



HAL
open science

Développement, Organisation et Comportement Biomécanique des Structures Cellulaires et Tissulaires

Patrick Cañadas

► **To cite this version:**

Patrick Cañadas. Développement, Organisation et Comportement Biomécanique des Structures Cellulaires et Tissulaires. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Montpellier, 2017. <tel-01623472>

HAL Id: tel-01623472

<https://hal.science/tel-01623472v1>

Submitted on 25 Oct 2017

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

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



HAL Authorization



Université de Montpellier

École Doctorale : Information Structures Systèmes
Spécialité Doctorale : Mécanique et Génie Civil

Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches

Développement, Organisation et Comportement Biomécanique des Structures Cellulaires et Tissulaires

Patrick Cañadas

Soutenance publique prévue le 7 juin 2017 devant le jury composé de :

Mme	Marie-Christine HO-BA-THO	Professeure des Universités BMBI – Compiègne	Rapporteuse
MM	Claude VERDIER	Directeur de Recherches LIPhy – Grenoble	Rapporteur
	Damien LACROIX	Professeur des Universités INSIGNEO – Sheffield	Rapporteur
	Benoît LADOUX	Professeur des Universités Institut J. Monod – Paris	Examineur
	Christian JORGENSEN	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier IRMB – Montpellier	Examineur
	Franck JOURDAN	Professeur des Universités LMGC – Montpellier	Président

Préambule

Comme la plupart d'entre nous, je suis d'un naturel très curieux (“de tout”), ce qui peut être vu comme une qualité fondamentale de l'enseignant-chercheur mais qui présente aussi certains inconvénients dont, en premier lieu, de grands tiraillements entre mes différents attraits et autres aspirations. Ainsi, lorsqu'au lycée je réfléchissais à mon futur professionnel, étais-je écartelé entre, d'une part, mes aptitudes et goûts pour les sciences physiques et mathématiques et, d'autre part, une certaine prédilection pour l'observation de la nature, notamment les animaux dont l'humain, depuis leur anatomie et leur physiologie jusqu'aux aspects cognitifs et comportementaux. Ma formation universitaire en est précisément le symptôme : d'abord une tentative en faculté de Médecine, suivie d'une réorientation vers la Mécanique (avec une visée de formation d'ingénieur dans l'aérospatiale, la météorologie ou le génie civil...) pour finalement choisir la voie de la recherche académique en me spécialisant dans la Biomécanique ce qui, par ailleurs, me permettait de contenter simultanément mes désirs de Physique et de Biologie. Au cours de mon année de Maîtrise, j'ai ainsi effectué un stage en laboratoire à Valence (Espagne), à l'issue duquel le métier de chercheur – au sens large – s'est imposé comme une évidence pour moi. Six ans plus tard, j'étais recruté à l'Université Montpellier 2 et au Laboratoire de Mécanique et Génie Civil, en tant que Maître de Conférences ; douze ans après mon arrivée à Montpellier, je rédige ce mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR).

Aussi, ce document n'a pas pour “simple” objectif de lister mes activités en tant qu'enseignant-chercheur en vue de l'obtention du diplôme d'HDR ; il s'agit, avant tout et de façon quelque peu égoïste, de me donner l'occasion de faire un bilan personnel de mon parcours, une synthèse de l'ensemble de mes activités (enseignement, recherche, gestion/administration et autres implications collectives) à un moment où je réfléchis sérieusement à ma carrière universitaire. En d'autres termes, il s'agit de me poser quelques instants pour “faire le point” sur le présent, à la lumière du passé, et de me projeter sur les différentes perspectives vers lesquelles ce parcours universitaire pourrait m'entraîner.

J'ai choisi d'organiser ce mémoire en deux parties principales :

- un chapitre “Dossier personnel” contenant : (i) une présentation synthétique de mon parcours universitaire, (ii) une description succincte de mes activités d'enseignement, (iii) un résumé de mes implications administratives et collectives et (iv) une synthèse de mes activités de recherche incluant les collaborations développées et la communication/valorisation de ces travaux ;
- un chapitre “Volet recherche” détaillant mes activités de recherche depuis le DEA, le fil conducteur de ces travaux, assorti d'un bilan et des ouvertures/perspectives de ces travaux en vue de proposer un projet issu de ces perspectives.

Enfin, à la suite des références bibliographiques appuyant le “Volet recherche”, une sélection de quatre articles représentatifs de mes travaux de recherche est proposée en Annexes.

Sommaire

Dossier Personnel.....	7
Curriculum Vitae de Patrick Cañadas.....	9
Synthèse des activités de recherche.....	13
1- Parcours personnel et travaux de recherche.....	13
a) Mécanique cellulaire.....	13
b) Remodelage osseux (LMGC).....	14
c) Modélisation de la morphogenèse d'épithéliums monocouches par milieux divisés (LMGC).....	14
d) Modélisation de la croissance des tissus mous par milieux continus (LMGC).....	15
2- Encadrements.....	15
3- Collaborations.....	17
4- Valorisation de la recherche.....	17
Volet Recherche :.....	23
A- Comportement mécanique des cellules et des tissus animaux.....	25
A-1- Caractérisations expérimentales.....	27
A-1-1- Comportement viscoélastique du cytosquelette (CSQ) des cellules tissulaires.....	27
1) Tests de magnétocytométrie (MTC).....	27
2) Tests par microplaques.....	30
A-1-2- Caractérisations mécaniques des tissus fibreux.....	31
1) Caractérisations mécaniques des cartilages.....	31
2) Évaluation de la perméabilité intrinsèque de l'os cortical.....	36
A-2- Modélisations mécaniques des cellules adhérentes.....	37
A-2-1- Modèle de tenségrité viscoélastique.....	37
A-2-2 Modèle granulaire de cellule adhérente.....	43
B- Processus d'évolution impliquant la mécanique.....	44
B-1- Structuration du CSQ.....	44
B-2- Morphogenèse de tissus épithéliaux monocouches.....	48
B-2-1- Effet de la vitesse de développement d'un tissu non prolifératif sur sa topologie finale... 52	
B-2-2- Cas des tissus prolifératifs.....	53
B-3- Croissance volumétrique des cartilages.....	55
B-3-1 Croissance du disque intervertébral.....	57
1) Modèle de croissance d'annulus fibrosus avec prise en compte d'un gradient de nutriments	57
2) Étude des contraintes de croissance dans l'annulus fibrosus.....	58
B-3-2- Croissance de modèles <i>in vitro</i> de micropellets de cartilages.....	59
B-3-3 Synthèse/perspectives – biomécanique de la croissance des cartilages.....	61
B-4- Remodelage osseux.....	62
C- Substrats artificiels pour l'ingénierie tissulaire.....	63
D- Bilan, perspectives, projet.....	64
D-1- Biomécanique des cellules et de leurs assemblages.....	65
D-1-1- Modèle de cellule unique.....	65
D-1-2- Modèle de morphogenèse tissulaire.....	67
1) Développements sur la base du modèle actuel de morphogenèse épithéliale.....	67

2) Jonction avec le modèle de cellule unique.....	69
D-2- Biomécanique des tissus fibreux.....	69
D-2-1- De la croissance des cartilages à la croissance des tissus fibreux.....	69
D-2-2- Substrats artificiels pour l'ingénierie tissulaire.....	71
D-3- Rêvons un peu.....	72
Références bibliographiques.....	75
ANNEXES.....	79

Dossier Personnel

Curriculum Vitae de Patrick Cañadas

Etat civil et coordonnées :

Nom : Cañadas

Prénom : Patrick

Date de naissance : 01/06/1972

Enseignant-chercheur (MCF, classe normale) de l'Université de Montpellier, UFR Faculté des Sciences, Département de Mécanique, avec affectation au Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC), UMR CNRS-UM 5508.

Section CNU : 60.

Adresse professionnelle : Université de Montpellier, LMGC – CC048, 163 rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier (France).

Courriel : patrick.canadas@umontpellier.fr

Téléphone professionnel : +33 (0)4 67 14 97 11

Parcours professionnel et universitaire :

- Enseignant-chercheur à l'Université Montpellier 2 (Université de Montpellier depuis janvier 2015) depuis septembre 2004.
- Chercheur vacataire (post-doctorat) à l'INSERM U492, Créteil, de septembre 2003 à juin 2004.
- Attaché temporaire enseignement et recherche (mi-temps), Université de la Méditerranée, Marseille, de septembre 2002 à août 2003.
- Thèse de doctorat à l'Université Paris12, Créteil. Titre : “Un modèle de tenségrité viscoélastique du cytosquelette pour l'étude de la réponse dynamique des cellules vivantes”. Directeur : Daniel Isabey. Co-encadrante : Sylvie Wendling-Mansuy.
- DEA de Biomécanique, Université Paris 12, Créteil, de septembre 1998 à juin 1999.
- Maîtrise de mécanique, Université de la Méditerranée, Marseille, de septembre 1997 à juin 1998.

Enseignements :

Depuis mon arrivée en 2004 à Montpellier, j'ai enseigné sous tous les modes (Cours Magistraux, Travaux Dirigés, Travaux Pratiques, encadrement de Projets, suivi de stagiaires en entreprise) et à tous les niveaux, depuis la première année de Licence jusqu'à la seconde année de Master. J'effectue chaque année un service qui tourne en moyenne autour de 210 heures. J'ai eu la possibilité de créer 2 modules de biomécanique en compagnie de Franck Jourdan, l'un destiné à initier les étudiants inscrits en 1^e année de Licence de Biologie (4 groupes de TD), avec mise en place de TP (Mesures de pression sanguine ; Flexion 3 points de barreaux de bois ; Compression de tranches d'os à moelle ; Densité d'échantillons de bois et d'os ; Anatomie de coupes de bois et d'os) et l'autre destiné aux étudiants de 2^e année du Master de Mécanique, parcours Modélisation et Simulation et Mécanique (MSM), avec également la mise en place d'un TP de simulation numérique de croissance tissulaire. Ce dernier enseignement est également proposé en tant que Module Doctoral de l'École Doctorale Information Structures Systèmes (I2S) à laquelle je suis rattaché (spécialité doctorale : Mécanique et Génie Civil). De plus, dans le cadre du module “Mécanique du solide déformable” (responsable Pierre Alart) de 3^e année de Licence, j'ai mis en place avec le responsable de cet enseignement des Travaux Pratiques (Contraintes et déformations d'une plaque mince circulaire, encastrée et soumise à une pression uniforme ; Contraintes dans un tube creux à parois minces sous pression ; Contraintes dans un tube épais pressurisé). En outre, j'ai

également mis en place un banc de TP pour étudier les déformations et les niveaux de tension/compression d'un treillis de barres plan, dans le cadre du module Résistance des Matériaux de 3^e année de Licence de Mécanique.

Sans entrer dans les détails et en fonction des années, j'ai enseigné et/ou j'enseigne :

- Modélisation et Conception des Systèmes Mécaniques – Licence 1, semestre 1 – CM pour la partie Technologie ; TD et TP – co-responsable du module de 2008 à 2011 avec Pierre Alart ;
- Introduction à la biomécanique humaine et végétale – Licence 1, semestre 1 – CM, TD et TP ;
- Calculus (reprise de bases de calcul pour une meilleure intégration des nouveaux arrivants en Licence) – Licence 1, semestre 1 – enseignement sous forme de cours/td – responsable pour la mention Mécanique de Licence ;
- Statique et cinématique du solide – Licence 1, semestre 2 – TD et TP à Montpellier et CM de 2005 à 2007 à l'université de Nîmes où j'étais responsable de ce module ;
- Dynamique et vibrations – Licence 2, semestres 1 et 2 – TD ;
- Projet technologique – Licence 2, semestre 2 – suivi de projets ;
- Résistance des matériaux – Licence 3, semestre 1 – CM (partie dimensionnement de poutres), TD et TP ;
- Mécanique des Fluides – Licence 3, semestre 1 – TD et TP ;
- Mécanique du solide déformable – Licence 3, semestre 2 – TD et TP ;
- Structure et dimensionnement des structures – Licence 3, semestre 2 – partie Dimensionnement 1D uniquement – CM, TD et TP ;
- Mécanique des fluides et transferts thermiques – Master 1, semestre 1 – partie thermique uniquement – TD ;
- Initiation aux éléments finis – Master 1, semestre 1 – TD ;
- Biomécanique humaine – Master 2, semestre 1 – CM, TD, TP – responsable du module ;
- Suivi des stages en entreprise d'étudiants de Master ou d'élèves ingénieurs – 4 étudiants/élèves suivis en moyenne chaque année (visite en entreprise, etc.).

J'ai également participé à un dispositif de tutorat chaque année universitaire (sauf la présente) dans le cadre de l'opération "référénts-évaluation". Il s'agit de suivre un groupe de TD de Licence 1 toute l'année ; au premier semestre, les guider, les conseiller dans leur orientation, etc., et recueillir leurs évaluations des enseignements ; au second semestre, en plus de ce rôle de référent, il s'agit également d'être leur enseignant-évaluateur dans le cadre de leur Projet Personnel de l'Étudiant, où chaque élève doit choisir un métier (si possible en lien avec son propre projet professionnel... quand il en a un), faire une recherche sur les formations possibles et sur les différentes facettes du métier, faire une entrevue d'un professionnel du domaine, faire une lettre de motivation et un CV, apprendre les rudiments de la communication professionnelle (notamment par courriel) et faire une synthèse du projet à travers un dossier.

Thèmes de recherche développés :

- Biomécanique cellulaire : modélisations mécanique et numérique du cytosquelette, depuis son processus de structuration lors de l'adhésion et de l'étalement cellulaire (recherche de formes "bio-réalistes") jusqu'à la caractérisation de son comportement mécanique (notamment l'évolution de ses propriétés viscoélastiques en fonction de la fréquence du chargement appliqué). Étude de la rupture membranaire par action mécanique et de sa réparation. Modèles de tenségrité et milieux divisés.
- Biomécanique tissulaire : morphogenèse de tissus épithéliaux, recherche de formes (distribution des formes polygonales dans un tissu), transmission d'efforts entre cellules au sein d'un tissu. Grilles de tenségrité et milieux divisés. Croissance des cartilages par approche poroélastique, lien avec la nutrition et l'activité cellulaire, rôle des actions mécaniques vs implication d'agents biochimiques (facteurs de croissance, inflammation), recherche des contraintes de croissance, modèles *in vitro*

(disque intervertébral) et *ex vivo* (micropellets de cartilage articulaire). Remodelage osseux (poroélasticité ; étude par simulations numériques de l'implication de la phase fluide dans le processus de remodelage à l'échelle du tissu ; effet de la fréquence de chargement et implication de la vitesse de Darcy).

- Caractérisation de substrats artificiels 3D pour l'ingénierie tissulaire et modélisation de la différenciation/prolifération cellulaire en leur sein substrats.

Expertises :

- Membre de l'Editorial Board du journal Applied and Computational Mechanics (depuis 2014) ;

- Expertise d'articles pour : Journal of Biomechanics (depuis 2003), Applied and Computational Mechanics (depuis 2008), Mathematics and Computers in Simulation (depuis 2009) ;

- Expertise d'une demande de projet ANR en 2013 ;

- Expertise de demandes de financements auprès du ministère de la recherche de République Tchèque en 2008 et 2010 ;

- Rapporteur de deux thèses :

* Jan Vychytil, "Grid Extended Continuum Approach", Université de Bohême Occidentale (Pilsen, République Tchèque), novembre 2009

* M. Bansod, "Computational simulation of mechanical tests of isolated animal cells", Université Technologique de Brno (République Tchèque), novembre/décembre 2016.

- Participations à des comités de sélection (année, université, composante, type de poste) :

* 2010, Université Paris Est – Créteil, Faculté de Médecine, MCF Biophysique cellulaire ;

* 2010, Université de la Méditerranée, UFR STAPS, MCF Biomécanique matériaux ;

* 2012, Ecole Centrale de Lyon, MCF Biomécanique tissus/matériaux.

Responsabilités administratives et autres activités collectives :

- janvier 2005 – décembre 2009 : Création et coordinateur de l'Opération Transversale "Mécanique du vivant" et membre de l'équipe de direction du LMGC. Lors de mon arrivée au LMGC, la direction m'a missionné pour "structurer" la biomécanique au laboratoire (plusieurs travaux dans ce domaine s'effectuaient dans différentes équipes sans lien entre-elles, la plupart du temps, voire parfois sans être connues des autres acteurs locaux du domaine) ;

- janvier 2005 – août 2013 : Responsable financier du Département de Mécanique de l'UFR Faculté des Sciences de l'Université Montpellier 2 ;

- 2008 – 2001 : Membre élu au CNU ;

- juin 2008 – décembre 2008 : Membre élu du Département de Mécanique et Génie Civil (département de recherche) de l'Université Montpellier 2 (disparition des départements de recherche au profit des Pôles Formation Recherche de l'établissement en décembre 2008).

- novembre 2008 – décembre 2010 : Membre élu du Pool d'Experts (ex- commission de spécialistes) 60ème de l'Université Montpellier 2 ;

- mai 2008 – décembre 2009 : Membre élu au Conseil Scientifique de l'Université Montpellier 2 et Membre de la commission transversale “structuration de la formation et de la recherche” de l'établissement depuis cette élection ;
- décembre 2009 – décembre 2014 : Membre élu au Conseil d'Administration de l'Université Montpellier 2. Dans ce cadre, membre élu au Conseil du Service d'Action Sociale de l'université et membre de la Section Disciplinaire de l'université ;
- 2009 – 2011 : Responsable de la première année de Licence pour le Département de Mécanique de l'UFR Faculté des Sciences de l'Université Montpellier 2 ;
- 2011 – 2014 : Coordinateur de la première année de licence commune aux filières Mathématiques, Informatique, Physique, Mécanique et E.E.A. (portail “MIPS”) ;
- septembre 2006 – : Responsable de la troisième année de Licence de Mécanique de l'UFR Faculté des Sciences de l'Université de Montpellier ;
- février 2016 – : Membre élu de l'école doctorale I2S de l'Université de Montpellier ;
- Participation aux GDR (CNRS, ST2I et INSIS) “Mécanotransduction” (Thierry Hoc) et “MécaBio” (Claude Verdier) ;
- Participation à la Caravane des Sciences (CNRS en Languedoc-Roussillon) dans le cadre de la fête de la science depuis 2006 (vulgarisation en direction des collégiens de la région, notamment dans les zones les plus rurales) ; dernière caravane en 2011 par défaut de soutien financier ;
- Participation au Salon de l'Étudiant et autres Journées Portes Ouvertes de l'UM2 depuis 2005 ;
- Président de jury de baccalauréat (sections scientifiques) de 2005 à 2007 ;
- Secrétaire de section syndicale (SNESUP section Campus-UM2 devenue section Triolet depuis janvier 2015) depuis septembre 2008. Dans le cadre de ces activités syndicales, membre désigné (suppléant) du Comité Hygiène et Sécurité de l'Université ainsi que de la Commission Électorale de l'établissement.

Synthèse des activités de recherche

1- Parcours personnel et travaux de recherche

Même si j'avais eu l'occasion de découvrir auparavant le monde de la recherche universitaire et la biomécanique à travers certains amis effectuant eux-même un stage en laboratoire, mon premier contact direct avec cet univers a vraiment eu lieu à l'occasion du stage que j'ai effectué en 1998 à l'Universitat Politècnica de Valencia (Espagne) sous la direction de Francisco Chinesta. Il s'agissait de partir d'un modèle isotrope de tissus mous (basé sur la méthode des éléments de frontière) pour en proposer une version anisotrope destinée à la simulation numérique (que je n'ai pas effectuée) d'opérations de microchirurgie comme la laparoscopie, en temps réel. Ce travail, finalement anecdotique sur le plan scientifique, ne sera pas détaillé dans la suite de ce document, bien que ce soit à cette occasion que ma double envie de recherche et de biomécanique s'est précisée. C'est en effet surtout à partir de mon stage de DEA, effectué au sein du Laboratoire de Mécanique Physique (LMP) de Créteil (devenu depuis B2OA) et portant sur la modélisation mécanique du squelette des cellules eucaryotes (encore appelé cytosquelette ou CSQ par la suite), que j'ai réellement commencé à me familiariser avec le travail de recherche en biomécanique. Ensuite, au gré de mes réflexions, des différentes rencontres et autres opportunités, j'ai évolué quelque peu en terme de thématiques pour m'intéresser de plus en plus aux aspects structuration du CSQ (au cœur de mon projet de recherche proposé à l'occasion de mon recrutement au LMGC en 2004, au sein de l'ex-équipe Systèmes Multi Contacts ou SMC), puis au remodelage osseux, à la morphogenèse d'épithéliums monocouches, et plus récemment, à la croissance tissulaire ainsi qu'aux substrats artificiels.

a) Mécanique cellulaire

La relation intime entre (i) l'activité biologique des cellules vivantes et (ii) les interactions physiques/mécaniques qu'elles entretiennent avec leur environnement immédiat, a été mise en évidence il y a plusieurs décennies par de nombreux chercheurs en biologie. Aussi retrouve-t-on au centre des questions qui se posent en biomécanique cellulaire, la compréhension du comportement mécanique des cellules vivantes considérées dans leur environnement ainsi que l'étude des signaux mécaniques auxquels elles sont sensibles. C'est ainsi que de nombreuses équipes de recherche ont développé, notamment depuis la dernière décade du siècle dernier, des outils expérimentaux et des modèles mécaniques, de plus en plus sophistiqués, destinés à analyser ces réponses mécaniques des cellules vivantes.

C'est dans ce cadre que j'ai effectué mes premiers travaux de recherche en biomécanique cellulaire : (i) d'abord en DEA en 1999 (encadrante : Sylvie Wendling-Mansuy) et en thèse de 1999 à 2003 (directeur : Daniel Isabey ; co-encadrante : Sylvie Wendling-Mansuy) où j'ai développé un modèle de tenségrité viscoélastique destiné à étudier le comportement mécanique du cytosquelette (CSQ) sous diverses sollicitations, quasi-statiques comme harmoniques (le tout, en lien avec l'organisation architecturale du CSQ), (ii) ensuite en post-doc (septembre 2003- août 2004) où j'ai transformé le banc de Magnétocytométrie (MTC) de l'unité INSERM U492 de Créteil (devenue depuis Équipe 13 de l'Institut Mondor de Créteil dirigée par Daniel Isabey) pour permettre d'expérimenter ces réponses mécaniques du cytosquelette sous chargements cycliques.

Mes principaux collaborateurs étaient, outre mes encadrants de DEA et thèse, Valérie Laurent, Bruno Louis, Emmanuelle Planus, Sophie Féréol et Redouane Fodil. J'ai également encadré Maria

Gianelli, que j'ai notamment formée à la culture cellulaire (cellules épithéliales d'alvéoles pulmonaires de la lignée A549) ainsi qu'à la technique de MTC, pour son stage de DEA en 2013-2014. J'ai aussi, à cette époque, effectué deux séjours de 2 mois chacun au Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique (LMA) de Marseille, notamment pour (i) effectuer des tests sur une structure de tensegrité viscoélastique physique et (ii) développer un modèle numérique de structure de tensegrité viscoélastique, basé sur la mécanique des milieux divisés (sous le code lmgc90), en étroite collaboration avec Michel Jean du LMA et, à distance, avec Frédéric Dubois du LMGC.

Ces activités ont été publiées dans : Cañadas et coll., 2002, 2003 et 2006 ; Laurent et coll., 2002a, 2002b et 2003 ; Wendling-Mansuy et coll., 2002 et 2003.

Ensuite, lors de mon arrivée à Montpellier, je me suis intéressé à la structuration du cytosquelette (ce qui était au cœur de mon projet d'intégration au laboratoire) d'abord par structures de tensegrité non régulières puis par les milieux divisés. Mes principaux collaborateurs étaient Bernard Maurin, René Motro et un post-doctorant que nous avons co-encadré (Haïmad Baudriller) au LMGC ainsi que les biologistes Philippe Montcourrier et Nadir Bettache de l'ex-laboratoire Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires (CNRS – Université Montpellier 2). Une collaboration (projet PEPS) a également eu lieu avec Emmanuelle Planus alors à l'Institut Bonniot (INSERM – Université Joseph Fourier, Grenoble) et Sylvie Wendling-Mansuy alors au Laboratoire d'Aérodynamique et de Biomécanique du Mouvement (CNRS – Université de la Méditerranée, Marseille).

Ces activités ont été publiées dans : Baudriller et coll., 2006 ; Cañadas et coll., 2009 ; Maurin et coll., 2008 et 2010.

b) Remodelage osseux (LMGC)

En parallèle de mes travaux sur la structuration du CSQ, aussi pour tenter une meilleure intégration au sein de l'équipe SMC dont je faisais alors partie, j'ai assisté David Dureisseix et Franck Jourdan dans leur encadrement d'un stage de DEA puis des deux premières années de thèse d'Étienne Malachanne, sur l'étude des effets poroélastiques dans le cadre du remodelage de l'os cortical. Mon intervention a surtout porté sur le lien entre l'échelle du tissu, au cœur de cette thématique, et celle des cellules osseuses, notamment dans les effets de chargements mécaniques fréquents. J'ai aussi participé aux mesures expérimentales de coefficients de perméabilité de l'os cortical.

Ces travaux ont été publiés dans : Malachanne et coll., 2008.

c) Modélisation de la morphogenèse d'épithéliums monocouches par milieux divisés (LMGC)

Le démarrage de la thèse de Yoann Chélin que j'ai co-encadrée (directeur : Bernard Maurin) a donné lieu au développement d'une nouvelle thématique de recherche au sein du LMGC (la morphogenèse de tissus animaux) via une nouvelle collaboration initiée par Bernard Maurin avec des biologistes cellulaires et un biostatisticien spécialisés dans les sciences du développement (Karim Azzag, Stephen Baghdiguiian et François Rousset de l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, ou ISEM, CNRS – Université Montpellier 2). Il s'agit notamment d'étudier le rôle des actions mécaniques dans le processus de morphogenèse de tissus épithéliaux. Pour cela, Yoann Chélin a développé un modèle basé sur la mécanique des milieux divisés, capable de reproduire la croissance individuelle des cellules, la mitose, l'apoptose, ainsi que les interactions mécaniques entre cellules

jointives.

Ces travaux ont été publiés dans : Chélin et coll., 2013. Un second article est en cours de rédaction.

d) Modélisation de la croissance des tissus mous par milieux continus (LMGC)

Cette thématique a d'abord été initiée par Dominique Ambard et Fabien Cherblanc, à travers leur encadrement de la thèse de Adrien Baldit. Il s'agissait de proposer un modèle poroélastique du disque intervertébral (DIV), capable de considérer les effets chimio-osmotiques observés pour le DIV, afin de tenter d'expliquer la scoliose idiopathique par un problème de nutrition cellulaire aggravé par les chargements mécaniques. Cette période a coïncidé avec la création de l'actuelle équipe BIOTIC. Par la suite, avec l'arrivée de Simon Le Floc'h en 2011, ces travaux ont été poursuivis et c'est à ce moment là que j'ai intégré cette thématique. Ainsi, un modèle de croissance de tissus mous considérant un gradient de nutriments pour proposer une explication de la genèse de contraintes de croissance a été développé (à travers le stage de Master de Virginie Cardin en 2012). De plus, une séquence IRM a été mise au point afin d'obtenir le tenseur de diffusion (3D) ainsi que les vitesses d'écoulement 1D, par Loubna Drissenek alors en stage de Master (2013). Ceci nous permettra, à terme, de visualiser les flux au sein de DIV (modèle *ex vivo*) sous chargement mécanique. En outre, un protocole destiné à déterminer les contraintes résiduelles (en considérant qu'elles pourraient être représentatives des contraintes de croissance) dans le DIV a été mis au point par Raphaël Lung-Soong, également en stage de Master (2014). Par la suite, une allocation ministérielle a été obtenue pour cette thématique et c'est ainsi que Gilles Dusfour est venu nous rejoindre à l'automne 2015. Enfin, un financement de 12 mois de post-doc a été obtenu auprès du Labex NUMEV de l'université et nous avons alors recruté Marie Maumus (pour un an depuis septembre 2016) spécialisée dans la production de micropellets de cartilage par culture cellulaire (modèle *in vitro*), le tout dans le cadre d'une collaboration avec Danièle Noël et Christian Jorgensen de l'Institut de Médecine Régénérative et de Biothérapies ou IRMB (INSERM/CHRU/Université de Montpellier). En croisant toutes ces approches, l'objectif est de déterminer le rôle des actions mécaniques vs celui des facteurs biochimiques (notamment, facteurs de croissance) dans le processus de croissance des cartilages et de tenter d'expliquer la genèse des contraintes de croissance dans ces tissus.

2- Encadrements

- Stages de Master/DEA :

* Maria Gianneli – DEA de Biomécanique (Paris 12, Créteil) – 2003 : Étude de l'effet des lavages broncho-alvéolaires dans la réponse en fréquence des cellules alvéolaires pulmonaires mesurée par MTC ;

* Lætitia Lefebvre – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2005 : Comportement mécanique en fréquence d'assemblages de ressorts aux propriétés viscoélastiques différentes ;

* Matthieu Sanchez – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2006 : Comportement mécanique en fréquence de systèmes de tensegrité viscoélastiques non réguliers ;

* Rafik Affes – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2008 : Contribution au comportement mécanique en fréquence de structures de tensegrité aux répartitions non régulières des propriétés viscoélastiques ;

* Jérémy Dallard – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2012 : Modèle granulaire de cellule pour simuler des tests d'indentation AFM avec lésions

membranaires ;

* Virginie Cardin – Master 2^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2013 : Modélisation de la croissance des tissus biologiques considérant un gradient de nutriments – co-encadrement avec Dominique Ambard et Simon Le Floc’h ;

* Loubna Drissenek – Master 2^e année de STIC pour la Santé, spécialité Physique Médicale (Faculté des Sciences, Université de Montpellier) – 2014 : IRM de diffusion pour l’identification des mécanismes de transport dans le disque intervertébral – co-encadrement avec Dominique Ambard, Christophe Coillot (BioNanoMRI, Université de Montpellier) et Simon Le Floc’h ;

* Raphaël Lung-Soong – Master 2^e année de Mécanique (Faculté des Sciences, Université de Montpellier) – 2015 : Estimation des contraintes résiduelles lors de la croissance des tissus biologiques. Application au disque intervertébral – co-encadrement avec Dominique Ambard et Simon Le Floc’h ;

* Pape Momar Sy – Master 1^e année de Mécanique (Faculté des Sciences, Université de Montpellier) – 2016 : Conception d’un dispositif expérimental destiné à solliciter mécaniquement des micro-sphères de cartilage dans un environnement stérile – co-encadrement avec Dominique Ambard et Simon Le Floc’h ;

* Yohan Boyer – Master 1^e année de Mécanique (Faculté des Sciences, Université de Montpellier) – 2016 : Conception d’une machine d’essai pour l’estimation des propriétés mécaniques du disque intervertébral sous compression au sein d’un dispositif d’IRM – co-encadrement avec Dominique Ambard et Simon Le Floc’h.

- Projets de Master (en laboratoire) :

* Malik Berkane et Noureddine Temzi (binôme) – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2014/2015 : Contribution à la modélisation biomécanique de la morphogenèse d’épithéliums : simulations numériques et étude paramétrique – co-encadrement avec Julien Averseng (LMGC) ;

* Romain Briand – Master 1^e année de Mécanique de Montpellier (Faculté des Sciences) – 2015/2016 : Simulation numérique et étude paramétrique de la morphogenèse de tissus épithéliaux – co-encadrement avec Julien Averseng (LMGC).

- PIFE : Franck Richard – 5^e année d’École d’Ingénieur (Polytech’Montpellier) – 2016/2017 : Modélisation de la morphogenèse épithéliale Modélisation et simulation numérique de la morphogenèse épithéliale – co-encadrement avec Julien Averseng (LMGC).

- Post-doctorants :

* Haïmad Baudriller – Post-doc CNRS – 2004-2006 : Modélisation par structures de tenségrité non régulières du cytosquelette ; simulation de la structuration du cytosquelette par milieux divisés) – co-encadré avec Bernard Maurin (LMGC) ;

* Cédric André – Post-doc CNRS – 2009-2011 : Comportement mécanique des cellules adhérentes par milieux divisés – co-encadré avec Bernard Maurin (LMGC) ;

* Marie Maumus – Post-doc Labex NUMEV (Université de Montpellier) – depuis septembre 2016 : Croissance de pellets de cartilage sous contraintes mécaniques. Confrontation des analyses mécaniques et biologiques sur modèle in vitro – co-encadrée avec Danièle Noël et Christian Jorgensen (IRMB, INSERM/CHRU/Université de Montpellier) ainsi que Simon Le Floc’h (LMGC).

- Doctorants :

* Étienne Malachanne – allocation ministérielle – Thèse soutenue en 2008 (Université

Montpellier 2) – Codirecteurs : David Dureisseix et Franck Jourdan ;

* Yoann Chélin – allocation ministérielle – Thèse soutenue en 2012 (Université Montpellier 2) – Directeur : Bernard Maurin ;

* Gilles Dusfour – allocation ministérielle – Thèse en cours (début octobre 2015 ; Université de Montpellier) – Directeur 1e année : Fabien Cherblanc ; Directeur 2e année : Franck Jourdan – Co-encadrants : Dominique Ambard et Simon Le Floc’h.

3- Collaborations

- PEPS CNRS ST2I 2007-2008 “Modélisation mécanique et analyse expérimentale de la structuration du cytosquelette et de son comportement mécanique associé, en fonction de l’état d’adhésion de la cellule adhérente” en collaboration avec Bernard Maurin (LMGC), Robert Peyroux (LMGC puis Laboratoire Sols, Solides, Structures, Risques ; 3SR, CNRS/Université Joseph Fourier, Grenoble), Emmanuelle Planus (Institut Albert Bonniot, INSERM/Université Joseph Fourier, Grenoble) et Sylvie Wendling-Mansuy (Laboratoire d’Aérodynamique et de Biomécanique du Mouvement, CNRS/Université de la Méditerranée, Marseille) – porteur du projet ;

- PEPS CNRS Interactions INS2I 2010 “Caractérisation biomécanique des processus de lésion-réparation du cortex cellulaire” en collaboration avec Sophie Féréol, Redouane Fodil et Daniel Isabey de l’Institut Mondor (INSERM/Université Paris-Est, Créteil) – porteur du projet ;

- PEPS CNRS INSIS 2016 “Recréer pour l’ingénierie tissulaire un environnement cellulaire proche de la matrice native à l’aide de substrats nanofibrillaires dont la microstructure et son interaction avec les cellules seront modélisées pour favoriser la régénération” en collaboration avec Martine Pithioux, Jean-Louis Milan (porteur du projet) et Patrick Chabrand (Institut des Sciences du Mouvement, CNRS/Aix-Marseille Université) ainsi que Jérôme Sohier et Romain Debret (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard, Lyon).

Au-delà de ces financements sur projets, existent également des collaborations scientifiques complémentaires :

- Dans le cadre des thématiques “Modèles de tenségrité cellulaires non réguliers” et “Structuration du cytosquelette”, collaborations avec Nadir Bettache et François Montcourrier du laboratoire Dynamique des Membranes et des Interactions Moléculaires (DMIM, CNRS/Université Montpellier 2) ;

- Dans le cadre de la thématique “Morphogenèse épithéliale”, collaboration avec Kami Azzag, Stephen Baghdiguiian et François Rousset de l’Institut des Sciences de l’Évolution de Montpellier (ISEM, CNRS/Université de Montpellier) ;

- Enfin, dans le cadre de la modélisation des cellules et tissus avec prise en compte du tonus cellulaire, collaborations succinctes avec Fanny Moravec et Miroslav Holecek (Université de la Bohême Occidentale, Pilsen, République Tchèque) et Jirka Bursa (Université Technologique de Brno, République Tchèque), ainsi qu’avec Eligiusz Postek (Institut de Recherche Technologique Fondamentale de l’Académie des Sciences Polonaise, Varsovie, Pologne).

4- Valorisation de la recherche

1) Articles dans des revues internationales à comité de lecture : (12 articles)

Chélin Y., Azzag K., Cañadas P., Averseng J., Baghdiguiian S., Maurin B. Simulation of Cellular Packing in Non-Proliferative Epithelia, *Journal of Biomechanics*, 2013, Vol. 46(6), 1075–1080.

Maurin B., Cañadas P., Baudriller H., Montcourrier P., Bettache N. Mechanical Model of the Cytoskeleton Structuration During Cell Adhesion and Spreading. *Journal of Biomechanics*, 2008. Vol. 41(9), 2036-2041.

Malachanne E., Cañadas P., Dureisseix D., Jourdan F. Experimental and Numerical Identification of Cortical Bone Permeability. *Journal of Biomechanics*, 2008. Vol. 41(3), 721-725

Baudriller H., Maurin B., Cañadas P., Montcourrier P., Parmeggiani A. and Bettache N. Form-Finding of Complex Tensegrity Structures: Application to Cell Cytoskeleton Modelling. *Comptes Rendus de Mécanique*, 2006, 334 (11): 662-668.

Cañadas P., Wendling-Mansuy S. and Isabey D. Frequency Response of a Viscoelastic Tensegrity Model: Structural Rearrangement Contribution to Cell Dynamics. *ASME Journal of Biomechanical Engineering*, 2006, 128(4): 487-495.

Cañadas P., Laurent V.M., Chabrand P., Isabey D. and Wendling-Mansuy S. Mechanisms Governing the Viscoelastic Responses of Living Cells Assessed by Foam and Tensegrity Models. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2003, 41(6): 733-739.

Wendling S., Cañadas P. And Chabrand P. Toward a generalized tensegrity model describing the mechanical behavior of the cytoskeleton structure. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 2003, 1: 1-8.

V.M. Laurent, R. Fodil, P. Cañadas, S. Féréol, B. Louis, E. Planus, and D. Isabey. Partitioning of Cortical and Cytosolic Cytoskeleton Responses from Transient Magnetic Bead Twisting. *Annals of Biomedical Engineering*, 2003, 31(10): 1263-1278. Cover page.

Cañadas P., Laurent V.M., Oddou C., Isabey D. and Wendling S. A Cellular Tensegrity Model to Analyze the Structural Viscoelasticity of the Cytoskeleton. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, 218: 155-173.

Laurent V.M., Cañadas P., Planus E., Fodil R., Asnacios A., Wendling S. and Isabey D. Tensegrity Behavior of Cortical and Cytosolic Cytoskeletal Components in Twisted Living Adherent Cells. *Acta Biotheoretica*, 2002, 50(4): 331-356.

Wendling S., Cañadas P., Oddou C. and Meunier A. Interrelations Between Elastic Energy and Strain in a Tensegrity Model; Contribution to the Analysis of the Mechanical Response in Living Cells. *Computer Method in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 2002, 5(1): 1-6.

Laurent V.M., Fodil R., Cañadas P., Planus E. and Isabey D. Specific Mechanical Responses of Cortical and Cytosolic Cytoskeleton in Living Adherent Cells. *JSME International Journal*, 2002, series C, 45(4): 897-905.

2) Articles dans des revues nationales à comité de lecture : (2 articles)

Maurin B., Cañadas P. Motro R. (2010). Modélisation en mécanique cellulaire par systèmes de tensegrité. *Les Techniques de l'Ingénieur*. RE 117 - janvier 2010.

Cañadas P., Maurin B., Motro R. (2009). Mécanique des systèmes précontraints appliquée à la structure du cytosquelette. *Mécanique et Industries*. Vol. 10 (3-4), 285-290 (article sélectionné par le comité scientifique du CFM 2009).

3) Congrès et colloques nationaux et internationaux - séminaires invités : (nombre total 34, dont : 2 conférences invitées, 2 séminaires invités)

E. Postek, F. Dubois, R. Mozul and P. Cañadas (2016). Modelling of a Collection of Non-rigid Particles with a Non-smooth Discrete Element Method. 40th Solid Mechanics Conference, Varsovie (Pologne), 29 août-2 septembre 2016. A paraître dans Engineering Transactions courant 2017.

P. Cañadas, Y. Chélin, J. Averseng, B. Maurin (2014). Epithelial Tissue Morphogenesis Assessed by Divided Media. 7th World Congress of Biomechanics (WCB 2014), Boston (USA), 6-11 juillet 2014. Conférence invitée par Dimitrije Stamenovic.

Y. Chélin, J. Averseng, P. Cañadas and B. Maurin (2013). Divided media based simulations of tissue morphogenesis. 38e Congrès de la Société de Biomécanique (SB 2013), Marseille, 4-6 septembre 2013.

Yoann CHÉLIN, Julien AVERSENG, Patrick CAÑADAS, Bernard MAURIN (2013). Modèle granulaire de morphogenèse tissulaire. 11e Colloque National en Calcul des Structures (CSMA 2013), 13-17 Mai 2013, Giens.

Chélin Y., Azzag K., Cañadas P., Baghdiguian S. and Maurin B. (2012). A mechanical and numerical approach applied to epithelium topology and development. The 18th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB 2012), Lisbonne (Portugal), 1-4 juillet 2012.

Féréol S., Fodil R., Isabey D. and Cañadas P. (2011). Some features of the mechanical response of living cells to large deformations. The 4th European Cell Mechanics Meeting (CellMech 2011), Amsterdam (Pays-Bas), 17-19 octobre 2011.

Chélin Y., Cañadas P., André C., Maurin B. (2011). Cytoskeleton numerical morphogenesis in cell adhesion. The 4th European Cell Mechanics Meeting (CellMech 2011), Amsterdam (Pays-Bas), 17-19 octobre 2011.

Cañadas P. (2009). Structure, prestress and mechanical modelling in cell/tissue biomechanics. Institut des Nouvelles Technologies, Université de Bohème Occidentale, Pilsen (République Tchèque), 16 octobre 2009. Séminaire invité.

Cañadas P, Maurin B., Motro R. (2009). Mécanique des systèmes précontraints appliquée à la structure du cytosquelette. 20ème Congrès Français de Mécanique, 24-28 Août 2009, Marseille.

Cañadas P. Maurin B., Peyroux R. (2009). Modélisation cellulaire par systèmes précontraints. Journées du GDR Mécanotransduction : déterminants et implications. 11-12 juin, Marseille.

Maurin B., Cañadas P., Motro M. (2008). Tensegrity architecture calculation of the cellular cytoskeleton. AISS-IACM 2008, 6th ICCSS, 28-31 may 2008, Ithaca, New York, Etats Unis d'Amérique.

Cañadas P., Maurin B., Baudriller H., Montcourrier P., Bettache N. (2008). Numerical model of the cytoskeleton structuration during cell spreading. 16th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB 2008), 06-09 juillet 2008, Lucerne, Suisse.

Cañadas P., Maurin B., Baudriller H. (2008). Initial stress system modelling applied to adherent cell mechanics. Human Biomechanics 2008, 29 septembre-01 octobre, Prague, République Tchèque. Invited speaker

- Cañadas P. (2007), Mechanical and numerical models of the prestressed cytoskeleton structure : mechanical behavior and structuration. Département de Mécanique, Université de Bohème Occidentale, Pilsen (République Tchèque), 22 novembre 2007. Séminaire invité
- Malachanne E., Cañadas P., Dureisseix D., Jourdan F. (2007). Identification Expérimentale et Numérique de la Perméabilité de l'Os Cortical pour la Modélisation du Remodelage. 18ème Congrès Français de Mécanique, Grenoble, aout 2007.
- H. Baudriller, P. Cañadas, B. Maurin (2007). Form-Finding of the Cytoskeleton Structuration During Cell Adhesion. 2nd European Meeting on Cell Mechanics (CellMech-2007), Barcelona (Espagne), 26-28 septembre 2007.
- Baudriller H., Maurin B., Cañadas P. (2006). Numerical Modeling of the Cytoskeleton Prestressed Structure. V World Congress of Biomechanics (wcb 2006), Munich (Allemagne), CD-ROM, Juillet-Aout 2006.
- Cañadas p., Xending-mansuy s., Isabey d. (2006) Structural Contribution of the Cytoskeleton to the Dynamic Response of Adherent Cells Assessed by a Viscoelastic Tensegrity Model. V World Congress of Biomechanics (wcb 2006), Munich (Allemagne), CD-ROM, Juillet-Aout 2006.
- Cañadas P. (2005), Apports du concept de tenségrité à la biomécanique cellulaire. Séminaires interface physique-biologie, Laboratoire de Dynamique moléculaire des Interactions Membranaires, Montpellier, 25 octobre 2005.
- Cañadas P. (2005). Frequency response of a viscoelastic tensegrity structure. 1st European Meeting on Cell Mechanics (CellMech-2005), Paris, 23-24 septembre 2005.
- Cañadas P., Jean M., Laurent V.M., Chabrand P., Isabey D., Wendling S. (2003). Etude de l'origine structurale du comportement dynamique du cytosquelette par un modèle de tenségrité viscoélastique. CFM2003, 16ème Congrès Français de Mécanique, Nice, Septembre 2003.
- S. Wendling, J.L. Milan, M. Jean, P. Cañadas, P. Chabrand. (2003). Cytoskeleton organization in adherent cells analyzed by a granular tensegrity model. SB, Archives of Physiology and Biochemistry, 111, Supplément, p. 13, 2003.
- Cañadas P., Laurent V.M., Fodil R., Planus E., Wendling S. and Isabey D. (2002). Assessment of Structural Viscoelasticity of Cytoskeleton by Tensegrity Model. IVth World Congress of Biomechanics, Calgary (Canada).
- Wendling S., Cañadas P., Laurent V.M., Planus E., Fodil R., Chabrand P., Isabey D. (2002). Increasing Number of Interconnected Elements in Tensegrity Models Induces a Structural Softening Consistent with Cortical Cytoskeleton Function. IVth World Congress of Biomechanics, Calgary (Canada).
- Fodil R., Laurent V.M., Cañadas P., Planus E. and Isabey D. (2002). Actin Structure and Mechanical Properties of Cortical and Cytosolic Cytoskeleton in Twisted Living Adherent Cells. XXVII^{ème} Congrès de la Société de Biomécanique, Valenciennes (France).
- Cañadas P., Wendling S., Planus E., Laurent V.M., Fodil R., Asnacios A., Oddou C. and Isabey D. (2001). Apport des modèles de tenségrité en mécanique cellulaire, XXI^{ème} Séminaire de la Société

Française de Biologie Théorique (14 juin 2001), Paris (France).

Cañadas P., Isabey D., Oddou C. and Wendling S. (2001). Scale Effect and Internal Tension Dependence of a Viscoelastic Tensegrity Structure : a Model of Cytoskeleton Dynamic Response, XXVI^{ème} Congrès de la Société de Biomécanique (S. d. Biomécanique, ed.), 109:106. Arch. Physiol. Biochem.(Swets & Zeitlinger), Marseille (France).

Cañadas P., Oddou C., Isabey D. and Wendling S. (2001). Viscoelasticity properties of a tensegrity model; application to dynamical response of living cells, 5th International Conference on Cellular Engineering. Proceedings. Aachen (Germany).

Villautreix M., Cañadas P., Chabrand P. and Wendling S. (2001). General Relationships Between Shape, Stiffness and Internal Tension of Tensegrity Structures; Contribution to the Analysis of the Mechanical Response of Living Cells, 5th International Symposium of Computer Method in Biomechanical and Biomedical Engineering. Roma (Italy).

Cañadas P., Isabey D., Oddou C. and Wendling S. (2000). Time Response of a Viscoelastic Tensegrity Model to Approach Cell Dynamical Response, XXV^{ème} Congrès de la Société de Biomécanique et XI^{ème} Congrès de la Société Canadienne de Biomécanique (SB-SCB, ed.), Vol. 108(1): 170. Arch Physiol. Biochem. (Swets & Zeitlinger), Montréal (Québec, Canada).

Oddou C., Cañadas P., Isabey D. and Wendling S. (2000). A Critical Review of Cell Rheological Data, The Second China-France-Denmark Symposium on Biomechanics and Biorheology. Shanghai (China).

Wendling S., Cañadas P., Laurent V.M., Planus E., Fodil R., Oddou C. and Isabey D. (2000). Tensegrity model to describe the coupling between elastic energy and deformation of cells twisted by magnetic probes, XXV^{ème} Congrès de la Société de Biomécanique et XI^{ème} Congrès de la Société Canadienne de Biomécanique (SB-SCB, ed.), 108(1): 9. Arch. Physiol. Biochem.(Swets & Zeitlinger), Montréal (Québec, Canadas) .

Wendling S., Cañadas P., Meunier A. and Oddou C. (2000). Couplages entre énergie mécanique de déformation, formes et fonctions de la cellule soumise à des contraintes variées, Proceedings of the Conference Mécanotransduction 2000, (GAMAC, TEC & DOC ed.), pp 137-148. Matériaux et Structures des sciences de l'ingénieur et du vivant, Paris (France).

Oddou C., Wendling S., Cañadas P. and Geiger D. (1999). Biomechanics of Cell Mechanosensors and Tissue Transduction, Lecture notes of the ICB seminars on Biomechanics of musculoskeletal system and medical robotics (K. Kedzior & A. Morecki Eds) pp. 209–218. Polish Academy of Sciences & International Centre of Biocybernetics Publications, Varsaw (Poland).

4) Autres formes de production : (1 chapitre de livre de vulgarisation)

Cañadas P. (2007). Le Squelette des Cellules. Voir l'Invisible. Éditions Ecrin, J-P Gex et E. Fox Keller, éd. Omniscience. 224 pages, pp. 40-41.

Volet Recherche :

Développement, Organisation
et Comportement
Biomécanique des Structures
Cellulaires et Tissulaires

Les organismes pluricellulaires sont constitués d'un ensemble d'organes remplissant des fonctions spécifiques et constitués d'arrangements ordonnés de tissus, eux-mêmes constitués de diverses cellules plus ou moins immergées dans une matrice extracellulaire (MEC). Chez les animaux, celle-ci est constituée de fibres (collagène, fibronectine, élastine, laminine), assemblées en réseaux tridimensionnels plus ou moins structurés par liaisons covalentes et associées à différentes macromolécules (protéoglycanes, glycosaminoglycanes ou GAG), le tout dans un environnement saturé en fluides. A l'instar des végétaux, les milieux biologiques animaux présentent ainsi une très grande diversité de structures anatomiques, évolutives dans le temps et associées à une grande variabilité en termes d'échelles d'organisation, de fonctions biologiques, d'interactions biochimiques de comportements mécaniques, etc. Les travaux que j'ai effectués portent, d'une part, sur la caractérisation du comportement mécanique des cellules et tissus humains et, d'autre part, sur l'étude du rôle des sollicitations mécaniques dans l'évolution des structures cellulaires et tissulaires. Pour ce faire, j'ai participé à des expérimentations *ex vivo* et *in vitro*, et ai travaillé au développement de modèles mécaniques destinés à représenter et expliquer les phénomènes observés ainsi qu'à prédire des comportements difficilement observables ou dont les conditions/paramètres influents sont difficilement maîtrisables expérimentalement.

Ce chapitre est organisé en quatre parties :

- une présentation des travaux destinés à la caractérisation du comportement mécanique des systèmes biologiques étudiés (cellules, tissus) ;
- une présentation des activités portant sur l'étude biomécanique des processus d'évolution des cellules et tissus ;
- une brève présentation de travaux en ingénierie tissulaire venant de démarrer ;
- un bilan assorti de perspectives.

A- Comportement mécanique des cellules et des tissus animaux

C'est à travers cette thématique qu'ont démarré mes activités de recherche en DEA en 1998 puis en thèse. Il s'agissait, en l'occurrence, d'étudier la viscoélasticité de la structure du cytosquelette (CSQ) pour les cellules adhérentes vivantes. Depuis mon arrivée au LMGC en 2004, j'ai peu à peu appréhendé l'échelle du tissu en participant à la détermination de la perméabilité de l'os cortical ainsi qu'à la caractérisation de propriétés mécaniques de certains cartilages (disque intervertébral ou DIV et micropellets de néo-cartilage articulaire).

Concernant les cellules animales, il est admis dans la communauté scientifique internationale, et ce depuis plusieurs décennies, qu'il existe un lien intime entre activité biologique et interactions physiques avec le micro-environnement immédiat, à savoir la matrice extracellulaire (MEC), les cellules voisines et/ou les fluides ambiants. En particulier, le lien fonction – forme cellulaire a été mis en évidence à de nombreuses reprises et constitue l'un des fondements de la biomécanique cellulaire. Lorsque j'ai débuté mon stage de DEA, de nombreux travaux révélaient alors que le cytosquelette constituait très probablement le principal support de la réponse mécanique cellulaire à une sollicitation extérieure (voir par exemple, Ingber & Jamieson, 1985, Maniotis et coll., 1997 ou encore Janmey, 1998). Pour une cellule adhérente, le CSQ se présente sous la forme d'une structure 3D, constituée de trois sous-réseaux correspondant à trois types de filaments distincts (filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules), chacun semblant jouer un rôle mécanique particulier (c'est à dire, support de compression pour les microtubules et générateurs ou supports de tension pour les deux autres types) associé à une organisation architecturale spécifique. Ces filaments sont issus de l'assemblage de monomères et sont en permanence soumis à des processus

de polymérisation/dépolymérisation. Ils sont, en outre, associés à des moteurs moléculaires (myosines, kinésines et dynéines, pour l'essentiel) et peuvent être interconnectés entre eux par diverses protéines de liaison ("cross-linking proteins" telles que les microtubule-associated-proteins ou MAPs, les fimbrines, α -actinines, filaggrines, plectines, etc.). Enfin, les terminaisons du cytosquelette sont associées aux complexes trans-membranaires d'adhésion (intégrines, cadhérines, I-CAM, V-CAM, etc.), constituant un lien physique direct entre CSQ et environnement cellulaire immédiat et jouant probablement le rôle de mécanorécepteurs. Le cytosquelette peut donc être vu comme une structure 3D réticulée, composée de divers constituants et dont l'organisation architecturale, très évolutive dans le temps, dépend étroitement de ses interactions physiques avec le micro-environnement immédiat de la cellule, en particulier de son équilibre mécanique avec la MEC. C'est sur la base de ces hypothèses fondamentales que se sont effectués mes travaux sur le comportement mécanique des cellules animales adhérentes vivantes. Par suite, ces activités à l'échelle d'une cellule ont été poursuivies au niveau d'assemblages cellulaires constituant ainsi des tissus (qualifiés ici de tissus cellulaires), notamment pour l'étude de la morphogenèse d'épithéliums mono-couches.

Concernant le comportement mécanique de tissus tels que l'os ou les cartilages, thème sur lequel je me suis penché plus récemment, mon activité à ce jour a surtout consisté en la participation à des travaux de caractérisation expérimentale et aux discussions scientifiques correspondantes, pour alimenter les modèles mécaniques développés par mes collègues de l'équipe BIOTIC. En outre, les modélisations proposées n'étaient pas tant destinées à la stricte analyse du comportement mécanique de ces tissus qu'à être utilisées pour étudier des processus d'évolution, en particulier le remodelage de l'os cortical et la croissance des cartilages, présentés plus en détail dans la partie **B-Processus d'évolution impliquant la mécanique**. Ces tissus font partie de ceux dont le composant majeur est la matrice extracellulaire (les cellules ne représentant qu'une faible portion volumique, en général inférieure à 10%) qui se présente sous la forme d'un réseau plus ou moins structuré de fibres de collagène, qu'il soit cristallisé (par le calcium, pour l'os) ou non (chez les cartilages), associé à certaines molécules comme les protéoglycanes dans les cartilages. L'échelle de ces composants varie entre le nanomètre et le micromètre tandis que celle du tissu est celle du millimètre. Les modélisations de ces matériaux s'effectuent donc en général sur la base d'une approche de type milieux continus. Ainsi, dans le cadre de la thèse de doctorat d'Étienne Malachanne, co-dirigée par David Dureisseix et Franck Jourdan, j'ai participé à des tests sur des tranches d'os cortical, couplés à un calcul EF afin d'en déterminer la perméabilité intrinsèque globale (publié dans Malachanne et coll., 2008). De même, je participe à des tests de compression de modèles *in vitro* de néo-cartilages hyalins articulaires ("micropellets") effectués par Gilles Dusfour, actuellement en thèse de doctorat que je co-encadre avec Simon Le Floc'h et Dominique Ambard, et ce dans le cadre d'une collaboration avec Marie Maumus, Danièle Noël et Christian Jorgensen de l'Institut de Médecine Régénérative et Biotechnologies (IRMB, UMR INSERM/CHU/Université de Montpellier ; article correspondant en préparation). J'ai également suivi les essais de traction sur des éprouvettes d'*annulus fibrosus* de disque intervertébral (DIV) dans le cadre du stage de 2^e année de Master de Raphaël Lung-Soong. En outre, j'ai aussi co-encadré avec Dominique Ambard et Simon Le Floc'h le stage de 2^e année de Master de Loubna Drissenek destiné à mettre en place les protocoles "diffusion" et "convection" par imagerie IRM, en collaboration avec Christophe Goze-Bac et Christophe Coillot de la plateforme BioNanoMRI de l'université de Montpellier ainsi qu'avec Pascal Kouyoumdjian PU-PH au CHU de Nîmes, afin d'utiliser ultérieurement ces techniques pour mieux caractériser certains paramètres poreux du DIV, nécessaires pour valider le modèle poro-hyper-élastique de disque intervertébral développé par Dominique Ambard et Fabien Cherblanc.

Cette partie est divisée en deux avec, d'une part, une présentation des outils expérimentaux utilisés et des principaux résultats obtenus et, d'autre part, une synthèse des modèles développés et des

résultats numériques associés, confrontés aux observations expérimentales.

A-1- Caractérisations expérimentales

Cette première sous-partie est organisée en fonction des objets étudiés, à savoir d'abord les expériences que j'ai menées à l'échelle cellulaire suivies des expérimentations auxquelles j'ai participé à l'échelle tissulaire.

A-1-1- Comportement viscoélastique du cytosquelette (CSQ) des cellules tissulaires

1) Tests de magnétocytométrie (MTC)

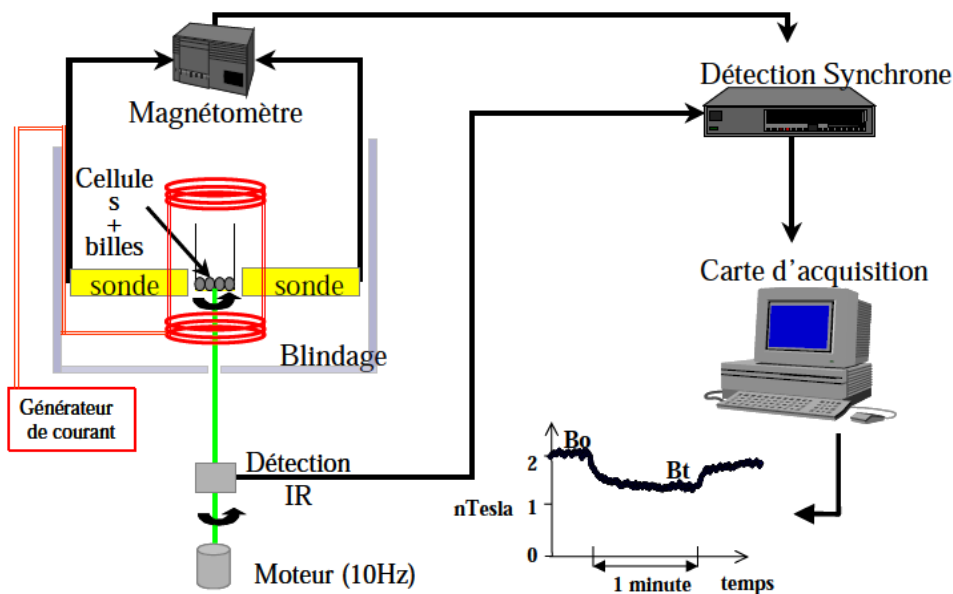


Figure 1 : Schéma explicatif du dispositif de Magnétocytométrie. Le puits cellulaire est placé entre deux bobines de Helmholtz (en rouge) générant un champ magnétique perpendiculaire au plan des sondes (horizontal) du magnétomètre. Le signal recueilli via la carte d'acquisition correspond à la composante horizontale moyenne du champ rémanent de l'ensemble des micro-billes (relative donc au cosinus de leur angle moyen de rotation). B_0 indique le niveau initial du champ rémanent avant application du couple magnétique, $B_t = B_0 \cos(\theta(t))$ la variation de ce champ rémanent au cours du temps lors de l'application du champ magnétique vertical (durée 1 min) avec $\theta(t)$ l'angle de rotation moyen des billes.

Parmi les différentes techniques expérimentales développées depuis la seconde moitié du XX^e siècle pour explorer le comportement mécanique des cellules, la magnétocytométrie occupe une place de choix à l'instar des pinces optiques ou encore de la microscopie à force atomique (AFM). En effet, la MTC permet de solliciter la structure du CSQ à travers ses terminaisons connectées aux protéines trans-membranaires d'adhésion (intégrines, cadhérines, etc.) de cellules adhérentes vivantes, tout en maîtrisant relativement bien les forces appliquées ainsi que leur localisation. Le principe est finalement simple, bien que faisant appel à des connaissances et technologies physiques non triviales (voir figure 1), et le protocole comporte 3 étapes principales :

- Dans un premier temps, on fixe des micro-billes ferromagnétiques (de l'ordre de 10^5 billes d'un diamètre de $4,5 \mu\text{m}$ et de densité par rapport à l'air d'environ 1,5) sur une mono-couche de cellules

adhérentes (environ 5.10^4 cellules d'alvéoles pulmonaires, lignée A549 dans le cas présent) à l'aide de ligands spécifiques des mécano-récepteurs trans-membranaires liés au cytosquelette (par exemple, on recouvre les billes d'un peptide RGD si l'on veut les faire adhérer aux intégrines). Un rinçage permet d'éliminer les billes qui ne se seraient pas fixées et qui pourraient fausser les résultats.

- Ensuite, on applique un champ magnétique bref (150 μ s) et de haute intensité (0,15 T) afin de magnétiser les billes suivant une direction choisie (ici horizontalement). Ces billes deviennent donc des dipôles magnétiques également orientés.

- Enfin, on génère un champ magnétique uniforme à travers deux bobines de Helmholtz, de plus faible intensité (< 6 mT) que le précédent et dans une direction différente de la précédente (classiquement à 90° du champ de magnétisation). Ce champ génère ainsi un couple magnétique appliqué aux billes, les entraînant dans une rotation. Les micro-billes étant physiquement liées au cytosquelette, leur rotation dépend donc directement des propriétés physiques de celui-ci (rigidité, viscoélasticité...), ce qui fait de la MTC une technique de choix pour révéler la réponse mécanique de la structure même du CSQ pour des cellules vivantes.

Lorsque j'ai connu l'équipe de Daniel Isabey à l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB, U955 INSERM/Université Paris Est Créteil) au cours de mon stage de DEA, celle-ci avait déjà conçu et fabriqué un banc de magnétocytométrie. C'est notamment Valérie Laurent qui a mis au point le dispositif au cours de son doctorat et, par la suite lorsque j'étais moi-même en thèse, j'ai pu profiter non seulement de la présence de cet appareil mais aussi et surtout de l'expérience couplée de Valérie Laurent et de Daniel Isabey en MTC. Outre ma participation à certaines campagnes expérimentales, ma principale contribution a été double : (1) aider à l'analyse des résultats expérimentaux en conditions quasi-statiques (fluage) "à la lumière" du modèle de tenségrité que je développais en thèse (présenté dans la partie **A-2-1**) ; (2) modifier le banc de magnétocytométrie afin de pouvoir appliquer des chargements harmoniques à différentes fréquences contrôlées. Un objectif de l'équipe alors était d'apporter des éléments de réponse à la problématique clinique du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ; il s'agissait de tester l'effet, sur la réponse mécanique cellulaire sous chargements cycliques (prise comme caractéristique de l'état de sa structure cytosquelettique), en présence de lavages broncho-alvéolaires dans leur milieu de culture.

(1) Contribution à l'analyse des résultats expérimentaux

Les premières observations effectuées par l'équipe de Daniel Isabey, avant mon arrivée, montraient qu'une dépolymérisation partielle des structures d'actine (suite à l'ajout d'une faible quantité de cytochalasine-D durant quelques minutes) provoquait une diminution du module d'élasticité apparent, associée à un effet non significatif sur le module de viscosité apparent du cytosquelette évalué par MTC. Un parallèle avait alors été fait en terme de rigidité avec le comportement semblable observé pour les modèles de tenségrité purement élastiques (notamment grâce aux travaux de Sylvie Wendling-Mansuy) en reliant cet effet de la cytochalasine-D à une diminution de la tension interne de la structure cytosquelettique. Toutefois, la question restait ouverte quant au non effet relatif remarqué pour la viscosité du CSQ et c'est grâce au modèle de tenségrité viscoélastique (MTV) que j'ai développé qu'une explication a pu être proposée. En effet, à l'instar de ce qui était mesuré expérimentalement sur cellules vivantes, modifier la tension interne du MTV n'avait qu'une incidence non significative sur son module de viscosité apparent (Cañadas et coll., 2002). L'étude des effets de la diminution de la tension interne du cytosquelette sur ses propriétés viscoélastiques révélées par MTC a, par la suite, été approfondie avec le modèle de double compartiment de Valérie Laurent. Celle-ci avait proposé ce modèle rhéologique pour analyser la réponse mécanique cellulaire en considérant deux compartiments pour le cytosquelette : (i) le CSQ cortical, essentiellement formé d'une fine couche de très nombreux courts filaments d'actine faiblement

tendus, associés à la membrane plasmique et (ii) le CSQ dit cytosolique ou profond, composé notamment de quelques grosses et longues fibres de stress, fortement tendues, traversant de grandes régions du cytoplasme et associées aux microtubules ainsi qu'aux filaments intermédiaires. L'utilisation du modèle de tenségrité viscoélastique pour l'analyse des résultats expérimentaux, dépouillés via le modèle de double compartiment, a alors permis de conforter ce dernier. En effet, le CSQ cortical apparaissait plus souple que le cytosquelette profond. En outre, l'ajout de cytochalasine-D provoquait une plus grande diminution relative du module élastique apparent du CSQ profond que de celui du cortical (et aucune modification significative de leur module de viscosité respectif). En appliquant le MTV, on a pu relier cette différence d'effets sur chaque compartiment cytosquelettique au niveau de polymérisation des assemblages d'actine de chacun, à leur nombre d'éléments respectif ainsi qu'à leur niveau de tension respectif (ces travaux ont été publiés dans Laurent et coll., 2002a, 2002b & 2003).

(2) Contribution au développement du dispositif de MTC :

A mon arrivée dans l'équipe de Daniel Isabey, le banc de magnétocytométrie permettait d'effectuer des tests en quasi-statique (fluage et recouvrance). Toutefois, des résultats issus de la littérature montraient alors que les propriétés viscoélastiques de cellules musculaires lisses dépendaient de la fréquence de chargement imposée suivant des lois puissance spécifiques (Maksym et coll., 2000; Fabry et coll., 2001). Les cellules testées à Créteil étaient des cellules alvéolaires pulmonaires (lignée A549) et n'avaient jamais été testées sous contraintes mécaniques harmoniques. Pour y remédier, il a fallu modifier le banc de MTC. En effet, avant ces modifications, le champ magnétique imposé permettant la mise en rotation des micro-billes ferromagnétiques (troisième étape du protocole décrit auparavant) était appliqué dans la direction verticale tandis que le champ de magnétisation (deuxième étape du protocole) était appliqué suivant la direction horizontale (Figure 1). De plus, les sondes du magnétomètre étant placées horizontalement, le signal recueilli est lié au cosinus moyen de l'angle de déviation des micro-billes. En raison de la parité de la fonction cosinus, il était ainsi impossible de différencier le signal correspondant à un angle θ de celui d'un angle $-\theta$. Le dispositif de magnétisation a donc été modifié afin de magnétiser les micro-billes suivant un angle de 45° par rapport à l'horizontale, définissant un nouveau "zéro" comme position initiale et permettant de différencier cette fois le sens de la rotation. En outre, le dispositif d'alimentation présent alors ne délivrait qu'un courant monopolaire. Il a donc été remplacé par une alimentation construite au sein de l'unité, capable de fournir un courant électrique dans les deux sens avec une vitesse de réaction assez importante pour pouvoir imposer des fréquences relativement hautes (jusqu'à 50 kHz en théorie). Enfin, Bruno Louis (IMRB, Créteil) a développé un programme de traitement des signaux permettant d'obtenir directement les parties réelles et imaginaires (par transformée de Fourier) correspondant aux composantes élastiques et dissipatives (associées à la viscosité) de la réponse mécanique du CSQ. Pour ce travail, j'ai également été assisté par Maria Gianneli que j'encadrais alors pour son stage de DEA de biomécanique dont le sujet portait sur l'étude de l'effet des lavages broncho-alvéolaires dans la réponse en fréquence des cellules alvéolaires pulmonaires mesurée par MTC.

Les premiers essais de ce dispositif rénové ont montré des résultats conformes avec ceux issus de la littérature. En outre, ces premiers tests ont permis d'améliorer le protocole afin de s'assurer que les micro-billes non fixées sur les récepteurs trans-membranaires étaient bien éliminées par rinçages successifs. En effet, une publication récente (Fabry et coll., 1999) venait de mettre à mal l'hypothèse d'un comportement non-linéaire du CSQ révélé par MTC, à savoir une rigidification apparente lorsque le niveau de contrainte appliqué augmentait. Fabry et collaborateurs estimaient que cette réponse non-linéaire n'était pas due aux propriétés mécaniques spécifiques du cytosquelette mais à l'arrachement de certaines micro-billes au fur et à mesure que le niveau de contrainte était augmenté. En fait, cette hypothèse de détachement de billes ne faisait que renforcer l'observation

faite avec la technique de MTC sur la rigidification à la contrainte du CSQ puisque si des billes étaient arrachées, alors la rigidité apparente mesurée ne pouvait être que minimisée. Toutefois, pour répondre à cette polémique, de nombreux tests ont été réalisés avec plusieurs rinçages permettant de vérifier le bien-fondé du protocole utilisé et de le conforter.

2) Tests par microplaques

A l'occasion d'une courte coopération, lors des dernières semaines de travail de thèse à Créteil, j'ai aussi participé à quelques manipulations expérimentales de cellules adhérentes par la technique de microplaques afin de poursuivre l'analyse du caractère viscoélastique de cellules prises dans une autre condition d'adhésion que par MTC (en collaboration avec Atef Asnacios et Nicolas Desprat, LBHP, Paris 7). Ces essais ont été effectués sur des fibroblastes L929 murins après trois heures d'adhésion aux deux plaques recouvertes de fibronectine, afin de permettre l'établissement de fibres de stress au niveau des deux surfaces d'adhésion. Des tests de fluage en traction (figure 2) ont donc été effectués avec un niveau de force contrôlée de l'ordre de 16 nN grâce au matériau piézoélectrique utilisé pour la microplaque mobile (l'autre restant fixe). Au bout d'une minute de sollicitation, l'écartement entre les plaques se stabilisait plus ou moins et une première configuration déformée apparaissait, ce qui correspondait aux temps observés en MTC alors que la sollicitation n'était pas localisée autour d'un site d'adhésion (bille de MTC) mais globalement appliquée à l'ensemble de la cellule via l'ensemble de ses points d'ancrage au substrat (microplaques). Toutefois, au bout d'une heure d'application de ce même niveau de force, une autre configuration, en apparence également stabilisée, était mise en lumière ce qui n'avait pas été observé en MTC, le tout avec un écartement entre les plaques restant du même ordre que celui identifié après une minute. Il est à noter qu'une telle observation ne pouvait se faire avec la MTC car, au bout de quelques dizaines de minutes, les micro-billes utilisés étaient alors totalement endocytées par les cellules. L'hypothèse alors émise pour expliquer cette dualité de formes cellulaires associées à une même force appliquée constante et à une même déformation globale (représentée par l'écartement des microplaques) est la suivante : dans le temps court d'une minute, ce qui était observé représentait essentiellement la réponse mécanique de la cellule via son cytosquelette tandis que sur les temps longs (une heure) il s'agissait probablement de la mise en lumière du remodelage du CSQ. En outre, des niveaux de force supérieurs ont également été testés, jusqu'à la rupture du corps cellulaire (pour environ 200 nN appliqués). Enfin, un "rappel viscoélastique" était observable pendant quelques minutes après la rupture de la cellule. Cependant, l'analyse de ces expérimentations a surtout été qualitative, plus que quantitative ; en particulier, un problème technique n'a pas permis d'enregistrer les données expérimentales (notamment l'écartement des microplaques au cours du temps), ce qui a rendu impossible le calcul des paramètres viscoélastiques correspondants. En outre, la microplaque mobile fut cassée lors d'un essai suivant celui-ci et les importants délais de remplacement (plusieurs mois) ont induit l'arrêt de ces tests qui n'ont pas été poursuivis par la suite.

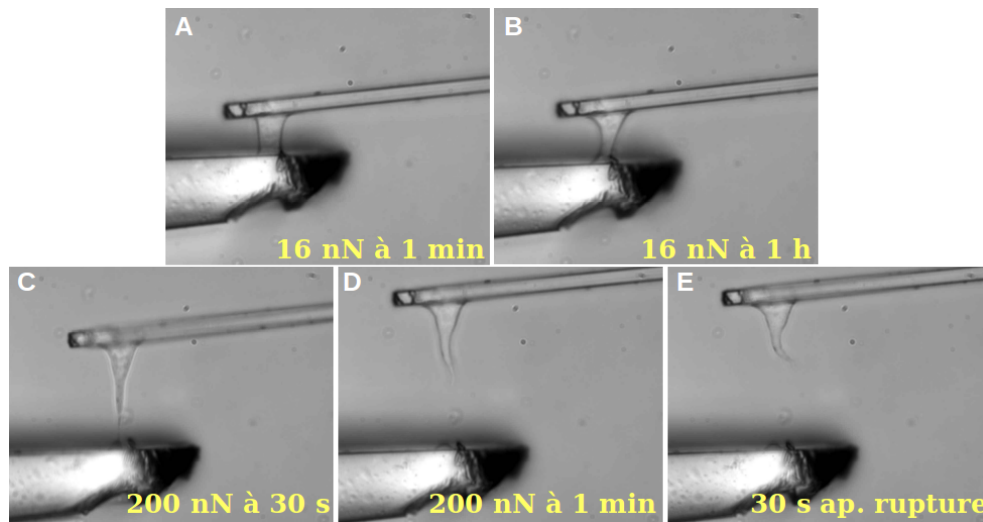


Figure 2 : Succession de photographies prises au cours d'un test de fluage d'un fibroblaste murin par la technique de microplaques. En haut, avec 16 nN appliqués, en A au bout de 1 min et en B au bout d'une heure. En bas, avec 200 nN appliqués, en C au bout de 30 s, en D rupture totale du corps cellulaire au bout de 1 min et en E illustration du rappel viscoélastique 30 s après cette rupture.

A-1-2- Caractérisations mécaniques des tissus fibreux

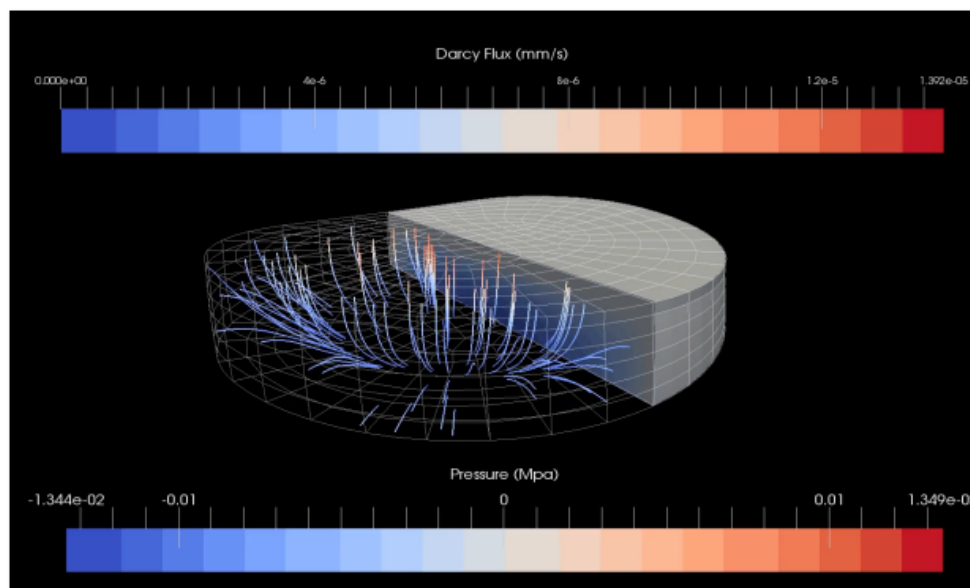
Les os et cartilages, dont le disque intervertébral ou DIV, sont des tissus dont le composant majeur est la matrice extracellulaire laquelle est donc le principal responsable du comportement mécanique tissulaire observé. En outre, ces organes se présentent sous la forme de milieux poreux saturés. Ainsi, pour alimenter le modèle poroélastique développé pour étudier le remodelage osseux (voir partie **B-4**), il a été nécessaire d'évaluer expérimentalement la perméabilité de l'os. De même pour l'étude de la croissance volumétrique des cartilages (voir partie **B-3**), des tests ont été effectués afin d'estimer, d'une part, certaines propriétés hyper-élastiques d'échantillons *ex vivo* d'*annulus fibrosus* (la partie fibrocartilage du DIV) et, d'autre part, certaines caractéristiques mécaniques de modèles *in vitro* de cartilages articulaires (micropellets).

1) Caractérisations mécaniques des cartilages

(i) Aide à la mise en place de protocoles de diffusion et de convection par IRM

La nutrition des chondrocytes au sein du disque intervertébral fait très probablement intervenir des phénomènes de diffusion et de convection en son sein (se référer à la partie **B-3** pour les explications sur le rôle supposé de la nutrition des chondrocytes dans la croissance des cartilages). Un modèle poro-hyper-élastique de DIV avait déjà été développé par Adrien Baldit lors de son doctorat au LMGC, dirigé par Fabien Cherblanc et co-encadré par Dominique Ambard (Baldit et coll., 2014), permettant de représenter des phénomènes chimio-osmotiques reconnus pour le disque intervertébral ainsi que de prédire des flux de diffusion et de convection internes au DIV (figure 3). Il reste toutefois à vérifier expérimentalement ces prédictions afin de valider et d'améliorer ce modèle, avant d'y intégrer des "ingrédients" relatifs à la croissance afin de tenter de simuler ce phénomène. Pour cela, l'outil IRM semble correspondre au besoin, notamment du fait de la résolution qu'il offre pour des échantillons biologiques (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres). En effet, l'université dispose d'une plateforme IRM destinée à l'imagerie sur le petit animal vivant (BioNanoNMRI, responsable Christophe Goze-Bac) avec deux IRM générant des champs de forte puissance, respectivement de 9,4 et 4,7 Tesla (par comparaison, un IRM hospitalier classique génère des champs généralement de l'ordre de 1,5 et plus rarement jusqu'à 3 Tesla). Une

collaboration avec les collègues du BioNanoMRI, notamment Christophe Coillot, a été initiée à travers le co-encadrement (avec Dominique Ambard et Simon Le Floc'h) de Loubna Drissenek en stage de 2^e année du Master STIC pour la Santé, spécialité Physique Médicale. Au début de ce travail, aucun protocole permettant d'obtenir des coefficients de diffusion dans toutes les directions de l'espace avec l'IRM (définissant ainsi un "tenseur de diffusion") n'avait encore été établi au sein de la plateforme de l'université. Ainsi, un milieu modèle constitué d'un mélange d'eau distillée et de glycérine (qui a la particularité d'avoir une masse volumique et une viscosité proches de celles du sang), à diverses concentrations (de 0 % à 100 % de glycérine), a été utilisé et a permis de mettre au point le protocole de diffusion, après confrontation des valeurs obtenues avec celles issues de la littérature. Par la suite, l'imagerie de flux de convection 1D par RMN a été mise au point, tout en restant dans l'ordre de grandeur des flux prédits par le modèle poro-hyper-élastique, lesquels seraient assez proche des vitesses de diffusion supposées pour le disque intervertébral.



Il reste encore à mettre au point cette imagerie en 3D pour que cet outil soit pleinement opérationnel et prêt à être utilisé afin de caractériser ces paramètres poroélastiques pour des DIV et de valider le modèle existant, en vue de l'utiliser comme modélisation de base pour les futures simulations numériques de la croissance du disque. Pour ce faire, il est prévu d'instrumenter l'IRM par un dispositif permettant de solliciter mécaniquement des DIV entiers. Plus précisément, il s'agit de soumettre les disques intervertébraux à des tests cycliques de traction/compression et d'utiliser l'imagerie par résonance magnétique afin d'en observer finement les déformations tout en suivant les perturbations des flux de diffusion et de convection en son sein. Les échantillons seront préparés en conservant les vertèbres supérieure et inférieure au DIV visé afin d'en préserver l'intégrité. Ainsi, grâce au travail d'un étudiant de 1^e année de Master de Mécanique en stage au printemps 2016 (Yoann Boyer, que j'ai co-encadré avec Dominique Ambard, Gilles Dusfour, Simon Le Floc'h ainsi que Vincent Huon, responsable du service expérimental du LMGC ou SERVEX), un principe de solution a été validé pour le dispositif de sollicitations sous IRM (en considérant les contraintes liées non seulement aux forts champs magnétiques et à la non perturbation des mesures par les antennes utilisées, mais aussi aux aspects biocompatibilité). Il reste désormais à finaliser la

conception de l'appareil puis à le fabriquer avec le concours de SERVEX (prototype prévu pour l'année universitaire 2017/2018).

(ii) Suivi de tests de caractérisation mécanique d'échantillons d'annulus fibrosus

Cette partie est directement connectée aux travaux dédiés à la détermination des contraintes de croissances au sein de l'*annulus fibrosus* de DIV (voir paragraphe dédié en **B-3-1-2**). Ce travail a été initié à l'occasion du stage de 2^e année de Master de Mécanique de Raphaël Lung-Soong, co-encadré par Dominique Ambard, Simon Le Floch et moi-même, et est actuellement poursuivi par Gilles Dusfour dans le cadre de sa thèse de doctorat. L'objectif est ici d'alimenter le modèle utilisé pour estimer les contraintes résiduelles au sein du disque intervertébral avec l'hypothèse qu'elles sont représentatives des contraintes générées lors du processus de croissance. En effet, la méthode suivie consiste dans un premier temps à procéder à une ou plusieurs coupures radiales de l'*annulus fibrosus*, lequel s'ouvre alors libérant tout ou partie de ses contraintes internes. Dans un second temps, des simulations numériques basées sur un modèle mécanique approprié (hyper-élastique dans notre cas) sont effectuées afin de "faire le chemin inverse", à savoir mimer la fermeture du DIV coupé. A la fin de ces calculs, la détermination des efforts au sein du matériau modèle permet d'estimer ces contraintes résiduelles, notamment dans le sens circonférentiel, que l'on suppose représentatives des contraintes de croissance. Pour cela, le modèle avait besoin d'être nourri en termes de propriétés mécaniques du matériau visé, d'où l'objet de ces tests expérimentaux.

En conditions physiologiques, une particularité de l'*annulus* d'un DIV soumis à des chargements de type compression à travers les segments vertébraux connexes, est qu'il se trouve lui-même en tension dans le sens circonférentiel. Ainsi, les essais de caractérisation mécanique ont été effectués par des tests de traction d'échantillons *ex vivo* d'*annulus fibrosus* de disques de porc (fournis par le CHU de Nîmes) découpés dans le sens circonférentiel et issus de plusieurs zones des DIV (latérale, antérieure, etc.). Chaque éprouvette a été testée à l'aide d'une machine de traction. Un pré-conditionnement de 5 cycles a été effectué avant de procéder à l'essai de traction proprement dit. L'analyse s'effectue alors sur la base du modèle hyper-élastique Holzapfel-Gasser-Ogden (HGO) qui considère un module de cisaillement (ou module de Coulomb) et un module d'élasticité isostatique globaux associés au module d'élasticité des fibres de collagène ainsi qu'à un coefficient adimensionnel caractéristique de leur non linéarité. Une fois estimés, ces paramètres sont ensuite intégrés dans le modèle permettant de simuler la re-fermeture de l'*annulus fibrosus* et d'estimer ses contraintes résiduelles (voir partie **B-3-1-2**).

(iii) Mesure des propriétés mécaniques de modèles de micropellets de cartilages

Plusieurs techniques existent à ce jour pour générer *in vitro* des tissus cartilagineux (articulaires, en général) en laboratoire avec l'objectif, une fois la technique maîtrisée et validée, de les injecter directement chez des patients atteints de pathologies associées à ces organes. L'équipe "Biologie de la cellule souche mésenchymateuse et thérapies du cartilage" de Christian Jorgensen, Danièle Noël et Marie Maumus, de l'Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies (IRMB, Université de Montpellier / CHRU / Inserm) a ainsi développé un modèle *in vitro* de "micropellets" qui correspond à de petites sphères d'un diamètre légèrement inférieur au millimètre, constituées de néo-cartilage hyalin articulaire et obtenues en 3 semaines à partir de la culture de cellules souches mésenchymateuses (CSM) différenciées en chondrocytes. Cette différenciation est induite grâce à la culture en 3D ("micropellets") et l'addition de TGF β 3, un facteur de croissance transformant impliqué notamment dans la formation des systèmes osseux et cartilagineux. Le processus

expérimental est plus précisément décrit dans la partie **B-3-2**).

Peu de travaux biomécaniques publiés concerne l'influence des contraintes mécaniques sur la formation *de novo* de la matrice extracellulaire (MEC) des cartilages (Bougault et coll., 2009) ; ils évaluent essentiellement la formation de cartilage après combinaison de cellules dans un biomatériau chondroinducteur (Michalopoulos et coll., 2012). Ce type d'approche, qui permet d'évaluer l'intérêt de différents biomatériaux à stimuler la formation de cartilage possédant des propriétés mécaniques proches du cartilage natif, est intéressant pour des projets d'ingénierie tissulaire. En revanche, il ne reflète pas la formation *de novo* de cartilage. Il semble ainsi qu'aucun travail publié n'a été effectué sur les micropellets, probablement en raison de leur petite taille qui rend difficile l'évaluation des propriétés biomécaniques de ces tissus. Une collaboration a donc débuté en 2016 avec cette équipe de l'IRMB en poursuivant un double objectif : (1) utiliser la caractérisation mécanique des micropellets en complément des analyses biologiques, afin de quantifier et qualifier ces néo-cartilages formés en fonction des conditions de culture, et (2) solliciter mécaniquement les micropellets au cours de leur croissance pour tenter d'étudier les rôles spécifiques et croisés des actions mécaniques et des facteurs de croissance dans la formation des cartilages, voire tenter d'optimiser le processus de croissance des micropellets (les travaux relatifs à ce second objectif sont décrits dans la partie **B-3-2**).

Le premier objectif a débuté au printemps 2016 par un travail préliminaire d'un stagiaire de 1^e année de Master de Mécanique, Pape Momar Sy (co-encadré avec Dominique Ambard, Gilles Dusfour, Simon Le Floc'h et Vincent Huon), qui a conçu et fait fabriquer (par SERVEX) des plateaux appropriés à la taille des micropellets (variant entre 0,5 et 1 mm) afin de les adapter sur un dispositif de compression déjà en place (figure 4). Celui-ci est également instrumenté à l'aide d'un capteur de 0,1 N et deux caméras rapides permettent de traquer par corrélation d'images, suivant deux plans orthogonaux, les déformations locales et globales de la micropellet testée. De plus, ces outils de visualisation sont aussi utilisés pour quantifier la taille et la forme précise des différents néo-cartilages formés. Pour remonter aux propriétés globales des micropellets (en particulier le module de Young apparent), les échantillons biologiques sont soumis à une dizaine de cycles de compression/relâchement autour d'une déformation initiale d'environ 10 % et les courbes force-déplacement sont analysées en considérant un double modèle de Hertz (contacts en deux zones opposées de la micro-sphère de cartilage avec les deux plateaux du dispositif de compression).

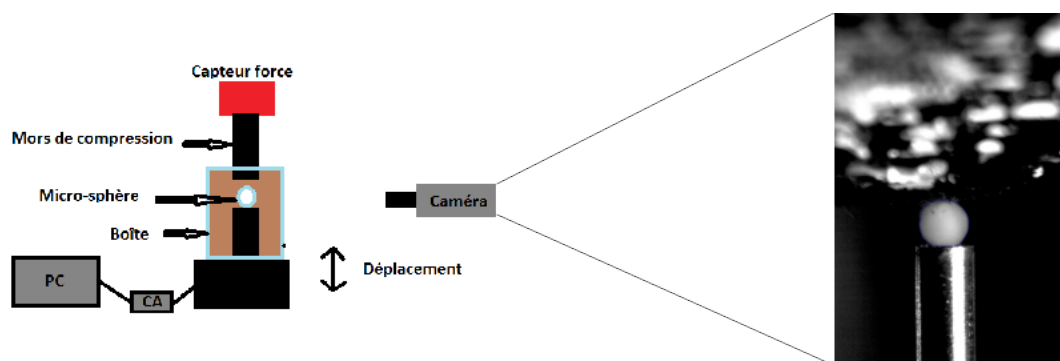


Figure 4 : A gauche, schéma du montage expérimental utilisé pour la caractérisation mécanique des micropellets. A droite, photographie prise avec une des deux caméras utilisées, montrant une pellet coincée entre les deux plateaux de compression.

Les premiers essais de caractérisation biologique (Marie Maumus) et mécanique (Gilles Dusfour) ont été effectués sur des micropellets après 21 jours de formation en considérant trois conditions de culture, à savoir (1) un milieu sans facteur de croissance, (2) un milieu contenant du TGFβ3 (ajouté

au bout au jour J7) et (3) un milieu contenant du TGFβ3 (J7) et enrichi de FGF9 (J12). Les résultats préliminaires sont regroupés dans les figures 5 et 6 et montrent d'une part les analyses biologiques (figure 5) et d'autre part les analyses physiques en termes de taille et de module d'Young apparent (figure 6). Le croisement de ces analyses indique que les micropellets, formées dans un milieu de culture contenant du TGFβ3 seul, sont à la fois les plus grosses et celles qui expriment le plus de collagène de types IIB et X. Elles contiennent également le plus de protéoglycanes (caractéristiques du cartilage hyalin et hypertrophique), tout en exhibant le module élastique le plus important (autour de 300 kPa). Il est à noter que ces valeurs sont intermédiaires entre celles trouvées dans la littérature pour des néo-cartilages fibreux, donc cartilage immature (environ 150 kPa) et celles données pour du cartilage mature (jusqu'à 1,9 MPa). A l'inverse, les échantillons cultivés dans un milieu sans facteur de croissance sont les plus petits, les plus souples (module d'élasticité d'une trentaine de kPa) et ceux qui expriment le moins les protéines spécifiques du cartilage. Un résultat a toutefois été surprenant : contrairement à ce qui était espéré et référencé dans la littérature, l'ajout de FGF9 n'a pas permis d'obtenir de "bons" néo-cartilages en termes qualitatifs et quantitatifs. En effet, on constate une relativement faible production des protéines spécifiques associée à une surproduction de métalloprotéinases matricielles ou MMP ; de plus, leur taille et module d'élasticité (autour de 200 kPa) se trouvent dans des valeurs intermédiaires de celles des micropellets cultivées sans facteur de croissance ou en présence de TGFβ3 seul.

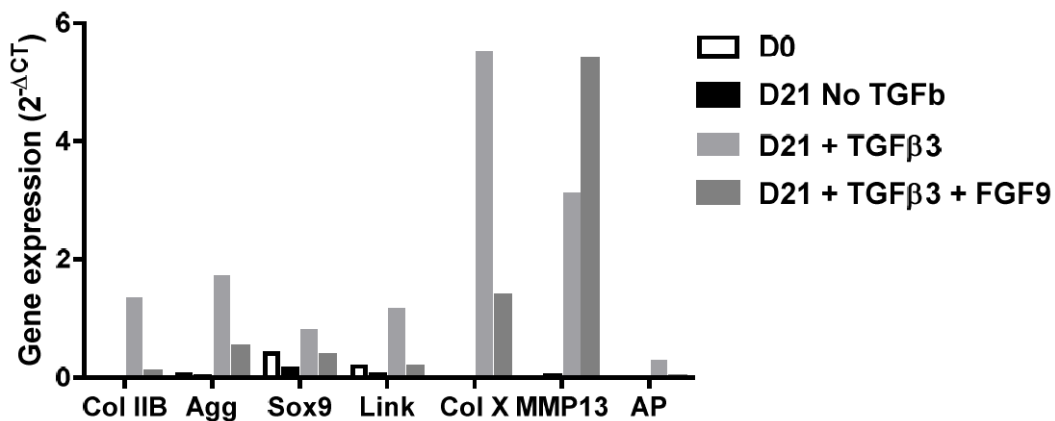


Figure 5 : Résultats de l'analyse de marqueurs biologiques pour les différents pellets testés. Les barres vides indiquent les valeurs de référence avant J7 (ajout du TGF). Au bout de 21 jours de culture, les pellets avec TGFβ3 seul sont celles où les cellules expriment le plus les gènes relatifs aux collagènes II et X ainsi qu'au protéoglycanes (Agg). Les pellets traitées avec du FGF9 sont celles qui expriment le plus le gène relatif aux métalloprotéinases (MMP) qui dégradent la matrice.

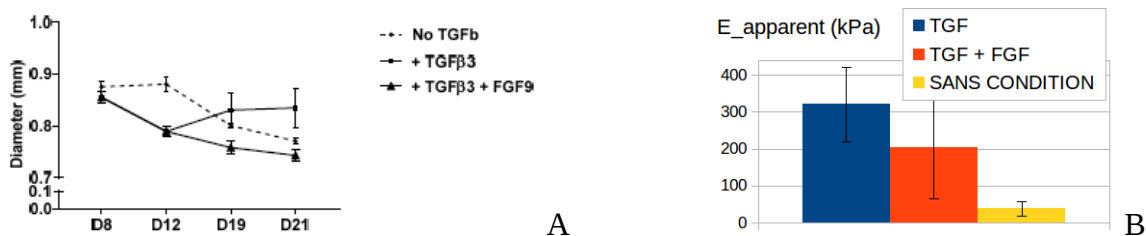


Figure 6 : Résultats de paramètres physiques des pellets testés. A gauche (A), évolution de la taille des pellets au cours des 21 jours de formation, en fonction des conditions de culture. Seules les pellets avec uniquement du TGFβ3 montrent une augmentation du volume à partir de J12. A droite (B), les valeurs de module d'élasticité apparent à J21 pour les trois conditions de culture.

En outre, des essais de compression viennent également d'être effectués pour des micropellets après 21, 29 et 35 jours de culture. Leur module d'élasticité moyen ainsi déterminé à J29 (respectivement J35) apparaît supérieur de près de 50 % (respectivement près de 80 %) supérieur à celui estimé à J21. Leur taille moyenne semble, en revanche, peu évoluer par rapport à J21, même si leur forme globale se rapproche de plus en plus d'une sphère parfaite. Ainsi, au delà de trois semaines de culture, les pellets pourraient subir un processus de remodelage (densification) plus que de croissance volumétrique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à partir d'une certaine taille (et peut-être encore d'une certaine densité de fibres de collagène) les nutriments ne puissent plus diffuser suffisamment pour nourrir les cellules, en particulier au cœur de la pellet où de l'apoptose a déjà été observée.

L'ensemble de ces résultats préliminaires confirme le fait qu'avec du TGF β 3 on est bien en présence de cartilages bien qu'immatures et conforte la validation du modèle de micropellet. Un article est ainsi en cours de rédaction pour une soumission prévue début 2017. De plus, ces résultats sont déjà utiles, en particulier pour mieux définir les niveaux d'efforts qui devront être mis en jeu pour solliciter les micropellets au cours de leur croissance et afin de mieux préciser les futures protocoles à utiliser. Par exemple, s'il est prévu pour la suite de continuer de tester d'autres facteurs de croissance, il a d'ores et déjà été décidé de ne plus continuer d'utiliser le FGF9, non convaincant. Toutefois, ces travaux collaboratifs n'ont débuté qu'il y a quelques mois ; les analyses actuelles demandent encore à être approfondies.

2) Évaluation de la perméabilité intrinsèque de l'os cortical

Dans le cadre de la thèse de doctorat d'Étienne Malachanne portant sur le rôle de la phase fluide dans le processus de remodelage osseux, j'ai participé à des tests sur des tranches d'os cortical (échantillons d'os à moelle de bœuf) couplés à un calcul EF afin d'en déterminer la perméabilité intrinsèque globale. En effet, le cœur de ce travail de thèse consistait en le développement d'un modèle de remodelage osseux basé sur les propriétés poroélastiques caractéristiques de ces tissus. Il s'agissait notamment d'étudier le rôle de la phase fluide dans le processus de remodelage, en considérant les variations de pression ainsi que les vitesses d'écoulement. Or, les valeurs de perméabilité intrinsèque de l'os cortical trouvées dans la littérature variaient de plusieurs ordres de grandeur (entre 10^{-13} et 10^{-20} m²) en fonction de la localisation et de l'échelle, sans que celles-ci ne soient toujours précisées dans les études publiées. Des tests simples de mise en pression hydrostatique de tranches d'os cortical (dans le sens radial) ont donc été effectués (figure 7). En couplant les résultats expérimentaux à un modèle de structure reprenant la géométrie moyenne des échantillons testés, la valeur de $1,1 \cdot 10^{-13}$ m² a été obtenue puis utilisée dans le modèle de remodelage d'os cortical brièvement présenté dans la partie **B-4** (travaux publiés dans Malachanne et coll., 2008).

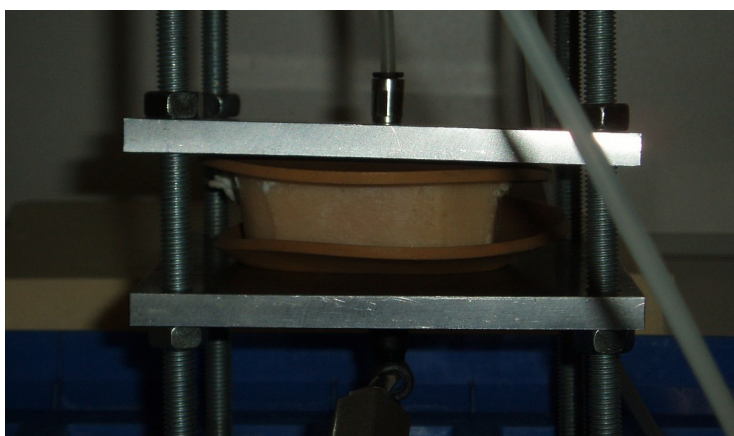


Figure 7 : Photographie du test de perméabilité intrinsèque d'échantillons d'os cortical. Une pression hydrostatique est imposée au centre de l'os (vidé de sa moelle) et des joints en silicone permettent l'étanchéité au niveau des faces supérieures et inférieures de l'échantillon.

A-2- Modélisations mécaniques des cellules adhérentes

A-2-1- Modèle de tenségrité viscoélastique

L'application du concept de tenségrité à la modélisation et l'étude du comportement mécanique des cellules adhérentes a été ma principale activité en biomécanique, depuis mon stage de DEA en 1999 jusque dans les premières années de mon arrivée au LMGC. Ma contribution majeure dans ce domaine résulte probablement dans l'établissement de la notion de "viscoélasticité structurale du cytosquelette" par le développement d'un modèle de tenségrité viscoélastique (MTV) confronté aux observations expérimentales tant effectuées au laboratoire qu'issues de la littérature.

L'analogie de tenségrité avec la structure du cytosquelette (CSQ) avait été proposée au milieu des années 80 par Donald E. Ingber et repose sur quelques principes et hypothèses de base (Ingber & Jamieson, 1985) :

- le CSQ est une structure réticulée composée de plusieurs types de filaments (et structures filamenteuses comme les fibres de stress) aux rôles mécaniques spécifiques ; en particulier, les assemblages et filaments d'actine sont considérés comme travaillant essentiellement en traction (les filaments intermédiaires probablement aussi) tandis que les microtubules sont pressentis pour supporter des efforts de compression ;
- les extrémités du cytosquelette, c'est à dire les points et plaques d'adhésion, sont supposées être les mécanorécepteurs cellulaires et peuvent être associées aux nœuds d'une structure, liées ou non à un support extérieur et/ou subissant des sollicitations mécaniques extérieures appliquées ;
- il existerait une relation entre la forme globale de la cellule et l'architecture du CSQ ; en particulier, la déformation de la structure cytosquelettique ne serait pas tant due à la déformation individuelle de ses composants qu'aux réarrangements spatiaux de ceux-ci ;
- la rigidité du CSQ serait directement dépendante du niveau de tension interne essentiellement due aux structures d'actine (en particulier aux couplages acto-myosines comme dans les fibres de stress) ;
- il existerait un équilibre mécanique entre le CSQ et la matrice extracellulaire (MEC) à travers leurs liens qui constituent les points et plaques d'adhésion ; en particulier, une cellule préalablement adhérente et étalée sur un substrat s'arrondit une fois détachée ; de même, après rupture des microtubules d'une cellule adhérente, il apparaît une nouvelle configuration structurale du CSQ et un nouvel état d'équilibre entre la cellule et la MEC.

Les premières simulations numériques de modèles de tenségrité cellulaires ont été effectuées par l'équipe de Dimitrije Stamenovic en 1996 en utilisant une structure symétrique composée de 6 barres comprimées par un réseau de 24 câbles tendus, tous les éléments étant pris comme purement élastiques (Stamenovic et coll., 1996). Un des premiers apports de ce groupe a été de mimer le comportement fortement non-linéaire observé expérimentalement sur cellules vivantes, en particulier une rigidification quand le niveau de chargement mécanique augmente ("stress hardening").

Un modèle similaire a été ensuite utilisé par Sylvie Wendling-Mansuy (Wendling et coll. 1999, 2000a et 2000b) pour étudier notamment l'impact sur le module d'élasticité apparent du modèle : (i) de la tension interne correspondant à l'extension initiale des câbles, (ii) de la longueur des éléments et (iii) du nombre de nœuds liés à un substrat ainsi que leur localisation. Il a ainsi été montré que le module élastique apparent était proportionnel à la racine carrée de la tension interne et qu'il était aussi proportionnel à l'inverse du carré de la longueur des éléments constitutifs.

Lorsque j'ai commencé mon stage de DEA, il n'y avait pas dans la littérature de modèle de tenségrité cellulaire capable de représenter le comportement viscoélastique des cellules vivantes. C'est donc au cours de ce stage que j'ai commencé à développer un modèle de tenségrité composé d'éléments structuraux viscoélastiques (notamment les câbles), modèle que j'ai continué de

développer et d'étudier par simulations numériques au cours de mon travail de thèse. A l'instar des précédents modèles de tenségrité cellulaire, celui-ci était composé de 6 barres et 24 câbles, permettant de comparer son comportement mécanique à celui de ses "prédécesseurs" (figure 8). L'originalité de ce modèle résidait donc dans la considération d'un comportement viscoélastique pour ses câbles (il semblait à l'époque que les microtubules avaient un comportement plus proches de celui de barres élastiques que d'éléments viscoélastiques). Pour cela, un modèle rhéologique simple fut choisi, à savoir le modèle de Voigt (ou Kelvin-Voigt) considérant un élément élastique (ressort du modèle analogique associé) travaillant en parallèle d'un élément visqueux (amortisseur en analogique). Ce choix fut guidé par le fait que les expérimentations menées alors dans mon laboratoire de thèse (dispositif de magnétocytométrie) s'effectuaient en force imposée et que ce modèle rhéologique est le plus simple pour représenter un solide viscoélastique soumis à ce type de sollicitations.

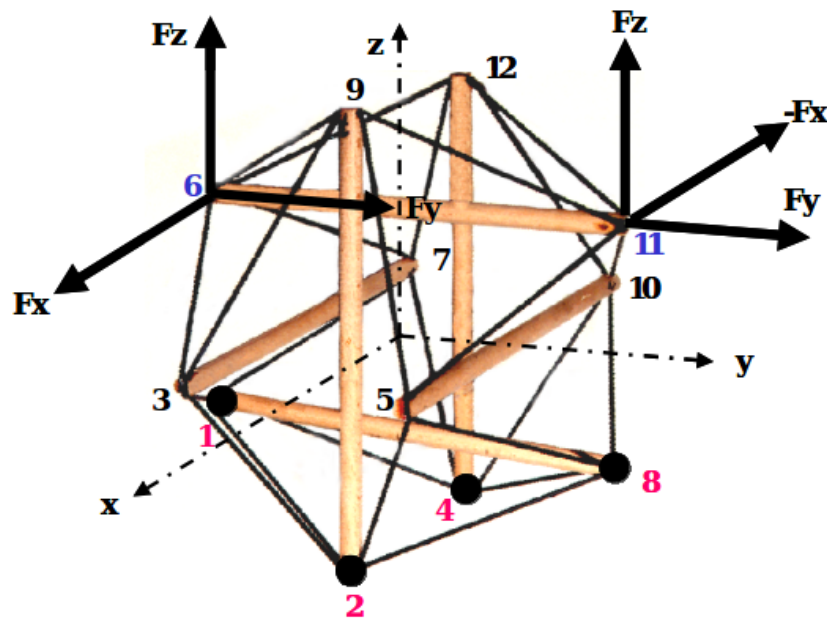


Figure 8 : Image du modèle de tenségrité utilisé, avec numérotation des nœuds, ainsi que des conditions limites considérées. Les 4 nœuds du bas, numérotés en rouge sont supposés reliés à un bâti virtuel via des liaisons pivot. Les forces sont appliquées aux extrémités de la barre supérieure (nœuds numérotés en bleu) : des forces d'égale amplitude suivant $+Fz$ (respectivement $-Fz$) sont appliqués pour simuler des tests de traction (respectivement de compression) ; un couple de forces appliquées suivant $+Fx$ et $-Fx$ est utilisé pour les essais de torsion et des forces d'égale norme sont appliquées suivant Fy pour simuler des tests de cisaillement/glisement.

Ce modèle de tenségrité viscoélastique (MTV) a donc été testé, par simulations numériques (d'abord avec Matlab puis avec lmgc90, code développé au LMGC par Frédéric Dubois et Michel Jean ; <https://git-xen.lmgc.univ-montp2.fr/groups/lmgc90>), en fluage ainsi que sous oscillations forcées suivant une grande gamme de fréquences imposées (de 10^{-4} Hz à 10^2 Hz). Avec l'outil Matlab, il s'est agi de faire avant tout du calcul analytique pour un treillis de barres avec amortissement par calcul matriciel. Toutefois, la lenteur des calculs (pour un test de fluage, la solution analytique passe par le calcul de l'opérateur "exponentielle de matrice" dont la définition passe par la convergence de la série de Taylor associée, ce qui imposait de très longs temps de calculs, parfois plusieurs jours) a fait que je me suis orienté vers une autre méthode, originale, de résolution numérique en "détournant" le code lmgc90 destiné au-préalable aux milieux granulaires. Pour ce faire, au lieu de modéliser le MTV à travers ses éléments barres et câbles, il a été choisi de

le représenter à travers ses nœuds considérés alors comme des “grains”. Ainsi, les éléments barres et câbles ont été remplacés par des lois d'interactions entre grains à distance. En prenant en compte la longueur à vide de chacun et en utilisant la notion de “contact unilatéral”, il a donc été possible de représenter les états de compression ou de tension des éléments structuraux et donc de simuler des tests mécaniques du MTV ainsi numériquement modélisé. Les détails des méthodes utilisées, tant pour le calcul matriciel que par l’outil milieux divisés, sont présentés dans (Cañadas et coll., 2002 et 2006).

Les résultats numériques obtenus en quasi-statique ont d'abord confirmé le comportement fortement non linéaire tant du point de vue du module élastique global équivalent du modèle que de sa viscosité apparente globale. Cette non linéarité (ainsi que la valeur quantitative des modules élastiques et visqueux globaux) se montrait aussi dépendante des conditions de sollicitations de la structure, à savoir une rigidification avec l'augmentation de la force pour des tests de type “traction” ou “compression” alors que sous “torsion” ou “cisaillement” une première phase d'assouplissement était observée avant de retrouver une rigidification. Par voie de conséquence, la constante de temps apparente globale du modèle s'avérait similairement dépendante des conditions de sollicitations ainsi que du niveau de force appliquée. De même, ces paramètres viscoélastiques se sont montrés dépendants de la longueur des barres ainsi que du niveau de tension initiale de pose des câbles. Ainsi, sur la base des variations respectives des modules globaux apparents d'élasticité et de viscosité ainsi que de la constante de temps globale du MTV, des processus de “rigidification” (augmentation de la rigidité) et “assouplissement” (diminution de la rigidité), “solidification” (augmentation de la constante de temps) et “fluidification” (diminution de la constante de temps), “épaississement” (augmentation de la viscosité) et “dilution” (diminution de la viscosité), en fonction des conditions de sollicitations et/ou de la longueur des barres et la tension initiale des câbles. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau 1 ci-après.

	Traction		Cisaillement		L*		T*	
	$\varepsilon_i = 5\%$	$\varepsilon_i = 50\%$	$\varepsilon_i = 5\%$	$\varepsilon_i = 50\%$	Traction	Cisaillement	Traction	Cisaillement
E^*	0,0016 Rigidification	0,0026 Rigidification	0,0004 Rigidification	0,0006 Rigidification	$\propto L^{*-2}$ Assouplissement	$\propto L^{*-2}$ Assouplissement	$\propto T^{*0,3}$ Rigidification	$\propto T^{*0,7}$ Rigidification
τ^*	0,22 Fluidification	0,47 Fluidification	0,72 Solidification	0,40 Solidification	$\propto L^{*0}$ Sans effet	$\propto L^{*0}$ Sans effet	$\propto T^{*-0,2}$ Solidification	$\propto T^{*-0,6}$ Solidification
η^*	0,0003 Epaississement	0,0012 Epaississement	0,0003 Dilution	0,0002 Dilution	$\propto L^{*-2}$ Dilution	$\propto L^{*-2}$ Dilution	$\propto T^{*0,1}$ Effet non significatif	$\propto T^{*0,1}$ Effet non significatif

Tableau 1 : Synthèse des évolutions des propriétés viscoélastiques globales du MTV (module d'élasticité E^ , de viscosité η^* et constante de temps τ^*) issues de simulations d'essais de fluage en traction et en cisaillement, en fonction du niveau de déformation ε_i de la structure, de la longueur normalisée des éléments constitutifs L^* ainsi que de la tension des câbles T^* . L'astérisque indique les valeurs normalisées par les propriétés locales des câbles du modèle.*

En particulier, tandis que le module global apparent d'élasticité du MTV augmentait avec la racine carrée de la tension initiale des câbles (comme pour les modèle de tenségrité purement élastiques), sa viscosité est apparue très peu dépendante de cette tension (tableau 1). Ceci a pu alors être mis en relation avec l'effet de la modulation de tension interne du CSQ en précisant l'hypothèse de l'effet de la cytochalasine-D et en partant du postulat que les propriétés viscoélastiques cellulaires observées expérimentalement sont avant tout dues aux propriétés viscoélastiques des constituants du cytosquelette, notamment de l'actine. En effet, mettre en présence une cellule vivante à de faibles concentrations de cette drogue, et pendant un court laps de temps, diminuerait le niveau de tension au sein du CSQ (par légère dépolymérisation des structures d'actine) ce qui expliquerait la diminution du module d'élasticité et la quasi non modification du module de viscosité de la cellule testée (voir paragraphe **A-1-1- 1) (1) Contribution à l'analyse des résultats expérimentaux**). L'ensemble des conclusions résumées ci-dessus sont détaillées dans (Cañadas et coll., 2002 et 2006 ; Laurent et coll., 2002a, 2002b et 2003).

En outre, ces résultats numériques ont été confrontés avec ceux obtenus pour un modèle de solide alvéolaire viscoélastique issu de la théorie des mousses (Gibson & Ahsby, 1988), en se basant sur un travail similaire préalablement publié par D. Stamenovic et M.F. Coughlin, où les auteurs tentaient de retrouver quantitativement des valeurs expérimentalement obtenues sur cellules vivantes (Stamenovic & Coughlin, 1999). Pour ce faire, les auteurs ont injecté, dans leurs modèles respectifs de tenségrité et de solide alvéolaire, les valeurs de propriétés mécaniques (module de Young) et géométriques (longueurs et sections des filaments d'actine et de microtubules) déterminées expérimentalement dans plusieurs travaux publiés alors. Les auteurs ont alors obtenu un module d'élasticité global de leur modèle de tenségrité correspondant aux valeurs déterminées pour des cellules testées par magnétocytométrie (MTC), pinces optiques (PO) ou, dans une moindre mesure, aspiration par micropipette (AM). A l'opposé, le module d'élasticité obtenu par le modèle de solide alvéolaire élastique se rapproche des valeurs expérimentalement trouvées par rhéométrie magnétique (RM), compression microplaques (MP) et par AFM à pointe non fonctionnalisée (à savoir non recouverte d'un ligand spécifique des sites d'adhésion cellulaire). De plus, dans une étude similaire, Wendling et collaborateurs (Wendling et al., 2000a) ont montré des effets d'échelle différents pour le modèle de tenségrité et celui de solide alvéolaire, suggérant que les résultats obtenus par le premier correspondraient à un réseau dont les éléments ont une longueur de plusieurs micromètres (correspondant donc aux éléments les plus grands du CSQ) tandis que ceux obtenus par le modèle de mousse seraient caractéristiques d'un réseau fin dont la maille est de l'ordre de la centaine de nanomètres (correspondant possiblement plutôt au cortex d'actine). Reprenant la même démarche que pour ces travaux précédents, j'ai déterminé le module de viscosité pour chacun des deux modèles (Cañadas et coll., 2003). Il s'est avéré que les valeurs obtenues pour le MTV étaient proches de celles obtenues par magnétocytométrie, pinces optiques et, dans une moindre mesure, rhéométrie magnétique. A l'inverse, les résultats numériquement déterminés pour le modèle de solide alvéolaire tombaient dans la gamme de modules de viscosité de cellules testées par microplaques, AFM non fonctionnalisée et, en partie, micropipette (figure 9).

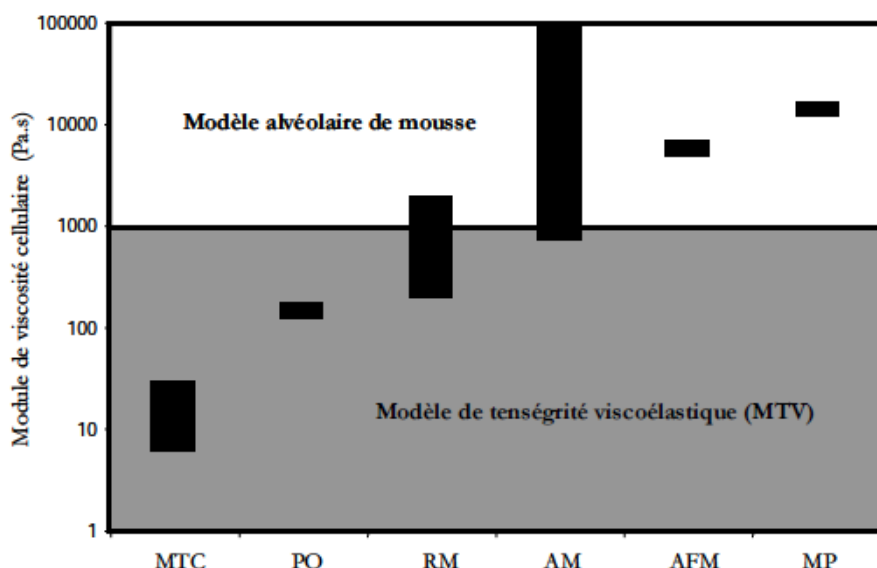


Figure 9 : Valeurs de module de viscosité cellulaire prédites par le MTV et le modèle de solide alvéolaire. MTC : magnétocytométrie ; PO : pinces optiques ; RM : rhéométrie magnétique ; AM : aspiration par micropipette ; AFM : microscopie à force atomique ; MP : microplaques.

Ainsi, pris globalement, ces résultats indiquent que les techniques expérimentales de type magnétocytométrie ou pinces optiques seraient avant tout spécifiques de l'ensemble de la structure du cytosquelette sollicitée par ses "nœuds" (les sites d'adhésion) dont le principal mode de déformation pourrait être le réarrangement spatial des éléments structuraux (notamment grandes fibres de stress et microtubules). A l'opposé, les techniques non spécifiques du CSQ telles que l'aspiration par micropipette (en particulier pour les plus petits diamètres utilisés), l'AFM non fonctionnalisée ou la compression par microplaques sans adhésion cellulaire préalable, seraient avant tout révélatrices d'assemblages de courts filaments d'actine (probablement le cortex d'actine) dont le mode de déformation principal pourrait être la flexion individuelle des filaments.

Le modèle de tenségrité viscoélastique a aussi été testé sous sollicitations harmoniques en imposant une force sinusoïdale et en faisant varier la fréquence entre 10^{-4} Hz à 10^2 Hz (Cañadas et coll., 2006). Ce choix s'est imposé au regard des expérimentations correspondantes effectuées sur cellules vivantes publiées à l'époque et les simulations ont été faites en considérant la même amplitude de force, quelle que soit la fréquence imposée. Les résultats obtenus montrent une dépendance des propriétés viscoélastiques globales du MTV en fonction de la fréquence choisie et confortent leur dépendance respective à la tension et à la longueur des éléments structuraux. Des lois puissance ont ainsi pu être établies, notamment autour de la fréquence correspondant à l'inverse de la constante de temps du MTV, et sont regroupées dans le tableau 2.

	Loi puissance de la fréquence imposée
Amplitude maximale d'oscillations	$\propto f^{-0,83}$
Module d'élasticité E^*	$\propto f^{+0,18} \Rightarrow$ rigidification faible
Module de viscosité η^*	$\propto f^{-0,24} \Rightarrow$ dilution modérée
Constante de temps τ^*	$\propto f^{-0,42} \Rightarrow$ solidification
Hystérésivité h	$\propto f^{+0,58}$

Tableau 2 : Récapitulatif des lois puissance, fonction de la fréquence imposée, suivies par les propriétés viscoélastiques du MTV soumis à des tests harmoniques (traction/compression).

Il est notable que la puissance trouvée pour le module élastique global du MTV (0,18) soit dans la gamme de ce qui a été observé pour des cellules adhérentes (entre 0,15 et 0,35 selon les types cellulaires et les conditions expérimentales utilisées). Dans une moindre mesure, la puissance déterminée numériquement pour la viscosité du MTV (-0,24) n'est pas en désaccord avec celle obtenue expérimentalement sur cellules adhérentes (entre -1 et 0, chacun exclus, suivant la gamme de fréquences imposées). La différence majeure pour ces effets visqueux réside dans le fait que la puissance -0,24 du MTV est constante tandis que, pour les cellules, la puissance varie entre 0 et -1 avec l'augmentation de la fréquence imposée. Ceci pourrait être relié à la façon qu'a une autre propriété (l'hystérésivité, à savoir dans notre cas le produit entre la constante de temps de l'objet testé et la pulsation imposée) de varier avec la fréquence et s'explique probablement par le fait que le modèle de tenségrité viscoélastique est constitué d'éléments ayant tous le même module de viscosité donc la même constante de temps, tandis qu'il se pourrait qu'une cellule exprime une grande variété de constantes de temps distinctes. En effet, en deçà d'une fréquence proche de 10 Hz, l'hystérésivité cellulaire apparaît constante ; en considérant la définition rappelée plus haut pour cette propriété viscoélastique, cela signifie donc qu'à une fréquence donnée (et inférieure à 10 Hz) la cellule exprime une constante de temps spécifique. Ainsi, il est très probable qu'une cellule adhérente puisse exprimer une diversité (pour ne pas dire une infinité...) de constantes de temps, chacune pouvant être révélatrice d'un phénomène biochimique particulier et/ou de la sollicitation d'une sous-structure du CSQ spécifique, dans cette gamme de fréquences imposées. Au-delà de 10 Hz, l'hystérésivité cellulaire augmente également suivant une loi puissance dont la valeur augmente elle-même pour se rapprocher de 1, ce qui n'est pas en désaccord avec la valeur trouvée pour le MTV de 0,58.

Ainsi, du fait des bons accords trouvés en termes de résultats, le MTV a montré une certaine pertinence dans la modélisation biomécanique du cytosquelette pour des cellules adhérentes. Toutefois, les différences entre les observations expérimentales et les résultats numériques rappellent qu'un tel modèle est probablement encore trop simple au regard de la complexité du CSQ, tant sur le plan architectural que sur la considération de la grande variété de propriétés mécaniques intracellulaires. C'est la raison pour laquelle, lors de mon arrivée au LMGC, un des premiers travaux que j'ai effectué en collaboration avec Bernard Maurin, René Motro et Haïmad Baudriller (post-doctorant) a été de trouver numériquement des formes non régulières (c'est à dire

non symétriques) de structures de tenségrité constituées d'un plus grand nombre d'éléments. Ces travaux ont été publiés dans (Baudriller et coll., 2006, Cañadas et coll., 2009, et Maurin et coll., 2010) et les résultats obtenus étaient intéressants en termes architecturaux puisque les structures obtenues parvenaient à représenter l'organisation spécifique des réseaux de microtubules et d'assemblages d'actine dont les fibres de stress, en considérant un nombre de barres et de câbles bien plus important que pour les modèles de tenségrité cellulaire publiés à l'époque (figure 10). Cependant, aucun test mécanique n'a alors été effectué sur ces modèles. En effet, bien que prometteurs en terme architectural, ces modèles apparaissaient encore trop “figés” (longueur des éléments constante donc pas de prise en compte de processus biochimiques de type polymérisation/dépolymérisation ; connexions entre éléments structureaux constantes ; etc.) et, au final, chacun était trop spécifique d'une configuration cellulaire donnée alors qu'un objectif majeur était de développer un modèle “général” pouvant s'appliquer à un grand nombre de types cellulaires et de configurations observées expérimentalement. Ainsi, une autre approche a été développée, basée sur la mécanique des milieux divisés et est exposée dans le paragraphe **B-1- Structuration du CSQ**. En outre, une tentative similaire a été initiée et est brièvement présentée dans le paragraphe suivant.

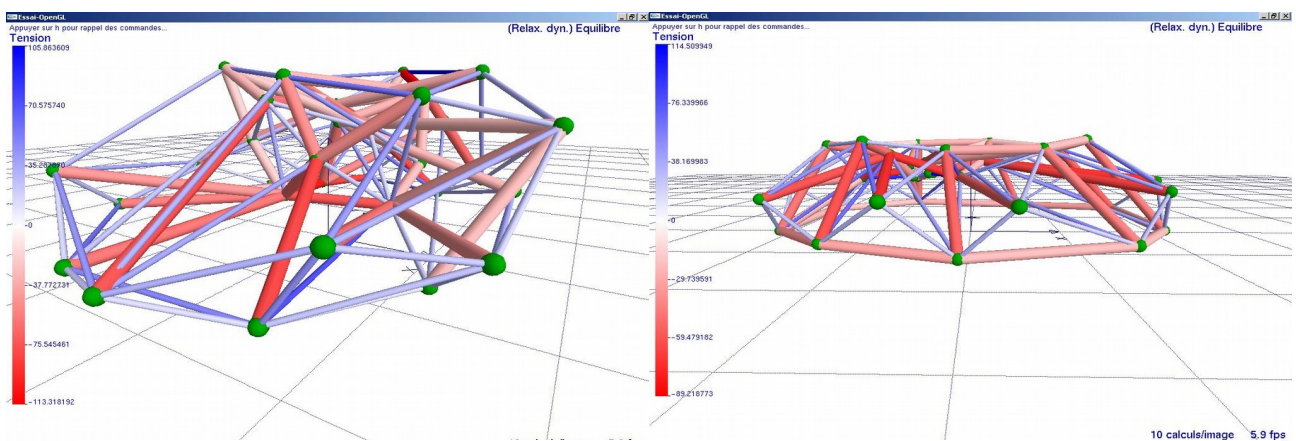


Figure 10 : Deux exemples de structures de tenségrité non régulières déterminées numériquement, sur la base d'images en microscopie. Le code couleur indique le niveau de tension (bleu) et de compression (rouge) des éléments structureaux.

A-2-2 Modèle granulaire de cellule adhérente

La modélisation numérique du MTV par lmgc90, présentée dans la partie précédente, a montré qu'il était finalement possible d'utiliser l'outil «milieux divisés» en biomécanique cellulaire. De plus, des études publiées ultérieurement par d'autres équipes ont montré qu'un modèle granulaire 2D pouvait représenter certains aspects du comportement mécanique de cellules adhérentes tout en suivant la réorganisation spatiale de la structure du CSQ (Milan et coll., 2007). C'est suivant cette idée que deux autres modélisations mécaniques de cellules ont été initiées.

La première s'est effectuée dans le cadre d'une brève collaboration (Sophie Féréol et Redouane Fodil) avec l'IMRB de Créteil, où il s'agissait d'étudier la blessure de la membrane cytoplasmique et sa cicatrisation au cours du temps. Ainsi, un modèle granulaire de cellule adhérente a été développé sans toutefois définir d'interaction spécifique de type tension / compression, c'est à dire sans y distinguer un cytosquelette. Il était constitué d'un ensemble bidimensionnel de disques cohésifs représentant un cytoplasme indifférencié et entouré d'une couche d'autres grains, de taille beaucoup plus petite et reliés entre eux ainsi qu'à la première couche des grains “cytoplasmiques” par des ressorts virtuels tendus, pour représenter la membrane sous tension par l'action du cortex d'actine.

Des simulations d'indentation ont été effectuées comme tests préliminaires à l'étude (figure 11). Cependant, les essais expérimentaux de lésion membranaire effectués sur cellules vivantes par AFM se sont avérés infructueux et le modèle n'a donc pu être réellement utilisé ni validé. En effet, même avec les vitesses les plus importantes permises par ce banc AFM (de l'ordre de plusieurs dizaines de micromètres par minute), aucun trou n'a été observé sur la membrane des cellules adhérentes testées (lignée A549 comme celles utilisées en MTC, cf partie A-1-1), y compris pour des niveaux d'indentation élevés c'est à dire en faisant pénétrer la pointe de l'AFM jusqu'à un $0,5 \mu\text{m}$ de la face basale des cellules. Seule une empreinte laissée par cette pointe dans le cortex d'actine a pu être observée lors de tests d'indentation où elle était laissée en position indentée une dizaine de minutes.

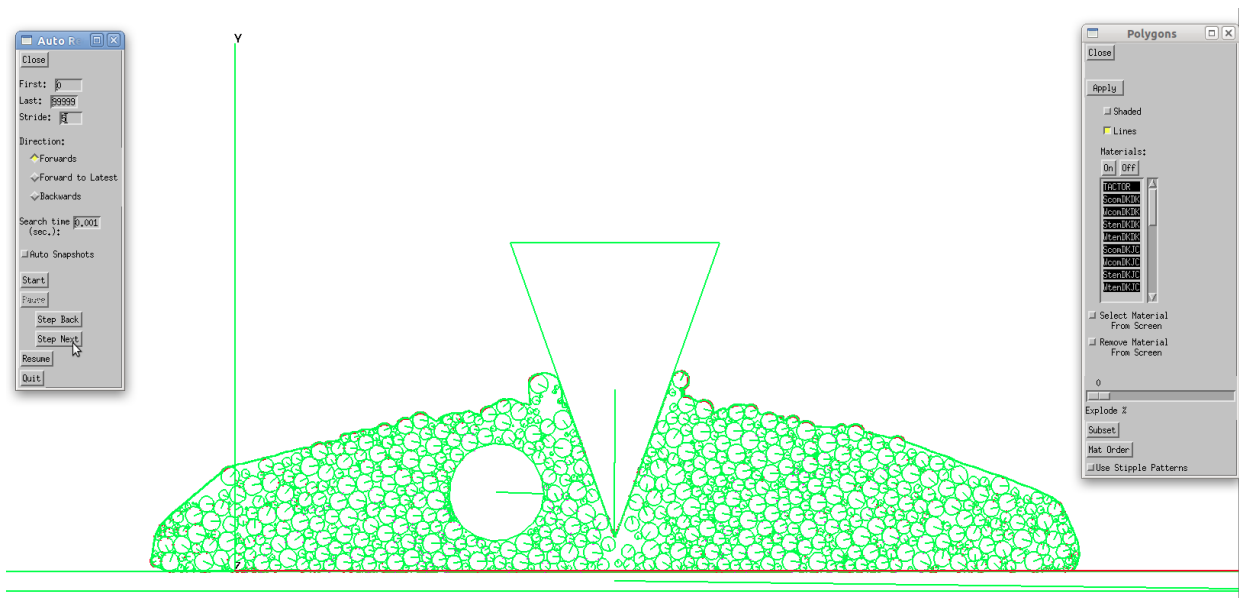


Figure 11: Image issue de la simulation d'un test d'indentation profonde par une pointe d'AFM d'un modèle granulaire 2D de cellule adhérente. Le cytoplasme est représenté par un ensemble polydisperse de disques dont l'un, beaucoup plus gros que les autres, correspond au noyau. La membrane associée au cortex d'actine est ici pris en compte par une série de disques de très petite dimension (non précisément visible sur cette figure) et reliés par de petits ressorts virtuels.

La seconde approche a été effectuée dans l'objectif de développer un outil capable de simuler le processus de morphogenèse de tissus épithéliaux mono-couches. Elle est présentée dans la partie **B-2-** ci-après.

B- Processus d'évolution impliquant la mécanique

B-1- Structuration du CSQ

Dans l'objectif de développer un modèle biomécanique "général" de cellule adhérente, l'idée retenue est qu'un tel modèle devait être capable de "déterminer par lui-même" (c'est à dire sans ou en limitant au maximum l'action humaine en tant que pilote du modèle) une architecture du CSQ correspondant à n'importe quelle configuration architecturale observée expérimentalement. De plus, fort des nombreux accords entre les modèles de tenségrité cellulaire et les expérimentations sur cellules vivantes, il importait d'en conserver deux éléments de base : l'aspect structure 3D du cytosquelette et les rôles de tension ou compression respectifs de l'actine (et des filaments

intermédiaires) et des microtubules. Par conséquent, en se basant à la fois sur la modélisation numérique du MTV à l'aide de l'outil Imgc90 destiné initialement aux milieux granulaires (voir la partie précédente **A-2-1- Modèle de tenségrité viscoélastique**) et sur un scénario d'adhésion et d'étalement d'une cellule sur un substrat plat, un tel modèle a été développé. Il s'agissait donc de partir d'un modèle de cellule non-adhérente, en suspension, donc de forme sphérique, et de le faire adhérer à une matrice plane pour qu'il "fabrique" son propre CSQ. Ces travaux ont été initiés par une collaboration avec Nadir Bettache et Philippe Montcourrier du DMIM (Université Montpellier 2) et ont été publiés dans (Cañadas et coll., 2009, et Maurin et coll., 2008 & 2010).

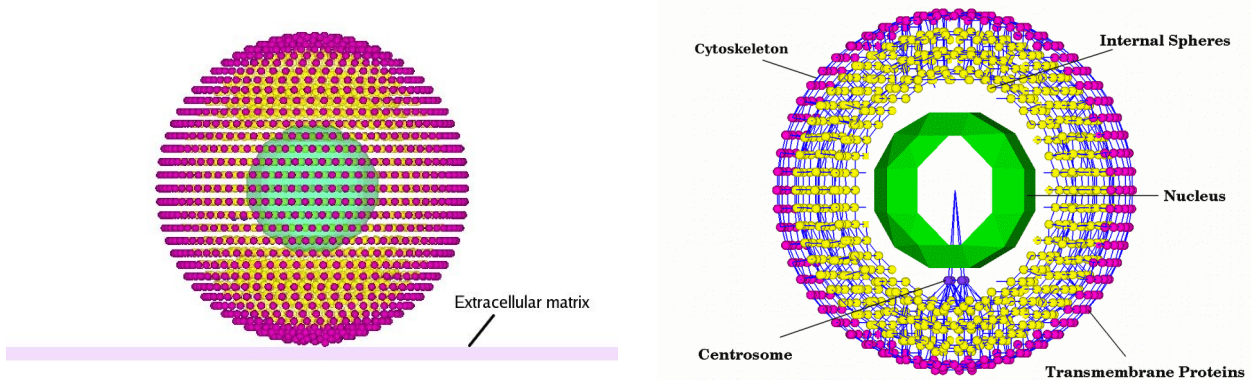


Figure 12 : Modèle granulaire de cellule destiné à simuler le processus de structuration du cytosquelette durant l'adhésion et l'étalement cellulaire. Sont représentées à gauche une vue complète 3D et à droite une coupe centrale du modèle. On y retrouve, en mauve les grains membranaires, en jaune les grains cytoplasmiques, en vert le noyau et en bleu (illustration de droite) une paire de grains représentant le centrosome d'où croissent les microtubules. Les traits bleus illustrent les interactions entre grains mais ne sont pas des éléments physiques.

Ainsi, la cellule est représentée par un ensemble de divers grains, répartis à l'état initial sur la surface de plusieurs sphères concentriques virtuelles, comme indiqués dans la figure 12 avec en mauve des grains représentant la membrane associée au cortex d'actine et dont certains, aléatoirement répartis, sont capables d'adhérer au substrat représenté par le plan (en mauve pâle sur la vue de gauche, figure 12), comme tout autant de complexes moléculaires d'adhésion (de type intégrines, cadhérines, etc.). En vert, au centre géométrique de la cellule-modèle, se trouve un grain de plus grande taille représentant le noyau et en jaune des grains cytoplasmiques simulant des protéines de liaison spécifiques des assemblages du CSQ. Chaque grain est connecté à ses voisins immédiats (que ce soit sur la même sphère virtuelle ou sur celles juste en dessous et en dessus) à travers des interactions à distance représentant tout autant de ressorts virtuels assortis de propriétés viscoélastiques (traits bleus de la vue de droite, figure 12), comme ce fut le cas pour modéliser numériquement le MTV avec Imgc90. Près du noyau, une paire de grains (bleus, vue de droite de la figure 12) représente le centrosome ; ceux-ci sont rigidement liés au centre du noyau à travers des interactions, leur permettant ainsi de bouger librement tout en restant à une distance constante de celui-ci. A l'état initial, c'est à dire au début de la simulation, les distances entre grains correspondent toutes aux longueurs à vides des ressorts virtuels de telle sorte qu'il n'y a ni tension ni compression entre les grains. Ceci permet de considérer la géométrie sphérique d'une cellule non adhérente en suspension, associée à un très faible niveau de tension interne au CSQ lequel, dans cette configuration, apparaît d'après les observations microscopiques extrêmement peu structuré et pourrait finalement se résumer à une sorte de gel non réticulé (composé principalement de monomères non ou très peu polymérisés) entouré d'une fine couche de très courts filaments d'actine corticale peu tendus.

La simulation débute par une phase de détection des grains-adhésifs de la membrane compris entre le substrat et le centrosome, en définissant un angle de recherche depuis ce dernier. Cet angle est choisi petit au départ de telle manière qu'il n'y ait pas un grand nombre de grains-adhésifs ainsi détectés et est augmenté progressivement lorsque (plus) aucun grain-adhésif n'est décelé afin d'entre "recruter" de nouveaux. A chaque fois qu'au moins un de ceux-ci est détecté, une série de ressorts virtuels est alors ajoutée depuis le centrosome jusqu'au grain-adhésif trouvé, en passant par les grains cytoplasmiques se trouvant entre les deux extrémités et définissant le plus court chemin entre elles. Ces ressorts virtuels sont définis avec une longueur à vide plus grande que la distance entre les grains qu'ils séparent et se trouvent donc en compression, ce qui a pour effet de repousser le grain cytoplasmique jusqu'au contact avec le plan auquel il peut alors adhérer. Dans le même temps, les mouvements de ces grains modifient la distance des ressorts virtuels initiaux, le plus souvent les mettant en tension par équilibre mécanique avec le réseau de compression ainsi créé. Le processus se poursuit ainsi ce qui aboutit à une adhésion et un étalement progressif de la cellule-modèle sur le substrat, comme indiqué dans la figure 13. Ainsi, par ce modèle, on considère que l'on simule la croissance de microtubules entre le centrosome et les sites d'adhésion par cette génération de ressorts comprimés et on associe la mise en tension des autres ressorts virtuels à la structuration d'assemblages d'actine en tension. Autrement dit, par ce modèle nous pensons simuler la mise en place du cytosquelette au cours des processus d'adhésion et d'étalement d'une cellule sur un substrat plan. En outre, chaque configuration ainsi trouvée est unique car dépendant avant tout de la position aléatoire des grains-adhésifs au niveau de la membrane, le tout sans pilotage humain.

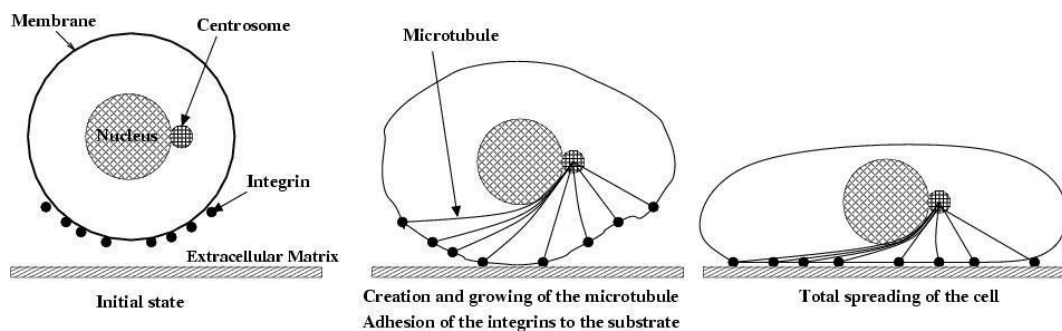


Figure 13 : Illustration du scénario choisi pour simuler la croissance des microtubules ainsi que l'étalement et l'adhésion de la cellule sur son substrat plan.

Il convient cependant de noter que le moteur de notre scénario est la croissance des microtubules, le réseau d'actine s'assemblant et se tendant en réponse par équilibre mécanique entre les tensions et les compressions au sein du modèle, ce qui n'est peut-être pas l'ordre chronologique réel. Toutefois, les informations issues de la littérature concernant les moteurs de la mise en place des réseaux de microtubules et d'actine, ainsi que la chronologie des événements sont très parcellaires et parfois contradictoires (notamment, l'actine s'assemble-t-elle avant que les microtubules ne croissent ? Ou est-ce le contraire ? Ou encore les deux réseaux se structurent-ils simultanément ?).

A la fin de chaque simulation, les réseaux de compressions et de tensions entre les grains peuvent être visualisés et l'on peut noter que leur organisation architecturale ressemble fortement aux assemblages respectifs de microtubules et d'actine constatés sous microscope (voir figure 14). De plus, la répartition des niveaux de tension, des plus importantes périphériques vers le substrat aux plus faibles vers le cœur et le haut du modèle, est en grand accord avec les observations expérimentales pour des cellules adhérant à une matrice plane : depuis les fibres de stress, joignant les sites d'adhésion de la face basale, générant de fortes tensions et souvent présentes en périphérie,

jusqu'au cortex d'actine, constitué de courts filaments plus faiblement tendus, au niveau de la face apicale de la cellule. Concernant le réseau de compressions associé aux microtubules, leur forme étoilée a été trouvée à chaque simulation pour laquelle le centrosome se trouve juste en dessous du noyau, ce qui semble en accord avec les visualisations microscopiques pour des cellules adhérant “simplement” au substrat. En outre, lorsque les grains centrosomes étaient placés au même niveau que le noyau, de façon latérale, les configurations trouvées pour les compressions ressemblaient plus à celles des microtubules observées pour des cellules en début ou en cours de migration. Il est d'ailleurs à noter que dans ces cas, un début de mouvement de la cellule-modèle était systématiquement remarqué, comme si la non-symétrie initiale due à la position latérale du centrosome pouvait initier une “migration cellulaire”, ce qui est aussi en accord avec les hypothèses de nombreuses études biophysiques sur la “perte de symétrie et d'équilibre” dans la migration cellulaire.

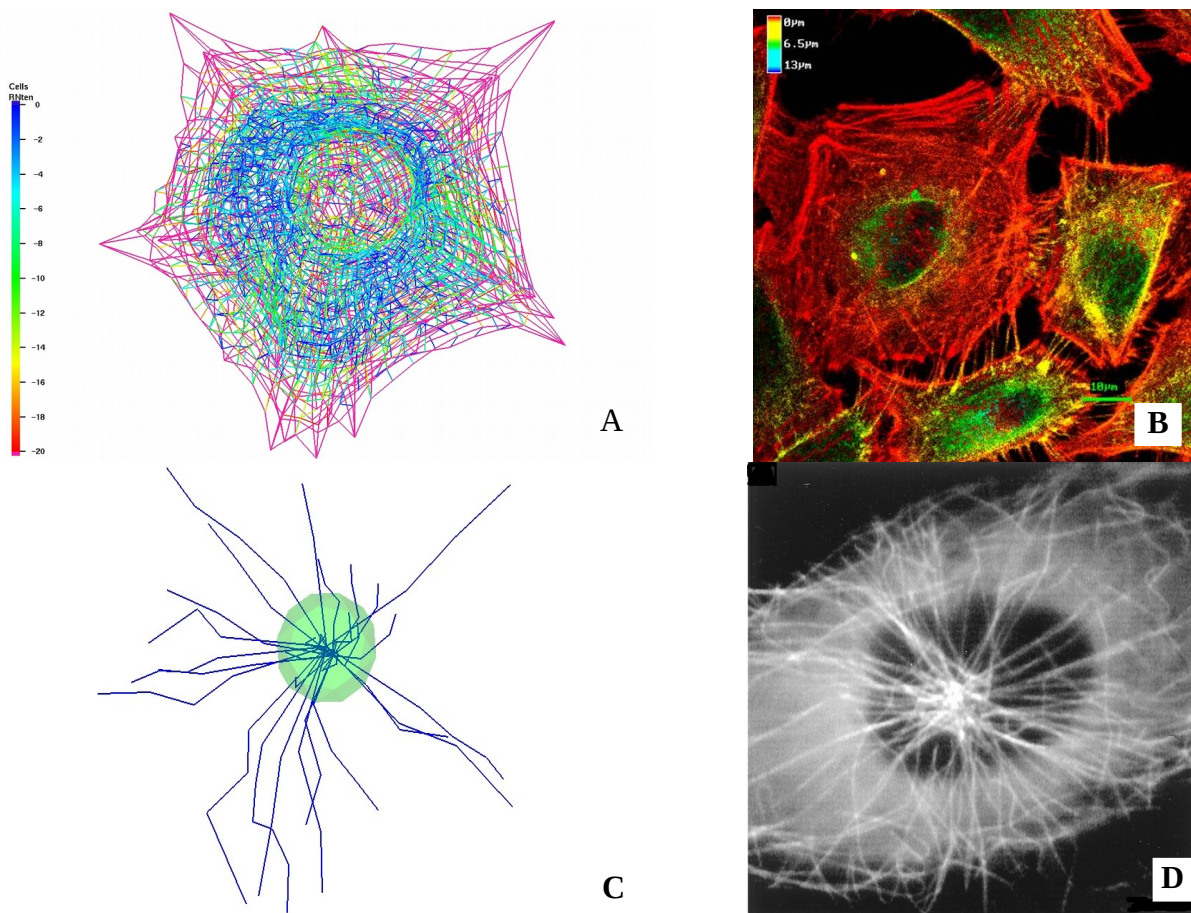


Figure 14 : Illustration du bon accord entre résultats numériques (A et C) et expérimentations sur cellules épithéliales (B et D). A : répartition du réseau de tensions dans le modèle, des plus importantes (rouge) aux plus faibles (bleu). B : réseau des structures d'actines polymérisée ; le code couleur indique la hauteur, depuis le plan basal (rouge) jusqu'à la face apicale (vert/bleu) prises en microscopie confocale (Wendling et coll., 2000b). C : réseau des interactions en compression dans le modèle (bleu), le noyau étant représenté en vert. D : image prise par microscopie à transmission de l'assemblage étoilé des microtubules (Keating et coll., 1997).

Ces excellents accords avec les observations expérimentales, en terme de répartitions architecturales des compressions et tensions au sein de ce modèle de structuration du CSQ, font de celui-ci un outil prometteur pour générer des structures 3D, non symétriques, de type tenségrité (à savoir des

éléments en compression associés à un réseau d'éléments tendus), dans des configurations dépendant de l'équilibre mécanique entre elles et le substrat auxquelles ces structures adhèrent. Autrement dit, cette approche novatrice et originale devrait permettre de définir des modèles mécaniques cellulaires beaucoup plus bio-réalistes que ceux développés jusqu'à présent. Toutefois, aucune des structures ainsi générées n'a été à ce jour soumise à des tests mécaniques simulant des essais effectués sur cellules adhérentes par des techniques spécifiques du CSQ (magnétocytométrie, pinces optiques, AFM fonctionnalisée...) afin de valider cette approche. Cependant, des modèles assez proches de celui-ci ont aussi été développés par d'autres équipes (Milan et coll., 2007) et ont montré leur pertinence en terme de représentation de certains aspects du comportement mécanique du cytosquelette sous actions extérieures, ce qui laisse tout de même à penser que notre approche devrait pouvoir être validée.

De plus, bien que ce modèle fonctionne sans pilote humain aux commandes et dépende fortement de la disposition aléatoire des grains-adhésifs, il reste encore dépendant de la disposition initiale des autres grains qui est elle choisie au-préalable par le modélisateur (qui est finalement ici très symétrique donc potentiellement "cristalline"). En outre, du fait de toutes les interactions existant entre les grains, leurs mouvements restent assez limités et ne peuvent encore représenter le recrutement sur de plus grandes distances intracellulaires des monomères cytosquelettiques comme des complexes moléculaires d'adhésion de type intégrines ou cadhérines. Enfin, bien qu'un processus de "croissance" de microtubules et de "mise en place" de structures d'actine soit ici considéré, il ne s'agit pas encore de réellement simuler les processus de polymérisation, dépolymérisation, ni de modification des connections entre filaments du CSQ, alors que cette biochimie est très probablement à la base des propriétés mécaniques des composants cytosquelettiques et, au final, du comportement mécanique global du CSQ. Des développements et tests supplémentaires restent donc encore à effectuer afin de valider "définitivement" l'approche et de disposer d'un outil simulant réellement la structuration du cytosquelette ainsi que ses restructurations en fonction des configurations rencontrées et sollicitations associées. En outre, au cours des derniers mois de son travail de thèse, Yoann Chélin a aussi proposé des pistes de développements ultérieurs sur la base du modèle de morphogenèse épithéliale qu'il avait développé.

B-2- Morphogenèse de tissus épithéliaux monocouches

Depuis longtemps, plusieurs siècles si l'on se réfère aux travaux publiés par Hooke en 1665 (dans "Observation XVIII" de *Micrographia*) ainsi qu'aux travaux de D'Arcy Wentworth Thompson (*On Growth and Form*, 1917), les formes cellulaires observées ainsi que leur mise en place ont intrigué les chercheurs. Notamment, il a été remarqué que, au sein d'un tissu contenant peu ou pas de matrice extracellulaire entre elles, les cellules adoptent généralement des formes de polygones plus ou moins irréguliers. C'est, par exemple, le cas de nombreux épithéliums prolifératifs (c'est à dire pour lesquels la genèse s'effectue à travers les processus de mitose et croissance individuelle des cellules tout en faisant intervenir le mécanisme d'apoptose) chez lesquels il a été observé, tant chez des animaux que chez des végétaux, environ et en moyenne 45 % de cellules "hexagonales", 30 % de "pentagonales" et 20 % d'"heptagonales" associées à quelques "tétraogonales" et "octogonales", voire dans de rares cas, quelques cellules "ennéagones" et/ou "décagonales" (Gibson et coll., 2006). Ces valeurs sont assez bien reproductibles au sein d'une même espèce et quelques variations très légères existent entre les espèces étudiées sans toutefois s'éloigner significativement de ces moyennes. Le fait que ces observations aient été faites chez diverses espèces animales et végétales, vivant dans des environnements différents (aérien, aquatique...), variables en taille, etc., laisse à penser que les facteurs génétiques ou biochimiques ne peuvent expliquer cette relative reproductibilité du phénomène. Par conséquent, s'il existe une sorte d'"invariant" au cœur du

processus de morphogénèse des tissus épithéliaux prolifératifs, on peut émettre l'hypothèse que des aspects physiques à l'échelle des cellules pourraient en être une composante non négligeable.

Par ailleurs, d'autres topologies en termes de distributions polygonales ont été rencontrées par l'équipe de Stephen Baghdiguian de l'ISEM (Université de Montpellier – CNRS) pour des épithéliums non prolifératifs (c'est à dire formés exclusivement à partir du dépôt et de la croissance individuelle des cellules, sans mitose ni apoptose apparentes), à savoir environ 63 % de formes hexagonales, près de 30 % de pentagonales et 7 % heptagonales, voire très rarement quelques tétragonales et/ou octogonales (Martinand-Mari et coll., 2009). Ainsi, à l'initiative de Bernard Maurin et de Stephen Baghdiguian, une collaboration a débuté en 2011 entre l'ISEM et le LMGC pour s'intéresser aux aspects biomécaniques de la morphogénèse épithéliale. L'objectif était alors de développer un modèle mécanique considérant l'échelle cellulaire et simulant ce processus de formation du tissu, appliqué notamment aux épithéliums monocouches tant prolifératifs que non prolifératifs, et d'en analyser la topologie finale. En parallèle, des analyses expérimentales étaient effectuées par les collègues de l'ISEM sur plusieurs modèles *in vitro* de tissus épithéliaux monocouches : le système folliculaire qui se développe à la surface d'œufs d'Ascidies dont *Ciona Intestinalis* en tant que modèle d'épithélium non prolifératif ainsi que des cultures de monocouches de cellules COS (en culture 3D sans adhésion à une matrice extracellulaire ce qui amène ces cellules à s'organiser suivant une surface sphérique virtuelle) et de cellules colonnaires de *Drosophila Melanogaster* comme modèles d'épithéliums prolifératifs.

Pour cela, un modèle basique de cellule "2D" a été proposé, basé sur la mécanique des milieux divisés et autorisant numériquement l'interpénétration entre les éléments constitutifs. Pour des raisons de souplesse d'utilisation, ce nouveau modèle a été développé à l'aide d'un autre code de calcul (logiciel ToyGL, développé au LMGC par Julien Averseng, initialement pensé pour la recherche de formes de structures spatiales de type tensegrité et basé sur des méthodes numériques explicites ; <http://www.lmgc.univ-montp2.fr/~averseng/JA/ToyGL.html>). La cellule est donc ici, comme le montre la figure 15, représentée par un ensemble de grains (en gris) mimant un cytoplasme indifférencié (c'est à dire sans noyau, cytosquelette ou organite décrit), entouré par une "membrane" constituée d'une série de barres (en vert) articulées entre elles au travers de grains (également en vert). En autorisant numériquement l'interpénétration entre eux, les grains "cytoplasmiques" se repoussent, mettant en tension les barres ; la cellule est donc ici représentée grossièrement comme constituée d'un cytoplasme globalement en compression, entouré d'une membrane tendue, le tout étant en équilibre mécanique. Ce choix a été effectué non seulement parce qu'il s'agissait alors d'une première tentative pour vérifier la faisabilité d'une telle approche, mais aussi et surtout car, dans de tels tissus "cellulaires", chaque cellule se retrouve finalement dans un environnement confiné du fait de la "pression" de ses voisines. En outre, si les observations en microscopie confocale ont bien révélé des structures d'actine périphériques, sous-membranaires, elles n'ont pas mis en évidence de fibre de stress.

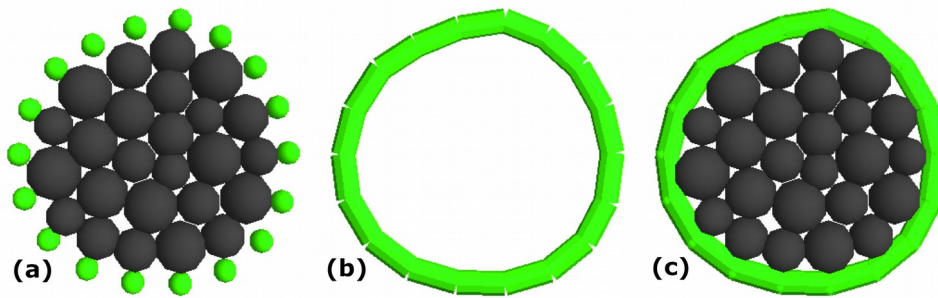


Figure 15 : Représentations du modèle cellulaire de base pour la simulation de la morphogenèse d'épithéliums monocouches. A gauche (a), seuls les grains cytoplasmiques (gris) et membranaires (vert) sont représentés. Au centre (b), seules les barres (vert) sont figurées tandis que l'on retrouve à droite (c) le modèle complet.

En jouant sur l'interpénétration des éléments, il est possible de simuler la croissance individuelle d'une cellule, en contrôlant la vitesse, par ajout séquentiel de nouveaux grains cytoplasmiques au centre du modèle de cellule. Il est à noter que les grains cytoplasmiques sont de tailles différentes afin d'éviter tout arrangement de type "cristallin" (figure 16). De plus, l'ajout d'un nouveau grain a pour conséquence d'augmenter les forces de répulsion au sein du cytoplasme-modèle, ce qui provoque par réaction l'amplification du niveau de tension des barres. Par conséquent et afin de conserver le niveau de tension des éléments de membrane dans une gamme restreinte, en accord avec certaines observations expérimentales (Laurent et coll., 2003), la longueur à vide des barres peut être modifiée en cours de simulation : lorsque la tension d'un élément membranaire atteint une valeur plafond, sa longueur à vide est augmentée en considérant cette valeur maximale, ce qui a pour conséquence de réduire le niveau de tension de la barre. Enfin, la croissance de chaque cellule est arrêtée lorsqu'une taille maximale "adulte" est considérée en définissant un nombre limite d'éléments cytoplasmiques, correspondant à l'aire moyenne observée expérimentalement par les collègues de l'ISEM.

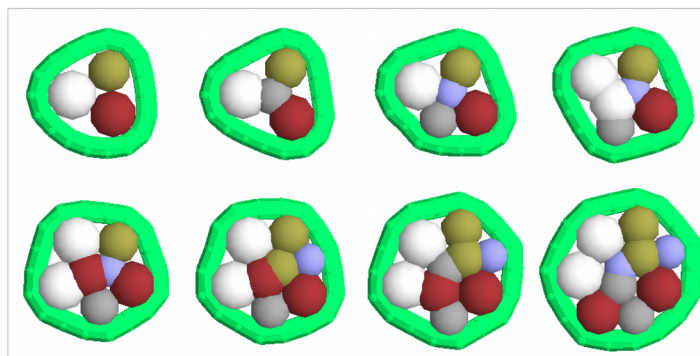


Figure 16 : Étapes de la simulation de la croissance d'une cellule par ajout successif de grains au centre du modèle. Les différentes couleurs indiquent les différentes tailles de grains.

En procédant de façon inverse, le processus d'apoptose peut aussi être simulé en supprimant progressivement des éléments cytoplasmiques puis la membrane entière. De même que la tension dans les barres peut énormément augmenter lors de la croissance, cette tension diminue parfois fortement suite au retrait des grains internes. Ainsi et pour conserver ces tensions membranaires dans la gamme restreinte sus-citée, lorsque la tension d'un élément atteint une valeur plancher, sa

longueur à vide est diminuée en considérant cette valeur minimale, de façon à ce que la tension de la barre augmente. Enfin, le processus de division cellulaire peut aussi être simulé avec ce modèle. Pour ce faire, un élément “câble” est créé entre deux grains-membranaires opposés (afin de représenter en 2D l'anneau d'actine caractéristique et “responsable” de la mitose), puis la longueur à vide du câble est progressivement diminuée afin d'en augmenter la tension et d'en raccourcir la longueur jusqu'à ce que celle-ci corresponde à la longueur des éléments barres. Enfin, les deux grains extrémités du câble sont chacun remplacés par deux grains en vis-à-vis et le câble est remplacé par deux barres joignant chacune une paire de “nouveaux” grains, de sorte que deux cellules “filles” sont alors séparées l'une de l'autre (figure 17). A la suite de cela, chaque “fille” peut évoluer individuellement, c'est à dire croître puis rentrer en apoptose ou se diviser elle-même, en fonction d'un certain nombre de paramètres définis par la suite.

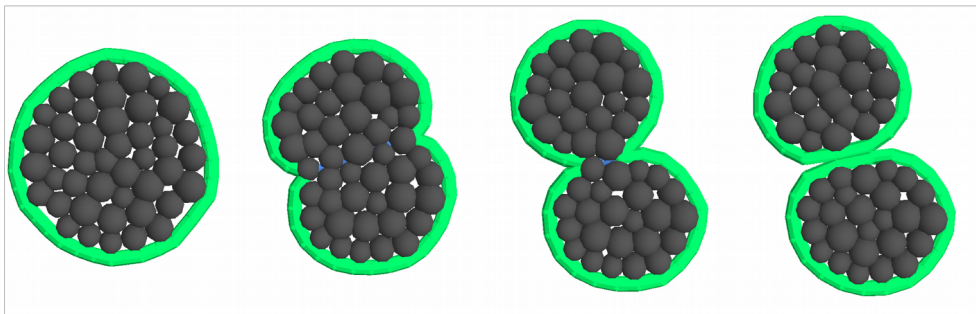


Figure 17 : Étapes de la simulation de la mitose avec le modèle de cellule. Est représenté en bleu, le câble représentant l'anneau d'actine.

En prenant en compte la possibilité de simuler l'un ou plusieurs de ces 3 mécanismes fondamentaux de la vie cellulaire, plusieurs scénarios de formation tissulaire ont été définis :

- morphogenèse de monocouches épithéliales non prolifératives à la surface d'une sphère croissante (virtuelle dans nos calculs, en obligeant chaque élément du modèle à rester à une distance déterminée et augmentant pas à pas) à l'image de la mise en place du système folliculaire à la surface d'œufs d'invertébrés marins (comme *Ciona Intestinalis*, très utilisé dans nos études) au cours de leur croissance ;
- morphogenèse de monocouches d'épithéliums prolifératifs à la surface d'une sphère équivalente, pour comparer les deux types de tissus dans des conditions similaires ;
- morphogenèse de monocouches épithéliales prolifératives sur des surface planes, de même aire que celle de la surface de la sphère testée pour aider aux comparaisons des résultats ; certains plans étaient limités par des bords carrés ou ronds, d'autres sans frontière, afin de tester d'éventuels effets des conditions limites sur les tissus finaux, considérant également que la surface sphérique correspond à une condition périodique.

Dans tous les cas de figure envisagés, lorsque des cellules entrent en contact, elles se repoussent. En outre, la possibilité que des cellules très voisines puissent aussi adhérer entre elles a également été testée. Aucune adhésion à la surface d'évolution n'a été, en revanche, prise en compte. Par ailleurs, pour le cas non prolifératif, plusieurs vitesses de développement ont été considérées afin d'en étudier l'hypothétique impact sur la topologie finale du tissu formé. Enfin, plusieurs taux de mitose/apoptose ainsi que différents critères pour gérer la division ou la mort cellulaire ont été testés, à savoir un processus totalement aléatoire ou un processus guidé par la mécanique en calculant l'état de contrainte globale de chaque cellule, les plus contraintes étant alors appelées à mourir tandis que les moins étant choisies pour se diviser, conformément à certaines observations expérimentales issues de la littérature (Dike et coll., 1999, et Basan et coll., 2009).

B-2-1- Effet de la vitesse de développement d'un tissu non prolifératif sur sa topologie finale

Pour le cas de la morphogenèse d'épithéliums non prolifératifs de type système folliculaire chez *Ciona Intestinalis*, un gros travail préliminaire a consisté à trouver un jeu des trois principaux paramètres – vitesse de croissance des cellules, vitesse de développement de l'œuf support et taux d'apparition de nouvelles cellules pour représenter la vitesse d'accrétion progressive constatée expérimentalement – permettant d'atteindre un nombre final de cellules proche des observations microscopiques (près de 59 cellules en moyenne). Une seule combinaison de ces trois vitesses, définissant ici une vitesse de développement du tissu (ou VDT), a permis de retrouver ce nombre final de cellules sur la sphère et a alors représenté une VDT de référence. A la fin des différentes simulations effectuées, les pourcentages de formes pentagonales, hexagonales et heptagonales dénombrés correspondaient très bien aux observations expérimentales sur *Ciona Intestinalis* : le modèle fournit en moyenne 32 % de pentagones, 62 % d'hexagones et 6 % d'heptagones, à comparer aux valeurs expérimentales respectives de 30 %, 63 % et 7 %. Numériquement, les écarts-types variaient entre 2,5 % et 6,1 % tandis qu'expérimentalement ils oscillaient entre 4,9 % et 9,4 %, ce qui là encore montre le bon accord entre les résultats issus du modèle et ceux issus des observations sur *Ciona Intestinalis* (figure 18). Fort de ces bonnes correspondances, deux autres VDT ont été testées, l'une deux fois plus importante que celle de référence et l'autre deux fois plus petite. Le nombre final obtenu de cellules recouvrant la sphère était alors de 58 pour la petite VDT et de près de 61 pour la grande, suggérant que plus la vitesse de développement du tissu augmente, moins les cellules déjà sur l'œuf ont la possibilité de croître avant l'apparition de nouvelles. De plus et dans tous les cas, les fréquences d'apparition des trois principales formes cellulaires polygonales ont été conservées, avec toutefois une petite tendance à obtenir un peu plus d'hexagones et un peu moins de pentagones pour la VDT la plus grande, et inversement pour la VDT la plus petite, le pourcentage d'apparition d'heptagones étant lui non significativement modifié. Enfin, les écarts-types trouvés pour la VDT la plus grande étaient sensiblement supérieurs à ceux issus de la VDT de référence et inversement là encore pour la VDT la plus petite. En revanche, l'activation ou non de liaisons entre cellules n'a montré aucune différence significative que ce soit en terme de nombre final de cellules que de répartition des formes polygonales observées, et ce, quelle que soit la VDT testée.

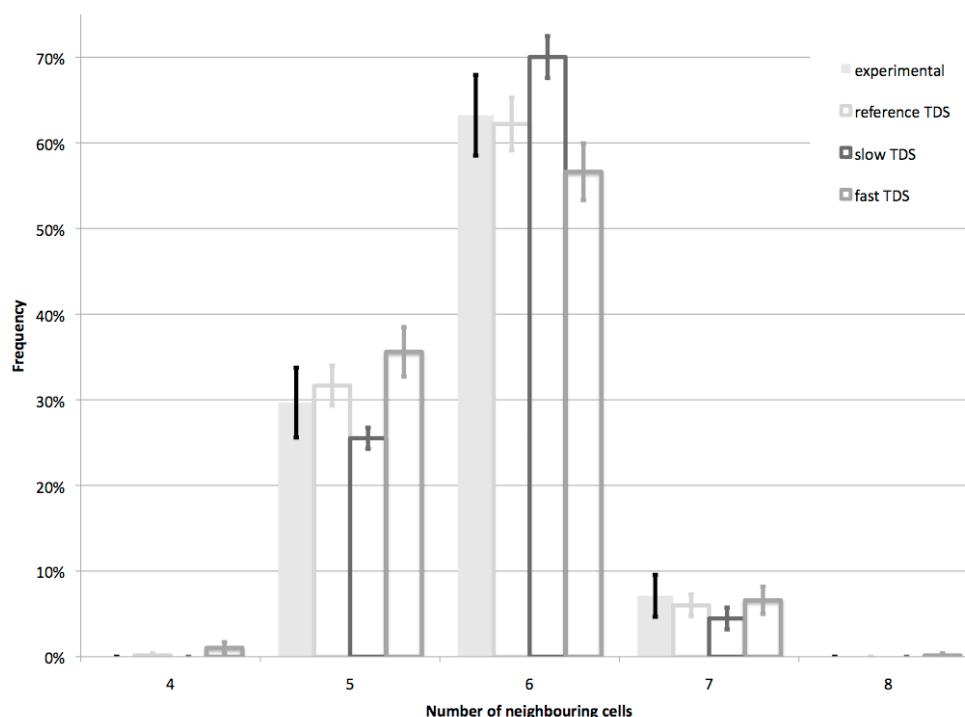


Figure 18 : Histogramme confrontant les résultats expérimentaux (barres pleines) aux numériques (barres creuses) en terme de fréquence de répartition des formes polygonales cellulaires rencontrées pour un épithélium non prolifératif (Chélin et coll., 2013)

Ainsi, un potentiel (bien que léger) effet de la vitesse de développement d'un tissu prolifératif sur sa topologie finale est prédit par le modèle, aussi bien pour le nombre de cellules que pour les répartitions des classes polygonales. En outre, la meilleure reproductibilité (plus petits écarts-types) des résultats obtenue avec la plus faible VDT laisse à penser que plus ce processus de morphogenèse s'effectue lentement, plus le tissu final pourrait atteindre un état "stable". Toutefois, ces légères différences restent à confirmer en faisant varier davantage la vitesse de développement tissulaire. Ces travaux ont été publiés dans (Chélin et coll., 2003).

Enfin, il a aussi été procédé à quelques simulations de la mise en place du système folliculaire sur des œufs d'autres espèces d'Ascidies, de plus grande taille que ceux de *Ciona Intestinalis* donc recouverts d'un plus grand nombre de cellules (respectivement environ 150 et 200 pour les deux cas testés). Les résultats prédisent (aucune étude expérimentale de la topologie de ces tissus n'avait été menée alors sur ces autres espèces) que la répartition des formes polygonales correspond exactement à celle obtenue pour une sphère recouverte d'une soixantaine de cellules et observée pour *Ciona Intestinalis*.

B-2-2- Cas des tissus prolifératifs

L'essentiel des résultats obtenus suite aux simulations de la morphogenèse d'épithéliums prolifératifs est résumé dans la figure 19 qui reprend également les résultats du cas non prolifératif avec la VDT de référence afin de comparer les deux. Pour toutes les simulations, 7 % de cellules présentes sur le substrat virtuel se divisent, correspondant à des observations des collègues de l'ISEM. Le nombre de cellules finales obtenu est de 65 pour la surface sphérique et le plan infini, et de 61 pour les surfaces planes avec conditions limites. Ces valeurs sont supérieures à celles

obtenues dans le cas non prolifératif, quelle que soit la VDT utilisée, et pourraient être dues au fait que certaines cellules venaient juste de se diviser (donc de taille plus petite) au moment de stopper la simulation dans le cas prolifératif (c'est à dire lorsque 99 % de la surface disponible est recouverte par les cellules). De plus, le fait qu'il y ait moins de cellules pour un tissu formé sur une surface carrée ou ronde que dans le cas périodique ou en l'absence de conditions limites, pourrait indiquer un possible effet de bord sur le processus de morphogenèse par augmentation du niveau de confinement au sein du tissu. En terme de répartition des formes polygonales rencontrées, quelles que soient les conditions de bords et le type de surface (sphérique ou plane) considérées, les valeurs moyennes oscillent autour de 4 % de tétraèdres, 28 % de pentagones, 43 % d'hexagones, 20 % d'heptagones et 5 % d'octogones. Il est à noter que pour les cas avec conditions limites, les cellules collées aux bords n'étaient pas prises en compte dans le décompte ; de même, pour le cas du plan infini, les cellules n'étant pas entourées de voisines n'ont pas été considérées. Ainsi, des simulations ont aussi été effectuées en considérant les plans carrés et ronds occupant une surface de moitié supérieure à la surface de la sphère (donc des plans à bords testés avant) afin de pouvoir faire le décompte des formes polygonales sur un plus grand nombre de cellules (une soixantaine environ cette fois). Les résultats se sont montrés inchangés par rapport aux précédents.

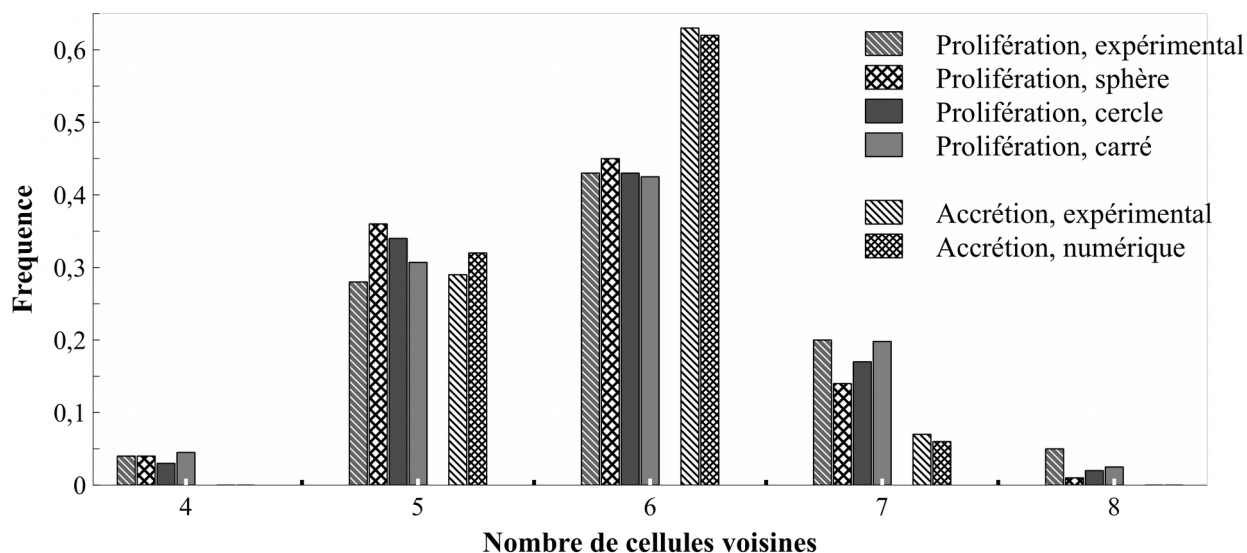


Figure 19 : Histogramme confrontant les résultats expérimentaux aux valeurs numériques en terme de fréquence de répartition des formes polygonales cellulaires rencontrées pour un épithélium prolifératif (les quatre barres de gauche pour chaque classe polygonale) considérant diverses formes du substrat et prolifératifs (noté ici “accrétion” ; les deux barres de droite pour chaque classe polygonale).

La comparaison avec les valeurs publiées par Gibson et collaborateurs (Gibson et coll., 2006), pour plusieurs espèces sauvages de plantes et d'animaux, montre un très bon accord là encore des résultats numériques avec les expérimentations. Il a toutefois été surprenant de constater que ni la présence (ou non) de bords ni la nature de la surface (sphérique ou plane) de développement n'a eu d'effet significatif. Dans les cas avec limites, tout semble se passer comme si la faculté d'adaptation géométrique et mécanique des cellules bordantes suffisait à permettre au reste du tissu de “conserver” une organisation “typique” des tissus prolifératifs. En outre, lorsque l'on procède au décompte des formes polygonales des cellules constituant la couche immédiate après les cellules bordantes, on trouve environ 32 % ($\pm 1,5\%$) de pentagones, 56 % ($\pm 4\%$) d'hexagones et 12 % ($\pm 3\%$) de heptagones, ce qui constitue un intermédiaire entre les moyennes obtenues pour les tissus prolifératifs et les non prolifératifs. Enfin, lorsque l'on étudie ces répartitions polygonales pour les

couches suivantes, c'est à dire plus “profondes” au sein du tissu, on constate qu'elles convergent très rapidement (dès la 3^e couche) vers les résultats typiques des tissus prolifératifs. Ainsi, la grande diversité de plasticité de formes et d'adaptation mécanique de couche de cellules bordantes pourrait en faire une sorte de “zone tampon” en terme de transmission de contraintes entre les bordures rigides et le reste (plus mou) du tissu lequel peut alors évoluer “plus librement”.

Par ailleurs, la comparaison des distributions obtenues en fonction du critère choisi pour la mitose et/ou l'apoptose montre quelques légères différences pour les substrats plans. Ainsi, le nombre d'hexagones est inférieur lorsque les cellules sont choisies aléatoirement pour se diviser et mourir (entre 40 et 45 %) que lorsque qu'elles sont désignées suivant le critère mécanique défini auparavant (de 45 à 50 %). De plus, un croisement des deux critères, à savoir division aléatoire avec apoptose mécaniquement dirigée ou mitose suivant le critère mécanique avec mort cellulaire aléatoire, aboutit à des résultats intermédiaires aux deux précédents. A l'inverse, le choix du critère mécanique pour division et apoptose conduit à obtenir un peu moins de pentagones et d'heptagones. En outre, les écarts-types obtenus avec un choix totalement aléatoire pour mitose et mort cellulaire sont, dans la plupart des cas, supérieurs à ceux obtenus via le critère mécanique. Ainsi, la mécanique pourrait “orienter” le processus de morphogenèse, sur la base de l'équilibre des forces, vers des configurations finales plus stables (du moins plus reproductibles) et permettant probablement de minimiser l'énergie globale, ce qui correspond à la classe hexagonale.

En outre, afin d'étudier un éventuel effet de la mort cellulaire, deux taux apoptose/mitose ont été testés, à savoir 0 (aucune apoptose) et 1/5, valeur correspondant aux observations des collègues de l'ISEM. Là encore, les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative tant sur le nombre final de cellules que sur la répartition des formes polygonales rencontrées. Toutefois, les écarts-types diminuent globalement pour un taux de 1/5 par rapport au cas sans apoptose. Ceci pourrait indiquer un effet “stabilisateur” de la mort cellulaire dans le processus de morphogenèse, en “compensation” avec le rôle “perturbateur” de la mitose. En effet, l'apoptose pourrait permettre de libérer des contraintes dans un épithélium prolifératif en croissance, rendant sa topologie finale plus reproductible tout en aboutissant à une plus grande homogénéité des contraintes au sein du tissu formé. Un article est en cours de rédaction pour reprendre l'ensemble de ces résultats sur le cas prolifératif.

Enfin, quelques tentatives de simulation d'un tissu constitué de deux familles de cellules, l'une avec un taux de prolifération “classique”, l'autre avec une vitesse de développement bien plus rapide (cas hyperprolifératif) ont été effectuées. Ces essais n'ont pas été jusqu'à la caractérisation des topologies finales rencontrées mais ont toutefois permis d'en montrer la faisabilité, ouvrant quelques perspectives intéressantes, notamment dans l'étude de la genèse de tumeurs épithéliales. Toutefois, celles-ci se forment généralement en 3D ce que ne peut représenter le modèle actuel.

Pour résumer, cette approche bien que basée sur un modèle de cellule très simpliste au regard de la réalité, semble prometteuse du fait des très bons accords entre résultats numériques et résultats expérimentaux. Il reste toutefois beaucoup de développements à effectuer afin d'améliorer le modèle, comme intégrer un cytosquelette à l'image des travaux effectués sur sa structuration (voir la partie **B-1** précédente), considérer l'adhésion cellule-matrice et mieux représenter les liens intercellulaires, passer à une approche réellement 3D, etc.

B-3- Croissance volumétrique des cartilages

Les tissus cartilagineux font partie des tissus mous fibreux, c'est à dire essentiellement constitués de

fibres (ici de collagène) associées à diverses protéines, notamment les protéoglycanes, et où les cellules occupent généralement moins de 10 % du volume tissulaire. Ils se présentent sous la forme de milieux poreux où les effets osmotiques sont importants du fait de la présence des protéoglycanes. Ils sont également pas ou très peu vascularisés ce qui implique que les nutriments arrivent jusqu'aux cellules par diffusion (échange avec les os environnants) et mouvements de fluide interstitiel, qui peuvent être perturbés par la modification des chargements mécaniques dus aux cycles jour-nuit (c'est à dire debout-couché) comme à l'activité physique (marche, course, repos...). Des défauts de nutrition sont généralement supposés être à l'origine des principales pathologies des cartilages telles que l'arthrose articulaire ou la scoliose idiopathique. Dans ce dernier cas, la pathologie est généralement diagnostiquée au début de l'adolescence et dégénère rapidement avec la croissance de la personne atteinte ce qui nécessite souvent des interventions chirurgicales lourdes et/ou la pose de corsets de maintien, ce qui s'avère généralement très contraignant, gênant voire douloureux. Pour le cas de l'arthrose, des équipes bio-médicales travaillent sur divers procédés de réparation, parmi lesquels se trouve l'idée de prélever chez un patient des cellules souches mésenchymateuses afin de générer en laboratoire, par culture cellulaire, des micro-sphères de cartilage et de les implanter directement dans la zone atteinte. Ces deux exemples cliniques montrent l'importance de mieux comprendre, pour ne pas dire maîtriser, les mécanismes régissant la croissance volumétrique des cartilages, donc d'étudier aussi ce processus d'un point de vue biomécanique pour tenter d'y déterminer le rôle des actions mécaniques. Il convient de préciser que le processus étudié ici concerne l'augmentation du volume et de la masse d'un objet biologique par synthèse et ajout de matière nouvelle en son sein, sans forcément en modifier la forme globale ni même la masse volumique globale. En effet, lorsque des cellules produisent de nouvelles fibres de collagène, celles-ci ont très probablement la même masse volumique que les fibres déjà présentes dans la matrice extracellulaire ; ainsi, l'hypothèse de travail choisie ici est que cette augmentation de masse par ajout de matière provoque une augmentation de volume sans modification de la masse volumique globale du matériau biologique.

Cette thématique a été initiée au LMGC par Dominique Ambard et Fabien Cherblanc, en se centrant sur la problématique de la scoliose idiopathique, à travers des tests de caractérisation mécanique de l'*annulus fibrosus* du disque intervertébral (DIV) et le développement d'un modèle poro-hyper-élastique du DIV (en considérant un matériau hyper-élastique néo-hookéen de type Holzapfel-Gasser-Ogden ou HGO) capable de représenter les phénomènes chimio-osmotiques qui y résident et fournissant des prédictions en termes de flux de diffusion et de convection en son sein. Suite à l'arrivée de Simon Le Floch et au recrutement de Gilles Dusfour en thèse de doctorat, cette thématique, dans laquelle je me suis alors intégré, s'est grandement renforcée dans l'équipe. A travers des collaborations avec des praticiens hospitaliers, d'une part, et avec des biologistes spécialistes de la croissance des cartilages, d'autre part, des modèles *ex vivo* (DIV) et *in vitro* (micro-sphères de cartilages ou micropellets, qui constituent à ce jour un modèle vivant de néo-cartilage hyalin articulaire) sont désormais disponibles pour nos travaux. Enfin, l'intégration récente de Pascale Royer dans cette thématique laisse espérer un renforcement des aspects mécaniques théoriques pour les modélisations associées dans un contexte multiphasique avec changement d'échelles.

Cette partie est donc divisée en deux, avec d'abord une présentation des travaux auxquels j'ai participé sur le disque intervertébral puis avec un exposé des activités sur les micropellets, le tout suivi d'une courte synthèse sur la biomécanique de la croissance des cartilages.

B-3-1 Croissance du disque intervertébral

Ma contribution dans cette thématique a été de participer à l'étude des contraintes de croissance et à la modélisation de la croissance assortie de la simulation de la coupure d'*annulus fibrosus*.

1) Modèle de croissance d'*annulus fibrosus* avec prise en compte d'un gradient de nutriments

C'est à l'occasion du co-encadrement, avec Simon Le Floc'h et Dominique Ambard, de Virginie Cardin en stage de 2^e année de Master de Mécanique, qu'a été menée la première tentative de simuler un processus de "croissance" de tissu mou au sein de l'équipe. Pour cela, un modèle mécanique 2D hyper-élastique de type Holzapfel-Gasser-Ogden (HGO) a été utilisé. Celui-ci avait été renforcé auparavant (Dominique Ambard) en ajoutant des aspects multi-physiques, notamment le caractère thermo-dilatant du matériau. Ainsi, dans cette première approche, il ne s'agissait pas à proprement parler de simuler une réelle croissance volumétrique (voir introduction de cette partie B-3) mais de représenter celle-ci par une dilatation (entraînant donc une diminution de la masse volumique globale). L'objectif premier était alors de vérifier la faisabilité de ces simulations, à partir d'un modèle "basique", avec le code *lmgc90*.

En outre, en "détournant" le caractère thermo-dilatant du modèle utilisé, des flux de nutriments ont été pris en compte à travers des flux thermiques correspondants. En effet, une hypothèse retenue pour expliquer l'existence de contraintes résiduelles au sein d'un tissu biologique est de considérer qu'une croissance volumétrique asymétrique, ou tout au moins non homogène, pourrait générer des contraintes internes au matériau biologique (d'où la notion de contraintes de croissance), notamment dans le cas où celui-ci conserverait sa forme globale. Dans le cas des cartilages, du fait des flux de diffusion et de convection qui y résident en fonction des variations de chargement mécanique subit par l'organe, il se pourrait qu'il existe en son sein des gradients de concentration de nutriments. Ainsi, certains chondrocytes pourraient avoir à disposition une grande quantité de substances vitales dans certaines régions tandis que d'autres cellules pourraient être en présence de quantités moindres dans d'autres zones. Ceci pourrait amener à différents niveaux d'activité cellulaire dont différentes quantités de nouveau collagène produit. Ces fibres accumulant à celles déjà présentes dans l'organe et celui-ci conservant globalement sa forme au cours de sa croissance, des gradients de contraintes pourraient alors être générés en son sein pendant ce processus. Ceci pourrait alors expliquer l'ouverture de tissus à la suite d'une coupure comme cela avait déjà été observé dans divers travaux portant sur les parois artérielles, la peau, etc., trouvés dans la littérature. Dans le cas des artères, il est aisé de supposer que les couches les plus internes (intima et media) reçoivent plus de nutriments (par contact direct avec le sang qui circule) que la couche la plus externe (adventice) ce qui pourrait expliquer que l'intima serait dans un état de compression (notamment circonférentielle) supérieure à celui de l'adventice, ou dans un état de tension inférieur à celui de la couche externe, ou encore que l'intima serait en compression et l'adventice en tension, d'où les ouvertures observées. Dans le cas de l'*annulus fibrosus*, l'hypothèse des travaux présents est que les nutriments arrivent principalement par le *nucleus pulposus* (par diffusion depuis les plateaux vertébraux) et qu'ils sont aussi propagés au sein de l'organe de façon radiale (flux de convection) depuis l'intérieur vers l'extérieur. Ainsi, il existerait là encore un gradient de concentrations de nutriments, des quantités les plus importantes au cœur du DIV jusqu'aux plus faibles vers les parties externes de l'*annulus fibrosus*. Il semble par ailleurs, d'après la littérature, que la croissance de ce fibrocartilage soit plus importante à l'intérieur qu'à l'extérieur, ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une "meilleure" nutrition des chondrocytes proches du *nucleus pulposus* que de ceux se trouvant près de la frontière externe du DIV.

Les simulations ont donc consisté en l'application, sur des demi-disques creux (en considérant des conditions de symétrie aux deux extrémités), de flux "thermiques" pour représenter ces potentiels flux de matière, suite à quoi le modèle se dilatait en cas de flux positifs (croissance) ou se contractait pour des flux négatifs (décroissance ou atrophie). De plus, lorsque le gradient était dirigé

vers l'extérieur du modèle (c'est à dire les plus fortes valeurs de "température" au centre), alors l'intérieur du modèle apparaissait en compression circonférentielle tandis que l'extérieur était en tension (figure 20). Le résultat opposé était obtenu en inversant le sens du flux. A la suite de ces calculs numériques, il a été procédé à la simulation de la coupure du tissu en libérant l'une des deux extrémités et, comme attendu, une ouverture était observée pour un gradient dirigé vers l'extérieur et une fermeture dans le cas inverse.

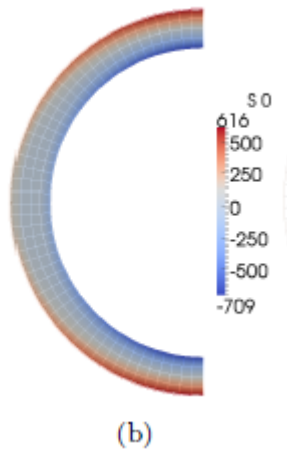


Figure 20 : Répartition des contraintes circonférentielles au sein du modèle de tissu en croissance pour un gradient dirigé vers l'extérieur. Le code couleur indique en rouge les tensions et en bleu les compressions.

Bien que ces simulations ne représentent pas une réelle croissance volumétrique par ajout de matière, les résultats obtenus semblent indiquer que les hypothèses retenues en termes de gradients ou flux de nutriments disponibles pour les cellules pourraient expliquer une croissance non homogène de l'*annulus fibrosus*, résultant en la génération d'un gradient de contraintes de croissance en son sein, générant son ouverture après une coupure. Toutefois, cette ouverture par libération des contraintes n'avait pas encore été observée expérimentalement ; ceci a été l'objet d'un travail initié par la suite et présenté dans le paragraphe suivant.

2) Étude des contraintes de croissance dans l'annulus fibrosus

Ces travaux ont débuté à l'occasion d'un autre stage de 2^e année de Master de Mécanique (Raphaël Lung-Soong) où il s'agissait de mettre en place un calcul analytique et une procédure numérique pour remonter aux contraintes résiduelles en simulant la fermeture d'échantillons préalablement coupés et supposés libres de contraintes en configuration ouverte. Cette procédure numérique a été depuis améliorée et est utilisée par Gilles Dusfour pour estimer la répartition de contraintes internes après fermeture. Pour ce faire, 6 DIV porcins ont été prélevés en utilisant un système de double lames parallèles afin d'obtenir des échantillons les plus fins et plans possibles. Une coupure nette est alors réalisée sous enregistrement vidéo afin de suivre la cinématique d'ouverture par corrélation d'images, et ce, jusqu'à ce que l'ouverture se stabilise. Un modèle est ensuite numérisé en considérant la géométrie de l'échantillon ouvert et une simulation EF de la fermeture effectuée (avec le code *lmgc90*) en prenant en compte les déplacements des nœuds enregistrés par la vidéo (ainsi que la configuration non coupée) et en considérant de nouveau un matériau hyper-élastique néo-hookéen de type HGO. Il est alors possible d'obtenir une cartographie des déformations et des contraintes une fois la fermeture achevée, comme illustré en figure 21. Il est intéressant de noter que les contraintes circonférentielles positives (tensions, en rouge) se situent dans des zones parmi les plus externes de l'*annulus fibrosus* et que les négatives (compressions, en bleu) se trouvent essentiellement dans des zones internes, proches du *nucleus pulposus*, ce qui est en accord avec les hypothèses exposées dans les paragraphes précédents. Un article reprenant ces résultats est en cours de rédaction pour être soumis courant 2017.

Ces premiers résultats semblent prometteurs mais restent encore à confirmer par des expérimentations supplémentaires. En outre, le suivi actuel de la cinématique d'ouverture ainsi que le modèle numérique utilisé sont actuellement 2D tandis que quelques effets 3D sont visibles (quelques régions du DIV coupées se déplacent aussi hors plan). Au-delà, il y a peu de chance que la genèse de contraintes de croissance ne se fasse que dans un plan ; celles-ci sont très probablement tridimensionnelles. Il apparaît donc important de passer à des études en 3D ce qui est actuellement envisagé mais se heurte pour le moment à des difficultés techniques. L'utilisation de deux caméras, synchronisées, perpendiculaires entre elles devrait permettre de résoudre ce problème. L'utilisation de l'IRM a aussi été envisagée mais les temps d'imagerie sont probablement trop longs pour pouvoir suivre la cinématique d'ouverture, tout au moins les premiers instants (la vitesse d'ouverture décroît avec le temps jusqu'à une valeur nulle). Toutefois, cette technique pourrait permettre d'obtenir des images plus précises des configurations extrêmes, c'est à dire avant coupure et une fois l'ouverture stabilisée.

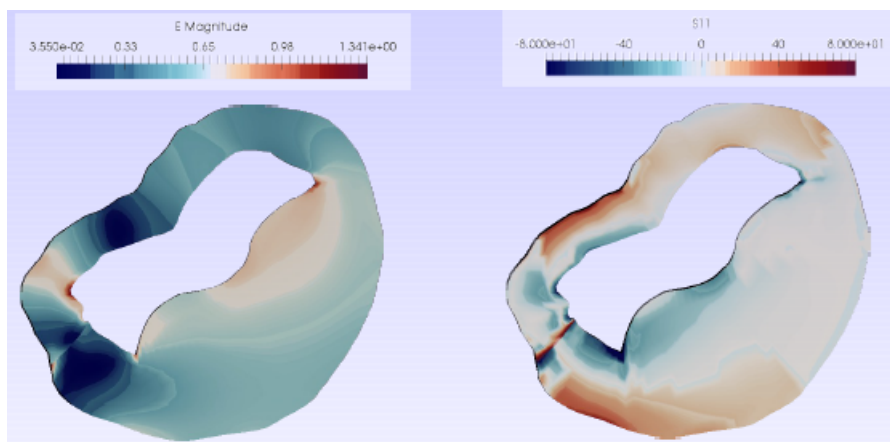


Figure 21 : Visualisation des déformations (à gauche) et des contraintes de Von Mises (à droite) en MPa pour un modèle de DIV porcin numériquement refermé après coupure. Celle-ci avait été effectuée vers le coin en bas à gauche du DIV d'où la concentration de contraintes et de déformations observée après fermeture et "soudure".

B-3-2- Croissance de modèles *in vitro* de micropellets de cartilages

Comme indiqué dans le paragraphe **A-1-2-1) (iii)**), les collègues de l'IRMB, avec lesquels une collaboration a débuté il y a un peu moins d'un an, génèrent des micro-sphères de cartilages par des techniques de culture cellulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses (CSM) différenciées en chondrocytes. Dans ce modèle, les CSM se regroupent tout d'abord en une condensation cellulaire après centrifugation des cellules (correspondant probablement à une phase initiale de morphogenèse ; jours 1 à 2 de culture) puis commencent à se différencier et sécrètent la matrice extracellulaire du cartilage caractérisée par l'induction de marqueurs spécifiques (Sox9, collagène de type II, Aggrécane, link-protein ; jours 10 à 21). Sur les temps tardifs (jours 14 à 21), une différenciation terminale est observée avec l'augmentation de marqueurs caractéristiques du stade hypertrophique (collagène de type X, MMP13, VEGF, phosphatase alcaline). Ce modèle de micropellets permet donc de reproduire les stades embryonnaires de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes et la formation de cartilage au niveau des futures articulations qui sont les étapes observées lors du développement des membres. L'intérêt de ce modèle est qu'il permet de reproduire la croissance du cartilage articulaire après induction par le TGF β 3 mais il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance pour stimuler cette

différenciation, comme par exemple FGF9. De plus, en fonction du cocktail de molécules inductrices ajoutées dans le milieu de culture, il peut favoriser la formation de cartilage hypertrophique (addition de l'hormone thyroïdienne 3,3',5-triiodo-L-thyronine T3) et même de cartilage de type disque intervertébral (phénotype des cellules du *nucleus pulposus* par addition de TGF β 1 et GDF5). A la fin des 3 semaines de culture, les micropellets ont actuellement une taille légèrement inférieure au millimètre. Toutefois, bien que les actions mécaniques soient reconnues pour jouer un rôle fondamental dans les processus de croissance, les micropellets actuelles sont formées sans application de chargement mécanique (en dehors de la gravité, partiellement compensée par la poussée d'Archimède et les forces visqueuses du milieu de culture). Au-delà, il semble qu'aucune des études publiées à ce jour dans ce domaine ne concerne les aspects biomécaniques liés. Ainsi, il est apparu particulièrement intéressant de solliciter mécaniquement les micropellets au cours de leur croissance pour tenter d'étudier les rôles spécifiques et croisés des déformations mécaniques et des facteurs de croissance dans la formation des cartilages, voire tenter d'optimiser le processus de croissance des micropellets. En effet, il peut être espéré d'une part que ces efforts mécaniques pourraient induire des voies de signalisation intracellulaire (mécanotransduction) et, d'autre part, d'optimiser la diffusion des nutriments aux cellules les plus centrales par les déformations de la micropellet. Un travail de choix de solution et de conception d'un dispositif remplissant ce rôle a donc été effectué par Pape Momar Sy au cours de son stage de 1^e année.

Pour ce faire, diverses contraintes et obligations ont été identifiées avant de définir des solutions possibles. Tout d'abord, les sollicitations doivent pouvoir s'effectuer tout au long des 3 semaines de culture, avec des niveaux de déformations visés de l'ordre de 10 à 15 % (ce qui exclut des techniques d'indentation de type AFM), au sein d'un incubateur (490 X 523 X 665 mm pour l'intérieur), contrôlé en température (37°C), taux de CO₂ (5 %) et d'humidité (95 %). Ensuite, le milieu de culture contenant les micro-sphères de cartilages ne doit pas être contaminé (le dispositif doit pouvoir être stérilisé et fabriqué dans des matériaux compatibles avec la culture cellulaire) tout en lui laissant la possibilité d'être renouvelé tous les trois jours. Autrement dit, les micropellets doivent pouvoir être facilement introduites et extraites du dispositif et/ou le dispositif doit permettre la vidange totale du milieu de culture pour être remplacé sans que les micro-sphères ne soient elles-mêmes accidentellement évacuées, dans un poste de sécurité microbiologique ou PSM (hotte). De plus, les conditions de culture excluent toute adhésion des cellules aux parois des contenants utilisés ; les seules adhésions autorisées sont les jonctions intercellulaires ainsi que l'adhésion des cellules aux fibres de collagènes sécrétées au sein de la micropellet. Ceci écarte donc des techniques de micromanipulation cellulaire utilisant des sondes fonctionnalisées telles que la magnétocytométrie ou les pinces optiques. En outre, il est souhaité que les efforts mécaniques produits par le dispositif puissent être ressentis similairement par l'ensemble des cellules présentes dans la micro-sphère. Ceci exclue donc aussi des techniques de type microplaques car les contraintes ressenties seraient très importantes dans les zones de contact et beaucoup plus faibles dans les autres zones, notamment au cœur de la micropellet.

Deux principes de solution ont ainsi été retenus : l'un basé sur la centrifugation et l'autre basé sur la microfluidique. La première solution semble être, en théorie, la mieux adaptée à la problématique, notamment par le fait que les efforts seraient quasi également ressentis par les cellules. Toutefois, elle apparaît très difficile à mettre en œuvre en pratique, dans la mesure où les accélérations à produire dépasseraient de très loin la limite de 600 G (soient près de 3768 rad/s) au-delà de laquelle les cellules risquent d'être détériorées. De plus, il est aussi souhaité de visualiser (à l'aide d'une caméra) les micropellets en cours de sollicitation afin d'en évaluer les déformations, non seulement pour contrôler qu'elles subissent bien autour de 10 % de déformation mais aussi afin de pouvoir remonter aux propriétés mécaniques (à partir de la corrélation d'images). Mieux encore, il est espéré

de pouvoir suivre l'évolution de la taille et des propriétés mécaniques au cours des trois semaines de culture. En outre, la solution par centrifugation ne permet pas de mimer les types d'efforts que subissent les cartilages articulaires, essentiellement de la compression et du cisaillement. C'est pour l'ensemble de ces raisons que la centrifugation a, pour le moment, été mise de côté.

Ainsi et en utilisant le fait que les micropellets sont constamment immergés dans leur milieu de culture, un dispositif de type microfluidique a été pensé (figure 22). Le principe est simple : il s'agit de mettre en écoulement le liquide contenant les micropellets et de les faire passer par un Venturi afin de les y déformer au passage, de façon répétée pour que les zones de contact entre la micropellet et les parois changent à chaque passage dans le rétrécissement, permettant à l'ensemble des cellules d'être similairement sollicitées. Il est à noter qu'il est possible que, dans les premiers jours de culture, les pellets ne soient pas suffisamment rigides et puissent passer de part et d'autre du rétrécissement ; il est ainsi prévu de les soumettre à des cycles "allers-retours". A l'inverse, au bout de plusieurs jours/semaines de culture, ces mêmes pellets seront probablement assez rigides pour ne pas pouvoir traverser le Venturi ; il est alors prévu de les soumettre à des cycles de "poussée-aspiration". Dans les deux cas, il est ainsi espéré que ces pellets tournent sur elles-mêmes entre deux passages dans le rétrécissement. En outre, ce type de dispositif permet de soumettre les pellets à des efforts de compression et de cisaillement en même temps. Un prototype destiné à solliciter une seule micro-sphère de cartilage a ainsi été conçu, fabriqué et est actuellement en phase d'expérimentation afin de vérifier la faisabilité et la viabilité (pas de fuite, etc.) de cette solution, et d'envisager un dispositif capable de solliciter plusieurs micropellets simultanément (pour chaque condition de culture, 7 micro-sphères sont considérées afin d'effectuer ensuite une analyse statistique). Par ailleurs, ces dispositifs (le prototype actuel et le multi-pellets final) sont alimentés par une pompe péristaltique à galets (pour éviter de contaminer le milieu de culture) et possèdent une vitre au niveau du Venturi afin de pouvoir visualiser les déformations des pellets et, à l'aide de la corrélation d'images, de remonter jusqu'à leurs propriétés mécaniques.

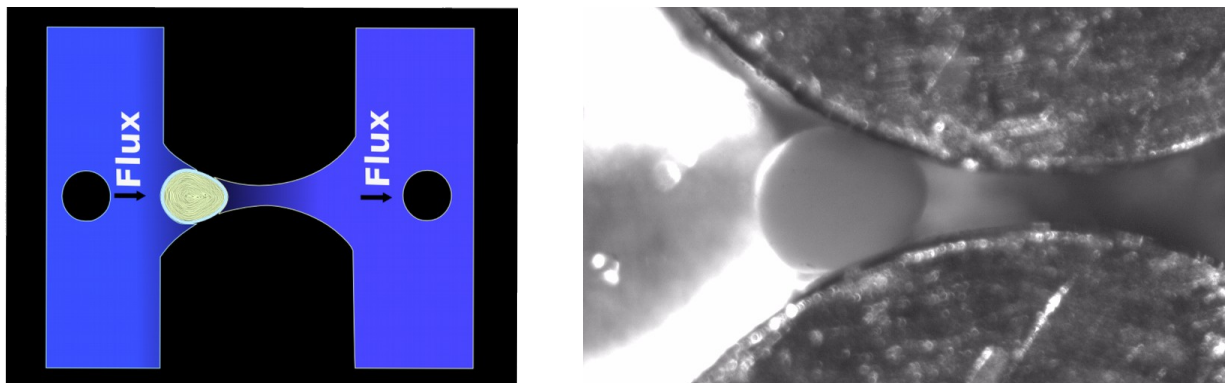


Figure 22 : Schéma de la solution retenue (à gauche) avec, en noir, la pellet non déformée avant passage dans le venturi et en jaune cette même pellet déformée par le Venturi. A droite, photographie d'une pellet dans le prototype actuellement en phase d'essais.

A terme, il est également prévu de procéder à une lésion de certaines micropellets une fois formées afin de tenter de remonter à d'éventuelles contraintes de croissance, à l'image des coupures effectuées sur les échantillons d'*annulus fibrosus*.

B-3-3 Synthèse/perspectives – biomécanique de la croissance des cartilages

A l'aide des collaborations développées ces dernières années avec des biologistes experts dans la

croissance des cartilages et des praticiens hospitaliers spécialisés dans les pathologies associées (arthrose et scoliose, principalement), les travaux portant sur la croissance des cartilages se sont fortement intensifiés au sein de l'équipe BIOTIC du LMGC. Ce qui est remarquable, à mes yeux, c'est que nous disposons désormais non seulement de modèles biologiques *ex vivo* mais aussi, depuis peu, de modèles *in vitro*. En outre, grâce aux travaux de Dominique Ambard, une modélisation poro-hyper-élastique intégrant des aspects multi-physiques (effets chimio-osmotiques, etc.) est disponible. En outre, les fortes interactions avec les collègues de la plateforme d'imagerie BioNanoMRI de l'Université de Montpellier nous offrent, avec l'utilisation du dispositif de sollicitations sous IRM, la possibilité de "définitivement" valider ce modèle avant d'y intégrer un processus de croissance. Pour cela, il est prévu d'utiliser les enseignements tirés du modèle 2D de croissance volumétrique en fonction du gradient de nutriments présent. De plus, le modèle devrait pouvoir être enrichi grâce aux activités menées sur la détermination des contraintes résiduelles d'*annulus fibrosus*. Par ailleurs, les travaux démarrés cette année sur les micropellets devraient s'avérer précieux de par l'utilisation d'un modèle expérimental de croissance de cartilages sur lequel il sera possible d'agir non seulement biochimiquement (facteurs de croissance) mais aussi mécaniquement. Il est ainsi attendu d'effectuer des "allers-retours constructeurs" entre les modèles *ex-vivo* de DIV et *in vitro* de néo-cartilage, de sorte qu'il est espéré d'atteindre le principal objectif fixé ici, à savoir de caractériser qualitativement (et si possible quantitativement) le rôle exact des actions mécaniques dans le processus de croissance des cartilages, incluant la genèse de contraintes de croissance. Au-delà et en fonction des possibles réussites futures sur ce thème, il se pourrait que nous parvenions à proposer des éléments de réponse pertinents permettant d'expliquer certains dérèglements de cette croissance (notamment pour le cas de la scoliose idiopathique) voire certains processus dégénératifs (tels que l'arthrose). Enfin, si les avancées espérées s'avèrent suffisamment importantes, ces travaux pourraient aussi servir à aider à la prévention de ces pathologies, à améliorer la précocité de leur diagnostic et/ou à enrichir la prise en charge thérapeutique des patients.

B-4- Remodelage osseux

Les os, sont des organes en constante évolution dont la structure interne subit un processus d'adaptation en fonction des actions mécaniques qu'ils supportent suivant des cycles de construction et de destruction. C'est en particulier le cas des os longs des membres inférieurs bien que ce phénomène soit aussi observable pour les autres tissus osseux. Ce processus aux effets visibles à l'échelle du tissu (de l'ordre du millimètre) serait en fait issu de l'action des cellules présentes dans l'os. Pour résumer l'hypothèse la plus généralement admise pour décrire le remodelage osseux, les ostéocytes perçoivent, directement ou indirectement (voir paragraphe suivant), des variations dans les chargements mécaniques appliqués à l'échelle de l'organe (essentiellement les effets dus à la gravité ainsi que les actions des muscles attachés à l'os). Ils envoient alors des signaux (probablement biochimiques) aux ostéoclastes qui vont résorber le tissu anciennement formé ; une fois la lacune formée, les ostéoclastes entrent en apoptose ; les ostéoblastes interviennent alors pour fabriquer de l'os nouveau, lequel se cristallise ensuite par l'action du calcium tandis que les ostéoblastes semblent se différencier en ostéocytes. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant au type de signaux perçus par les ostéocytes sans qu'aucune évidence expérimentale n'ait permis de réellement et objectivement distinguer certaines plus que d'autres : perturbations de l'environnement biochimique dues aux variations de chargement mécanique à l'échelle organique, transmission directe de ces actions mécaniques via la matrice solide, mouvements de fluides (pouvant, d'ailleurs, entraîner des modifications dans l'équilibre ionique au niveau de la frontière fluide/solide), variations de la pression du fluide interstitiel, etc.

Au démarrage de la thèse de doctorat d'Étienne Malachanne, il a été décidé de tester l'hypothèse portant sur l'effet potentiel des mouvements du fluide dans lequel est immergée la matrice solide. Pour ce faire, le choix s'est porté sur un travail de modélisation mécanique de l'os par un milieu poroélastique suivant la théorie de Biot et considérant la vitesse de Darcy pour représenter les mouvements de fluides, ainsi que de simulations numériques associées. Le modèle a permis de retrouver des résultats expérimentaux issus de la littérature et prédit une sensibilité à la fréquence de chargement avec un optimum en terme de taux de remodelage pour une gamme comprise entre 5 et 10 Hz (Malachanne et coll., 2011). Ma participation dans ce thème a surtout concerné le travail expérimental décrit dans la partie **A-1-2-2**). Toutefois, j'ai également pu aider à tenter de mettre en relation un effet potentiel de la fréquence de chargement (via la vitesse de Darcy) à l'échelle du VER du modèle (de l'ordre du millimètre) avec des observations expérimentales trouvées dans la littérature sur l'activation potentielle de cellules osseuses pour des fréquences du même ordre de grandeur.

A l'issue de ce travail de thèse d'Étienne Malachanne, les activités tournant autour du remodelage osseux se sont peu à peu arrêtées au LMGC.

C- Substrats artificiels pour l'ingénierie tissulaire

Un projet vient de débiter par un PEPS de l'INSIS du CNRS (appel à projets exploratoires 2016), porté par Jean-Louis Milan (ISM, UMR 7287 CNRS/Aix-Marseille Université) et auquel participons Jérôme Sohier et Romain Debret (LBTI, UMR5305 CNRS/Université Claude Bernard de Lyon) ainsi que, côté LMGC, Christiane Wagner-Kocher (de l'Université de Haute Alsace et actuellement en délégation au LMGC), Pascale Royer et moi-même. L'objectif est ici de recréer, pour l'ingénierie tissulaire, un environnement cellulaire proche de la structure fibreuse de la matrice extracellulaire à l'aide de substrats nano-fibrillaires issus d'une technique novatrice. Celle-ci est basée sur la diffraction et la projection de solutions de polymères par un flux d'air ("jet spraying") résultant en la précipitation de fibres de divers polymères pouvant être biodégradables et biocompatibles tels que les poly(α -hydroxyesters), poly(ϵ -caprolactone) et poly(éthers esters). Elle permet ainsi d'obtenir de façon reproductible des nanofibres polymériques de diamètres variables et ajustables de 300 nm à 4 μ m, englobant donc le diamètre moyen des fibres de collagène (600 nm). En outre, le contrôle de la densité en fibres permet de faire varier la porosité globale de la matrice de 70 % à 99 %. Les substrats fibreux obtenus ressemblent alors à une "membrane" d'une épaisseur de l'ordre du millimètre. Ils se présentent sous la forme d'un réseau 3D fibrillaire, de structure ouverte et de porosité élevée, permettant l'infiltration et la colonisation par des cellules, contrairement à d'autres techniques telles que l'"electrospinning". De plus, les matrices produites supportent la synthèse de MEC minéralisée *in vitro* et la formation de tissu *in vivo*. Ces substrats fibreux pourraient donc proposer un environnement mécanique 3D proche de celui que voit la cellule dans la matrice extracellulaire native en s'accrochant aux fibres constitutives. Toutefois, il semble qu'aucune étude concernant les propriétés mécaniques, tant macroscopiques qu'à l'échelle cellulaire, n'ait été publiée à ce jour. L'idée est donc ici de déterminer le comportement mécanique global de ces substrats fibreux et de tenter de remonter jusqu'à la caractérisation de l'environnement mécanique d'une cellule qui y serait immergée. Ceci permettrait ainsi de vérifier la biocompatibilité de telles matrices artificielles et de proposer des pistes d'amélioration du processus de formation de ces substrats.

Pour ce faire, il est prévu d'effectuer au LMGC des tests expérimentaux sur des éprouvettes issues de ces tissus artificiels et d'y accoler une analyse sur la base d'un modèle mécanique adapté (milieux fibreux, milieux poreux, passage d'échelles...). Ceci devrait permettre d'alimenter un modèle de cellules dans un réseau de fibres, développé par l'équipe de Marseille, afin d'analyser l'influence de

la topographie nano-fibrillaire sur la forme et le tonus cellulaire. A terme, il est aussi envisagé de proposer une modélisation à une échelle légèrement plus large pour étudier l'effet de cette topologie fibreuse sur la prolifération/différentiation cellulaire en se basant sur le modèle de morphogenèse présenté dans la partie **B-2**. Au moment où s'écrivent ces lignes, des tests préliminaires ont été effectués sur quelques échantillons de substrats produits à Lyon (traction simple, traction jusqu'à rupture, cycles de traction/relâchement, relaxation). Les essais de traction simple sont actuellement en cours d'analyse et semblent montrer un module apparent de l'ordre de 150-200 kPa, ce qui correspond à ce qui est généralement observé pour des cartilages non matures. De plus, il a été observé que ces substrats sont finalement très peu élastiques et plutôt plastiques (pas de retour à part peut-être pour d'extrêmement faibles déformations globales). Ainsi, bien qu'à ce jour les données expérimentales n'ont pas toutes été exploitées et que les protocoles expérimentaux sont encore à affiner, ces tests préliminaires ont permis de montrer la faisabilité de ces expérimentations au LMGC. En outre, un premier modèle de cellule adhérent à un réseau 3D de fibres a d'ores et déjà été mis au point par l'équipe de Marseille. Enfin, la culture de cellules sur ces substrats est en train d'être affinée par le groupe de Lyon. Le PEPS s'est donc avéré fructueux, mettant en évidence la bonne articulation entre les acteurs de ce projet, son bien-fondé ainsi que sa mise en œuvre pratique. Une demande de financement vient ainsi d'être déposée à l'ANR, portée là encore par J-L Milan.

D- Bilan, perspectives, projet

Les parties A et B de ce chapitre "volet recherche" présentent l'essentiel des travaux que j'ai effectués (ou auxquels j'ai participé) depuis mon entrée dans le monde de la recherche académique, en biomécanique, en stage de DEA puis surtout en thèse en 1999, tandis que la partie C présente un projet venant de démarrer. J'ai ainsi travaillé en biomécanique cellulaire tout en intégrant progressivement l'échelle du tissu, d'abord par celle de monocouches épithéliales de dimensions restreintes (quelques dizaines de cellules) puis à un niveau supérieur notamment pour l'os et les cartilages. Je me suis surtout intéressé à deux aspects concernant ces cellules et tissus, à savoir l'analyse de leurs comportements mécaniques spécifiques ainsi que l'étude de certains de leurs principaux modes d'évolution respectifs (mise en place des structures cytosquelettiques, assemblages cellulaires en tissus épithéliaux, remodelage osseux, croissance volumétrique des cartilages).

Au niveau cellulaire, mes travaux ont d'abord permis de conforter le concept de viscoélasticité structurale du CSQ grâce au modèle de tenségrité que j'ai développé en thèse, notamment par le bon accord des résultats numériques avec les observations expérimentales, tant quantitativement (en particulier en conditions quasi-statiques) que qualitativement (comportement viscoélastique non linéaire, effets de la tension interne, du nombre d'éléments structuraux et de leur longueur ainsi que de la fréquence de chargement). De plus, mes activités ont permis de proposer des pistes pour développer des modèles structuraux très réalistes de cytosquelette, générés et structurés en fonction des conditions d'adhésion et d'étalement cellulaire à un substrat. En outre, la modélisation par milieux divisés a aussi permis de renforcer l'hypothèse d'un rôle majeur joué par la mécanique sur les processus de morphogenèse épithéliale, notamment l'équilibre mécanique individuel de chaque cellule constituante (par une probable balance entre efforts de compression et de tension) associé aux interactions mécaniques entre cellules jointives (notamment de type répulsion).

Au niveau des tissus fibreux, j'ai pu participer à la mise en place d'expériences et de modélisations associées devant permettre d'étudier le rôle de la phase fluide dans le processus de remodelage osseux, de remonter aux contraintes de croissance au sein des cartilages, de mieux caractériser les propriétés poroélastiques et d'analyser le rôle des sollicitations mécaniques dans leur processus

de croissance. En particulier, le modèle de remodelage osseux permet de retrouver des résultats expérimentaux issus de la littérature, à savoir un effet de la fréquence de chargement mécanique sur l'évolution du taux de remodelage. En outre, le modèle de croissance cartilagineuse en fonction d'un gradient de nutriments est en accord avec les observations sur les différences de zones de croissances au sein du disque intervertébral et permet de retrouver son ouverture par génération de contraintes internes au cours de sa croissance, là encore en accord avec les expérimentations mises en place pour déterminer ces contraintes de croissance à partir de coupures d'*annulus fibrosus*. Par ailleurs, les premiers tests effectués sur les micropellets confirment le bien-fondé de ces modèles *in vitro* de néo-cartilages.

Au final, ces travaux dans leur ensemble peuvent être vus comme tout autant de portes ouvertes par des approches parfois originales et souvent prometteuses (modélisation mécanique du cytosquelette par structures de tenségrité viscoélastiques ; modélisation numérique de structures de tenségrité en “détournant” un outil avant tout dédié aux milieux granulaires ; modèles cellulaires – incluant ceux destinés à simuler la morphogenèse épithéliale – basés sur les milieux divisés ; imagerie par RMN pour préciser certaines propriétés de modèles *ex vivo* de DIV et instrumentation du banc IRM pour explorer ces aspects poroélastiques sous divers chargements mécaniques ; méthode couplant expérimentations et simulations numériques pour déterminer les contraintes de croissance au sein de l'*annulus fibrosus* ; modèle *in vitro* de micropellets et sollicitations mécaniques en cours de croissance ; “dialogue” entre les deux modèles (*ex vivo* de disque intervertébral et *in vitro* de pellets) ; modélisations de la croissance volumétrique des cartilages ; optimisation de substrats artificiels pour l'ingénierie tissulaire...). En prenant une image sportive, on pourrait dire que plusieurs essais ont été marqués et qu'il convient maintenant de les transformer. Ce qui suit représente précisément quelques pistes que je propose pour faire suite à ces travaux passés et présents. Cet ensemble de propositions trouve une cohérence tant du point de vue de l'étude du comportement mécanique pur que de celui de l'analyse des processus d'évolution que sont la mise en place des structures cellulaires, la morphogenèse et la croissance volumétrique. De plus, chacun de ces deux aspects peut s'avérer nourricier pour l'autre, tant les propriétés mécaniques d'un système biologique dépendent fortement de ses évolutions biologiques passées et présentes, et tant les processus d'évolution sont également très influencés par la mécanique propre aux cellules et aux tissus. Ces suggestions sont présentées ci-après en distinguant les aspects cellulaires (y inclus les épithéliums) de ceux touchant aux tissus. Finalement, cet assemblage de pistes à suivre peut aussi être vu comme l'ébauche d'un projet de recherches à moyen et long termes.

D-1- Biomécanique des cellules et de leurs assemblages

D-1-1- Modèle de cellule unique

Les modèles cellulaires basés sur le concept de tenségrité ont fait leurs preuves, y compris par mes travaux, quant à leur capacité à reproduire de nombreuses caractéristiques du comportement mécanique complexe des cellules adhérentes animales, en lien avec les conditions d'adhésion et de chargement mécanique externe ainsi qu'avec la tension interne du cytosquelette et les aspects architecturaux connexes. Toutefois, le faible nombre d'éléments constitutifs au regard de la réalité du cytosquelette ainsi que leur structure “figée”, c'est à dire la non prise en compte des évolutions des connexions entre filaments du CSQ et la non considération des processus de polymérisation et dépolymérisation qu'ils subissent, sont une limite importante dans la poursuite du développement de modèles de tenségrité réellement bio-réalistes. Pour y remédier, une première étape a été franchie par le modèle granulaire de structuration du cytosquelette, montrant la faisabilité de retrouver un système beaucoup plus complexe de réseaux de tensions et de compressions, à l'organisation architecturale très proche des observations microscopiques sur les assemblages d'actine et de

microtubules. Cette approche s'est donc avérée très prometteuse et mérite d'être poursuivie. Pour cela, de nombreux développements restent encore à effectuer :

Le premier concerne l'amélioration du non pilotage de la structuration du cytosquelette. En effet, bien que la particularité de ce modèle soit de laisser une structure se former sans décider au préalable de son organisation architecturale, il est clair que sa forme finale dépend tout de même forcément du "maillage", c'est à dire de la position initiale des grains du modèle ainsi que des interactions à distance possibles, pré-définies au début de chaque simulation. Une idée serait que les grains soient initialement disposés aléatoirement et de tailles différentes, un peu à l'image du modèle développé par Yoann Chélin pour la morphogenèse épithéliale, mais en 3D cette fois. Ce dernier, en marge de son travail de thèse, s'était aussi intéressé à cette problématique de structuration du CSQ et avait proposé une stratégie qui pourrait s'avérer utile de suivre : chaque grain cytoplasmique peut se retrouver en interaction distante avec tout grain de son voisinage immédiat ; au cours de l'évolution du modèle de cellule (c'est à dire en cours d'adhésion et d'étalement cellulaire) lorsque deux grains proches s'éloignent, on crée une interaction de type tension, assortie d'un module d'élasticité relatif à l'actine (tel un ressort virtuel tendu) ; à l'opposé, si deux grains se rapprochent, on crée une interaction de type compression, assortie d'un module élastique correspondant aux microtubules (ressort virtuel comprimé) ; si, à un autre moment de la simulation, une interaction de type tension (respectivement compression) se détend (respectivement se décomprime), alors celle-ci disparaît lorsque la longueur à vide du ressort virtuel est atteinte ; ceci se fait et défait à chaque pas de calcul. On se retrouverait ainsi avec la structuration de réseaux de forces de tension et compression totalement évolutifs en fonction de l'évolution propre du modèle global de cellule dans son propre environnement, comme cela semble être le cas pour le cytosquelette d'une cellule vivante.

En outre, les lois de comportement utilisées actuellement pour ce modèle sont de type élastique linéaire alors qu'il conviendrait de considérer des comportements plus complexes, en particulier la viscoélasticité des polymères filamenteux constituant le CSQ. Si une telle approche montre des résultats intéressants, il conviendra alors de considérer des substrats non plans ; une connexion serait alors possible avec le projet PEPS sur les substrats fibreux artificiels (voir partie C précédente). De plus, l'adhésion actuellement considérée est de type "colle" et est irréversible tandis qu'il est connu qu'il s'agit d'un processus biochimique très dynamique dans le temps (recrutement d'intégrines, liaisons et dé-liaisons successives avec la MEC, grossissement progressif de la plaque d'adhésion lorsque les intégrines s'accrochant deviennent régulièrement plus nombreuses que celles qui se décrochent de la matrice). Il conviendrait donc de mettre en œuvre une véritable cinétique d'adhésion, en prenant en compte ce recrutement d'intégrines, et de laisser la possibilité à la cellule de dé-adhérer du substrat. Ceci aurait, en outre, l'avantage de permettre par la suite la simulation de la migration cellulaire.

Par ailleurs, il serait intéressant de tester le scénario inverse de celui utilisé à ce jour, à savoir de considérer une mise en place du réseau d'actine (notamment à partir et autour des points d'adhésion), incluant d'éventuelles fibres de stress, avant la croissance des microtubules. De plus, le noyau actuel est un grain rigide et il conviendrait de le rendre déformable, soit en utilisant un solide déformable soit en remplaçant ce grain-noyau par un ensemble cohésif de grains de plus petite taille, avec une rigidité d'interaction attractive permettant à la fois la cohésion du noyau et sa déformation. En outre, les filaments intermédiaires (dont les processus de polymérisation et la mise en place sont encore à ce jour mal connus) restent absent de ces modélisations tandis qu'il faudrait enfin les prendre en compte.

Enfin, et ceci pourrait très bien constituer la première tâche à effectuer avant même de penser aux

développements proposés ci-avant, les structures obtenues n'ont toujours pas été mécaniquement testées afin de vérifier qu'elles ont un comportement correspondant aux observations sur cellules vivantes, donc de valider le modèle correspondant d'un point de vue mécanique. Il serait particulièrement intéressant de vérifier qu'un tel modèle granulaire serait à même de représenter le comportement spécifique sous chargement fréquentiel, comme révélé à l'aide des milieux vitreux mous. Pour cela, il est possible qu'il faille également considérer la phase fluide présente dans le cytoplasme ce qui serait possible grâce aux développements effectués par Frédéric Dubois pour coupler lmgc90 à des outils de simulation de mécanique des fluides ; ce couplage a déjà été utilisé dans des études récentes au LMGC, portant sur la sédimentation de particules au sein d'un fluide.

Si tous ces développements s'avèrent fructueux, l'objectif de disposer d'un modèle mécanique de cellule, "généralisateur" c'est à dire pouvant représenter l'essentiel des configurations cellulaires (notamment structurales) en fonction des interactions avec l'environnement immédiat, pourrait alors être considéré comme atteint.

D-1-2- Modèle de morphogenèse tissulaire

1) Développements sur la base du modèle actuel de morphogenèse épithéliale

En parallèle aux évolutions proposées dans la partie précédente, il serait utile de poursuivre les travaux sur la simulation de la morphogenèse tissulaire. Tout d'abord, il serait particulièrement intéressant de suivre l'évolution des contraintes au sein du tissu au cours de son développement. En particulier, ceci pourrait permettre de vérifier l'hypothèse du rôle constructeur et stabilisateur de l'apoptose par libération des contraintes dans les épithéliums prolifératifs (voir partie **B-2**), ce qui ne semble toujours pas démontré expérimentalement dans la littérature. De même, il faudrait laisser les simulations se poursuivre au-delà des scénarii testés à ce jour (actuellement, les simulations sont stoppées une fois que 99 % de la surface disponible est recouverte de cellules) afin de voir comment évolue le tissu une fois formé. Les contraintes s'homogénéisent-elles en son sein ? Les distributions polygonales changent-elles ? Si oui, tendent-elles vers une distribution "optimale" correspondant à la théorie d'Euler (d'après ce dernier, on ne peut recouvrir totalement la surface d'une sphère avec uniquement des hexagones ; il faut 80 % d'hexagones et 20 % de pentagones pour y parvenir) ? Autant de questions intéressantes auxquelles le modèle présent pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse.

En outre, plusieurs développements restent encore à effectuer. Dans un premier temps, il conviendrait, à l'instar du modèle de cellule unique, d'enrichir le modèle en considérant les aspects viscoélastiques et l'adhésion des cellules au substrat ainsi qu'entre elles dans la modélisation. Une autre amélioration majeure serait de passer à une modélisation 3D des cellules constitutives. Pour cela, il existe une difficulté à dépasser, à savoir passer des éléments barres pour la membrane à des éléments de type "coques" assortis des mêmes souplesses que celles conférées aux barres actuelles. De plus, la méthode numérique utilisée à ce jour est basée sur un schéma d'intégration explicite, ce qui confère une certaine souplesse et rapidité de calculs pour un nombre d'éléments restreint avec peu de contacts à gérer. Toutefois, une méthode explicite ne devrait pas convenir pour un passage à la 3D impliquant de fait un plus grand nombre d'éléments et de contacts à gérer. Ainsi, il est prévu de transférer le modèle du code actuellement utilisé (ToyGL) vers le code lmgc90, préalablement dédié aux simulations de milieux granulaires en dynamique et utilisant des méthodes implicites. Pour nous aider dans cette tâche, un projet PIFE (Polytech'Montpellier, département Mécanique & Interactions) est actuellement en cours (début : octobre 2016 – fin : février 2017). En outre, ce passage à la 3D est primordial si l'on veut s'attaquer au cas des épithéliums dits "hyperprolifératifs", notamment à l'étude du rôle des actions mécaniques dans la formation de tumeurs.

Par ailleurs, le modèle *in vitro* de pellets de cartilage montre, dans les premiers jours de formation, une phase de morphogenèse d'abord plane puis tridimensionnelle. Ainsi, et bien que ce modèle biologique n'ait pas été développé pour des études portant sur cette thématique et que les cellules employées ne soient pas épithéliales (les cellules souches mésenchymateuses utilisées pour les pellets peuvent essentiellement se différencier en chondrocytes, ostéocytes ou adipocytes, en fonction des facteurs de croissance et du milieu de culture utilisés), il apparaît envisageable de l'utiliser comme modèle *in vitro* 3D de morphogenèse tissulaire afin d'améliorer le modèle mécanique proposé ici. De plus, dans le projet portant sur les substrats artificiels destinés à l'ingénierie tissulaire (voir partie C), il est prévu d'étudier l'effet de leur topologie fibreuse sur la prolifération des cellules cultivées sur (et au sein) de ces matrices de synthèse en se basant sur le modèle de morphogenèse. Cette étude ouvrirait ainsi un autre champ d'application au modèle de morphogenèse, complémentaire des précédents, du fait de la forte présence de matrice extracellulaire dans un environnement 3D.

Par ailleurs, ce modèle de morphogenèse tissulaire n'a jamais été testé mécaniquement c'est à dire qu'aucune expérience numérique n'a été menée en soumettant le tissu obtenu à des chargements extérieur afin d'en analyser la réponse mécanique. Il serait donc intéressant (et utile) d'effectuer de telles simulations numériques. Celles-ci pourraient trouver un écho expérimental à l'aide de plusieurs techniques complémentaires. Pour les tissus cellulaires 2D, la magnétocytométrie (voir partie A-1-1-1)) pourrait convenir car elle présente l'avantage de solliciter mécaniquement l'ensemble d'une mono-couche cellulaire. Toutefois, il faudrait modifier le dispositif actuellement présent à l'Institut Mondor de Créteil afin d'obtenir non plus une valeur moyenne des propriétés viscoélastiques par cellule mais la valeur globale sur l'ensemble de la mono-couche. Il conviendrait également de connaître précisément la position de chaque bille au niveau de la mono-couche afin de mieux considérer la répartition des efforts à considérer avec le modèle. Pour les tissus 3D, des tests effectués sur des pellets de J0 à J7, en l'absence de facteur de croissance dans le milieu (c'est à dire composées quasi exclusivement de cellules jointives entre elles) devraient pouvoir servir de base expérimentale. Au-delà, les micropellets pourraient constituer un modèle *in vitro* de choix pour s'attaquer à la morphogenèse d'assemblages cellulaires tridimensionnels.

Enfin, des ouvertures vers la biomécanique végétale sont envisageables sur la base de ce modèle de morphogenèse. En effet et d'une part, les observations sur les topologies d'épithéliums prolifératifs à la base de nos travaux ont été effectuées sur des espèces tant animales que végétales (voir introduction de la partie B-2). D'autre part, la biomécanique des plantes, en particulier de l'arbre, est un thème historique fort du LMGC, très développé au sein de l'équipe BOIS. Une des questions fondamentales à laquelle s'intéressent les collègues de cette équipe – et ce depuis de nombreuses années – concerne la genèse de contraintes de croissance dans le bois de l'arbre au cours de son développement. Celles-ci seraient la combinaison de contraintes dites de maturation et de contraintes dites de chargement. Les contraintes de maturation semblent se mettre en place au niveau des parois des cellules nouvellement créées au cours de la croissance secondaire de l'arbre (croissance radiale du tronc et des branches), pendant leur maturation, du fait de la conjonction entre le phénomène de croissance individuelle cellulaire et leur adhésion aux cellules déjà existantes vers le cœur du tronc ou de la branche considérée. En effet, à l'issue de cette phase de maturation, la cellule a tendance à grossir dans le sens transverse et se rétracter dans le sens longitudinal. Toutefois, son adhésion aux anciennes cellules (bois mort) vers le centre et son confinement par l'écorce empêche les déformations tangentielles et longitudinales. Ainsi, la paroi de la cellule nouvellement créée se trouve comprimée dans le sens tangentiel et tendue dans le sens longitudinal. Les contraintes de chargement sont elles dues à l'augmentation de la masse végétale créée (croissances primaire et secondaire) et viennent ainsi s'ajouter aux contraintes de maturation. Le

processus de croissance secondaire pourrait s'apparenter à la morphogenèse des épithéliums prolifératifs au cœur de nos propres travaux (y inclus le confinement des cellules en présence) et il serait donc probablement intéressant de tenter d'appliquer notre modèle à ces applications végétales afin d'aider à identifier les mécanismes responsables de ces générations de contraintes, notamment de maturation, au sein des parois des cellules du bois de l'arbre.

2) Jonction avec le modèle de cellule unique

Si les développements proposés pour les deux approches précédentes (modèles de cellule unique et de morphogenèse épithéliale) sont suffisamment finalisés, il serait enfin très intéressant de parvenir à les coupler, d'autant plus que l'outil numérique serait le même (Imgc90). En effet, et outre la recherche d'une pure description structurale plus fine, un tel couplage permettrait d'étudier le transfert d'informations mécaniques entre cellules jointives. Il n'est pas impossible que de telles études puissent révéler des "chemins préférentiels" de communication physique au sein d'un tissu et parvienne ainsi à proposer des éléments d'explication supplémentaires sur la raison de localisation d'événements tels que la mitose ou l'apoptose. Au-delà, un tel couplage proposerait une réelle modélisation micro/macro, permettant peut-être de relier les propriétés mécaniques cellulaires et tissulaires, ce qui reste à ce jour peu documenté dans la littérature. En outre, si les résultats s'avéraient concluants, un tel modèle pourrait alors être utilisé pour étudier les contributions cellulaires individuelles dans le comportement global du tissu ce qui, à ma connaissance, n'est pas le cas des approches publiées à ce jour. En effet, les modélisations actuellement publiées considèrent essentiellement un comportement et des configurations identiques pour toutes les cellules constitutives tandis que des dysfonctionnements tissulaires pourraient être dus à des dérèglements d'une partie de ces cellules.

Toutefois, au vu du grand nombre d'éléments à considérer, un tel couplage devra très probablement nécessiter aussi de gros développements numériques afin de pouvoir traiter autant de contacts en même temps.

D-2- Biomécanique des tissus fibreux

D-2-1- De la croissance des cartilages à la croissance des tissus fibreux

Les modèles de croissance volumétrique développés ces dernières années dans l'équipe sont actuellement appliqués au cas des cartilages articulaires et du disque intervertébral (DIV). Les "allers-retours" entre les modèles *ex-vivo* de DIV porcin et *in vitro* de pellets hyalins, enrichis par la détermination des contraintes de croissance (contraintes résiduelles) devraient permettre de conforter et d'améliorer l'actuel modèle poro-hyper-élastique de cartilage en vue de l'utiliser dans la simulation de la croissance de ces tissus tout en considérant la nutrition cellulaire par diffusion et convection en leur sein. Ainsi, le principal objectif de ces travaux pourrait être atteint, à savoir une caractérisation qualitative (et, si possible, quantitative) du rôle exact des actions mécaniques (notamment : type, amplitude et fréquence des sollicitations) dans ce processus de croissance des cartilages, le tout au regard de l'implication de facteurs biochimiques (en particulier : concentration et gradient de concentration de nutriments, facteurs de croissance). Il devrait alors être possible de proposer des éléments d'explication bio-mécaniques pour certains dérèglements de cette croissance (scoliose idiopathique, arthrose...), d'aider à leur prévention et à l'amélioration de leur diagnostic précoce ainsi que de leur prise en charge thérapeutique.

Au-delà, trois élargissements de ces travaux peuvent être envisagés, à savoir l'ouverture vers d'autres tissus fibreux animaux, la jonction avec des travaux en biomécanique végétale, notamment

la genèse des bois de réaction (essentiellement de compression chez les résineux et de tension chez les feuillus) ainsi que la proposition de stratégies en ingénierie tissulaire. Ce dernier point sera plus détaillé dans le paragraphe **D-2-2** suivant.

En ce qui concerne l'ouverture à l'ensemble des tissus fibreux animaux, une étape préliminaire devra être mise en œuvre par l'application de ces travaux aux autres types de cartilages non étudiés actuellement : (i) les cartilages hyalins non-articulaires tels que la cloison nasale, les anneaux bronchiques, les extrémités des côtes, etc., (ii) d'autres fibrocartilages que le DIV tels que la symphyse pubienne, les ménisques des genoux, etc., et (iii) les cartilages élastiques comme le pavillon auriculaire, l'épiglotte, le cartilage laryngé, etc. Cependant, ces différents types de cartilages diffèrent grandement en termes de types de collagène constituant (par exemple, les fibrocartilages sont constitués essentiellement de fibres de collagène de types I et II tandis que les cartilages élastiques sont composés principalement du collagène de type II entrelacé avec des fibres d'élastine) ce qui est très probablement associé à des différences en termes d'organisation de la microstructure et d'éléments biochimiques impliqués dans leur croissance. De même, le comportement mécanique varie probablement d'un type de cartilage à un autre. Ainsi, il conviendra au-préalable d'étudier plus encore l'histologie et la biochimie de ces divers tissus cartilagineux et de vérifier que l'actuel modèle poro-hyper-élastique leur soit applicable. En parallèle, il sera probablement intéressant d'enrichir nos approches par une meilleure prise en compte de l'aspect fibreux (orientation des fibres, réarrangements spatiaux en cours de sollicitation) ainsi que de la viscoélasticité des fibres constitutives. Enfin, ces travaux pourront aussi s'appliquer aux autres tissus fibreux tels que les parois vasculaires ou la peau, en vue de proposer des analyses se voulant généralistes sur la croissance de l'ensemble des tissus fibreux mous humains.

En outre, il se pourrait que certains aspects de nos études sur les tissus animaux puissent être (tout au moins en partie) transposés aux tissus végétaux, notamment le bois de l'arbre en formation qui est également un matériau fibreux au sein duquel on retrouve également des contraintes résiduelles (de croissance). De manière complémentaire à la proposition d'utiliser le modèle de morphogenèse tissulaire pour étudier la mise en forme des cellules constitutives du bois (voir partie **D-1-2-1**), l'utilisation du modèle de croissance volumétrique en fonction du gradient de nutriments pourrait aider à expliquer la mise en place des contraintes de croissance à une échelle supérieure. En effet, si le modèle de morphogenèse pourrait contribuer à l'étude de la genèse de ces contraintes de maturation à l'échelle des parois cellulaires, le modèle de croissance volumétrique pourrait quant à lui aider à analyser les mécanismes de mise en place de ces contraintes à l'échelle supérieure en considérant également les contraintes de chargement (augmentation du poids propre de l'arbre du fait de son développement). En particulier, il est à noter qu'immédiatement sous l'écorce, le tronc des arbres apparaît précontraint en compression dans la direction transverse tandis qu'il peut se trouver en tension dans la direction longitudinale, celle des fibres. De plus, cette croissance radiale s'effectue essentiellement dans le cambium, à savoir juste sous l'écorce, et il est également intéressant de noter qu'il semblerait exister un gradient de nutriments depuis l'extérieur vers l'intérieur du cambium. En outre, les résultats actuels, sur la base du modèle de croissance volumétrique considérant un tel gradient, montrent que dans ce cas les contraintes tangentielles résultantes sont de type compression à l'extérieur et tension à l'intérieur (voir partie **B-3-1-1**). Ainsi, sur la base de ce modèle, un élément d'explication quant à la compression tangentielle observée pour le tronc des arbres pourrait être une dissymétrie dans le processus de croissance au sein du cambium due à un éventuel gradient de nutriments en jeu. Il apparaît donc intéressant de proposer d'appliquer nos travaux sur la croissance volumétrique au cas de l'arbre en développement.

D-2-2- Substrats artificiels pour l'ingénierie tissulaire

Les travaux sur cette thématique, nouvelle en ce qui me concerne, viennent donc de débiter par le projet PEPS présenté dans la partie C précédente. Une demande de financement vient également d'être déposée à l'ANR et, qu'elle aboutisse ou pas, il est clair pour l'ensemble des parties prenantes que cette collaboration est prévue pour se développer et durer. Finalement, tout reste à faire ! Dans un premier temps, il faut poursuivre le travail d'analyse des résultats expérimentaux déjà effectués (il s'agit notamment d'analyser les données issues des tests de traction jusqu'à rupture, cycles de traction/relâchement et relaxation) afin d'avoir une meilleure idée des propriétés mécaniques de ces substrats et d'ainsi proposer d'éventuelles modifications du banc expérimental (les tests de rupture ont d'ores et déjà montré qu'il était nécessaire d'acquiescer un "capteur de force" plus adapté que ceux actuellement disponibles au laboratoire). En outre, il faudra également effectuer des essais expérimentaux sur des échantillons immergés pour déterminer si des effets poreux sont à considérer en plus de la viscosité qui semble être révélée par les tests préliminaires de relaxation. De plus, ces expérimentations devront être menées sur des matrices artificielles constituées à partir de différents polymères, considérant différentes densités et différents diamètres de fibres afin de les comparer entre elles et de les classer. En effet, bien qu'en théorie le nombre de composés utilisables est très important (voir partie C), il se pourrait que certains polymères ne permettent pas de constituer des substrats qui conviennent aux besoins de l'ingénierie tissulaire (par exemple, en terme de rigidité). Enfin, les futurs tests devront s'effectuer en utilisant la corrélation d'images afin de tenter de remonter aux propriétés mécaniques locales, en visant l'alimentation des modèles cellulaires prévus (c'est à dire, le modèle de cellule unique développé à Marseille et le modèle de prolifération qui sera développé au LMGC sur la base du modèle de morphogenèse épithéliale). Pour y parvenir, il conviendra au préalable de définir le bon modèle mécanique de tissu à utiliser. Pour cela et en complément de l'analyse des tests expérimentaux, il est prévu d'alimenter la réflexion en s'intéressant aux approches développées pour étudier les géotextiles. En outre, comme il est également attendu que les cellules ayant proliféré au sein de ces substrats artificiels en dégradent progressivement les fibres tout en les remplaçant par des fibres de collagène (produites par les cellules présentes) et/ou que ces cellules puissent utiliser ces matrices artificielles comme support pour créer de la matrice nouvelle, il est possible qu'un croisement avec les travaux portant sur la croissance volumétrique soit enrichissant voire indispensable.

A plus long terme, ces travaux pourraient permettre de proposer des pistes d'optimisation pour la formation de matrices artificielles par impression 3D. En effet et d'une part, il convient de noter que la technique utilisée ici ("jet spraying") est une méthode de fabrication additive. De plus, celle-ci apparaît plus rapide et plus souple d'utilisation que la plupart des imprimantes 3D actuelles. En outre et d'autre part, il existe encore peu d'information précise sur la capacité d'une architecture spécifique pour induire une différenciation cellulaire ou pour optimiser le développement d'un type de tissu particulier. Ainsi, ces travaux devraient permettre d'étudier comment une architecture 3D, avec une cartographie de propriétés mécaniques associées, pourraient influencer sur la différenciation et la prolifération de cellules souches mésenchymateuses par rapport à des matrices 2D encore classiquement utilisées à ce jour en culture cellulaire (c'est notamment l'induction potentielle du phénotype ostéoblastique qui est visée ici). Plus précisément, il est prévu d'analyser l'influence de la densité fibrillaire, du diamètre et de la rigidité locale des fibres ainsi que de la porosité globale du tissu sur ces processus. Au-delà, se pose également la question de l'adaptation de l'architecture du cytosquelette et du tonus cellulaire dans de tels environnements tridimensionnels. Par conséquent, le projet actuel peut également être vu comme un cas-test afin de tenter de répondre à ces questions et de proposer des pistes d'optimisation de matrices artificielles par impression 3D.

D-3- Rêvons un peu...

L'ensemble des travaux synthétisés dans les parties **A** à **C** et les perspectives proposées dans les paragraphes précédents de la présente partie **D** pourraient donc constituer un projet de recherche à moyen et long termes. Les approches utilisées, tant à l'échelle cellulaire que tissulaire et aussi bien en termes d'analyse du comportement mécanique que d'études de l'implication des actions mécaniques dans les mécanismes d'évolution (morphogenèse, croissance volumétrique, remodelage), ont toutes montré leur pertinence. En d'autres termes, ces approches sont prometteuses, ce qui est par ailleurs également très motivant pour le chercheur et ses perspectives d'études. Et une part de rêve est permise tant sur la convergence d'approches diverses à des échelles différentes que la jonction de la biomécanique animale et la biomécanique végétale.

D'une part, il pourrait être songé au développement d'une modélisation biomécanique/mécanobiologique de tissus, considérant la cellule (et ses principaux organites dont le cytosquelette) et la matrice extracellulaire, capable d'inclure les aspects structuration, morphogenèse, remodelage et croissance volumétrique. Actuellement, les approches développées pour étudier chacun de ces processus d'évolution sont souvent différentes. Toutefois, ces mécanismes sont possiblement liés entre eux. Les micropellets en sont un exemple où une phase de morphogenèse précède la croissance volumétrique ; cette dernière semble trouver actuellement un optimum au bout de trois semaines de culture et paraît être suivie d'une phase de remodelage. Il est enfin très possible que ce remodelage s'effectue également en parallèle de la phase de croissance volumétrique. Ainsi, un enjeu futur en biomécanique pourrait (voire devrait) être de parvenir à la jonction entre ces approches. Il s'agit peut-être là d'un fantasme mais il me plaît de penser que je pourrais être un acteur en vue de son éventuelle réalisation future. Un challenge toutefois reste entier pour y parvenir à savoir identifier quantitativement le rôle exact des contraintes mécaniques dans ces processus de croissance. En effet, les observations sur lesquelles sont basées les travaux en morphogenèse épithéliale indiquent que les cellules qui entrent en mitose seraient parmi les moins contraintes tandis que celles déclenchant l'apoptose seraient parmi les plus contraintes. Ceci pourrait donc faire penser que moins il y a de contraintes appliquées et plus on favoriserait la prolifération cellulaire (donc la croissance ?). Toutefois, toutes les observations à l'échelle tissulaire (et au-delà) indiquent que la croissance d'un tissu ou d'un organe est favorisée par l'existence de contraintes, ce qui pourrait paraître quelque peu paradoxal avec l'idée précédente. Il est en réalité possible qu'il existe d'une sorte d'optimum en termes de contraintes extérieures favorisant cette prolifération cellulaire et la croissance tissulaire. De tels optimums ont déjà été montrés pour certains processus biologiques, par exemple sur la forme cellulaire pour la migration cellulaire : si une cellule est faiblement étalée sur un substrat plan, générant de faibles forces d'adhésion sur la matrice, alors elle n'arrive pas à migrer ou avec des vitesses faibles ; si elle est très étalée sur le substrat en générant des forces d'adhésion importantes, là encore elle a du mal à migrer ou le fait lentement ; enfin, si elle est "moyennement" étalée, générant des forces d'adhésion "moyennes", alors elle parvient à migrer avec des vitesses bien plus importantes que pour les deux autres situations extrêmes. Il est ainsi possible que de tels optimums puissent être mis en évidence tant sur la structuration du cytosquelette, la morphogenèse tissulaire ou encore la croissance volumétrique. Cette mise en évidence pourrait être une des clefs de jonction entre les diverses approches citées précédemment. Un projet dont j'aimerais être moteur concerne ainsi la jonction entre ces différentes approches portant sur des échelles parfois éloignées.

D'autre part, peu de travaux en biomécanique restent à ce jour publiés faisant le lien entre les végétaux et les animaux. Pourtant, tous deux sont constitués de cellules, d'une matrice qu'elles fabriquent, organisent et à laquelle elles adhèrent (dans le cas du bois cette matrice constitue en fait la paroi cellulaire). De même, tous deux sont des milieux multiphasiques, où les effets chimiques et osmotiques sont présents (et jouent un rôle important). En outre, tous deux sont soumis à ces

processus de morphogenèse et croissance. Enfin, les propriétés mécaniques du bois et des os ne sont pas si éloignées que cela (on reste dans des ordres de grandeur proches) pour des fonctions biologiques ayant de grandes similitudes (notamment dans le rôle de structure support et protecteur de l'organisme). Par ailleurs, l'organisation en lamelles concentriques, chacune constituée de fibres de biopolymères (collagène, cellulose...) ayant des orientations spécifiques, est commune à la paroi de la cellule du bois et à l'*annulus fibrosus* du disque intervertébral. La cellule végétale a aussi un cytosquelette composé au moins d'actine et microtubules. Il est ainsi étonnant qu'après tant de décennies il n'existe pas (ou si peu) de travaux communs en biomécanique. Ceci est en particulier vrai concernant la biomécanique liée aux aspects croissance en général. Par exemple, les travaux en morphogenèse épithéliale ont montré les mêmes distributions de formes cellulaires aussi bien chez diverses plantes que pour plusieurs espèces animales. Si ces deux communautés (biomécaniciens du végétal vs biomécaniciens de l'animal) sont actuellement si séparées (ceci inclus également les congrès nationaux comme internationaux), c'est probablement historique et lié à la différence existant en termes d'applications. En effet, la plupart des études en biomécanique animale est pensée avant tout avec une finalité humaine et est souvent reliée à des problématiques de santé. Du côté de la biomécanique de l'arbre, les attendus concernent surtout les procédés industriels liés à l'utilisation du bois après tronçonnage (séchage avec libération de contrainte entraînant des fissures parfois très importantes, utilisation dans la construction, la fabrication de meubles, d'instruments de musiques, de panneaux destinés à la peinture, etc.). Ainsi, ces applications de ces deux biomécaniques peuvent apparaître si éloignées que les deux communautés collaborent finalement peu, et même trop peu lorsque l'on regarde les nombreux points communs dans les processus fondamentaux existant dans les deux règnes, végétal et animal. C'est précisément un autre projet dont j'aimerais aussi être moteur, à savoir parvenir à réellement réunir les deux communautés. C'est ce que j'avais tenté d'initier lors de mon arrivée au LMGC en portant l'axe transversal Mécanique du Vivant. Un très petit bout de chemin avait alors été effectué. Il me plairait à présent de reprendre cette longue route et de la poursuivre...

Références bibliographiques

- Baldir A., Ambard D., Cherblanc F. and Royer P., 2014, Experimental analysis of the transverse mechanical behaviour of annulus fibrosus tissue. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, Springer Verlag, 2014, 13 (3): 643-652.
- Basan M., Risler T. Joanny J.F., Sastre-Garau X. and Prost J., 2009, Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP Journal*, 3: 265-272.
- Baudriller H., Maurin B., Cañadas P., Montcourrier P., Parmeggiani A. and Bettache N., 2006, Form-Finding of Complex Tensegrity Structures: Application to Cell Cytoskeleton Modelling. *Comptes Rendus de Mécanique*, 334 (11): 662-668.
- Bougault C., Paumier A., Aubert-Foucher E., Mallein-Gerin F., 2009, Investigating conversion of mechanical force into biochemical signaling in three-dimensional chondrocyte cultures, *Nature Protocols* 4.
- Cañadas P., Laurent V.M., Oddou C., Isabey D. and Wendling S., 2002, A Cellular Tensegrity Model to Analyze the Structural Viscoelasticity of the Cytoskeleton. *Journal of Theoretical Biology*, 218: 155-173.
- Cañadas P., Laurent V.M., Chabrand P., Isabey D. and Wendling-Mansuy S., 2003, Mechanisms Governing the Viscoelastic Responses of Living Cells Assessed by Foam and Tensegrity Models. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 41(6): 733-739.
- Cañadas P., Wendling-Mansuy S. and Isabey D., 2006, Frequency Response of a Viscoelastic Tensegrity Model: Structural Rearrangement Contribution to Cell Dynamics. *ASME Journal of Biomechanical Engineering*, 128(4): 487-495.
- Cañadas P., Maurin B., Motro R., 2009, Mécanique des systèmes précontraints appliquée à la structure du cytosquelette. *Mécanique et Industries*, 10 (3-4), 285-290 (article sélectionné par le comité scientifique du CFM 2009).
- Chélin Y., Azzag K., Cañadas P., Averseng J., Baghdiguian S., Maurin B., 2013, Simulation of Cellular Packing in Non-Proliferative Epithelia, *Journal of Biomechanics*, 46(6): 1075–1080.
- Dike L.E., Chen C.S., Mrkisch M., Tien J. Whitesides G.M. and Ingber D.E., 1999, Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 35: 441-448.
- Fabry B., Maksym G.N., Hubmayr J., Butler J.P. and Fredberg J.J., 1999, Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194: 120-125.
- Fabry B., Maksym G.N., Butler J.P., Glogauer M., Navajas D. and Fredberg J.J., 2001, Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.*, 87(14): 148102-1; 148102-4.

- Gibson L.J. and Ashby M.F., 1988, Cellular solids, structure and properties, Pergamon Press, 358.
- Gibson, M.C., Patel, A.B., Nagpal, R., Perrimon, N., 2006. The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature* 442: 1038-1041.
- Ingber D.E. & Jamieson J.D., 1985, Cells as tensegrity structures: architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane. Gene expression during normal and malignant differentiation, L. Anderson, C. Gahmberg, and P. Ekblom, Editors. San Diego Academic Press: London, p. 13-32.
- Janmey P.A., 1998, The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews*, 78(3): 763-781.
- Keating, T.J., Peloquin, J.G., Rodionov, V.I., Momcilovic, D., Borisy G.G., 1997, Microtubule release from de centrosome, *PNAS* 94: 5078-5083.
- Laurent V.M., Fodil R., Cañadas P., Planus E. and Isabey D., 2002a, Specific Mechanical Responses of Cortical and Cytosolic Cytoskeleton in Living Adherent Cells. *JSME International Journal*, series C, 45(4): 897-905.
- Laurent V.M., Cañadas P., Planus E., Fodil R., Asnacios A., Wendling S. and Isabey D., 2002b, Tensegrity Behavior of Cortical and Cytosolic Cytoskeletal Components in Twisted Living Adherent Cells. *Acta Biotheoretica*, 50(4): 331-356.
- Laurent V.M., Fodil R., Cañadas P., Féréol S., Louis B., Planus E., and Isabey D., 2003, Partitioning of Cortical and Cytosolic Cytoskeleton Responses from Transient Magnetic Bead Twisting. *Annals of Biomedical Engineering*, 31(10): 1263-1278. Cover page.
- Malachanne E., Cañadas P., Dureisseix D., Jourdan F, 2008, Experimental and Numerical Identification of Cortical Bone Permeability. *Journal of Biomechanics*, 41(3), 721-72.
- Malachanne E., Dureisseix D., Jourdan F, 2011 Numerical model of bone remodeling sensitive to loading frequency through a poroelastic behavior and internal fluid movements. *Journal of mechanical behavior of biomedical materials*, Elsevier, 2011, Bone remodeling, 4(6): 849-857
- Maniotis A.J., Chen C.S. & Ingber D.E., 1997, Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3): 849-854.
- Martinand-Mari, C., Maury, B., Rousset, F., Sahuquet, A., Mennessier, G., Rochal, S., Lorman, V., Mangeat, P., Baghdiguian, S., 2009, Topological control of life and death in non-proliferative epithelia. *PLoS One* 4, e4202.
- Maurin B., Cañadas P., Baudriller H., Montcourrier P., Bettache N., 2008, Mechanical Model of the Cytoskeleton Structuration During Cell Adhesion and Spreading. *Journal of Biomechanics*, 41(9), 2036-2041.
- Maurin B., Cañadas P. Motro R., 2010, Modélisation en mécanique cellulaire par systèmes de tensegrité. *Les Techniques de l'Ingénieur*. RE 117 - janvier 2010.

Michalopoulos E., Knight R.L., Korossis S., Kearney J.N., Fisher J. and Ingham E., 2012.. *Tissue Eng. Part C: Methods*, 18(4): 252-262.

Milan, J.L., Wendling-Mansuy, S., Jean, M., Chabrand, P., 2007, Divided medium-based model for analyzing the dynamic reorganization of the cytoskeleton during cell deformation. *Biomechan. Model Mechanobiol.*, 6(6): 373–390

Stamenovic D., Ingber D.E., Wang N. and Fredberg J.J., 1996, A microstructural approach to cytoskeletal mechanics based on tensegrity. *Journal of Theoretical Biology*, 181: 125-136.

Stamenovic D. and Coughlin M.F., 1999, The role of prestress and architecture of the cytoskeleton deformability of cytoskeletal filaments in mechanics of adherent cells: a quantitative analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 201: 63-74.

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

Wendling S., Oddou C. and Isabey D., 1999, Stiffening response of a cellular tensegrity model. *Journal of Theoretical Biology*, 196(3): 309-325.

Wendling S., Oddou C. and Isabey D., 2000a, Approche structurale de la mécanique du cytosquelette : solide alvéolaire vs modèle de tensegrité. *CRAS*, 328: 97-104

Wendling S., Planus E., Laurent V.M., Barbe L., Mary A., Oddou C. and Isabey D., 2000b, Role of cellular tone and microenvironmental conditions on cytoskeleton stiffness assessed by tensegrity model. *European Physical Journal AP*, 9: 51-62.

ANNEXES

Tirés à part d'une sélection d'articles

