



HAL
open science

Caracterisation et modelisation de l'organisation morphofonctionnelle du cytosquelette lors des processus de mecanotransduction

Stephanie Portet

► **To cite this version:**

Stephanie Portet. Caracterisation et modelisation de l'organisation morphofonctionnelle du cytosquelette lors des processus de mecanotransduction. Interface homme-machine [cs.HC]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2001. Français. NNT: . tel-00002326

HAL Id: tel-00002326

<https://theses.hal.science/tel-00002326>

Submitted on 31 Jan 2003

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.

UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT
UFR de Biologie et Sciences de la Nature

N° attribué par la bibliothèque
2001PA077049

THESE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

SPECIALITE: Biomathématiques

présentée et soutenue publiquement

par

Stéphanie PORTET

le 14 Mai 2001

Caractérisation et modélisation de l'organisation morphofonctionnelle du cytosquelette lors des processus de mécanotransduction

Directeur de thèse:

DAMIEN SCHOEVAERT

JURY

| | |
|--------------------|------------|
| Nguyen Phong Chau | Président |
| Jean-Marc Chassery | Rapporteur |
| Christian Oddou | Rapporteur |
| Sophie Lelièvre | Examineur |
| Jean-Louis Martiel | Examineur |
| Damien Schoëvaert | Examineur |

Aux Papoux et Mamoux,
avec une spéciale dédicace à Papou de Tilhouse

Je tiens à remercier:

Monsieur Nguyen Phong Chau, Professeur à l'Université Paris VII, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en Biomathématiques et pour l'honneur qu'il me fait de présider le Jury chargé de juger mon travail.

Monsieur Jean-Marc Chassery, Directeur de Recherche CNRS du Laboratoire LIS à Grenoble, et Monsieur Christian Oddou, Professeur à l'Université Paris XII, pour l'intérêt et l'attention qu'ils ont portés à l'examen de ce mémoire de thèse en tant que rapporteur.

Mademoiselle Sophie Lelièvre, Professeur Assistant à l'Université de Purdue (USA), et Monsieur Jean-Louis Martiel, Chargé de Recherche INSERM à Grenoble, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur Damien Schoëvaërt, Maître de Conférence Universitaire Praticien Hospitalier de l'Université Paris Sud, pour avoir dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme et pour m'avoir fait confiance.

Madame Jany Vassy, Maître de Conférence à l'Université Paris XIII, pour son aide, son soutien et son amitié tout au long de ces années qui m'ont permis de terminer ma thèse.

Monsieur Ovide Arino, Professeur à l'Université de Pau, pour son aide précieuse et son soutien constant tout au long de cette aventure.

Madame Théano Irinopoulou pour avoir été là dans tous les moments difficiles et en particulier pour son aide et ses conseils avisés lors de la rédaction de ce travail ainsi que son comparse Monsieur Michael Beil.

Tous les membres du Laboratoire d'Analyse d'Images en Pathologie Cellulaire et tout particulièrement Arlette, Ghislaine et Vénus pour l'amitié qu'elles m'ont témoigné en toutes circonstances.

Monsieur Jean-Paul Rigaut, Directeur du Laboratoire d'Analyse d'Images en Pathologie Cellulaire pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Ma famille, Jules et mes amis pour leur soutien et leur confiance qui n'ont jamais défailli. . .

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 15 |
| De la réalité au modèle: Caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques | 25 |
| 1 Préliminaires | 27 |
| 2 Caractérisation de l'architecture par analyse d'images | 35 |
| 2.1 Concepts de caractérisation | 35 |
| 2.2 Approche Filament | 38 |
| 2.2.1 Filtre non-linéaire ψ | 39 |
| 2.2.2 Reconstruction des objets curvilignes | 45 |
| 2.2.3 Quantification des objets curvilignes | 51 |
| 2.3 Approche Maillage | 54 |
| 2.3.1 Fermeture morphologique en niveaux de gris | 54 |
| 2.3.2 La ligne de partage des eaux | 56 |
| 2.3.3 Fusion de régions | 59 |
| 2.3.4 Quantification des mailles | 61 |
| 2.4 Combinaison des approches | 64 |
| 2.4.1 Segmentation | 65 |
| 2.4.2 Quantification des réseaux | 65 |
| 2.5 Discussion | 67 |
| 3 Variabilité de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires | 71 |
| 3.1 Variabilité intracellulaire de l'architecture | 71 |
| 3.2 Variabilité de l'architecture selon des conditions mécaniques différentes . | 75 |
| 3.3 Conclusion | 78 |
| Du modèle à la réalité: Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine | 81 |
| 4 Etat de l'art | 83 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine | 87 |
| 5.1 | Concepts de modélisation | 88 |
| 5.2 | Domaine cellule et ses composants | 94 |
| 5.3 | Equations du modèle | 95 |
| 5.4 | Synthèse protéique | 98 |
| 5.5 | Diffusion protéique | 107 |
| 5.6 | Initiation de filaments | 108 |
| 5.7 | Polymérisation des filaments | 112 |
| 5.8 | Consommation du pool soluble | 117 |
| 5.9 | Discussion sur les concepts de modélisation | 118 |
| 6 | Simulations numériques | 123 |
| 6.1 | Adimensionnalisation du modèle | 124 |
| 6.2 | Discrétisation du domaine de définition du modèle | 124 |
| 6.3 | Résolution numérique de l'équation de diffusion | 129 |
| 6.3.1 | Schéma de discrétisation | 129 |
| 6.3.2 | Consistance | 131 |
| 6.3.3 | Stabilité | 131 |
| 6.3.4 | Convergence | 133 |
| 6.3.5 | Résolution numérique | 134 |
| 6.4 | Modèle de simulation | 134 |
| 6.5 | Discussion | 137 |
| 7 | Résultats expérimentaux | 139 |
| 7.1 | Quelques résultats expérimentaux | 139 |
| 7.1.1 | Champs de concentration de pool soluble | 140 |
| 7.1.2 | Réseau de cytokératine | 142 |
| 7.2 | Etude quantitative du comportement du modèle | 147 |
| 7.2.1 | Effet du coefficient de diffusion | 149 |
| 7.2.2 | Effet de la stratégie d'initiation de filaments | 149 |
| 7.2.3 | Effet de l'agitation moléculaire | 151 |
| 7.2.4 | Effet du pas de temps | 154 |
| 7.3 | Discussion sur les résultats | 157 |

| | |
|---|------------|
| Discussion et perspectives | 159 |
| Conclusion | 165 |
| Bibliographie | 173 |
| Annexes | 175 |
| A Notions de morphologie mathématique | 177 |
| A.1 Morphologie mathématique sur les images binaires | 177 |
| A.1.1 Transformations ensemblistes classiques | 177 |
| A.1.2 Transformations en Tout ou Rien par un élément structurant . . . | 178 |
| A.1.3 Erosion | 179 |
| A.1.4 Dilatation | 180 |
| A.1.5 Ouverture | 181 |
| A.1.6 Fermeture | 181 |
| A.1.7 Transformations de voisinage | 182 |
| A.1.8 Amincissement | 183 |
| A.1.9 Epaissement | 184 |
| A.1.10 Détection de points particuliers | 185 |
| A.1.11 Alphabet de Golay | 186 |
| A.2 Morphologie mathématique sur les images en niveaux de gris | 187 |
| A.2.1 Dilatation et Erosion | 187 |
| A.2.2 Ouverture et Fermeture | 187 |
| A.2.3 Chapeau haut de forme | 187 |
| A.2.4 Amincissement et Epaissement | 188 |
| A.2.5 Gradient morphologique | 188 |
| B Quantitative analysis of cytokeratin network topology in the MCF7 cell line | 189 |
| C Effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 | 201 |

Table des figures

| | | |
|------|---|-----|
| 1 | Différents réseaux cytosquelettiques. | 16 |
| 2 | Organisation des différents réseaux cytosquelettiques dans la cellule. | 17 |
| 3 | Propriétés mécaniques de polymères cytosquelettiques. | 19 |
| 4 | Voies possibles de la mécanotransduction. | 20 |
| 1.1 | Principe de la microscopie confocale. | 29 |
| 1.2 | Organigramme du processus d'analyse d'images. | 33 |
| 2.1 | Primitives définies pour la caractérisation des réseaux cytosquelettiques. | 36 |
| 2.2 | Tailles de voisinage utilisées lors du filtre non-linéaire ψ | 43 |
| 2.3 | Filtre non-linéaire ψ de l'approche filament. | 45 |
| 2.4 | Seuillage dynamique dans l'approche filament. | 47 |
| 2.5 | Résultat de l'approche filament: reconstruction des objets curvilignes. | 50 |
| 2.6 | Méthode géométrique de calcul du rayon de courbure. | 53 |
| 2.7 | Image vue comme un relief topographique. | 55 |
| 2.8 | Fermeture morphologique en niveaux de gris. | 56 |
| 2.9 | Ligne de partage des eaux et bassins versants. | 59 |
| 2.10 | Résultat de l'approche maillage: fusion de régions. | 63 |
| 2.11 | Combinaison des approches. | 66 |
| 2.12 | Récapitulatif de la caractérisation des réseaux cytosquelettiques. | 69 |
| 3.1 | Variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux de cytokératine. | 74 |
| 3.2 | Réseaux de cytokératine de cellules contrôles et de cellules en micropesanteur. | 77 |
| 5.1 | Sous-unités du pool soluble et du pool insoluble. | 89 |
| 5.2 | Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine. | 92 |
| 5.3 | Processus de synthèse des protéines. | 101 |
| 5.4 | Mode de synthèse des protéines. | 105 |
| 5.5 | Susceptibilité d'initiation de filament. | 110 |
| 5.6 | Fonctions seuil $p(\cdot)$ spécifiant différentes stratégies d'initiation de filaments. | 111 |
| 5.7 | Récapitulatif du modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine. | 121 |
| 6.1 | Systèmes de voisinage utilisés dans le modèle de simulation. | 126 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 6.2 | Discrétisation du domaine cellule. | 128 |
| 7.1 | Champs de concentration de pool soluble. | 141 |
| 7.2 | Edification du réseau de cytokératine pour une initiation dans le cortex. . . | 143 |
| 7.3 | Edification du réseau de cytokératine pour une initiation périnucléaire. . . | 145 |
| 7.4 | Edification du réseau de cytokératine sans stratégie spécifique d'initiation. . | 146 |
| 7.5 | Effet du coefficient D de diffusion. | 150 |
| 7.6 | Effet de la stratégie d'initiation de filaments. | 152 |
| 7.7 | Effet de l'agitation moléculaire $\ v\ $ | 153 |
| 7.8 | Effet du pas de temps Δt | 155 |
| 7.9 | Effet du pas de temps Δt | 156 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | Principaux types de protéines des filaments intermédiaires. | 18 |
| 5.1 | Domaine cellule et ses composants. | 94 |
| 5.2 | Ensembles et fonctions utilisés dans le modèle. | 99 |
| 5.3 | Paramètres utilisés dans le modèle. | 100 |
| 7.1 | Valeurs des paramètres utilisés dans les simulations. | 140 |

Liste des Algorithmes

- 1 Algorithme du filtre non-linéaire ψ de l'*approche filament* 44
- 2 Algorithme de reconstruction des objets curvilignes de l'*approche filament* 52
- 3 Algorithme de fusion de régions dans l'*approche maillage* 62
- 4 Algorithme de simulation du processus de diffusion: méthode de Liebmann 134
- 5 Algorithme de simulation du processus de diffusion: méthode de relaxation 135

Introduction

Les cellules eucaryotes sont capables de positionner leurs organites, d'adopter des formes différentes et de se déplacer. Ces capacités reposent sur la présence de réseaux de filaments protéiques qui s'étendent à travers le cytoplasme, l'ensemble de ces réseaux est appelé le *cytosquelette*.

Une des questions essentielles de la mécanique de la cellule est de savoir "Comment les signaux mécaniques émanant de l'environnement extracellulaire se traduisent-ils en signaux biologiques à l'intérieur de la cellule?". Le processus de transformation des signaux mécaniques en signaux biologiques est nommé *mécanotransduction*.

L'objet de cette thèse est l'étude de l'implication du cytosquelette dans la mécano-transduction par une réorganisation coordonnée de sa structure en réponse aux changements mécaniques de la matrice extracellulaire. Cette conjecture est envisagée sous deux angles différents, l'un inductif et l'autre déductif.

Ce Chapitre décrit le contexte et les hypothèses biologiques sous-jacentes, et donne les différentes étapes du travail.

Le *cytosquelette* est constitué de trois types de filaments protéiques, organisés en réseaux tridimensionnels et dynamiques qui peuvent s'interconnecter [47]: les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires (Fig. 1). Chaque type de réseau cytosquelettique se caractérise par son rôle dans le fonctionnement cellulaire et son mode d'organisation structurale (Fig. 2).

Les *microfilaments* sont principalement impliqués dans le déplacement cellulaire tel que la migration des cellules sur un substrat et dans le changement de forme de la cellule. Les microfilaments, essentiellement composés d'actine (protéine globulaire), sont des polymères hélicoïdaux, à deux brins d'actine, de diamètre $\emptyset = 8nm$. Les microfilaments (filaments d'actine) sont des polymères polarisés possédant une extrémité \oplus et une extrémité \ominus . La polymérisation des filaments résulte de l'addition de monomères d'actine aux deux extrémités. Les deux extrémités \oplus et \ominus diffèrent par leur stabilité et leur vitesse de polymérisation. L'ajout de monomères est plus rapide à l'extrémité \oplus qu'à l'extrémité \ominus , l'extrémité \ominus a plutôt tendance à la dépolymérisation. Les microfilaments sont organisés en faisceaux bidimensionnels (fibres de stress, assemblage contractile, Fig. 1(a)) ou en gels tridimensionnels (réticulation, assemblage déformable). Ils se positionnent principalement dans le cortex cellulaire (région du cytoplasme sous la membrane plasmique) (Fig. 2).

Les *microtubules* se trouvent impliqués dans le transport de vésicules ou d'organites dans le cytoplasme. De plus, les microtubules interviennent dans la division cellulaire (la mitose), ils constituent le fuseau mitotique et interagissent avec les chromosomes

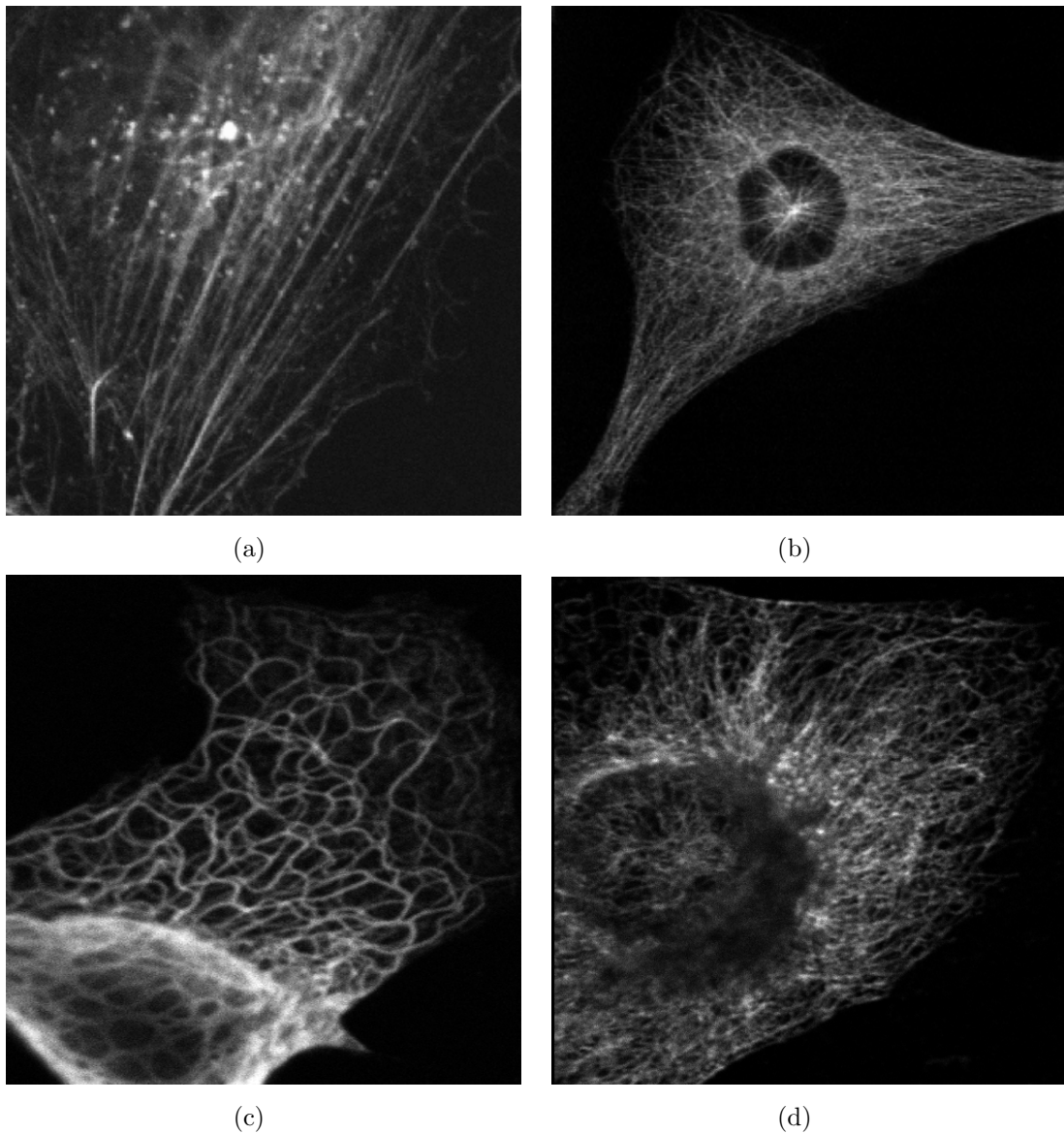


FIG. 1 *Différents réseaux cytosquelettiques visualisés par immunofluorescence et microscopie confocale (Jany Vassy, Laboratoire AIPC). (a) réseau de microfilaments, (b) réseau de microtubules, (c) réseau de filaments intermédiaires d'une cellule épithéliale (cytokératine) et (d) réseau de filaments intermédiaires d'une cellule endothéliale (vimentine).*

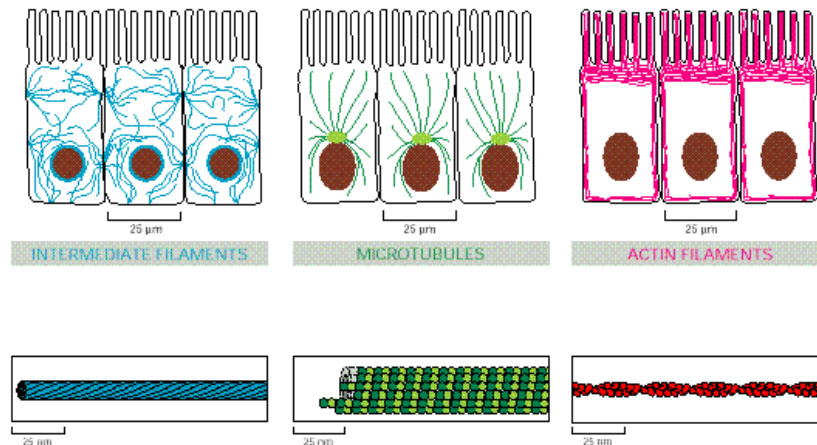


FIG. 2 *Organisation des différents réseaux cytosquelettiques dans la cellule. L'architecture des réseaux diffère selon les polymères, ainsi que la structure des polymères. Ce schéma est tiré de Cytoskeleton ©1998 par Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter . <http://www.essentialcellbiology.com>. Publié par Garland Publishing, INC.*

qui sont déplacés par les protéines motrices dirigées vers les extrémités \oplus ou \ominus . Les microtubules sont des tubes creux, de diamètre $\emptyset = 25nm$, constitués principalement de tubuline. Les microtubules sont des polymères polarisés possédant une extrémité \oplus et une extrémité \ominus . Ce sont des filaments longs et rectilignes dont l'extrémité \ominus est généralement liée à un centre organisateur situé près du noyau, le centrosome (Fig. 1(b)). A partir du centrosome, les microtubules rayonnent dans le cytoplasme (Fig. 2) par polymérisation à partir de leur extrémité \oplus . Ils se caractérisent par une instabilité dynamique, ainsi que par une vitesse de polymérisation différenciée selon l'extrémité. Les deux extrémités \oplus et \ominus ont tendance à la dépolymérisation si elles ne sont pas stabilisées. L'extrémité \oplus est capable d'une croissance rapide alors que l'extrémité \ominus a une croissance plus lente. Un microtubule est stabilisé lorsque ses deux extrémités sont capturées par des structures cellulaires spécifiques (extrémité \ominus liée au centrosome, extrémité \oplus liée à des protéines spécifiques). Des protéines motrices telles que les kinésines et les dynéines peuvent s'associer aux microtubules et sont responsables des transports antérograde ($\ominus \rightarrow \oplus$) et rétrograde ($\oplus \rightarrow \ominus$) des vésicules le long de ce réseau.

Les *filaments intermédiaires* ont un rôle qui n'est pas parfaitement élucidé, même si une littérature nombreuse montre leur implication dans le maintien de l'intégrité mécanique cellulaire [13, 19, 26, 36, 44]. Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines fibreuses, formant des fibres de diamètre $\emptyset = 10nm$. Ces protéines sont catégorisées en 5 classes principales et sont exprimées différemment selon le type cellu-

| | | |
|----------|--------------------|-----------------------------------|
| Type I | Kératines acides | Cellules épithéliales |
| Type II | Kératines basiques | Cellules épithéliales |
| Type III | Vimentine, desmine | Cellules mésenchymateuses, muscle |
| Type IV | Neurofilaments | Neurones |
| Type V | Lamines | Lamina nucléaire (ubiquitaires) |

TAB. 1 *Principaux types de protéines des filaments intermédiaires.*

laire, excepté pour les lamines, qui sont ubiquitaires (Tableau 1). Les monomères des filaments intermédiaires sont des protéines organisées en une structure tripartite: deux domaines globulaires (non hélicoïdaux) N- et C-terminaux (tête et queue) encadrent un noyau α -hélicoïdal [39]. Un dimère résulte de l'assemblage latéral entre deux monomères qui forment une paire d' α -hélices superenroulées l'une sur l'autre (coiled-coil structure). Le tétramère est formé par agrégation antiparallèle (côte à côte et avec un décalage) de deux dimères [33, 40]. Les tétramères sont considérés comme les sous-unités fondamentales à partir desquelles les filaments intermédiaires s'assemblent [38]. Huit tétramères s'apparient alors latéralement pour former une sous-unité de filament appelée *ULF* (unit-length filament) [39]. Ces sous-unités de filaments s'associent longitudinalement pour donner des filaments intermédiaires de $10nm$ de diamètre [40, 41]. Les filaments intermédiaires adoptent une organisation spécifique, tendus à travers tout le cytoplasme, de la région périnucléaire à la membrane plasmique.

Ainsi, le cytosquelette peut être envisagé à la fois comme l'"ossature" et le "muscle" de la cellule, car il intervient dans le maintien de l'intégrité cellulaire (réseau de filaments intermédiaires) ainsi que dans le déplacement des cellules (réseaux de microfilaments et de microtubules).

Chaque système de polymères cytosquelettiques possède ses propres caractéristiques rhéologiques (mécaniques) [44, 51] qui déterminent sa fonction biologique ainsi que son organisation architecturale. Les microtubules sont facilement déformables mais se rompent facilement. Les microfilaments sont plus rigides (moins déformables) mais se rompent aussi facilement (Fig. 3). Par contre, les filaments intermédiaires ont des propriétés rhéologiques bien spécifiques [51].

Les filaments intermédiaires se déforment facilement et supportent de grandes contraintes mécaniques sans se rompre (Fig. 3). De plus, ils résistent à de fortes tensions tout en augmentant leur rigidité; leurs polymères présentent un comportement de durcissement, de rigidification sous la contrainte [96]. Leurs propriétés viscoélastiques découlent de la structure superenroulée (coiled-coil structure) [41] commune à toutes les protéines des filaments intermédiaires.

De nombreux auteurs ont montré que les influences chimiques mais aussi mécaniques en provenance de l'environnement extracellulaire affectent profondément la régulation de l'expression des gènes et agissent sur la différenciation et la prolifération cellulaire

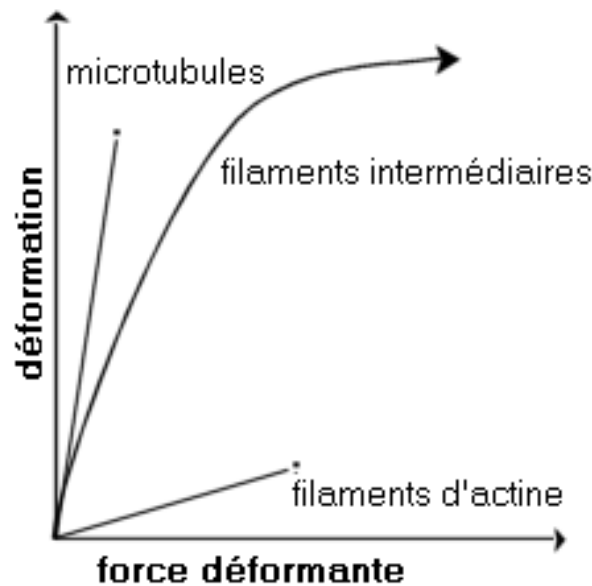


FIG. 3 *Propriétés mécaniques de polymères cytosquelettiques. Les microtubules sont facilement déformables mais se rompent facilement. Les filaments d'actine ou microfilaments sont plus rigides (moins déformables) mais se rompent aussi facilement. Par contre les filaments intermédiaires se déforment facilement et supportent de grandes contraintes mécaniques sans se rompre. La rupture des filaments est symbolisée par le •. Ce schéma est adapté de l'article [44].*

[43, 84, 85, 95]. La *mécanotransduction* est définie comme le processus de transformation des signaux mécaniques en signaux biologiques par lequel les cellules répondent à des stimuli mécaniques externes. Deux voies de mécanotransduction pourraient expliquer les influences mécaniques, émanant de l'environnement extracellulaire, sur la physiologie de la cellule (Fig. 4): une voie biochimique et une voie mécanique [65].

La voie mécanique fait appel au concept de matrice intégrée ("extended tissue matrix"), qui inclut les trois compartiments, la matrice extracellulaire, le cytosquelette et la matrice nucléaire [8, 52, 66]. Ce concept repose sur le fait que les récepteurs transmembranaires, le cytosquelette et la matrice nucléaire sont étroitement interconnectés [42].

La plupart des cellules est ancrée à une matrice extracellulaire via des récepteurs appelés complexes d'adhésion focale. Les complexes d'adhésion focale contiennent des intégrines, qui sont des récepteurs transmembranaires. Ces dernières sont liées à de nombreuses protéines au niveau des plaques d'adhésion (talin, vinculine et α -actine, paxiline) qui s'associent au cytosquelette d'actine. Ces complexes forment un pont moléculaire

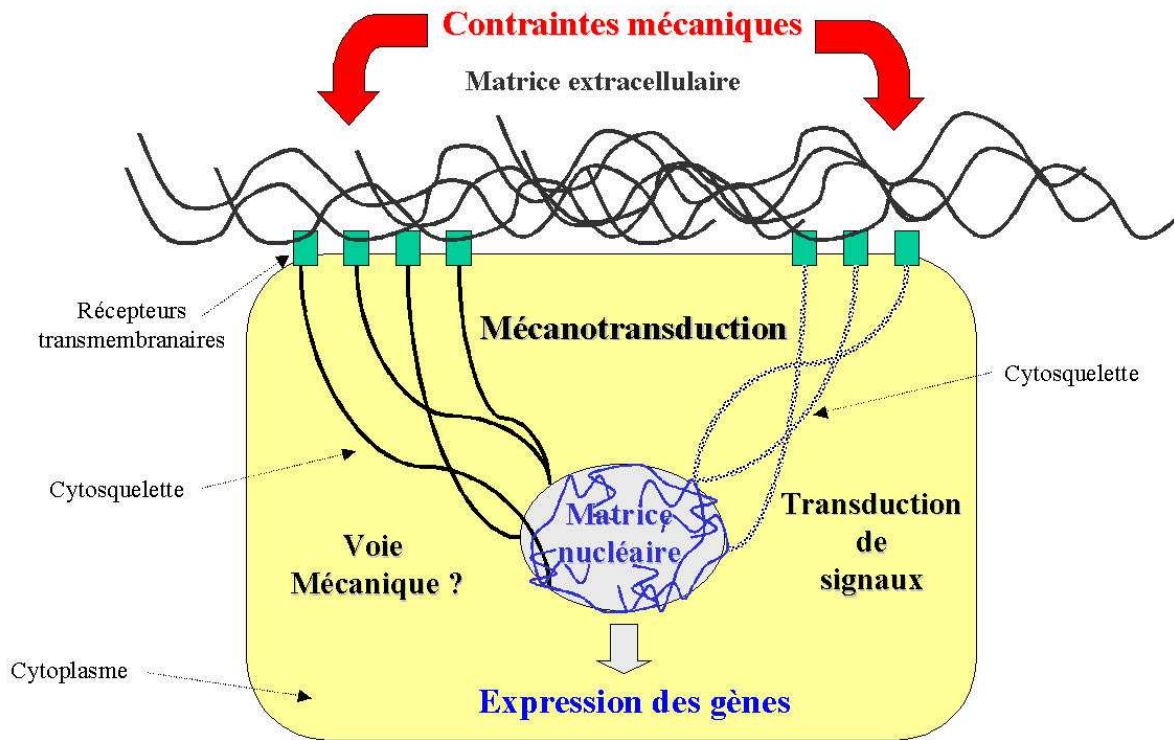


FIG. 4 *Voies possibles de la mécanotransduction. La mécanotransduction est le processus de transformation d'un signal mécanique externe en signal biologique. Il existe deux voies de mécanotransduction des signaux de la matrice extracellulaire vers la matrice nucléaire qui utilisent les réseaux cytosquelettiques, l'une biochimique par cascade de phosphorylation et transduction de signaux et l'autre mécanique qui reste moins connue.*

entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette situé dans le cytoplasme. Au voisinage de l'enveloppe nucléaire, le cytosquelette pourrait s'associer avec les fibres cytoplasmiques [14, 67], composant les complexes des pores nucléaires (structures protéiques de l'enveloppe nucléaire ayant un domaine extérieur et un domaine intérieur au noyau) [2, 59]. De même, les complexes des pores nucléaires sont liés à la matrice nucléaire, par l'intermédiaire de protéines associées aux lamines (protéines de la matrice nucléaire). Un autre modèle de connexion entre le cytosquelette et la matrice nucléaire pourrait être envisagé par l'intermédiaire de la plectine [99].

Les connexions moléculaires entre les intégrines (mécanorécepteurs transmembranaires, récepteurs transmembranaires capables de transmettre des signaux mécaniques [94]), le cytosquelette et la matrice nucléaire fournissent un chemin pour le transfert des signaux mécaniques à travers la cellule. Ce chemin correspond à un lien physique continu entre l'environnement extracellulaire et le matériel génétique et pourrait constituer une voie privilégiée de régulation du comportement cellulaire en fonction des contraintes environnementales (tenségrité) [42, 43].

Ainsi, le cytosquelette est un intermédiaire entre la matrice extracellulaire et la matrice nucléaire dont les altérations influencent l'activité transcriptionnelle de gènes spécifiques.

Dans cette thèse, il est supposé que *la mécanotransduction par la voie mécanique est réalisée par le cytosquelette selon un mécanisme de réorganisation coordonnée de l'architecture du cytosquelette en réponse aux changements mécaniques de la matrice extracellulaire.*

Les propriétés physicochimiques et de viscoélasticité ainsi que l'organisation structurale (lien entre matrice extracellulaire et matrice nucléaire) des filaments intermédiaires suggèrent qu'ils sont les meilleurs candidats, parmi tous les composants cytosquelettiques, pour une possible transduction mécanique et structurale des signaux de l'environnement extracellulaire vers la matrice nucléaire [44]. Pour cette raison, nous nous sommes focalisés sur les filaments intermédiaires et plus particulièrement sur les cytokératines qui sont des protéines de type filament intermédiaire majoritairement exprimées dans les cellules épithéliales (modèle cellulaire principalement observé dans cette thèse).

Les cellules épithéliales sont fixées les unes aux autres par des jonctions membranaires, assurant la cohésion de l'épithélium, telles que les *desmosomes* (jonctions adhérentes cellule-cellule). De plus, les cellules épithéliales s'ancrent à la lame basale ou à la matrice extracellulaire (pour les cellules en culture) par des jonctions membranaires adhérentes appelées *hémidesmosomes*. Ces deux types de jonctions adhérentes sont des plaques, fixées à la membrane plasmique (par l'intermédiaire des cadhérines ou des intégrines), constituées d'un assemblage de protéines dont des protéines associées aux filaments intermédiaires (desmoplaquines dans les desmosomes, BPAG1 dans les hémidesmosomes) [75]. Ces protéines associées aux filaments intermédiaires, constituant les plaques desmosomes et hémidesmosomes, soudent les filaments intermédiaires à ces plaques. Des faisceaux de filaments intermédiaires tapissent la membrane cellulaire pour former une trame de soutien; d'autres s'étendent d'un bout à l'autre du cytoplasme où ils se fixent aux desmosomes (Fig. 2). Ainsi, les filaments intermédiaires d'une cellule sont reliés à ceux des cellules adjacentes par les desmosomes. De plus, d'autres protéines associées aux filaments intermédiaires se trouvent dans les complexes des pores nucléaires [14], eux-mêmes en relation avec la matrice nucléaire. De ce fait, les filaments intermédiaires relient la matrice extracellulaire à la matrice nucléaire.

Les desmosomes assurent une continuité entre les réseaux de filaments intermédiaires des cellules adjacentes permettant la cohésion de l'épithélium. Ainsi une contrainte mécanique locale s'exerçant sur une cellule est répartie sur les cellules adjacentes. Cette redistribution des contraintes (compression, traction...) à travers le tissu évite les phénomènes de rupture. Réciproquement chaque cellule est soumise aux contraintes mécaniques exercées par les cellules adjacentes, alors par un mécanisme de renforcement, elle réorganise son réseau de filaments intermédiaires afin de préserver son intégrité.

En outre, cette structure peut transmettre des informations mécaniques et chimiques

provenant de l'environnement extracellulaire vers le noyau des cellules et vice versa. Ainsi chaque cellule est informée des contraintes mécaniques subies par ses voisines et s'adaptent en conséquence.

En résumé, les filaments intermédiaires semblent jouer un rôle mécanique, ils sont en charge du maintien de l'intégrité cellulaire. De plus, la structure des réseaux de filaments intermédiaires semble impliquer une fonction dans une transduction structurale des signaux mécaniques provenant de l'environnement extracellulaire [9].

L'objet de cette thèse est *l'étude de l'implication des filaments intermédiaires dans une fonction mécanique, et plus particulièrement, dans la fonction de mécano-transduction s'exerçant via un mécanisme de réorganisation de la structure du réseau en réponse aux changements mécaniques de la matrice extracellulaire.*

Cette problématique est appréhendée selon deux optiques différentes mais complémentaires, la première déductive et la seconde inductive. Par conséquent, cette thèse s'articule autour de deux parties.

La première partie –*De la réalité au modèle: Caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques*– traite de la caractérisation structurale des réseaux cytosquelettiques par des méthodes d'analyse d'images. La caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques se définit comme une représentation simplifiée des réseaux suivie d'une quantification de leur architecture. Les outils nécessaires à cette caractérisation sont définis lors du Chapitre 1. Le Chapitre 2 expose la méthodologie, développée pour spécifier l'architecture de réseaux d'objets curvilignes, qui se compose de trois approches découlant d'une observation hiérarchisée des réseaux. Cette méthodologie est ensuite appliquée dans le Chapitre 3, pour caractériser d'une part la variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux cytosquelettiques, et d'autre part les variations architecturales des réseaux cytosquelettiques de cellules exposées à des conditions mécaniques différentes.

La seconde partie –*Du modèle à la réalité: Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine*– présente un modèle d'édification du réseau de cytokératine, s'appuyant sur l'hypothèse selon laquelle l'organisation structurale d'un réseau spécifique de cytosquelette dépend de sa fonction biologique. Ce modèle a été conçu dans le but de valider l'hypothèse, émise et observée lors de l'étape de caractérisation, d'implication des réseaux de filaments intermédiaires dans la mécano-transduction par variations architecturales. Cette seconde partie débute par un état de l'art des modèles d'organisation du cytosquelette et de structures de type réseau dirigées par leur environnement (Chapitre 4). L'exposé de notre modèle mathématique d'organisation structurale du réseau de cytokératine d'une cellule épithéliale induite par des contraintes mécaniques données, ainsi que la discussion sur les concepts de modélisation utilisés sont faits dans le Chapitre 5. Nous présentons dans le Chapitre 6 un modèle de simulation, qui est dérivé du modèle mathématique, et discutons des caractéristiques numériques de ce dernier. Enfin, dans le Chapitre 7, nous nous livrons à un certain

nombre d'expériences numériques, examinons et discutons les résultats obtenus.

Pour finir, nous discutons de quelques limitations de ce travail, et des améliorations envisagées pour y remédier.

*De la réalité au modèle:
Caractérisation de
l'architecture des réseaux
cytosquelettiques*

1. Préliminaires

Dans la première partie de la thèse, notre but est de développer une méthodologie pour caractériser l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires afin de valider l'hypothèse selon laquelle l'environnement mécanique extracellulaire module l'architecture de ces réseaux. Cette hypothèse, soutenue dans le laboratoire AIPC par Jany Vassy¹, reflète le rôle des filaments intermédiaires dans le processus de mécanotransduction.

La caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques se définit comme une représentation simplifiée des réseaux suivie d'une quantification au sens topologique et morphologique de leur architecture. Cette caractérisation a été développée en utilisant différentes procédures d'analyse d'images qui sont exposées dans le Chapitre 2. Ces différentes méthodes s'attachent à la prise en compte des différents niveaux de géométrie des réseaux cytosquelettiques.

Cette caractérisation a été utilisée lors de deux études, ces dernières sont le sujet du Chapitre 3 dans lequel nous détaillons seulement leurs contextes et leurs conclusions, chacune de ces études ayant fait l'objet d'une publication (jointes en Annexes B et C). La première étude a eu pour but d'identifier les variations intracellulaires de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires résultant des conditions mécaniques qui s'appliquent différenciellement au sein d'une cellule. Elle a permis de mettre en évidence et de discriminer l'hétérogénéité structurale des réseaux de filaments intermédiaires en fonction des localisations intracellulaires. S'appuyant sur des expériences réalisées en micropesanteur² (envoi de cellules dans l'espace), la seconde étude a eu pour objet la mise en évidence des variations de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires induites par l'exposition de cellules à des conditions mécaniques différentes. Elle a permis d'évaluer les variations architecturales entre les réseaux de filaments intermédiaires de cellules épithéliales contrôles (cellules restées sur Terre) et ceux de cellules épithéliales en micropesanteur.

Les données exploitées lors de ces études sont des images d'immunofluorescence en microscopie confocale, de réseaux de filaments intermédiaires de lignées de cellules tumorales mammaires épithéliales (MCF-7). Nous présentons dans ce Chapitre, des notions

1. Maître de conférence, Université Paris XIII, Bobigny.

2. Le Laboratoire d'Analyse d'Images en Pathologie Cellulaire a participé en 1999 à une expérience en micropesanteur, nommée l'expérience EPITHELIUM, lors de la Mission spatiale Photon 12 sous l'égide du CNES.

de *microscopie confocale*, d'*image* et d'*analyse d'images* nécessaires à la compréhension de la méthodologie de caractérisation utilisée.

Microscopie confocale

La condition nécessaire à la réalisation d'une caractérisation fondée sur des méthodes d'analyse d'images, est l'obtention d'images de qualité. La qualité des images dépend essentiellement du système de formation et d'acquisition d'images.

La *microscopie confocale à balayage laser* a été utilisée pour ses capacités d'obtention d'images de très haute résolution et de grande finesse. En 1955, Marvin Minsky a décrit le principe de la microscopie confocale [54], cette dernière représente actuellement le meilleur moyen pour obtenir des coupes optiques très fines (de $0.7\mu m$ d'épaisseur) au sein d'un échantillon épais ($> 20\mu m$).

Un diaphragme (trou d'épingle), placé sur le trajet optique devant le détecteur, assure que seuls les rayonnements lumineux émanant du volume de l'échantillon situé dans le plan de focalisation atteignent le détecteur (Fig. 1.1). Cette construction optique confère à la microscopie confocale un pouvoir accru de résolution, car elle évite les phénomènes d'interférences (effet de flou) rencontrés en microscopie optique conventionnelle. Ces effets de flou sont dus à la diffusion de la lumière des plans hors-focus.

Pour construire une image bidimensionnelle, les informations (fluorescence) en chaque point du plan focal sont collectées séquentiellement en balayant le champ ligne par ligne à l'aide d'un miroir oscillant.

Pour nos études, l'acquisition des images est faite à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (MRC600, BioRad) couplé à un logiciel de numérisation (COMOS, BioRad).

Une image

Une image est une représentation bidimensionnelle d'un objet ou d'une scène provenant généralement d'un espace tridimensionnel. Elle est générée par un système optique qui capte la lumière (ou le rayonnement émis), émise par l'objet ou par la scène. L'information constituant l'objet ou la scène est ainsi transcrite en intensité de la lumière (luminosité).

Posons tout d'abord quelques définitions nécessaires à la définition des images numériques.

Définition 1.0.1 *Un pavage est une partition du plan, utilisant toujours les mêmes éléments ayant une forme élémentaire. Les éléments (régions élémentaires) constituant le pavage sont appelés tesselles. Les tesselles sont des polygones convexes réguliers.*

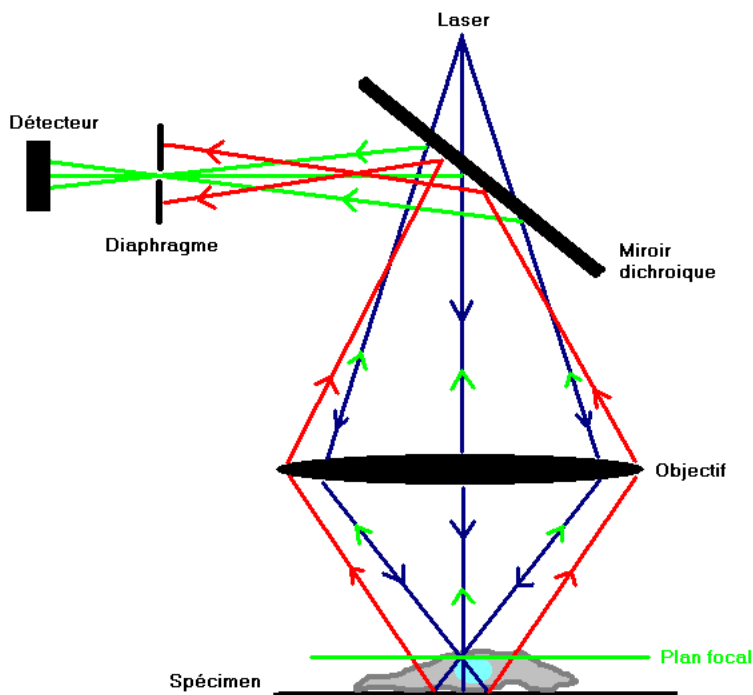
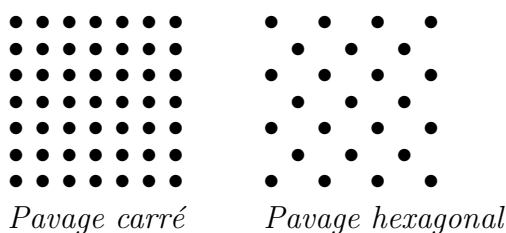


FIG. 1.1 *Principe de la microscopie confocale. Le diaphragme, placé devant le détecteur, permet d'éliminer les contributions lumineuses provenant des plans en dehors du plan focal.*

Autrement dit, un pavage est la répétition de tesselles de même forme, connectées par leurs sommets, qui recouvre entièrement le plan. Il existe plusieurs types de pavages dont les plus communs sont le pavage carré et le pavage hexagonal.



*Exemples de pavage d'un plan.
Chaque site figure le centre d'une tesselle.*

A tout pavage du plan est associé un maillage qui définit la relation entre les régions élémentaires (tesselles) du pavage, c'est à dire le mode de connexion entre les régions élémentaires.

Définition 1.0.2 *Un maillage est un graphe $G = (S, E)$ non-orienté dont les noeuds sont les sites associés aux tesselles du pavage. Un site correspond au centre de gravité de la tesselle associée. Une arête de ce graphe relie deux sites dont les tesselles sont adjacentes. L'ensemble S est l'ensemble des noeuds du graphe et l'ensemble E est composé des arêtes de G .*

Chaque pavage induit une structure de maillage particulière, il existe une relation de dualité entre le pavage et le maillage.

Une *image numérique* est une image dont le plan bidimensionnel est discrétisé en un pavage, constitué de petites régions élémentaires uniformes et disjointes auxquelles une valeur entière est assignée qui correspond à la discrétisation des intensités de la lumière. Une région élémentaire du pavage est appelée un *point image* ou un pixel (picture element). A chaque point image est associé une valeur qui intègre les valeurs de luminance sur le petit voisinage du site (centre de la tesselle).

Le pavage est obtenu de manière implicite par échantillonnage de l'image analogique lors de la phase de numérisation. Les images que nous avons analysées lors de cette étude, provenaient d'un système de numérisation travaillant en pavage carré. Une image numérique peut alors être considérée comme une matrice bidimensionnelle dont les indices des lignes et des colonnes caractérisent les coordonnées spatiales d'un point image et dont la valeur des éléments de la matrice correspond à l'intensité de la lumière de ces points (niveaux de gris).

Définition 1.0.3 Soit f une image en niveaux de gris définie sur un domaine D_f et prenant ses valeurs dans $I = [0, L]$,

$$\begin{aligned} f : D_f \subset \mathbb{N} \times \mathbb{N} &\rightarrow I \subset \mathbb{N} \\ p = (x, y) &\rightarrow f(p) = z \end{aligned}$$

f est une fonction qui associe une valeur entière ($z \in I$) à chaque point p du domaine D_f .

Chaque point p appartenant à D_f , appelé point image, est défini comme le couple de ses coordonnées spatiales $p = (x, y)$ ($x \in \mathbb{N}$, $y \in \mathbb{N}$) dans le domaine D_f .

Pour chaque point image $p \in D_f$, $f(p) = z$ est appelée le niveau de gris, l'intensité ou l'altitude (si on considère f comme un relief topographique) du point image p .

Remarque –

- Le domaine image D_f est un espace bidimensionnel borné.
- Le champ I de la fonction f , ou résolution en niveaux de gris de l'image f , est un intervalle de \mathbb{N} borné $I = [0, L]$ tel que $z = 0$ correspond au noir et $z = L$ représente le blanc. Toutes les valeurs intermédiaires entre 0 et L sont des nuances de gris variant graduellement du noir au blanc.

Les définitions des voisinages de points et les métriques associées sont liées au type de maillage. La donnée d'un graphe $G = (S = D_f, E)$ de maillage permet de définir pour tout point image p , un ensemble de points de l'image appelé voisinage $v_G(p)$ de p . Ce voisinage $v_G(p)$ est défini de la façon suivante:

$$v_G(p) = \{q \in D_f : (p, q) \in E\}$$

Tout point image q appartenant à $v_G(p)$ est un voisin du point image p , c'est à dire que q est adjacent à p dans le graphe G , il existe une arête dans E allant de p à q . La notion de voisinage doit être prise au sens de l'adjacence de sommets dans le graphe de maillage et non au sens topologique.

Dans le cas d'un pavage carré, il existe deux structures de maillage (ou trame), l'une en 4–connexité et l'autre en 8–connexité. Les voisinages d'un point image p de coordonnées spatiales (x,y) , dans le graphe de maillage G_4 et G_8 , sont représentés ci-dessous.

- En 4–connexité, p a quatre voisins (points adjacents), le voisinage $v_{G_4}(p)$ de p contient les points images de coordonnées $(x,y-1)$, $(x-1,y)$, $(x+1,y)$ et $(x,y+1)$.
- En 8–connexité, p a huit voisins (points adjacents), le voisinage $v_{G_8}(p)$ de p contient les points images de coordonnées $(x-1,y-1)$, $(x,y-1)$, $(x+1,y-1)$, $(x-1,y)$, $(x+1,y)$, $(x-1,y+1)$, $(x,y+1)$ et $(x+1,y+1)$.

| | | |
|-------------|-----------|-------------|
| $(x-1,y-1)$ | $(x,y-1)$ | $(x+1,y-1)$ |
| $(x-1,y)$ | (x,y) | $(x+1,y)$ |
| $(x-1,y+1)$ | $(x,y+1)$ | $(x+1,y+1)$ |

Les deux métriques discrètes, $d_4(\cdot)$ et $d_8(\cdot)$, associées respectivement à une trame en 4–connexité et 8–connexité, sont définies $\forall p, q \in D_f$ de la manière suivante:

$$d_4(p,q) = |x_p - x_q| + |y_p - y_q|$$

$$d_8(p,q) = \max(|x_p - x_q|, |y_p - y_q|)$$

L'information contenue dans une image doit être simplifiée afin d'en extraire les seules informations pertinentes en vue de l'application considérée; ces informations pertinentes doivent ensuite être traitées pour être décrites et interprétées. L'ensemble de ces processus est désigné par le terme d'*analyse d'images*.

Analyse d'images

L'analyse d'images peut être considérée comme la simplification, l'extraction et l'interprétation et/ou la quantification de l'information contenue dans une image. L'objectif du processus d'analyse d'images est de construire une description de l'image, dans une perspective donnée, en vue de son interprétation et/ou de sa quantification. Ce processus repose sur la façon d'appréhender l'image, définie par les applications envisagées, qui engendre une ou des problématiques d'analyse. Une problématique d'analyse implique la définition d'objets (primitives) appropriés à la compréhension et à la caractérisation de l'image appréhendée selon l'application considérée. La nature de ces objets (primitives) guide la conception des algorithmes à chaque étape du traitement.

Définition 1.0.4 *On appelle primitive l'élément de base qui par répétition de lui-même décrit totalement les structures constituant une image.*

Les premières étapes de l'analyse d'images sont des traitements de *bas niveau* tels que les prétraitements et la segmentation (Fig. 1.2). Les prétraitements ont pour but d'améliorer la qualité des images et de permettre l'extraction des informations pertinentes. Les prétraitements ont pour objet la transformation de l'image brute qui est souvent bruitée et sa simplification, l'image contenant une trop grande quantité d'informations. Le second type de traitement de *bas niveau* est la segmentation qui consiste en la partition de l'image f en sous-ensembles non vides disjoints R_i , appelés régions, telles que:

$$\begin{aligned} \forall i \quad R_i &\neq \emptyset \\ \forall i, j \quad i \neq j, R_i \cap R_j &= \emptyset \\ f &= \bigcup_i R_i \end{aligned}$$

Une région est un ensemble connexe constitué de points images "homogènes" selon un critère donné: tous les points d'une même région ont une ou des propriétés similaires. La définition du critère déterminant l'appartenance à une région découle de la nature des objets conceptuellement prédéfinis (primitives). Cette segmentation, conférant à des notions de similarités, revient à une analyse qualitative des structures composant l'image, c'est à dire à une détection des objets prédéfinis selon la problématique. Dans ce cas, les objets sont des régions qui se différencient les unes des autres selon des critères prédéfinis.

D'autres types d'objets peuvent être définis, comme par exemple une ligne discrète. Une ligne discrète est un chemin dans \mathbb{N}^2 .

Définition 1.0.5 *Un chemin dans \mathbb{N}^2 est une suite de points images (noeuds du maillage) p_0, p_1, \dots, p_n distincts et deux à deux adjacents pour le graphe de maillage de l'image.*

Une ligne discrète est un objet dont l'épaisseur est un point image. La définition de ce type d'objet induit des processus de segmentation de type squelettisation. La squelettisation a pour effet de mincir les structures, composant une image, jusqu'à l'idéalisation

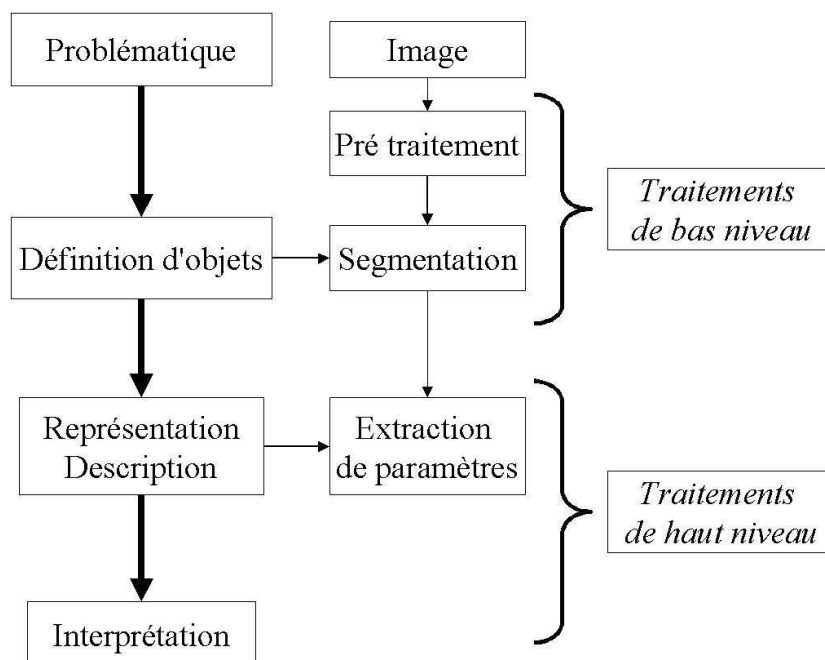


FIG. 1.2 Organigramme du processus d'analyse d'images

des structures à des lignes discrètes, que l'on appelle squelettes. Le squelette condense l'information de la structure originale tout en préservant ses propriétés.

Après les étapes de traitement de *bas niveau*, l'image obtenue est une représentation simplifiée, schématique de l'image originale, résultant de la nature des objets préalablement définis.

Les traitements de *haut niveau* font suite aux traitements de *bas niveau* et utilisent les informations fournies par ceux-ci conjointement aux informations *a priori* définies par la problématique de l'analyse. Les traitements de *haut niveau* intègrent l'extraction de paramètres quantitatifs caractérisant les structures composant les images segmentées en s'appuyant sur la définition des objets, ainsi que l'interprétation des résultats obtenus (Fig. 1.2). Ces traitements de *haut niveau* peuvent être assimilés à une analyse quantitative lorsque la finalité de l'application n'est pas seulement interprétative (reconnaissance de formes).

Les différentes étapes du processus d'analyse d'images sont résumées dans l'organigramme présenté dans la Figure 1.2.

Ces préalables étant établis, nous décrivons, dans le Chapitre 2, les méthodes d'analyse d'images mises au point pour caractériser l'architecture des réseaux cytosquelettiques, et exposons dans le Chapitre 3 les résultats de l'application de ces méthodes à deux études spécifiques.

2. Caractérisation par des méthodes d'analyse d'images de l'architecture des réseaux cytosquelettiques

Nous montrons ici qu'une caractérisation exhaustive de l'architecture des réseaux cytosquelettiques nécessite de considérer différentes problématiques s'attachant à la topologie et à la géométrie des réseaux ainsi qu'à la géométrie et à la morphologie des éléments les constituant. L'objet de ce Chapitre est de présenter la méthodologie que nous avons mis au point pour caractériser les différents aspects de l'architecture des réseaux cytosquelettiques.

Sommaire

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1 | Concepts de caractérisation | 35 |
| 2.2 | Approche Filament | 38 |
| 2.2.1 | Filtre non-linéaire ψ | 39 |
| 2.2.2 | Reconstruction des objets curvilignes | 45 |
| 2.2.3 | Quantification des objets curvilignes | 51 |
| 2.3 | Approche Maillage | 54 |
| 2.3.1 | Fermeture morphologique en niveaux de gris | 54 |
| 2.3.2 | La ligne de partage des eaux | 56 |
| 2.3.3 | Fusion de régions | 59 |
| 2.3.4 | Quantification des mailles | 61 |
| 2.4 | Combinaison des approches | 64 |
| 2.4.1 | Segmentation | 65 |
| 2.4.2 | Quantification des réseaux | 65 |
| 2.5 | Discussion | 67 |

2.1 Concepts de caractérisation

Les réseaux cytosquelettiques peuvent être envisagés à des niveaux différents d'observation. Chaque niveau d'observation permet de considérer un aspect particulier des réseaux cytosquelettiques. L'étude des différents aspects apporte une information utile

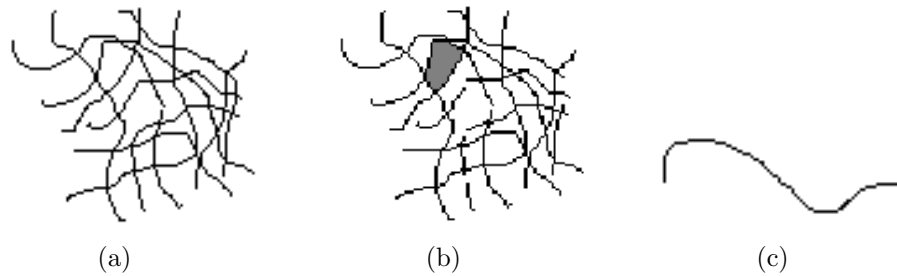


FIG. 2.1 Primitives définies pour la caractérisation des réseaux cytosquelettiques. (a) l'entité réseau, (b) la maille et (c) l'objet curviligne.

à la compréhension du rôle du cytosquelette. Une observation macroscopique nous permet d'appréhender le réseau dans sa totalité par sa configuration architecturale, tandis qu'une observation plus fine, dite microscopique, conduit à l'individualisation des éléments constitutifs (les filaments) du réseau et à la considération de leur morphologie. Ces deux niveaux d'observation mènent à la définition de deux types de problématiques qui permettent une caractérisation aussi exhaustive que possible de l'architecture des réseaux cytosquelettiques:

- à un niveau macroscopique, une problématique de *caractérisation de la topologie et de la géométrie des réseaux* pour une analyse de l'architecture des réseaux,
- à un niveau microscopique, une problématique de *caractérisation de la géométrie et de la morphologie des éléments constitutifs des réseaux cytosquelettiques*, pour une analyse de la morphologie des filaments.

La première problématique, relative à la topologie et à la géométrie des réseaux, propose la caractérisation de l'architecture des réseaux. Le réseau, défini comme un enchevêtrement de filaments peut être considéré comme une entité propre. En outre, un réseau peut être assimilé à une structure de filet, à un maillage; il est alors appréhendé comme une juxtaposition de mailles. Dans ce cas, l'élément constitutif d'un réseau est une maille. Par conséquent, cette problématique induit la définition de deux primitives (Déf. 1.0.4) permettant la description et la représentation des images: le *réseau* et la *maille*.

La seconde problématique, relative à la géométrie et la morphologie des filaments, propose la caractérisation de la forme des éléments constitutifs des réseaux qui sont les filaments. La primitive, induite par cette problématique, est un objet qui doit représenter un filament. Un filament peut être conceptualisé comme un *objet curviligne* de type ligne discrète (page 32).

Par conséquent, l'observation hiérarchisée qui mène à la considération de deux problématiques engendre la définition de trois types de primitives:

- le *réseau* (Fig. 2.1(a)),
- la *maille* (Fig. 2.1(b)),
- l'*objet curviligne* (Fig. 2.1(c)).

Ces trois types de primitives doivent maintenant être définis de manière explicite.

- Réseau

Définition 2.1.1 Soit un graphe non-orienté G , défini par une paire d'ensembles $G = (S, E)$ satisfaisant $E \subseteq S \times S$. L'ensemble S représente un ensemble dont les éléments sont appelés sommets ou noeuds du graphe G . L'ensemble E est l'ensemble de paires –non ordonnées– des divers sommets de S , ces paires sont appelées arêtes du graphe G . Un réseau est un graphe non-orienté.

Remarque – Les sommets ou noeuds du réseau sont des points objets ayant un seul voisin (extrémité) ou plus de 2 voisins qui sont eux-mêmes des points objets. Les arêtes du réseau sont des lignes discrètes dans \mathbb{N}^2 reliant deux sommets du réseau. Tous les points images appartenant à une arête ont au plus deux voisins appartenant à cette arête.

Interprétation – Le réseau cytosquelettique est constitué d'un enchevêtrement de filaments interconnectés. Les sommets ou noeuds du réseau peuvent être assimilés à des points d'anastomose¹ entre deux filaments cytosquelettiques.

- Maille

Définition 2.1.2 Soit un chemin fermé non sécant dans \mathbb{N}^2 , c'est à dire une suite de points images adjacents p_0, p_1, \dots, p_n tel que $p_0 = p_n$. Les points situés à l'intérieur de la boucle formée par ce chemin constituent un ensemble connexe de \mathbb{N}^2 de type région. Cette région est appelée une maille.

Interprétation – L'enchevêtrement des filaments cytosquelettiques figure un maillage semblable à un filet. Ce maillage dans le plan est composé de mailles juxtaposées de formes et de tailles variables.

- Objet curviligne

Définition 2.1.3 Un objet curviligne est un objet, défini comme une ligne discrète de \mathbb{N}^2 (un chemin dans \mathbb{N}^2), dont l'épaisseur est un point image.

Interprétation – Un filament cytosquelettique, visualisé par immunofluorescence en microscopie confocale, décrit une courbe en niveaux de gris dans le plan image.

Remarque – La primitive *réseau* et la primitive *maille* sont des structures duales vis à vis de la complémentation, la première de type frontière et la seconde de type région.

1. points de communication, d'attachement entre deux filaments distincts.

Le réseau constitue la frontière entre les différentes régions que sont les mailles.

Une problématique d'analyse implique la définition de primitives qui permettent la compréhension et la description des images. La définition de primitives guide ensuite la conception des algorithmes de segmentation des images (analyse qualitative) et la définition des paramètres pertinents de quantification (analyse quantitative).

L'analyse qualitative de l'architecture des réseaux cytosquelettiques et de la morphologie des filaments résulte de la mise au point de méthodologies de segmentation spécifiques à chaque problématique, qui s'appuient sur les définitions des primitives induites.

De même, l'analyse quantitative consiste en la définition de paramètres caractérisant les structures composant l'image, induite par les primitives précédemment définies. La quantification, découlant de la définition de la primitive réseau, s'attache à la densité et la connexion des réseaux de filaments intermédiaires, alors que celle, induite par la définition de la primitive maille, s'attache à la structure de maille (géométrie et forme des mailles). La définition de la primitive objet curviligne implique une quantification focalisée sur la morphologie des filaments.

Ainsi, selon les problématiques et les primitives induites, les réseaux peuvent être caractérisés en terme de connexion, de densité, de structure de maille ou de morphologie de filaments. Par conséquent, les différents aspects des réseaux cytosquelettiques, la topologie et la géométrie des réseaux ainsi que la morphologie des filaments, peuvent être spécifiés.

Comme trois types de primitives ont été définis, trois approches d'analyse ont été imaginées pour une caractérisation exhaustive de l'architecture des réseaux cytosquelettiques.

La première approche, l'*approche filament*, qui repose sur la définition de la primitive objet curviligne et associe plusieurs types de méthodologies d'analyse d'images, s'attache à l'analyse de la morphologie des filaments.

La deuxième approche, l'*approche maillage*, ayant pour but la caractérisation de la géométrie des réseaux en terme de structure de maille, a été développée à partir de la définition de la primitive maille et utilise principalement des procédures de morphologie mathématique.

L'approche maillage et l'approche filament découlent de la définition de deux primitives qui sont des éléments constitutifs des réseaux. La *combinaison* de ces approches constitue la troisième approche induite par la définition de la primitive réseau qui caractérise la topologie des réseaux cytosquelettiques en terme de densité et de connexion.

2.2 Approche Filament

La caractérisation de la morphologie des filaments, qui repose sur une problématique de caractérisation individualisée des filaments, en s'appuyant sur la définition de la

primitive objet curviligne, a pour intitulé l'*approche filament*. Le processus de segmentation de l'approche filament, qui mêle différentes méthodologies, comporte deux étapes. Les images en niveaux de gris sont tout d'abord traitées par un filtre non-linéaire ψ , qui ne préserve que les voisinages des maxima régionaux en s'attachant à la géométrie des objets curvilignes. Lors d'une seconde étape, les objets curvilignes sont reconstruits par une procédure de seuillage dynamique combinée à des opérations de morphologie mathématique.

2.2.1 Filtre non-linéaire ψ

Un filtre non-linéaire a été développé dans un but de simplification et d'extraction de l'information pertinente contenue dans les images, en prenant en compte la géométrie des structures composant les images. Ce filtre, appelé ψ , intègre trois opérateurs qui s'exécutent séquentiellement: un opérateur M linéaire (filtre moyenneur), un opérateur S de pseudoseuillage et un opérateur D de décision. L'image finale $\psi(f)$, obtenue par l'application du filtre ψ sur l'image originale f , est une image en niveaux de gris des voisinages de lignes de crêtes. L'expression de l'image finale $\psi(f)$ en fonction de l'image originale f est donnée par l'expression suivante:

$$\psi(f) = D(S(M(f)))$$

Les différents opérateurs, entrant dans la définition du filtre ψ , sont maintenant détaillés.

• Opérateur linéaire M (filtre moyenneur):

Les images originales f sont préalablement traitées dans un but de réduction du bruit. Les images originales sont soumises à un filtre moyenneur. Cet opérateur linéaire M est un filtre de convolution dont le noyau de convolution h (réponse impulsionnelle) est à support borné $[-m, m] \times [-m, m]$, avec $m \in \mathbb{N}$. La valeur du point image (x, y) de l'image transformée $M(f)$ en fonction de l'image originale f est donnée par l'expression suivante:

$$M(f)(x, y) = \sum_{i=-m}^m \sum_{j=-m}^m h(i, j) f(x - i, y - j)$$

dont les coefficients du noyau de convolution h sont définis tels que:

$$\forall i, j \in [-m, m] \quad h(i, j) = \frac{1}{(2m + 1)^2}$$

La condition $\sum_{i=-m}^m \sum_{j=-m}^m h(i, j) = 1$ est respectée ce qui implique que le filtre ne modifie pas l'intensité moyenne des régions de l'image.

La valeur du point image (x, y) de l'image transformée $M(f)$ en fonction de l'image originale f est alors donnée par l'expression suivante:

$$M(f)(x, y) = \frac{1}{(2m + 1)^2} \sum_{i=-m}^m \sum_{j=-m}^m f(x - i, y - j)$$

Interprétation – *Ce filtre consiste à calculer la valeur d'un point image (x,y) comme la moyenne des niveaux de gris de la fenêtre, qui est définie par le noyau de convolution $[-m,m] \times [-m,m]$, centrée sur le point image (x,y) .*

La taille du noyau de convolution $(2m + 1)^2$ est définie en fonction de la largeur moyenne (en point image) des structures (filaments) de l'image: le noyau de convolution doit pouvoir être totalement inclus dans les filaments afin d'éviter la dégradation du signal. La largeur du noyau de convolution, qui est $2m + 1$, doit être inférieure à la largeur moyenne des filaments.

Interprétation – *La condition imposée sur la taille du noyau de convolution du filtre moyenneur évite l'étalement (l'épaississement) des structures de type filament.*

• **Opérateur S (pseudoseuillage):**

Les images $M(f)$, transformées par l'opérateur M , sont ensuite soumises à un pseudoseuillage par borne inférieure au niveau t dans le but de supprimer les pixels du fond. L'opérateur S réalise une classification grossière des points images (points objets ou points du fond) en prenant leur intensité comme critère. La valeur du point image (x,y) de l'image transformée $S(f)$ par l'opérateur S , en fonction d'une image originale f est donnée par l'expression suivante:

$$S(f)(x,y) = \begin{cases} 0 & f(x,y) < t \\ f(x,y) & f(x,y) \geq t \end{cases}$$

Dans le cas du filtre non-linéaire ψ , la valeur du point image (x,y) de l'image transformée par l'opérateur $S(\cdot)$ en fonction de l'image originale f est alors donnée par l'expression suivante, qui intègre l'étape précédente du filtre moyenneur M :

$$S(M(f))(x,y) = \begin{cases} 0 & M(f)(x,y) < t \\ M(f)(x,y) & M(f)(x,y) \geq t \end{cases}$$

Interprétation – *Les points images ayant une intensité inférieure au niveau t sont définitivement transformés en point du fond, c'est à dire que leur intensité est assignée à 0 ($z = 0$, intensité des points du fond).*

Remarque – L'opérateur S agit comme un opérateur de seuillage sans transformer l'image en niveaux de gris en image binaire.

Les points images, non modifiés par l'opérateur de pseudoseuillage $S(\cdot)$, sont à cette étape considérés comme des points objets. La valeur du seuil t est, soit déterminée de façon empirique par l'utilisateur, soit calculée comme l'intensité moyenne des points images appartenant au fond de l'image $M(f)$.

Après l'application de l'opérateur de pseudoseuillage S , une première classification des points images est faite déterminant deux classes de points, les points images appartenant aux objets et les points du fond. Les points images de $S(M(f))$ sont alors transformés par un dernier opérateur, l'opérateur de décision D qui réalise une classification plus fine.

• **Opérateur D (de décision):**

L'opérateur de décision D travaille au niveau des intensités des points images pour caractériser la topologie du voisinage d'un point image. Selon la topologie de leurs voisinages, les points images sont alors classés en deux catégories, points objets ou points du fond.

Les points images sont classifiés selon leurs statuts de maximaux régionaux. Pour cette classification, les critères de décision sont N_{xy} et L_{xy} qui sont respectivement confrontés à des seuils δ et θ pour décider du statut du point image (x,y) . La valeur du point image (x,y) de l'image transformée $D(f)$ en fonction d'une image originale f est alors donnée par l'expression suivante:

$$D(f)(x,y) = \begin{cases} f(x,y) & N_{xy} > \delta \text{ et } L_{xy} < \theta \\ 0 & N_{xy} \leq \delta \text{ ou } L_{xy} \geq \theta \end{cases}$$

Pour chaque point (x,y) d'une image f , les critères N_{xy} et L_{xy} sont définis de la façon suivante:

$$N_{xy} = \#\{(x',y') \in D_f : d_8((x,y),(x',y')) \leq n \text{ tels que } f(x,y) \geq f(x',y')\} \quad (2.1)$$

$$L_{xy} = \#\{(x',y') \in D_f : d_8((x,y),(x',y')) \leq n \text{ tels que } f(x,y) = f(x',y')\} \quad (2.2)$$

avec $n \in \mathbb{N}$ et $d_8(\cdot)$ est la distance discrète en 8-connexité. Le symbole $\#$ se rapporte au cardinal d'un ensemble.

Interprétation – Le critère N_{xy} représente le nombre de points images voisins du point courant (x,y) dont l'intensité est inférieure ou égale à l'intensité du point (x,y) dans un voisinage qui est défini par une fenêtre de taille $(2n + 1)^2$ centrée sur (x,y) (Eq. 2.1).

Le critère L_{xy} représente le nombre de points images voisins du point courant (x,y) dont l'intensité est égale à l'intensité du point (x,y) dans un voisinage défini par une fenêtre de taille $(2n + 1)^2$ centrée sur (x,y) (Eq. 2.2).

La taille $(2n + 1)^2$ de la fenêtre, représentant le voisinage sur lequel a lieu le calcul de N_{xy} et L_{xy} , dépend de la largeur moyenne en points images des structures à analyser: le filament doit être totalement inclus en largeur dans le masque de sélection.

Le critère N_{xy} qualifie la situation du point (x,y) au sens topographique, les intensités des points sont assimilées à des altitudes, dans un voisinage donné. Plus la valeur du critère N_{xy} est grande, autrement dit, plus N_{xy} s'approche de $(2n + 1)^2$, plus le point

image (x,y) a des chances d'appartenir à un maximum régional. Si N_{xy} est égal à $(2n + 1)^2$, alors le point (x,y) est le ou l'un des maxima du voisinage considéré, le point (x,y) a l'intensité la plus haute du voisinage. La valeur du seuil δ associé au critère N_{xy} doit exprimer l'aire en points images que peuvent au plus représenter les structures à détecter dans le masque de sélection. La racine carrée $\sqrt{\delta}$ doit être égale à la largeur moyenne des structures. Ainsi la confrontation du seuil δ au critère N_{xy} permet de classer comme point objet uniquement les points appartenant à l'intérieur des structures.

Le critère L_{xy} qualifie l'appartenance d'un point (x,y) à un plateau, qui est défini comme une région constituée de points ayant la même altitude (en l'occurrence, la même intensité). Le seuil θ associé à L_{xy} permet de révéler les zones dites floues comme des zones de gel cytoplasmique ou des zones correspondant à des structures défocalisées. La valeur du seuil θ est telle que sa racine carrée $\sqrt{\theta}$ soit plus grande que la largeur moyenne des structures à détecter. Cette condition permet d'identifier des points appartenant à des régions homogènes, au sens des intensités, qui sont plus grandes en surface que les structures à détecter.

La combinaison des deux critères permet de repérer des points qui sont des maxima régionaux tout en évitant les points appartenant à des plages de haute intensité qui ne correspondent pas à des structures à détecter.

Par conséquent, la valeur du point image (x,y) de l'image transformée $\psi(f)$ par le filtre non-linéaire ψ , en fonction de l'image originale f est donnée par l'expression suivante (Fig. 2.3):

$$\psi(f)(x,y) = D(S(M(f)))(x,y) = \begin{cases} S(M(f))(x,y) & N_{xy} > \delta \text{ et } L_{xy} < \theta \\ 0 & N_{xy} \leq \delta \text{ ou } L_{xy} \geq \theta \end{cases}$$

Les critères de décision N_{xy} et L_{xy} sont calculés sur l'image $S(M(f))$. Les points images qui avaient été classés comme points du fond lors de l'étape de pseudoseuillage ne changent pas de statut. Seuls, des points classés points objets pour le pseudoseuillage changent de statut. L'algorithme complet du filtre non-linéaire ψ est présenté à la page 44.

Les conditions imposées sur la taille $(2m + 1)^2$ du noyau de convolution du filtre moyenneur $M(\cdot)$ et sur la taille $(2n + 1)^2$ du voisinage de sélection de l'opérateur de décision $S(\cdot)$ donnent la relation suivante:

$$2m + 1 \leq \text{Largeur moyenne des structures} < 2n + 1$$

Par conséquent, si la largeur moyenne des filaments est de 7 points images, une fenêtre de taille 9×9 points images est utilisée lors de l'étape de sélection de l'opérateur $D(\cdot)$, ainsi qu'un noyau de convolution de taille 3×3 pour l'opérateur $M(\cdot)$ (Fig. 2.2).

La largeur, en points images, des structures à détecter peut être estimée par comptage du nombre de points images composant un segment dont les extrémités sont les points images ayant les valeurs de gradient (Annexe A) les plus élevées (détection des contours).

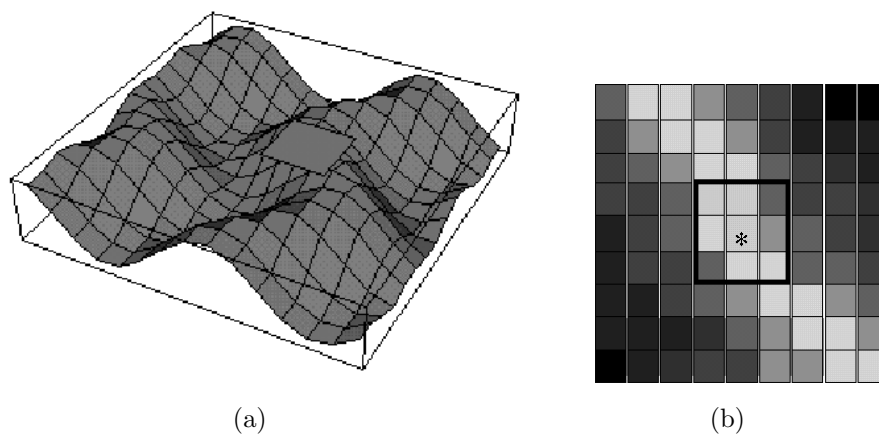


FIG. 2.2 *Tailles de voisinage utilisées lors du filtre non-linéaire ψ . La sous-figure (a) montre une surface dans l'espace tridimensionnel qui représente une image, contenant des structures de type filament, où les intensités des points images sont assimilées à des altitudes. Au-dessus du profil est positionné un voisinage qui est utilisé par l'opérateur de décision $D(\cdot)$ du filtre non-linéaire ψ . La sous-figure (b) est l'agrandissement du voisinage apparaissant dans la Figure (a). L'étoile (*) repère le point courant, et la sous-fenêtre délimitée en gras figure le noyau de convolution de l'opérateur moyenneur $M(\cdot)$ du filtre ψ . Les intensités des points images sont ici représentées par des niveaux de gris. Les points de niveaux de gris clairs correspondent à des points constituant les structures à détecter de l'image. Inversement, les points de niveaux de gris foncés sont des points du fond. Le masque de sélection de l'opérateur $D(\cdot)$ inclut les structures à détecter alors que le masque de convolution de l'opérateur $M(\cdot)$ est inclus dans les structures.*

Algorithme 1 Algorithme du filtre non-linéaire ψ de l'approche filament

Entrée: une image f , la largeur moyenne, notée L_{argeur} , des objets composant l'image, et l'intensité moyenne t des points du fond

Sortie: une image filtrée $\psi(f)$

*** Initialisation des tailles de masque ***

$n \leftarrow E[\frac{L_{argeur}-1}{2}] + 1$ ($E[\cdot]$ = partie entière)

$m \leftarrow E[\frac{L_{argeur}-1}{2}] - 1$

*** Filtre moyennneur (opérateur M) ***

Pour Tout point image (x,y) **Faire**

$$M(f)(x,y) = \frac{1}{(2m+1)^2} \sum_{i=-m}^m \sum_{j=-m}^m f(x-i, y-j)$$

Fin Pour

Pour Tout point image (x,y) **Faire**

*** Etape de pseudoseuillage (opérateur S) ***

Si $M(f)(x,y) \geq t$ **Alors**

$N_{xy} \leftarrow 0$

$L_{xy} \leftarrow 0$

*** Etape de sélection de l'opérateur de décision D ***

Pour $l = -n$ à n **Faire**

Pour $k = -n$ à n **Faire**

Si $M(f)(x+k, y+l) \leq M(f)(x,y)$ **Alors**

Incrémenter N_{xy}

Si $M(f)(x+k, y+l) = M(f)(x,y)$ **Alors**

Incrémenter L_{xy}

Fin Si

Fin Si

Fin Pour

Fin Pour

*** Etape de décision de l'opérateur de décision D ***

Si $(N_{xy} > \delta)$ et $(L_{xy} < \theta)$ **Alors**

$\psi(f)(x,y) \leftarrow M(f)(x,y)$

Sinon

$\psi(f)(x,y) \leftarrow 0$

Fin Si

Sinon

$\psi(f)(x,y) \leftarrow 0$

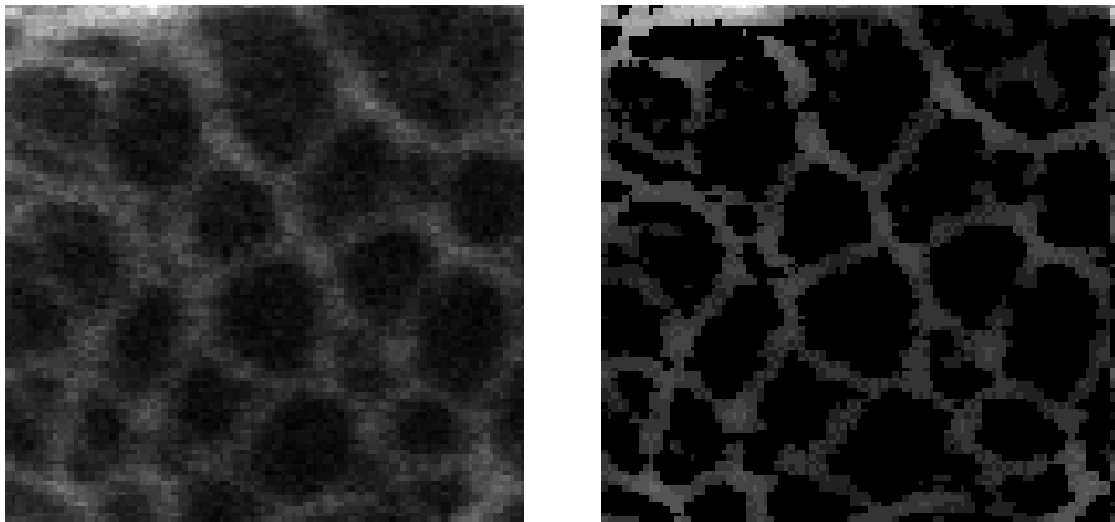
Fin Si

Fin Pour

Remarque – Définissons l'opérateur $\Gamma = D \circ S$ comme la composition des opérateurs S et D .

- l'opérateur Γ est une *transformation anti-extensive*, $\Gamma(f) \subset f$,
- l'opérateur Γ est une *transformation idempotente*, $\Gamma(\Gamma(f)) = \Gamma(f)$.

Le filtre non-linéaire ψ est un filtre adaptatif de lissage sélectif qui procède à un lissage sur des zones satisfaisant un critère (lissage sélectif) en utilisant des masques de sélection de tailles différentes (filtre adaptatif). Le filtre $\psi(\cdot)$ préserve les voisinages des maxima régionaux en s'appuyant sur la géométrie des objets curvilignes.



(a)

(b)

FIG. 2.3 *Filtre non-linéaire ψ de l'approche filament. La sous-figure (a) représente l'image originale f où apparaît un réseau dont les filaments ont une largeur moyenne de 7 points images. La sous-figure (b) montre l'image filtrée obtenue pour un noyau de convolution de taille 3×3 et un voisinage de sélection de taille 9×9 .*

2.2.2 Reconstruction des objets curvilignes

Dans l'*approche filament*, la phase de prétraitement, consistant en l'application du filtre non-linéaire ψ précédemment décrit, est suivie d'une étape de segmentation, appelée la reconstruction des objets curvilignes. L'image de départ f de la reconstruction des objets curvilignes est une image en niveaux de gris constituée uniquement des voisins des maxima régionaux d'une image originale, en l'occurrence une image filtrée par $\psi(\cdot)$.

La reconstruction des objets curvilignes fait intervenir un opérateur $R_{[t_{max}, t_{min}]}(\cdot)$ qui

est construit comme une combinaison d'un seuillage dynamique et d'opérations de morphologie mathématique.

Un seuillage dynamique est une transformation de seuillage dont la valeur du seuil évolue au cours des itérations. La reconstruction des objets curvilignes utilise un seuillage dynamique dont la valeur de seuil est décroissante et varie de t_{max} à t_{min} . La plus grande valeur de seuil t_{max} représente le niveau de gris maximal de l'image f .

$$t_{max} = \max_{(x,y) \in D_f} \{f(x,y)\}$$

La valeur de seuil t_{min} , fixée par l'utilisateur, doit être supérieure à l'intensité minimale de l'image f .

Pour toute valeur de seuil $t \in [t_{min}, t_{max}]$ ($t \in \mathbb{N}$), l'opérateur de seuillage dynamique est noté $S_t(\cdot)$. La valeur du point image $(x,y) \in D_f$ de l'image transformée $S_t(f)$, $\forall t \in [t_{min}, t_{max}]$, en fonction de l'image f est alors donnée par l'expression suivante:

$$S_t(f)(x,y) = \begin{cases} 1 & C_{xy}^t > \phi \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

La variable C_{xy}^t , utilisée comme critère de décision par l'opérateur $S_t(\cdot)$ en confrontant sa valeur au paramètre ϕ , qui est explicité ultérieurement, est définie de la façon suivante:

$$C_{xy}^t = \#\{(x',y') \in D_f : d_8((x,y),(x',y')) \leq n \text{ tels que } t \leq f(x,y) \leq (1+\tau) \times t \text{ et } (1-\tau) \times t \leq f(x',y') \leq t\} \quad (2.3)$$

avec $n \in \mathbb{N}$ et $d_8(\cdot)$ est la distance discrète en 8-connexité (page 31).

Interprétation – La variable C_{xy}^t représente le nombre de points voisins du point courant (x,y) , dont l'intensité vérifie $f(x,y) \in [t, (1+\tau) \times t]$ (domaine de sélection), dans un voisinage de taille $(2n+1)^2$ tels que leurs intensités $f(x',y')$ appartiennent à $[(1-\tau) \times t, t]$ (domaine de décision).

Le paramètre τ , qui est un pourcentage (à valeurs dans $]0,1[$), module la sensibilité du seuillage dynamique en fonction de la valeur du seuil t en réglant la profondeur des domaines de sélection $[(1-\tau) \times t, t]$ et de décision $[t, (1+\tau) \times t]$. Plus la valeur du seuil t est petite, plus le domaine de décision est petit, c'est à dire que les points images ayant une intensité faible ne sont pas favorisés. La valeur de τ est d'autant plus grande que la valeur moyenne des niveaux de gris de l'image f est petite.

Le support spatial du domaine de décision est défini par un voisinage dont la taille $(2n+1)^2$ dépend de la largeur moyenne des structures de l'image; le support du domaine de décision doit pouvoir s'inclure dans les structures.

Le paramètre ϕ est un paramètre empirique qui doit au moins être égal à la moitié du nombre total de points images constituant le support spatial du domaine de décision, autrement dit à $\frac{1}{2}(2n+1)^2$.

Les points images sélectionnés, lors du seuillage dynamique pour une valeur de seuil t , par la confrontation de C_{xy}^t (Eq. 2.3) au critère ϕ sont marqués, c'est à dire transformés en points objets de l'image binaire $S_t(\cdot)$ (Fig. 2.4), qui est ensuite soumise à d'autres processus.

Remarque – Les images binaires $S_t(f) \forall t \in [t_{min}, t_{max}]$, constituées des points $(x, y) \in D_f$ vérifiant la condition $C_{xy}^t > \phi$, possèdent les deux propriétés suivantes.

$$S_{t_{max}}(f) \not\subseteq S_{t_{max}-1}(f) \not\subseteq \dots \not\subseteq S_{t_{min}}(f)$$

Cette première propriété résulte de l'usage simultané d'un domaine de sélection $[t, (1 + \tau) \times t]$ et d'un domaine de décision $[(1 - \tau) \times t, t]$ différents.

La seconde propriété, qui s'exprime de la manière suivante,

$$\exists t \in [t_{min}, t_{max}] \quad S_{t+1}(f) \cap S_t(f) \neq \emptyset$$

découle du chevauchement des domaines de sélection et de décision pour deux valeurs de seuil $t + 1$ et t consécutives.

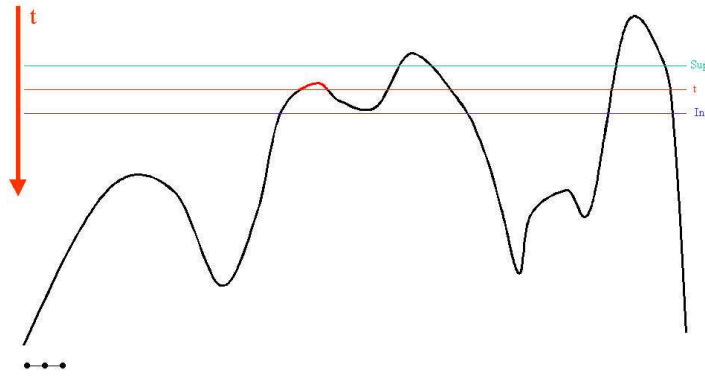


FIG. 2.4 *Seuillage dynamique pour la reconstruction des objets curvilignes dans l'approche filament. La Figure représente une image monodimensionnelle f sur laquelle la procédure de seuillage dynamique $S_t(f)$ est appliquée à la valeur de seuil t . Le support spatial du domaine de décision est donné par le voisinage constitué de trois points, représenté dans le coin gauche. Le domaine de sélection $[t, (1 + \tau) \times t]$ est l'intervalle des niveaux de gris défini par $[t, Sup]$. Le domaine de décision $[(1 - \tau) \times t, t]$ est l'intervalle des niveaux de gris défini par $[Inf, t]$. Les intensités des points sélectionnés (marqués) dans l'image f , lors du seuillage dynamique à la valeur de seuil t apparaissent en rouge. Ces points constituent l'image binaire $S_t(f)$.*

La phase de seuillage dynamique terminée pour la valeur de seuil t , avant de passer à la valeur de seuil suivante $t - 1$, l'image $S_t(f)$ est transformée par des opérations de morphologie mathématique afin de reconstruire les objets détectés au seuil t et de les associer aux objets précédemment reconstruits à des seuils $s > t$.

Une dilatation binaire $\delta_H(\cdot)$ par l'élément structurant H en 8–connexité est réalisée sur chaque image $S_t(f)$ ($\forall t \in [t_{min}, t_{max}]$). La transformation de dilatation $\delta_H(\cdot)$ est définie de la manière suivante:

$$\delta_H[S_t(f)] = S_t(f) \oplus H$$

Interprétation – La dilatation $\delta_H(\cdot)$ consiste à qualifier de point objet tout point image adjacent à un ou plusieurs point objet (Annexe A).

La dilatation par H permet de restaurer la connexité sans favoriser une direction particulière. L'élément structurant H en trame carrée et 8–connexité possède la configuration suivante:

$$H = \begin{matrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{matrix}$$

Pour finir, afin de reconstruire les objets curvilignes, une squelettisation binaire est réalisée sur les images $\delta_H[S_t(f)]$ tout en tenant compte du squelette de l'image f peu à peu constitué au cours des étapes précédentes du seuillage dynamique pour les valeurs de seuil s , $t_{max} \geq s > t$. Cette squelettisation est une squelettisation avec points d'ancrage [3, 88], qui sont les points du squelette préalablement construit pour des valeurs supérieures de seuil.

Le squelette de l'image f , à la fin du seuillage dynamique pour la valeur de seuil $t+1$, est noté $SQ_{t+1}(f)$. La squelettisation avec points d'ancrage (pour obtenir le squelette $SQ_t(f)$ de f pour la valeur de seuil t) est réalisée sur l'union de l'image $\delta_H[S_t(f)]$ et de l'image $SQ_{t+1}(f)$ par un amincissement homotopique avec l'élément structurant L , dont la configuration est définie dans l'alphabet de Golay (Annexe A), itéré dans toutes les directions jusqu'à idempotence. Le squelette $SQ_t(f)$ de l'image f pour la valeur de seuil t s'exprime de la façon suivante:

$$SQ_t(f) = \left((SQ_{t+1}(f) \vee \delta_H[S_t(f)]) \underline{\circ} L \right)_{\infty} \quad (2.4)$$

L'union, représentée par le symbole \vee , des images $\delta_H[S_t(f)]$ et $SQ_{t+1}(f)$, qui sont définies sur le même domaine de définition spatial D_f , s'exprime de la manière suivante [76]:

$$\begin{aligned} (\delta_H[S_t(f)] \vee SQ_{t+1}(f))(x,y) &= (\delta_H[S_t(f)] \cup SQ_{t+1}(f))(x,y) \\ &= \max[\delta_H[S_t(f)](x,y), SQ_{t+1}(f)(x,y)] \end{aligned} \quad (2.5)$$

Interprétation – L'opération d'union de deux images revient à affecter à chaque point (x,y) du domaine de définition spatial, le maximum des deux intensités de chaque image.

Le symbole $\underline{\bigcirc}$ de l'équation (2.4) indique que la transformation d'amincissement est itérée dans toutes les directions c'est à dire que l'amincissement est séquentiellement réalisé avec toutes les rotations possibles de l'élément structurant L .

Interprétation – *La transformation d'amincissement, notée $\underline{\bigcirc}$, consiste en l'élimination des points objets dont la configuration de voisinage correspond à la configuration fixée par l'élément structurant utilisé.*

La propriété d'homotopie (préservation de la connexité) de l'amincissement découle de l'homotopie de l'élément structurant utilisé. L est une configuration homotopique puisqu'en inversant la valeur du point central la connexité est conservée.

Du fait de cette homotopie, l'image amincie tend vers une limite et il existe donc un nombre maximal d'itérations au-delà duquel la transformation devient idempotente (Annexe A). La nomenclature $(\cdot)_\infty$ indique que la transformation d'amincissement homotopique séquentiel est itérée jusqu'à ce que cette transformation devienne une transformation idempotente, jusqu'à stabilisation du processus.

Pour une image en trame carrée considérée en 8-connexité, la transformation d'amincissement homotopique séquentiel est effectuée en alternant successivement les éléments structurants L et L' pour toutes les rotations d'angle $k\frac{\pi}{4}$ pour $k = 0, \dots, 7$ et de centre le point central des éléments structurants [18, 76]. L'élément structurant L possède alors la configuration suivante

$$L = \begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ * & 1 & * \\ 0 & 0 & 0 \end{array} \quad \text{aux rotations près}$$

et l'élément structurant L' , établi par Levialdi [18, 50], a la configuration

$$L' = \begin{array}{ccc} * & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ * & 1 & * \end{array} \quad \text{aux rotations près.}$$

Remarque – Le squelette $SQ_t(f)$ de l'image f , pour une valeur de seuil t , obtenu par amincissement homotopique séquentiel, a les propriétés suivantes:

$$\text{Pour } t = t_{max} \quad SQ_{t_{max}}(f) = \left(\delta_H[S_{t_{max}}(f)] \underline{\bigcirc} L \right)_\infty$$

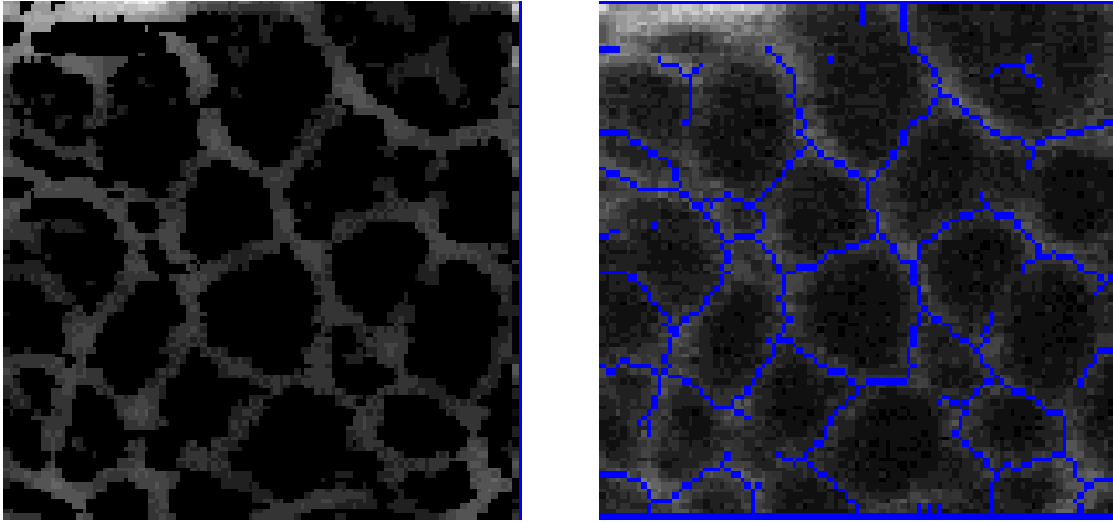
$$\exists t \in [t_{min}, t_{max}] \quad SQ_{t+1}(f) \subseteq SQ_t(f)$$

Ainsi pour chaque étape du seuillage dynamique pour une valeur de seuil t , une image binaire est créée ($S_t(f)$), cette dernière est dilatée $\delta_H[S_t(f)]$ et ensuite soumise à une squelettisation avec point d'ancrage afin d'obtenir le squelette $SQ_t(f)$ de l'image f qui

intègre le squelette de f construit au cours des étapes précédentes ($[t_{max}, t + 1]$). Toutes ces étapes définissent l'opérateur $R_{[t_{max}, t]}(\cdot)$ de reconstruction des objets curvilignes.

L'image transformée $R_{[t_{max}, t]}(f)$ pour la valeur de seuil t en fonction de l'image originale f est alors donnée par les expressions suivantes:

$$\begin{aligned}
 R_{[t_{max}, t]}(f) &= \left(\left\{ \left(\left\{ ([S_{t_{max}}(f) \oplus H] \circ L)_{\infty} \vee [S_{t_{max}-1}(f) \oplus H] \right\} \circ L \right)_{\infty} \vee \dots \vee [S_t(f) \oplus H] \right\} \circ L \right)_{\infty} \\
 &= \left(\left\{ \left(\left\{ (\delta_H[S_{t_{max}}(f)] \circ L)_{\infty} \vee \delta_H[S_{t_{max}-1}(f)] \right\} \circ L \right)_{\infty} \vee \dots \vee \delta_H[S_t(f)] \right\} \circ L \right)_{\infty} \quad (2.6) \\
 &= SQ_t(f)
 \end{aligned}$$



(a)

(b)

FIG. 2.5 *Reconstruction des objets curvilignes de l'approche filament. La sous-figure (a) représente l'image transformée par le filtre non-linéaire ψ sur laquelle est réalisée la reconstruction des objets curvilignes. La sous-figure (b) montre en bleu le résultat de la reconstruction des objets curvilignes sur-imposée sur l'image originale. L'image (b) est l'image résultat f_F de l'approche filament.*

Ce processus est effectué pour chaque valeur du seuil $t \in [t_{max}, t_{min}]$ afin de reconstruire les objets curvilignes (Fig. 2.5). L'algorithme complet de reconstruction des objets curvilignes est explicité à la page 52. Ainsi l'image résultat $R_{[t_{max}, t_{min}]}(f)$ de la reconstruction des objets curvilignes en fonction de l'image originale f est alors donnée par:

$$R_{[t_{max}, t_{min}]}(f) = SQ_{t_{min}}(f) \quad (2.7)$$

L'opérateur $R_{[t_{max}, t_{min}]}(\cdot)$ fournit le squelette binaire d'une image en niveaux de gris, par une série de squelettisation avec points d'ancrage d'images binaires résultant d'un

seuillage dynamique dont les domaines de sélection et de décision sont différents, dynamiques et dépendants des niveaux de gris.

L'image résultat de l'*approche filament*, notée f_F , est un squelette binaire des différents filaments composant l'image f .

2.2.3 Quantification des objets curvilignes

L'étape de segmentation de l'*approche filament* terminée, chaque filament constituant le réseau est représenté par un objet curviligne, c'est à dire une courbe discrète d'épaisseur 1 point image. Une quantification développée dans une problématique de caractérisation de la géométrie et de la morphologie des filaments doit s'attacher à la spécification de filaments particuliers considérés comme représentatifs. De ce fait, il est nécessaire de pouvoir individualiser un filament donné pour l'extraire et l'isoler afin de le quantifier. La première étape de la quantification est donc l'extraction de filaments particuliers rendue possible par l'étape de segmentation. La morphologie d'un filament est décrite par sa courbure moyenne.

Extraction d'un filament caractéristique

Afin de pouvoir isoler un filament exhibant une forme qui caractérise une configuration de réseau donnée, c'est à dire un filament considéré comme représentatif, un algorithme interactif a été développé. L'utilisateur est invité à choisir le début du filament qu'il souhaite analyser parmi les objets curvilignes de l'image résultat f_F de l'approche filament. L'algorithme parcourt alors le filament, en enregistrant les coordonnées spatiales des points le constituant, jusqu'à la rencontre d'un point de branchement (point du squelette ayant plus de deux voisins dans le squelette). Au niveau d'un point de branchement, l'algorithme propose à l'utilisateur toutes les directions possibles afin qu'il décide de la direction à poursuivre. Le filament ainsi parcouru est alors sauvegardé ou non selon le choix de l'utilisateur.

Ce filament, symbolisé par un objet curviligne, peut maintenant être soumis à la quantification.

Courbure moyenne des filaments

La courbure moyenne d'un filament renseigne sur le comportement morphologique du filament et permet de spécifier sa forme caractéristique. La courbure, en chaque point, le long d'un filament est calculée par une méthode géométrique qui est donnée ci-dessous.

Définition 2.2.1 *Soit trois points x_{i-h} , x_i et x_{i+h} appartenant à une courbe, on construit les droites (x_{i-h}, x_i) et (x_i, x_{i+h}) .*

Algorithme 2 Algorithme de reconstruction des objets curvilignes de l'*approche filament*

Entrée: une image f en niveaux de gris représentant des voisinages de maxima régionaux, t_{min} et t_{max}

Sortie: une image f_F contenant un squelette binaire

*** Seuillage dynamique par valeur décroissante ***

Pour Tout niveau de gris $t \in [t_{min}, t_{max}]$ **Faire**

*** Initialisation des valeurs maximales et minimales des domaines de sélection et de décision ***

$Sup \leftarrow (1 + \tau) \times t$

$Inf \leftarrow (1 - \tau) \times t$

*** Etape de sélection du seuillage dynamique ***

Pour Tout point (x, y) tel que $f(x, y) \in [t, Sup]$ **Faire**

*** Etape de décision du seuillage dynamique ***

$C_{xy}^t \leftarrow 0$

Pour $l = -n$ à n **Faire**

Pour $k = -n$ à n **Faire**

Si $f(x + k, y + l) \in [Inf, t]$ **Alors**

Incrémenter C_{xy}^t

Fin Si

Fin Pour

Fin Pour

Si $C_{xy}^t > \phi$ **Alors**

Marquage du point image (x, y)

Fin Si

Fin Pour

*** Dilatation des zones marquées ***

Dilatation par l'analogie, en trame carrée et en 8-connexité, de l'élément structurant H de l'alphabet de Golay des zones marquées.

*** Squelettisation avec points d'ancrage des zones dilatées ***

Squelettisation, par amincissement homotopique par les éléments structurants L et L' itérés dans toutes les directions jusqu'à idempotence, des zones marquées en tenant compte de squelette préalablement construit.

Décrémenter t

Fin Pour

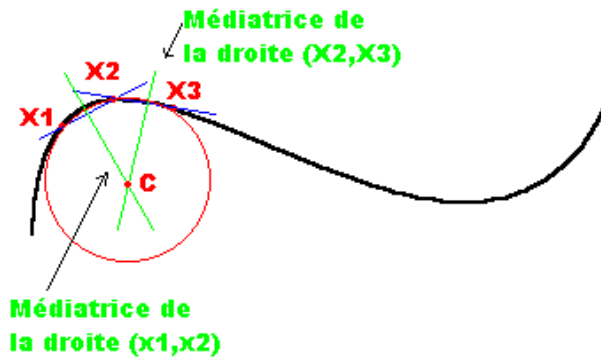


FIG. 2.6 Méthode géométrique de calcul du rayon de courbure.

Le point d'intersection des médiatrices des segments $[x_{i-h}, x_i]$ et $[x_i, x_{i+h}]$ est le centre c du cercle osculateur (Fig. 2.6).

Le rayon R_{x_i} , aussi appelé le rayon de courbure, du cercle osculateur passant par les trois points x_{i-h} , x_i et x_{i+h} de la courbe, est égal aux distances suivantes:

$$R_{x_i} = d(x_{i-h}, c) = d(x_i, c) = d(x_{i+h}, c)$$

La courbure $\kappa(x_i)$ de la courbe au point x_i est égale à l'inverse du rayon de courbure.

$$\kappa(x_i) = \frac{1}{R_{x_i}}$$

Définition 2.2.2 La courbure moyenne d'un filament est définie comme la somme des courbures en tous les points du filament divisée par le nombre de points constituant le filament.

Interprétation – Lorsque la courbure moyenne le long d'un filament donné est proche de 0 alors le filament a un comportement rectiligne.

L'approche filament décrit symboliquement les réseaux cytosquelettiques par un ensemble d'objets curvilignes individualisables (les représentations des filaments) qui permettent la caractérisation de la morphologie des filaments constituant les réseaux du cytosquelette.

2.3 Approche Maillage

La caractérisation de la géométrie des réseaux cytosquelettiques en terme de structure de maille, développée à partir de la définition de la primitive *maille*, utilise principalement des procédures de morphologie mathématique. Cette approche est nommée *l'approche maillage*.

Une maille est définie comme un ensemble de points connexes qui est délimité par une frontière. Les images traitées par cette approche se caractérisent par le fait que les points images frontières aient des intensités de niveaux de gris plus élevées que celles des points images appartenant aux régions qu'ils délimitent (Fig. 2.7(a)). Cette caractéristique, si elle n'est pas réalisée, peut être obtenue simplement par une inversion d'image (Annexe A).

De ce fait, *l'approche maillage* considère une image comme un relief topographique, les intensités de niveaux de gris sont assimilées à des altitudes: c'est à dire que les points, dont les niveaux de gris sont de hautes intensités (blanc), représentent des points de haute altitude (points de collines ou points de montagnes) alors que les points, dont les niveaux de gris sont de faibles intensités (noir), équivalent à des points de basse altitude (points de plaine ou points de plateaux) (Fig. 2.7(b)). Donc les frontières des mailles sont les chaînes de montagnes ou de collines du relief qui encerclent des plaines et plateaux représentant les mailles. L'approche maillage a donc pour but la détection et la quantification des plaines ou plateaux du relief.

Lors de cette approche, les images sont préalablement traitées par une fermeture morphologique en niveaux de gris [76]. L'étape de segmentation de cette approche comporte deux phases, la première est l'application de la transformation de la ligne de partage des eaux et la seconde est une procédure de fusion de régions. Pour finir, l'image segmentée est soumise à un jeu de paramètres de quantification permettant d'extraire des caractéristiques géométriques et morphologiques de primitive de type région.

2.3.1 Fermeture morphologique en niveaux de gris

L'étape de prétraitement de l'approche maillage consiste en une fermeture morphologique en niveaux de gris dont la taille dépend de la largeur moyenne des frontières des mailles, c'est à dire la largeur moyenne de filaments (ou largeur des chaînes de montagne). La fermeture morphologique [63], qui est une dilatation suivie d'une érosion (Annexe A), se définit de la façon suivante pour une image f en niveaux de gris [76]:

$$\forall x \in D_f \quad F(f)(x) = \inf_{y \in S_x} \sup_{z \in S_y} [f(z)]$$

S_x et S_y représentent respectivement les voisinages des points x et y .

Interprétation – La fermeture morphologique $F(\cdot)$ en niveaux de gris affecte à tout point x de l'image f l'intensité du point ayant l'intensité minimale sur

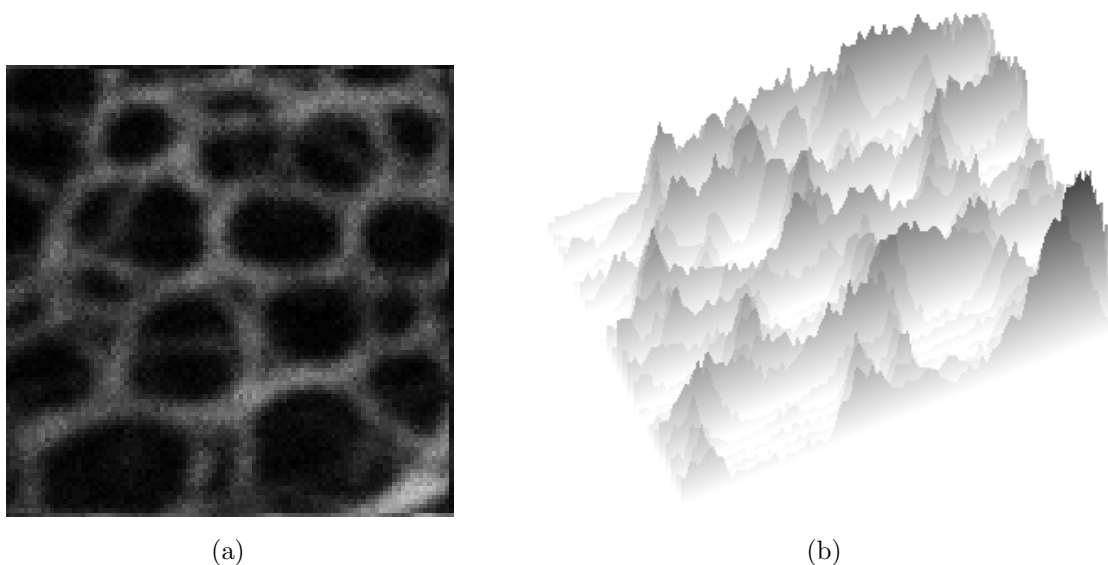


FIG. 2.7 *Image vue comme un relief topographique. La sous-figure (a) représente un réseau visualisé par de fortes intensités de niveaux de gris (image d'origine). La sous-figure (b) représente le profil tridimensionnel de l'image (a) où les intensités des points images sont assimilées à des altitudes. Un relief de montagnes où les fonds des vallées correspondent aux mailles et les chaînes de montagnes aux filaments.*

le voisinage centré sur x dont tous les points ont préalablement été affectés à l'intensité maximale sur leurs voisinages respectifs.

Le voisinage S_x d'un point x utilisé pour une fermeture morphologique est un élément structurant ayant la configuration H définie dans l'alphabet de Golay (Annexe A) [35, 72]. Pour la trame carrée, l'analogue de H est l'élément structurant cruciforme en 4-connexité ou l'élément structurant carré en 8-connexité.

Le voisinage utilisé pour réaliser la fermeture doit pouvoir s'inclure en largeur dans les frontières des mailles. La taille $(2n + 1)^2$ du voisinage se définit donc telle que $2n + 1$ doit être inférieur à la largeur moyenne des frontières des mailles.

Remarque – La fermeture morphologique est un filtre morphologique qui permet de combler les trous, les vallées étroites et de connecter les objets proches.

Ce filtre morphologique est un filtre de rang comme le filtre médian [27], qui peut être catégorisé comme un filtre passe-bas, un filtre de réduction de bruit.

La fermeture morphologique permet en particulier de lisser les frontières des mailles détériorées sous l'effet du bruit (Fig. 2.8).

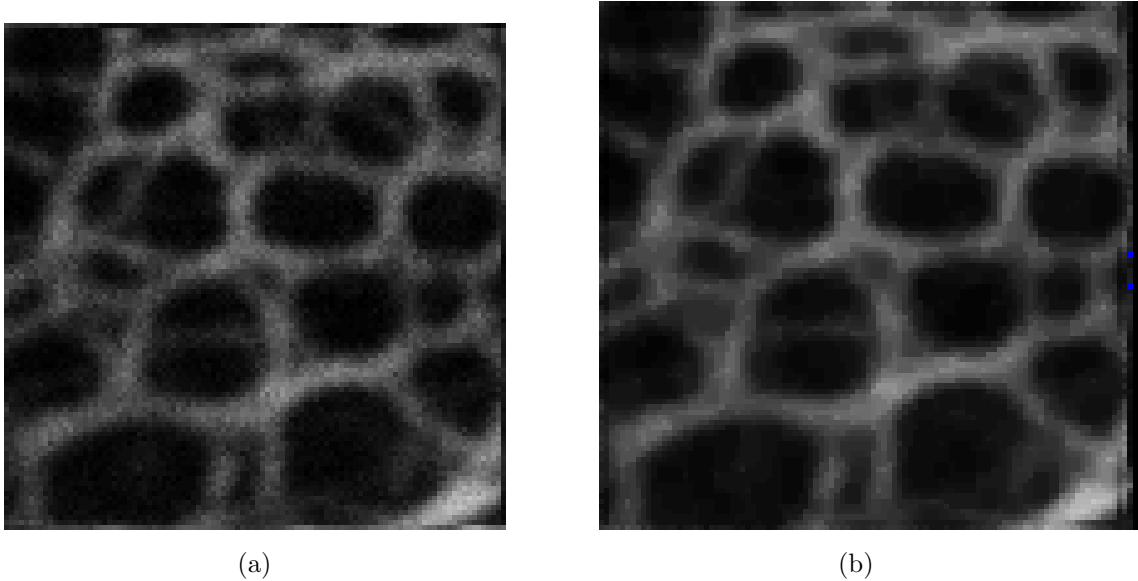


FIG. 2.8 *Fermeture morphologique en niveaux de gris. La sous-figure (a) représente l'image originale où apparaît un réseau dont les filaments ont une largeur moyenne de 7 points images. La sous-figure (b) montre le fermé de l'image (a) obtenu avec un voisinage de taille 5×5 .*

2.3.2 La ligne de partage des eaux

Après l'étape de prétraitement, la première phase de la segmentation de l'approche maillage est l'application de la méthode de la *ligne de partage des eaux* [4, 7, 23].

L'idée sous-jacente de cette méthode provient de la géographie. La ligne de partage des eaux d'un relief topographique inondé est l'ensemble des lignes divisant les domaines d'attraction de la pluie tombant sur une région [73]. L'autre alternative est d'imaginer l'immersion d'un relief, les bassins sont remplis à partir des minima locaux. Aux points où l'eau des différents bassins se rencontre, des barrages sont construits. Quand le niveau d'eau a atteint le plus haut pic du relief, le processus est arrêté. Le relief est partitionné en régions ou bassins séparés par des barrages appelés ligne de partages des eaux [6].

La méthode de ligne de partage des eaux fait intervenir deux notions qui se définissent de la façon suivante:

Bassin versant: espace géographique dans lequel toutes les eaux convergent vers le même minimum. Les différents bassins versants sont délimités par une ligne de partage des eaux

Ligne de partage des eaux: ligne de crête des massifs qui délimite deux bassins versants adjacents.

Les alternatives conceptuelles de construction de la ligne de partage des eaux, la première basée sur la recherche de la ligne de partage des eaux locale et la seconde fondée sur l'inondation à partir des minima [91], ont engendré deux classes d'algorithmes.

Dans l'approche maillage, un algorithme ayant pour but la construction locale de la

ligne de partage des eaux est utilisé.

La ligne de partage des eaux $LPE(f)$ d'une image f en niveaux de gris est obtenue par amincissement homotopique itéré dans toutes les directions jusqu'à idempotence (Annexe A) [6].

$$LPE(f) = (f \underline{\circ} L)_{\infty}$$

Interprétation – *L'amincissement homotopique est effectué avec la configuration de voisinage L itérée dans toutes les directions jusqu'à idempotence (Annexe A).*

$$(f \underline{\circ} L)_{\infty} = (((((((((f \circ \theta^0 L) \circ \theta^1 L) \circ \theta^2 L) \circ \theta^3 L) \circ \theta^4 L) \circ \theta^5 L) \circ \theta^6 L) \circ \theta^7 L)_{\infty} \quad (2.8)$$

Le symbole \circ désigne la transformation morphologique d'amincissement (Annexe A). Le paramètre θ^k représente la rotation d'angle $k\frac{\pi}{4}$ avec $k = 0, \dots, 7$ et de centre le point central de l'élément structurant (trame carrée considérée en 8–connexité). Les rotations d'angle $k\frac{\pi}{4}$ permettent d'obtenir les 8 configurations possibles de la famille de voisinage définie par l'élément structurant L , autrement dit les configurations de L dans toutes les directions. Le symbole $\underline{\circ}$ indique que la transformation d'amincissement est itérée dans toutes les directions c'est à dire que l'amincissement est séquentiellement réalisé avec toutes les rotations possibles de l'élément structurant L . La nomenclature $(\cdot)_{\infty}$ signifie que la transformation est itérée jusqu'à idempotence, c'est à dire jusqu'à stabilisation du processus.

Définissons la transformation d'amincissement \circ d'une image f en niveaux de gris effectuée avec une configuration de voisinage T quelconque. Chaque configuration de voisinage T peut être scindée en deux sous configurations T_n et T_b , la première contenant les points égaux à 1 et la seconde contenant les points égaux à 0. Alors l'amincissement de l'image f en niveaux de gris est défini de la manière suivante [5]:

$$(f \circ T)(x) = \begin{cases} \sup_{y \in T_n} [f(y)] & \text{si } \sup_{y \in T_n} [f(y)] < f(x) \leq \inf_{y \in T_b} [f(y)] \\ f(x) & \text{sinon} \end{cases}$$

Pour des images en trame carrée considérée en 8–connexité, comme dans le cas d'une squelettisation binaire, l'amincissement homotopique séquentiel (Eq. 2.8), utilisé pour construire la ligne de partage des eaux, est réalisé en alternant successivement les éléments structurants L et L' pour toutes les directions. L'analogue de l'élément structurant L pour la trame carrée en 8–connexité est défini avec la configuration suivante:

$$L = \begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ * & 1 & * \\ 0 & 0 & 0 \end{array} \quad \text{aux rotations près}$$

et l'élément structurant L' , établi par Levialdi [18, 50], qui est utilisé pour s'assurer de

la connexité de la ligne de crête, possède la configuration suivante:

$$L' = \begin{array}{ccc} * & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ * & 1 & * \end{array} \quad \text{aux rotations près}$$

Interprétation – Si on considère la configuration de voisinage L comme elle est définie ci-dessus, la transformation d'amincissement pour une image en niveaux de gris f consiste à remplacer le niveau de gris $f(x,y)$ du point (x,y) par la valeur A si et seulement $A < f(x,y) \leq B$ tel que:

$$A = \max\{f(x-1,y-1), f(x,y-1), f(x+1,y-1)\}$$

$$B = \min\{f(x-1,y+1), f(x,y+1), f(x+1,y+1)\}$$

sachant que

$$L = \begin{array}{|c|c|c|} \hline L_n & L_n & L_n \\ \hline f(x-1,y-1) & f(x,y-1) & f(x+1,y-1) \\ \hline * & L_n & * \\ & f(x,y) & \\ \hline L_b & L_b & L_b \\ \hline f(x-1,y+1) & f(x,y+1) & f(x+1,y+1) \\ \hline \end{array}$$

L'amincissement homotopique séquentiel selon L est alors obtenu en réalisant cette opération pour toutes les rotations d'angle $k\frac{\pi}{4}$ de la configuration de voisinage L .

L'amincissement effectué dans toutes les directions abaisse les niveaux de gris des pixels situés sur les flancs des pics, sans toucher aux sommets, ni aux vallées. En itérant jusqu'à stabilisation, les lignes de crêtes ont gardé leurs niveaux de gris d'origine et entourent des régions dont le niveau de gris est uniforme et égal au niveau de gris le plus bas de la région (Fig. 2.9).

En résumé,

- les points appartenant à la ligne de partage des eaux ne sont pas modifiés et gardent leur altitude,
- tous les autres points sont, en fin d'itération, ramenés à l'altitude minimale propre à chaque bassin.

L'image résultat $LPE(f)$ est divisée en plusieurs zones: les bassins versants et la ligne de partage des eaux. Les bassins versants sont les mailles du réseau et la ligne de partage des eaux représente le réseau lui-même (aux erreurs près).

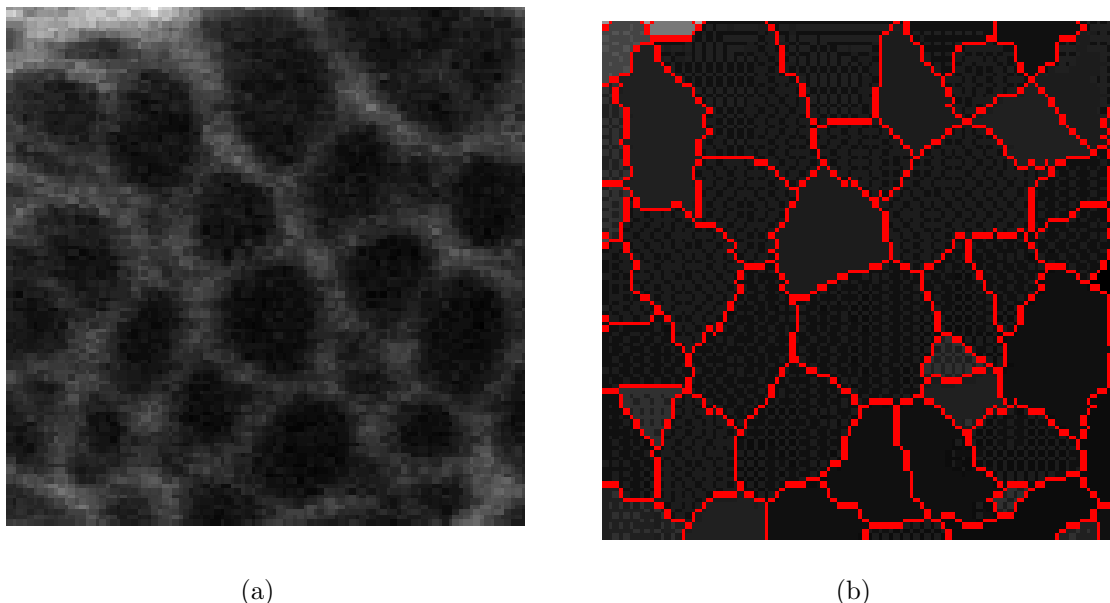


FIG. 2.9 *Ligne de partage des eaux et bassins versants. La sous-figure (a) représente l'image d'origine f . La sous-figure (b) montre la ligne $LPE(f)$ de partage des eaux et les bassins versants de f .*

La dualité des primitives *maille* et *réseau* se retrouve dans la dualité de la ligne de partage des eaux et des bassins versants.

La sur-segmentation est un problème inhérent à la méthode de la ligne de partage des eaux, elle est la conséquence de la démarche locale de la transformation d'amincissement qui fait exister de nombreux minima locaux dans l'image originale. Pour remédier à ce problème, il est possible de développer des méthodes de correction comme la fusion de régions.

2.3.3 Fusion de régions

L'algorithme de fusion de régions, qui a été développé, a pour but la réunion de bassins versants adjacents similaires, selon certains critères, par la destruction des sections de ligne de partage des eaux qui les séparent.

L'altitude de deux bassins versants adjacents est confrontée, si le dénivelé existant entre ces deux bassins versants est peu important alors l'altitude moyenne de la section de ligne de partage des eaux, qui les sépare, est comparée aux altitudes des deux bassins versants afin de déterminer l'effort minimal permettant de traverser la ligne de crête à partir d'un des deux bassins. Si cet effort est jugé raisonnable, alors il est considéré que le barrage constitué par la section de ligne de crête est inefficace contre une montée des eaux et ce barrage est donc détruit, la section de ligne de partage des eaux est détruite et les deux bassins versants sont réunis. Cet algorithme repose sur une détection des points

de branchement et un parcours (un suivi) de la ligne de partage des eaux (page 62).

Définition 2.3.1 *Un point de branchement de la ligne de partage des eaux est un point ayant plus de deux voisins appartenant à cette ligne (Cf. Déf 2.4.3).*

Définition 2.3.2 *Une section de ligne de partage des eaux est une partie de la ligne de crête commençant au point de branchement courant et se terminant au premier point de branchement rencontré.*

Un simple seuillage permet d'extraire la ligne de partage des eaux et d'obtenir une image binaire dont les seuls points objets sont les points de la ligne de partage des eaux. Cette image binaire f_M ainsi que l'image $LPE(f)$ de la ligne de partage des eaux en niveaux de gris, qui provient sans aucune modification de la première étape de segmentation de l'approche maillage, sont simultanément utilisées dans cette procédure de fusion de régions.

A partir de l'image binaire f_M , les points de branchement sont détectés via une transformation en Tout ou Rien avec la configuration de voisinage suivante (Annexe A):

$$\begin{array}{ccc} * & 1 & * \\ 1 & 1 & 1 \\ * & * & * \end{array}$$

aux rotations près.

Une fois tous les points de branchement détectés, l'algorithme visite chacun des points de branchement, et repère le nombre n de section de ligne de partage des eaux commençant à ce point (nombre de points objets voisins du point de branchement courant). Chaque section de la ligne de partage des eaux commençant au point de branchement courant est alors parcourue.

Le suivi d'une section de ligne de crête, appelée section courante, débute par la détection de son premier point qui est l'un des points objets voisins du point de branchement courant. Chaque point image détecté comme appartenant à la section courante de ligne de crête est marqué (indexé) pour ne pas être revisité. Une recherche des points objets (points appartenant à la ligne de crête) voisins du point courant de la section courante (dernier point marqué de la section courante), sur un voisinage carré de taille 3×3 , qui ne sont pas encore marqués, permet de détecter le prochain point appartenant à la section courante. De cette manière, la section courante est parcourue point image par point image. Les coordonnées spatiales des points images ainsi détectés sont enregistrées. Ce suivi est interrompu lorsque le voisin du point courant est un point de branchement, c'est à dire que la section courante a été entièrement parcourue.

Simultanément au parcours de la section courante sur l'image binaire f_M , l'image $LPE(f)$ en niveaux de gris de la ligne de partage des eaux est utilisée pour informer de l'altitude des deux bassins versants B_1 et B_2 séparés par cette section courante. L'altitude des deux bassins versants adjacents B_1 et B_2 est alors comparée. Si le dénivelé

entre B_1 et B_2 est inférieur à un seuil S_B , alors les altitudes de B_1 et B_2 sont comparées à l'altitude moyenne A_l le long de la section de ligne de crêtes les séparant. L'altitude moyenne A_l est calculée à partir des altitudes des points de l'image $LPE(f)$ en niveaux de gris de la ligne de partage des eaux dont les coordonnées spatiales ont été enregistrées lors du parcours de la section de ligne de crête. La comparaison des altitudes des deux bassins et de l'altitude moyenne de la section courante se fait par la fonction suivante $\min(|A_l - A_1|, |A_l - A_2|)$. L'utilisation du minimum reflète la notion d'effort minimal pour la traversé de la ligne de crête à partir de l'un des deux bassins versants. Si la valeur de cette fonction est inférieure à un seuil S_l , alors la section de ligne de partage des eaux est détruite dans l'image binaire f_M (les points objets de la section courante sont transformés en points du fond) ainsi les deux bassins versants sont fusionnés et ne font plus qu'une seule région.

Pour chaque point de branchement, ce traitement est itéré n fois, sachant que n est le nombre de points objets voisins du point courant de branchement. Lorsque tous les voisins au point de branchement courant sont marqués, c'est à dire que toutes les sections de ligne de crête débutant du point courant de branchement sont traitées, on applique ce même traitement à un autre point de branchement. Ainsi, toute la ligne de partage des eaux est parcourue section par section à partir des différents points de branchement. L'algorithme complet de la fusion de région est donné à la page 62.

En conclusion, la fusion de régions opère une comparaison entre deux régions voisines, si le critère de comparaison est vérifié alors la réunion des deux régions est faite par destruction de la section de ligne de partage des eaux les séparant (Fig. 2.10).

La sensibilité de l'algorithme depend des paramètres S_B et S_l qui sont définis par l'utilisateur.

L'image résultat f_M de l'*approche maillage* est une image binaire partitionnée en régions connexes (les mailles).

2.3.4 Quantification des mailles

L'étape de segmentation terminée, chaque maille formée par le réseau est bien délimitée. Une maille est une composante connexe de l'image (de \mathbb{N}^2). Afin de distinguer et d'identifier chaque maille, un algorithme d'étiquetage des composantes connexes d'une image est réalisé: tous les points d'une même composante connexe sont affectés à une même intensité de niveaux de gris qui équivaut à l'étiquette de la maille. Ainsi, chaque maille est individualisable et la quantification de ses propriétés est alors possible.

Les paramètres de quantification induits par la définition de la primitive maille doivent qualifier la structure de maille du réseau, en d'autres termes, ils doivent renseigner sur la géométrie et la forme des mailles constituant le réseau. Il est naturel alors de considérer des indicateurs caractérisant des propriétés géométriques telles que l'aire, le périmètre,

Algorithme 3 Algorithme de fusion de régions dans l'*approche maillage*

Entrée: une image $LPE(f)$ en niveaux de gris de la ligne de partage des eaux et des bassins versants et une image binaire f_M représentant uniquement la ligne de partage des eaux

Sortie: une image binaire f_M partitionnée en régions délimitées par une ligne partielle de partage des eaux

Détection des points de branchement de la ligne de partage des eaux dans f_M

Pour Tout point de branchement **Faire**

Pour Tout section de ligne de crête **Faire**

 Parcours de la section courante de ligne de crête dans f_M

 Calcul de l'altitude moyenne A_l de la section courante de ligne de crête dans $LPE(f)$

 Extraction des altitudes des deux bassins versants adjacents B_1 et B_2 à la section courante dans $LPE(f)$: A_1 et A_2

Si $|A_1 - A_2| < S_B$ **Alors**

Si $\min(|A_l - A_1|, |A_l - A_2|) < S_l$ **Alors**

 Destruction de la section courante de ligne de crête dans f_M

Fin Si

Fin Si

Fin Pour

Fin Pour

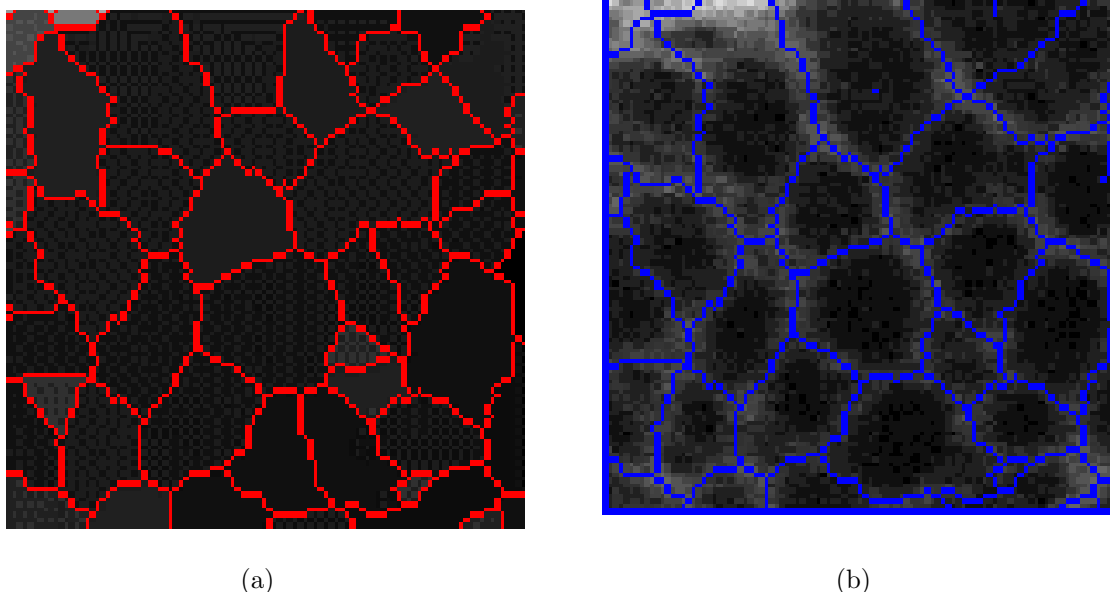


FIG. 2.10 *Résultat de l'approche maillage: fusion de régions. La sous-figure (a) représente la ligne $LPE(f)$ de partage des eaux et les bassins versants de f présentée à la sous-figure 2.9(a). (b) montre en bleu le résultat de la fusion de régions réalisée sur $LPE(f)$ par destruction de section de ligne de partage des eaux.*

et des propriétés de forme comme le facteur de circularité pour quantifier les mailles [10].

Aire de régions détectées

L'aire de régions détectées est un paramètre géométrique qui aide à la définition de la structure de maille des réseaux.

Définition 2.3.3 *L'aire A_R d'une région R est définie comme le nombre de points images constituant la région: $A_R = \#\{p \mid p \in R\}$*

Interprétation – *Plus l'aire moyenne des mailles est petite, plus la structure de maille du réseau est fine.*

Périmètre des régions détectées

Le périmètre d'une région R est un paramètre géométrique qualifiant également la structure de maille. Ce dernier peut être estimé de la manière suivante:

$$P_R = \#\{p : p \in R \text{ et } p \in \partial R\}$$

Cette expression approxime le périmètre d'une région R par le nombre de points images constituant sa frontière ∂R .

Le périmètre d'une région peut être calculé exactement de la façon suivante:

$$P_R = \sum_{p=p_0, p \in \partial R} d(p, p+1)$$

Ainsi le périmètre est égal à la somme des distances séparant deux points adjacents (consécutifs) de la frontière de R . La distance d est choisi selon la connexité de l'image: pour une image en trame carrée, d_4 si l'image est en 4-connexité ou d_8 si l'image est en 8-connexité.

Avant de calculer le périmètre d'une région R par cette méthode, les points images constituant la frontière de cette région doivent être identifiés. Par des méthodes de morphologie mathématique, les frontières interne $\partial_i R$ et externe $\partial_e R$ d'une région peuvent être détectées.

$$\partial_i R = R \setminus (R \ominus H)$$

$$\partial_e R = (R \oplus H) \setminus R$$

Remarque – Les périmètres calculés à partir des frontières interne et externe sont sensiblement différents.

Facteur de circularité

Le facteur de circularité est un paramètre morphologique qui indique la forme des mailles des réseaux.

Définition 2.3.4 *Le facteur de circularité C_R est défini comme suit: $C_R = \frac{4\pi A_R}{P_R^2}$.*

Interprétation – *Il est égal a 1 si la forme de R avoisine celle d'un disque et proche de 0 si la forme est très allongée.*

L'*approche maillage* donne une partition de l'image en régions délimitées par les réseaux cytosquelettiques qui permet la caractérisation de la géométrie des réseaux en terme de structure de maille.

2.4 Combinaison des approches

L'approche filament et l'approche maillage découlent de la définition de deux primitives, respectivement l'objet curviligne et la maille, qui sont des éléments constitutifs des réseaux. Une combinaison de ces approches associe alors ces deux primitives pour définir la *primitive réseau*.

La *combinaison des approches* a pour point de départ les images résultats f_F et f_M des deux approches filament et maillage auxquelles des transformations de morphologie

mathématique sont appliquées. Ces dernières sont explicitées dans la Section suivante. L'image finale f_C , résultat de ces opérations, est utilisée pour calculer les paramètres permettant de quantifier les réseaux. Cette combinaison permet de caractériser la topologie des réseaux cytosquelettiques en terme de densité et de connexion.

2.4.1 Segmentation

L'étape de segmentation de la *combinaison des approches* considère comme images de départ les images résultats des approches filament et maillage qui sont respectivement notées f_F et f_M . Ces deux images f_F et f_M sont des images binaires ayant les mêmes domaines spatiaux de définition.

La combinaison des deux approches procède en premier lieu par l'union des deux images résultats, cette union est suivie d'une dilatation qui permet de connecter les squelettes issus de l'approche filament et de l'approche maillage. La dernière phase de l'étape de segmentation de la combinaison des approches est une squelettisation qui permet de se ramener à une description de l'image en terme de réseau (enchevêtrement d'objets curvilignes). En résumé, la combinaison des deux approches consiste en la suite des opérations suivantes:

$$f_C = (((f_M \cup f_F) \oplus H) \underline{\circ} L)_\infty$$

où H et L représentent les analogues, pour la trame carrée en 8-connexité, des éléments structurants définis en trame hexagonale par l'alphabet de Golay (Annexe A).

En général, l'union de deux images f et g , définies sur le même domaine de définition spatial, peut être exprimée de la manière suivante [76]:

$$(f \cup g)(x,y) = \max[f(x,y), g(x,y)]$$

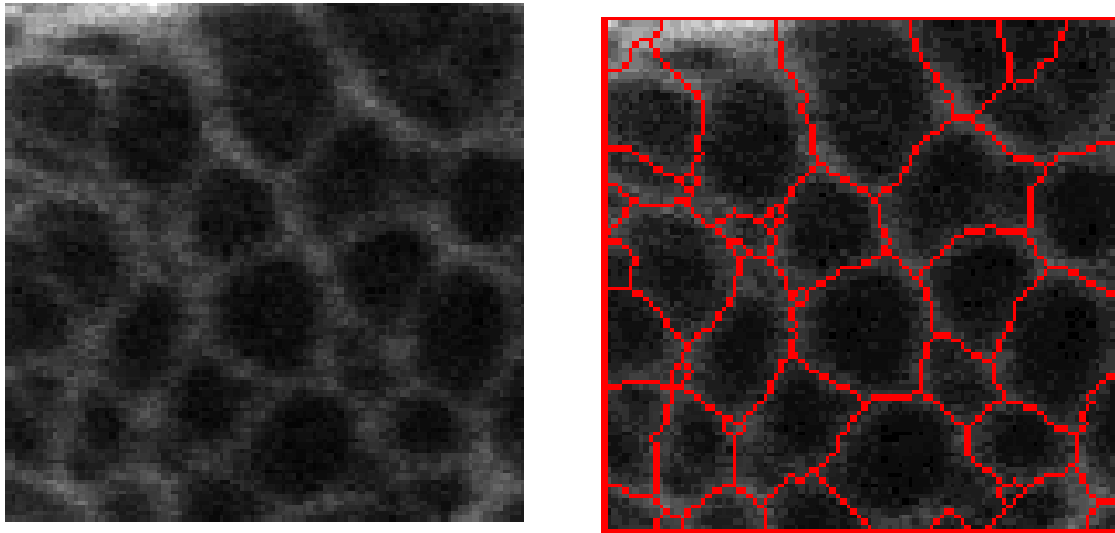
La transformation morphologique de dilatation, notée \oplus , est effectuée avec un élément structurant carré de taille élémentaire $n = 1$. La transformation de dilatation est explicitée en Annexe A. Cette transformation a pour but de connecter les squelettes provenant des deux approches (Fig. 2.11).

La squelettisation, qui est la dernière étape de segmentation de la combinaison des approches, est réalisée par un amincissement homotopique avec l'élément structurant L itéré dans toutes les directions jusqu'à idempotence.

L'image résultat f_C de la combinaison des approches est un squelette binaire représentant les réseaux cytosquelettiques.

2.4.2 Quantification des réseaux

L'étape de segmentation de la *combinaison des approches* terminée, des paramètres de quantification, induits par la primitive *réseau*, ont été développés. Ces paramètres



(a)

(b)

FIG. 2.11 *Combinaison des approches. La sous-figure (a) représente l'image d'origine f . (b) montre en rouge le résultat de la combinaison des approches sur-imposé sur l'image f : c'est à dire la combinaison des squelettes apparaissant en bleu dans les sous-figures 2.5(b) et 2.10(b).*

caractérisent les propriétés de connexion et de densité des réseaux. Les définitions ainsi que les interprétations des paramètres sont données dans la suite.

Nombre de régions détectées

Le nombre de régions détectées, qui est un paramètre topologique, est un indicateur de la densité du réseau.

Définition 2.4.1 *Le nombre de régions détectées est le nombre de composantes connexes que comporte l'image.*

Interprétation – *Le réseau est d'autant plus dense que le nombre de régions détectées est élevé.*

Ce paramètre doit être utilisé à des fins comparatives uniquement entre des images de même taille.

Longueur totale des lignes détectées

La longueur totale des lignes détectées constituant le réseau est un paramètre géométrique qui spécifie la densité du réseau.

Définition 2.4.2 *La longueur totale des lignes détectées est égale au nombre de points objets composant le réseau.*

Interprétation – *La longueur totale des lignes détectées est, tout comme le nombre de régions détectées, fonction croissante de la densité du réseau.*

De même que le paramètre précédent, la comparaison de deux réseaux par ce paramètre sous-entend deux supports spatiaux d'image de même dimension.

Nombre de points de branchement

Le nombre de points de branchement est un paramètre topologique qui caractérise la connexion des réseaux.

Définition 2.4.3 *Un point de branchement est un point objet ayant plus de deux voisins qui sont eux-mêmes des points objets.*

La détection des points de branchement est réalisée par une transformation en Tout ou Rien avec l'analogie de l'élément structurant de type F , défini dans l'alphabet de Golay, pour la trame carrée en 8–connexité.

Indice de connexion

Le nombre de points de branchement est un paramètre plus significatif en relatif, c'est pourquoi nous définissons le paramètre d'indice de connexion. Ce dernier renseigne, comme son nom l'indique, sur la connexion des réseaux.

Définition 2.4.4 *L'indice de connexion est défini comme le rapport de la longueur totale des lignes détectées sur le nombre de points de branchement:*

$$\frac{\text{Longueur totale des lignes détectées}}{\text{Nombre de points de branchement}}$$

Interprétation – *L'indice de connexion est inversement proportionnel à la connexion du réseau. Ainsi, un indice élevé caractérise un réseau faiblement connecté.*

La *combinaison des approches* décrit symboliquement les réseaux cytosquelettique par un enchevêtrement de structures curvilignes (larges d'un point image) qui permet de caractériser la topologie des réseaux en terme de densité et de connexion.

2.5 Discussion

Lors de ce Chapitre, nous avons développé une méthodologie de caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques par des procédures d'analyse d'images. Cette méthodologie comporte trois approches (l'*approche filament*, l'*approche maillage* et la

combinaison des approches), qui découlent de problématiques différentes et permettent une caractérisation aussi exhaustive que possible des différents aspects de l'architecture des réseaux en les représentant successivement par des objets curvilignes, des mailles ou des réseaux. Ainsi ces trois approches permettent de quantifier l'architecture cytosquelettique en terme de morphologie des filaments, de structure de maille, de densité et de connexion des réseaux. La méthodologie de caractérisation par ces trois approches est résumée dans le schéma récapitulatif de la Figure 2.12.

L'*approche filament*, une approche originale, permet d'extraire l'information locale, alors que l'*approche maillage*, une approche plus classique, dégage l'information à un niveau plus global. Ainsi elles permettent de préserver des informations présentes à deux niveaux de géométrie et de spécifier des paramètres de quantification différents.

Cependant, chacune de ces deux approches utilisées seules ne suffit pas à caractériser complètement l'architecture des réseaux cytosquelettiques. La *combinaison des approches*, en associant les deux niveaux de géométrie, permet d'obtenir une représentation plus complète de l'information.

De plus, la *combinaison des approches* peut être assimilée à une méthode de correction des résultats obtenus par l'une ou l'autre des approches en utilisant conjointement les deux niveaux de réalisation.

Cette méthodologie de caractérisation utilise des représentations bidimensionnelles d'objets tridimensionnels, de ce fait, les qualités des images ainsi que leurs positions d'acquisition doivent être d'une grande rigueur.

D'autres méthodologies d'analyse d'images, comme des algorithmes utilisant la géométrie différentielle, pourraient améliorer la caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques en permettant l'extraction automatique de la largeur des filaments [80].

Dans le Chapitre suivant, deux études utilisant cette méthodologie sont présentées:

- la première s'attachant à mettre en évidence la variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux cytosquelettiques,
- la seconde ayant pour objet la mise à jour de la variabilité de l'architecture des réseaux cytosquelettiques de cellules soumises à des contraintes mécaniques différentes.

D'autres applications de cette méthodologie de caractérisation peuvent être envisagées comme l'étude d'angiographie, la détection et la quantification de réseaux routiers. . .

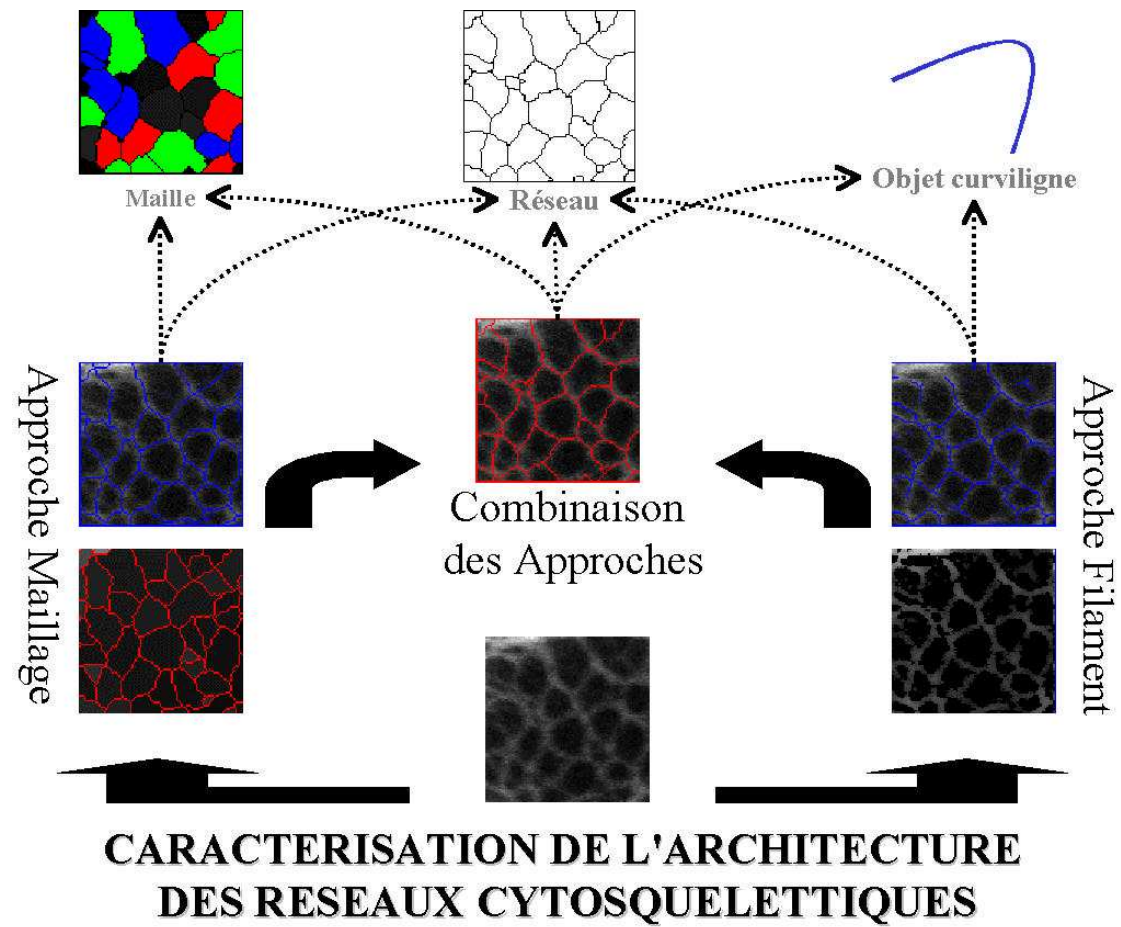


FIG. 2.12 *Récapitulatif de la caractérisation des réseaux cytosquelettiques de l'image d'origine à la représentation des images selon la définition des objets induits par les différentes problématiques.*

3. Variabilité de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires

Dans ce Chapitre, nous utilisons la méthodologie, mise au point et décrite dans le Chapitre précédent, pour caractériser l'architecture du réseau de filaments intermédiaires dans deux études distinctes. La première concerne l'identification des variations de l'architecture du réseau de cytokératine aux différentes localisations cellulaires résultant des contraintes mécaniques qui s'appliquent différenciellement au sein de la cellule. La seconde s'attache à la mise en évidence des variations de l'architecture des réseaux induites par l'exposition des cellules à des conditions mécaniques différentes.

Sommaire

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1 | Variabilité intracellulaire de l'architecture | 71 |
| 3.2 | Variabilité de l'architecture selon des conditions mécaniques différentes | 75 |
| 3.3 | Conclusion | 78 |

Les deux études, décrites dans ce Chapitre, ayant été l'objet de publications incluses en Annexes B et C, nous nous contentons d'en donner les contextes et d'en exposer les résultats.

3.1 Variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires

La mise en évidence de la variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires (réseaux de cytokératine), de lignées de cellules tumorales mammaires épithéliales (MCF-7) en culture, a été conduite sous l'hypothèse que des configurations différentes des réseaux de cytokératine reflètent des contraintes locales différentes subies par la cellule. Cette étude a fait l'objet d'un article¹ qui est joint en Annexe B.

1. Quantitative analysis of cyokeratin network topology in the MFC-7 cell line. (1999). Portet S., Vassy J., Beil M., Millot G., Hebbache A., Rigaut J.P. et Schoëvaërt D. Cytometry 35. pp. 203-213.

Pour ce travail la méthodologie de caractérisation, développée dans le Chapitre 2, a été appliquée sur des images de réseaux de cytokératine visualisés par immunofluorescence et microscopie confocale (Fig. 3.1(a)).

Les capacités de la microscopie confocale rendent possible l'acquisition d'images à une position précise dans l'épaisseur des échantillons. Toutes les images, utilisées lors de cette étude, ont été réalisées à des sections focales précises qui sont positionnées au niveau de l'enveloppe nucléaire et dans la zone de contact cellule–matrice extracellulaire (substrat).

De ces images ont été extraites des sous-images de même taille de 100×100 pixels selon un critère de localisation intracytoplasmique. En d'autres termes, les sous-images ont été sélectionnées dans trois zones spécifiques, dans des zones de jonction cellule–cellule et cellule–matrice extracellulaire, dans des zones de front de migration (zones de protrusion des cellules en migration) et autour du noyau. Ces zones ont été choisies parce qu'elles présentent des contraintes locales particulières.

Les zones de jonction cellule–cellule ou de jonction cellule–matrice extracellulaire sont des zones soumises à de fortes tensions locales. Les zones autour du noyau sont également des zones d'application de contraintes locales, en effet la position et l'intégrité du noyau sont maintenues. Les zones de front de migration sont des zones de relaxation exemptes de contact extracellulaire et où les contraintes sont minimales.

Le but de ce travail était de distinguer les motifs architecturaux des réseaux dans les différentes localisations intracytoplasmiques choisies et de quantifier leurs variations architecturales. La discrimination entre les différents motifs architecturaux a été réalisée par des tests statistiques non-paramétriques de Mann-Whitney [48, 77], comparant, deux à deux les trois différentes zones de localisation, par les paramètres de quantification développés dans le Chapitre 2.

Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence trois différentes configurations architecturales spécifiquement localisées dans le cytoplasme: un *motif rectiligne* présent dans les régions des jonctions cellule–cellule et cellule–matrice extracellulaire, un *motif alvéolaire* spécifiquement localisé dans la région périnucléaire autour du noyau et un *motif en "vague"* existant dans les régions de front de migration (Fig. 3.1(b)).

Les différences architecturales entre les trois motifs identifiés de réseaux de filaments intermédiaires se caractérisent par des différences significatives au niveau de la connexion, de la densité, de la structure de maille et de la morphologie des filaments.

Le *motif rectiligne* se caractérise par une forte connexion, une densification du réseau et une structure en maille allongée constituée d'un enchevêtrement de filaments ayant une faible courbure. Le *motif alvéolaire* présente les mêmes particularités que le *motif rectiligne* pour la connexion et la densité du réseau, par contre il possède une structure de maille très arrondie. Enfin, le *motif en "vague"*, qui a une plus faible connexion et une plus faible densité, possède une structure de maille plutôt allongée constituée par des filaments ayant de fortes courbures.

La plupart des paramètres topologiques et géométriques utilisés pour la caractérisation

des réseaux comme le nombre de points de branchement, l'index de connexion, la longueur du réseau, le nombre de régions détectées et leur aire ne permet pas de distinguer le *motif rectiligne* du *motif alvéolaire*. Par contre, ces mêmes paramètres différencient nettement le *motif en "vague"* des deux autres motifs *rectiligne* et *alvéolaire*.

Les motifs apparaissant dans des régions de forte contrainte locale (le *motif rectiligne* et le *motif alvéolaire*) possèdent les mêmes propriétés topologiques de connexion et de densité. Le réseau de cytokératine semble se densifier et établir plus de connexions entre ses filaments dans ces régions. Ce qui suggère que la connexion et la densité du réseau semblent influencées, augmentées par l'occurrence d'une contrainte locale.

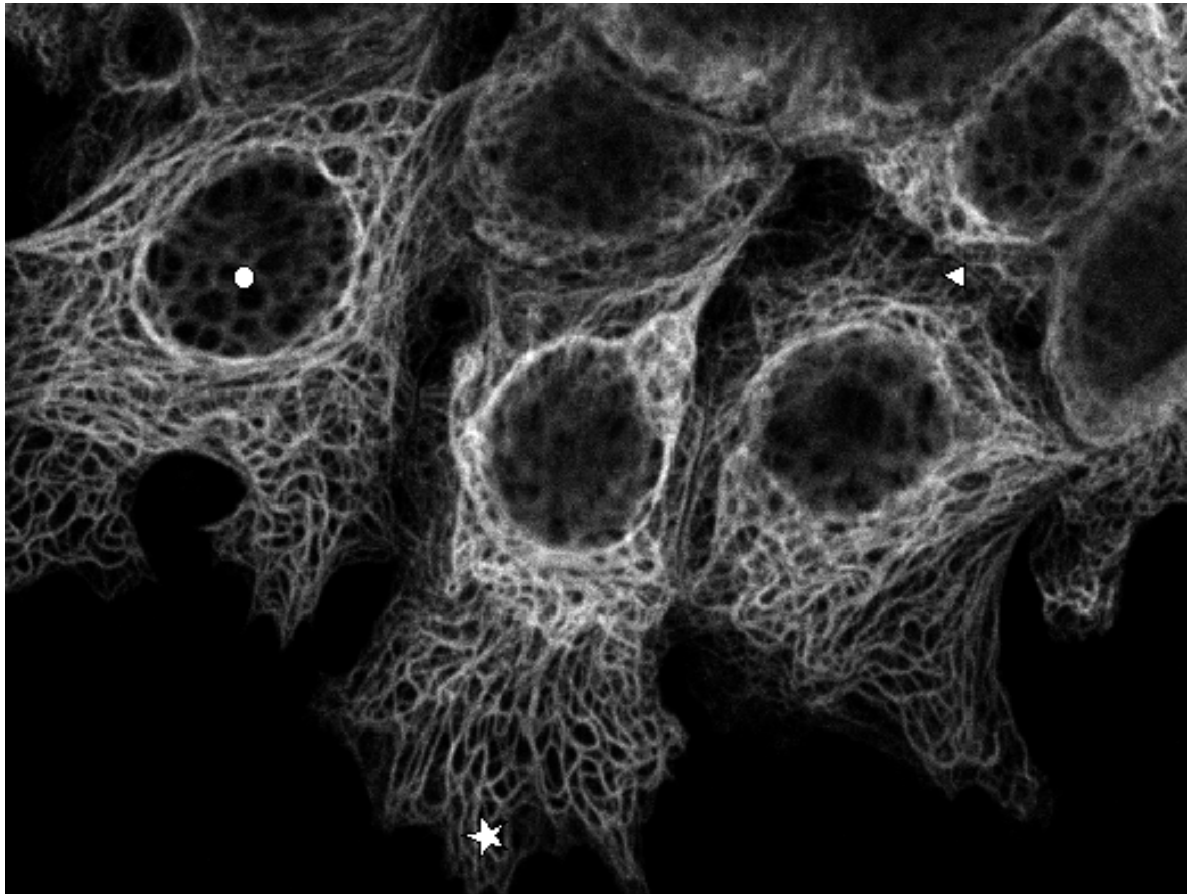
Le *motif alvéolaire*, présent autour du noyau, a une structure de maille très différente de celle des deux autres motifs *rectiligne* et *"en vague"*. Les motifs *rectiligne* et *"en vague"* ont une structure de maille similaire, les mailles sont allongées et larges, alors que le *motif alvéolaire* a une structure de maille plus arrondie et plus fine.

La structure de maille dépend de la localisation intracytoplasmique, elle spécifie et localise la position du réseau par rapport au noyau.

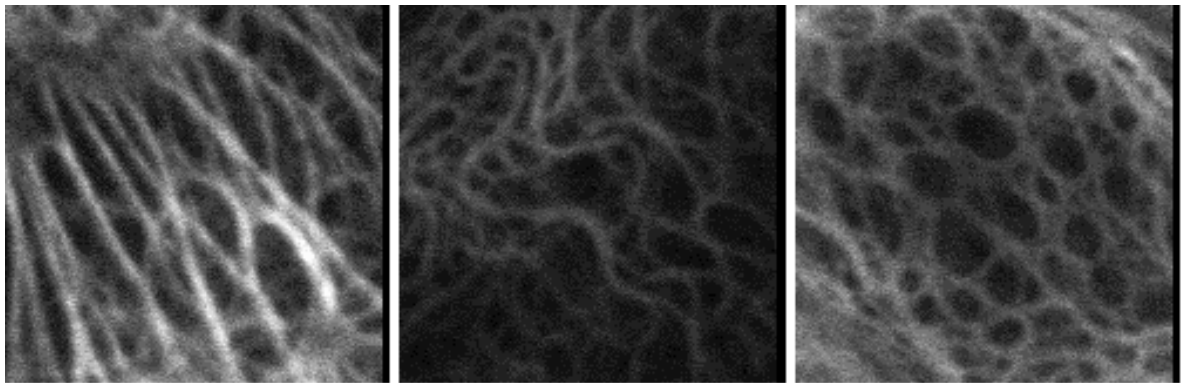
La morphologie des filaments varie selon la localisation intracytoplasmique. Dans chaque motif, les filaments adoptent un comportement différent: dans le *motif rectiligne*, les filaments sont assimilables à des droites, dans le *motif en "vague"*, les filaments sont des courbes sinueuses, et dans le *motif alvéolaire*, les filaments sont des courbes fermées proche du cercle (boucles). Le paramètre morphologique de courbure est le paramètre le plus discriminant.

Lors de cette étude, il a été observé que l'approche maillage est plus efficace pour des motifs isotropiques avec une forte connexion. L'approche maillage supprime toutes possibilités d'individualisation d'un filament, par contre elle conserve bien les caractéristiques géométriques des réseaux. L'approche filament pour sa part est plus efficace sur des motifs anisotropiques faiblement connectés.

En conclusion, la connexion et la densité des réseaux cytosquelettiques sont influencées par l'occurrence de contraintes mécaniques locales. La structure de maille caractérise la position du réseau par rapport à la région périnucléaire (proche ou distant du noyau) qui est considérée comme une région d'application de contraintes locales. Enfin, la morphologie des filaments indique à la fois la position du réseau par rapport au noyau et la présence ou l'absence de contrainte locale sur le site.



(a)



(b)

FIG. 3.1 Variabilité intracellulaire de l'architecture des réseaux de cytokératine. L'image (a) représente les réseaux de cytokératine de cellules tumorales mammaires épithéliales en culture (MCF-7). Trois localisations intracytoplasmiques spécifiques sont repérées: ● marque une zone autour du noyau, ★ indique un front de migration et ▲ pointe une zone de contact cellule-cellule. Selon les localisations intracellulaires, les réseaux de cytokératine adoptent des configurations architecturales différentes. Trois types de motifs architecturaux ont été identifiés. L'image (b) montre un exemple de chacun des types de motifs identifiés: de la gauche vers la droite, le motif rectiligne, le motif en "vague" et le motif alvéolaire.

3.2 Variabilité de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires selon des conditions mécaniques différentes

En 1999, notre laboratoire² a participé, lors de la Mission spatiale Photon 12 (CNES), à une expérience en micropesanteur, l'expérience EPITHELIUM. Le but de l'expérience, conduite par Jany Vassy, a été d'étudier le rôle de la gravité dans la transduction des signaux de l'environnement vers le noyau à travers le cytosquelette. Selon notre hypothèse, la force gravitationnelle est une force externe qui pourrait jouer un rôle dans l'organisation structurale du cytosquelette et par conséquent avoir des répercussions sur la physiologie de la cellule. L'expérimentation spatiale offre une bonne opportunité pour tester l'existence d'une relation entre l'organisation structurale cellulaire, la transduction des signaux, la prolifération cellulaire et les conditions mécaniques.

Cette expérience et ses résultats font l'objet d'un article³ qui est joint en Annexe C.

Lors de cette expérience, des méthodes d'immunofluorescence, de microscopie confocale et l'analyse d'images ont été utilisées pour étudier la prolifération cellulaire, la transduction de signaux, l'architecture du cytosquelette et la structure de la chromatine. Cette étude a comparé des lignées de cellules épithéliales tumorales mammaires (MCF-7) en condition de micropesanteur pendant 48h, à des cellules en gravité obtenue par centrifugation pendant le vol. Une partie du travail a porté sur la caractérisation de l'architecture du réseau de filaments intermédiaires (de cytokératine) pour différentes contraintes gravitationnelles.

La caractérisation du réseau de filaments intermédiaires s'est spécifiquement focalisée sur l'étude du réseau périnucléaire. Cette zone a été spécialement choisie pour la constance de son motif architectural, qui est formé d'alvéoles régulières [60]. D'autre part, le noyau représente la masse la plus importante sur laquelle les forces gravitationnelles pourraient agir.

Dans ce but, des images de réseaux de cytokératine ont été collectées dans un plan focal situé entre le substrat et le noyau, à partir de populations de cellules soumises à différentes conditions. Les différentes conditions étudiées lors de cette analyse sont au nombre de six et sont énumérées ci-dessous:

- contrôle au sol (1g),
- $t_0 = 1h30$,
- contrôle en vol au temps $t_1 = 22h$ (1g par centrifugation en vol),
- micropesanteur au temps $t_1 = 22h$ (μg),

2. Laboratoire d'Analyse d'Images en Pathologie Cellulaire, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.

3. Effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7. (2001) Vassy J., Portet S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafève F., Karniguian A., Gasset G., Irinopoulou T., Calvo F., Rigaut J.P., Schoëvaert D. Faseb J. Express 15.

- contrôle en vol au temps $t_2 = 48h$ (1g par centrifugation en vol),
- micropesanteur au temps $t_2 = 48h$ (μg)

Pour chaque population de cellules, des sous-images de taille 100×100 points images ont été extraites au niveau de la région périnucléaire. Le nombre total (toutes populations confondues) de sous-images utilisées pour cette étude est de 369. Les effectifs de chaque population sont les suivants:

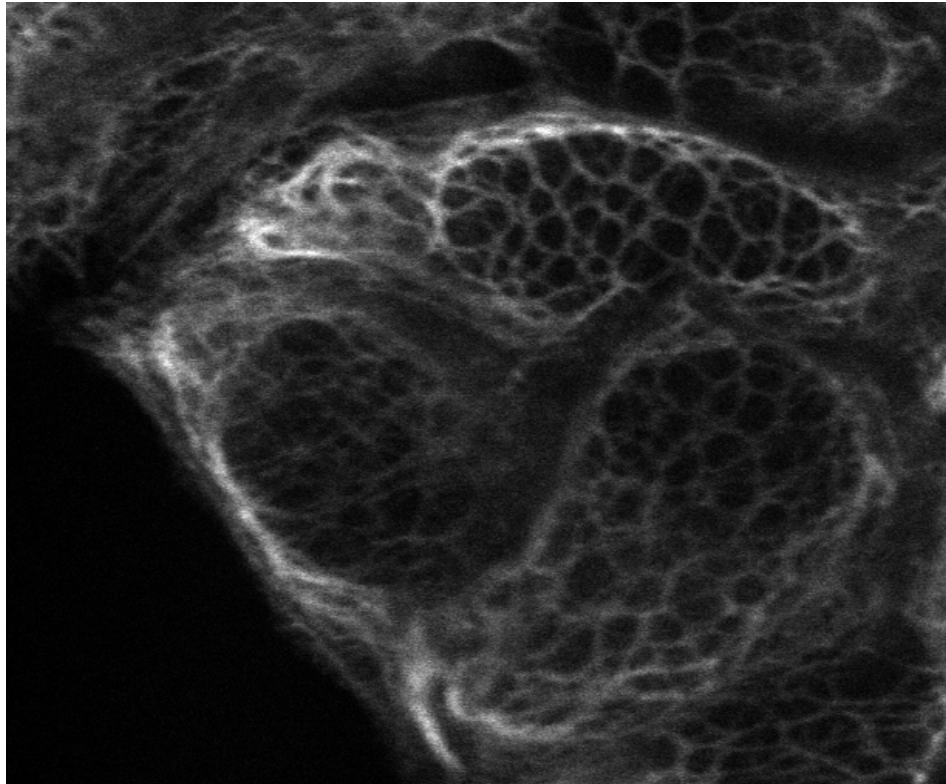
- 60 sous-images pour le contrôle au sol,
- 62 sous-images pour t_0 ,
- 64 sous-images pour le contrôle en vol au temps t_1 ,
- 59 sous-images pour la micropesanteur au temps t_1 ,
- 75 sous-images pour le contrôle en vol au temps t_2 ,
- 49 sous-images pour la micropesanteur au temps t_2 .

La discrimination et la quantification des motifs architecturaux qui apparaissent selon les conditions appliquées, ont été effectuées en utilisant des paramètres de quantification relatifs à la structure de maille. Pour se faire, ces paramètres ont été soumis à des tests statistiques non paramétriques de Mann-Whitney [48, 77], comparant deux à deux les six différentes populations de cellules.

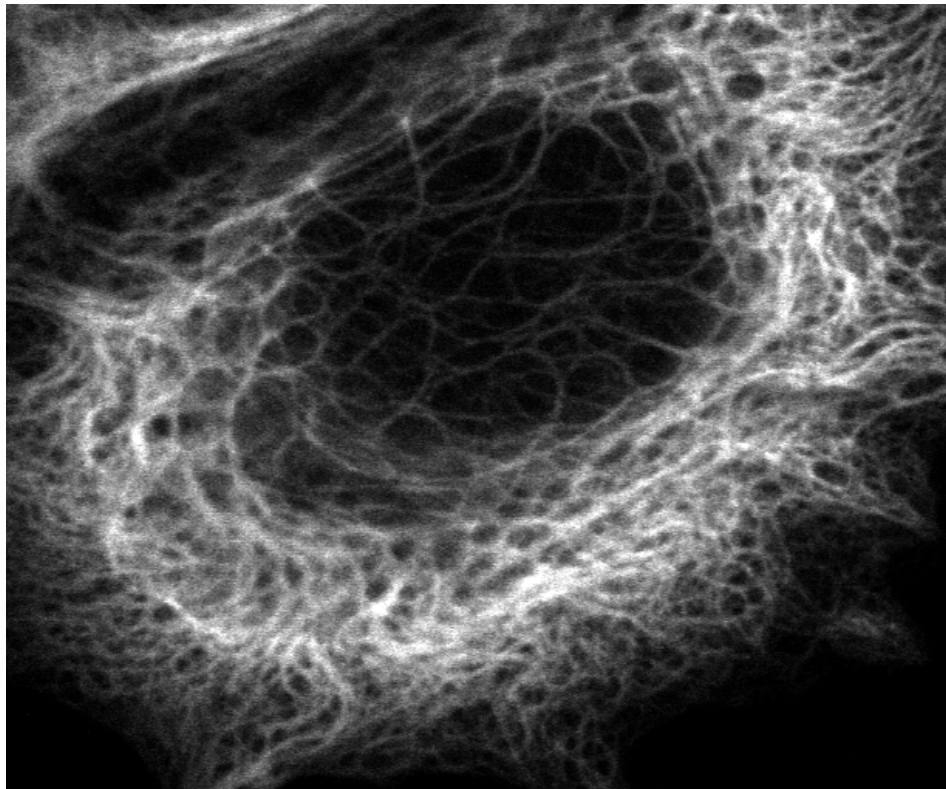
Le motif architectural, dit "motif alvéolaire" observé lors de la première étude, dans la région périnucléaire [60], est également observé dans les populations de contrôle au sol (Fig. 3.2(a)) et au temps t_0 .

Nous avons pu mettre en évidence une différence significative de la structure de maille entre les réseaux de cytokératine en micropesanteur et en condition de gravité (obtenue par centrifugation en vol), tant au temps t_1 (22h) qu'au temps t_2 (48h). Le maillage est beaucoup plus "lâche" en micropesanteur principalement au temps t_2 . Ce "relâchement" du réseau se traduit par une augmentation de la surface des mailles entre les filaments (Fig. 3.2(b)).

En conclusion, la gravité influe sur l'architecture du réseau de cytokératine. Ce dernier apparaît relâché, distendu (structure de maille très large) en condition de micropesanteur par rapport à celui observé en condition de gravité. Ces résultats confortent l'idée que la densification du réseau résulte d'un processus de renforcement induit par l'action de forces externes.



(a)



(b)

FIG. 3.2 Réseaux de cytokératine de cellules contrôles et de cellules en micropesanteur. (a) représente les réseaux de cytokératine de cellules contrôles (MCF-7). (b) montre les réseaux de cytokératine de cellules en micropesanteur (MCF-7).

3.3 Conclusion

La méthodologie de caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques par analyse d'images, exposée dans le Chapitre 2, comporte trois approches qui spécifient différents aspects des réseaux tels que la morphologie des filaments, la géométrie et la topologie des réseaux. Elle permet une étude, tant au niveau de la représentation qu'au niveau de la quantification, aussi exhaustive que possible de l'architecture des réseaux.

Cette méthodologie a été utilisée pour deux études ayant pour but la mise en évidence de la variabilité de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires en fonction des contraintes mécaniques s'appliquant localement ou globalement aux cellules.

La première étude (Annexe B) concerne l'identification des variations intracellulaires de l'architecture du réseau de filaments intermédiaires résultant des contraintes mécaniques qui s'appliquent différenciellement au sein d'une cellule. Elle a permis de mettre en évidence la variabilité structurale intracellulaire du réseau de cytokératine et de caractériser plusieurs motifs architecturaux du réseau de cytokératine spécifiquement localisés dans le domaine intracellulaire. Ces résultats nous ont amené à conclure à l'existence d'une relation entre les configurations architecturales du réseau de cytokératine et les contraintes locales. Les variations architecturales du réseau de cytokératine sont liées aux conditions mécaniques locales s'appliquant au sein de la cellule.

La seconde étude (Annexe C) a pour objet la mise en évidence des variations de l'architecture induites par l'exposition de cellules à des conditions mécaniques différentes (gravité et micropesanteur). La force gravitationnelle est une force qui agit sans point d'application physique et est distribuée uniformément sur tout le corps, elle est nommée force à distance. Par conséquent, l'observation en gravité et en micropesanteur (absence de gravité) offre la meilleure opportunité pour mettre en évidence l'existence d'une influence des conditions mécaniques sur l'organisation structurale des réseaux cytosquelettiques. Cette seconde étude a permis d'évaluer les variations architecturales entre les réseaux de filaments intermédiaires de cellules contrôles et ceux de cellules en micropesanteur et de ce fait, de mettre en évidence des effets de la gravité ou de l'absence de gravité sur l'architecture des réseaux cytosquelettiques.

Ces deux études ont permis la mise en évidence de la variabilité de l'architecture du réseau de filaments intermédiaires reflétant l'existence d'une relation entre l'organisation structurale du réseau de cytokératine et les conditions mécaniques extracellulaires. Le réseau de cytokératine réorganise son architecture en réponse aux modifications mécaniques locales ou globales de l'environnement extracellulaire, ce comportement renseigne sur une fonction mécanique possible du réseau de cytokératine. Cette fonction mécanique sous-entend son implication dans le maintien de l'intégrité cellulaire et potentiellement dans la mécanotransduction par voie structurale.

Afin de valider rigoureusement l'hypothèse de fonction mécanique du réseau de cytokératine selon laquelle l'organisation structurale du réseau est induite par les contraintes mécaniques extracellulaires, un grand nombre d'expériences, utilisant des protocoles

expérimentaux différents pour contrôler tous les paramètres impliqués dans ce processus, serait nécessaire.

Une autre solution pour valider cette hypothèse est la modélisation mathématique qui permet de contrôler plusieurs paramètres en même temps.

Pour cette raison, en nous appuyant sur nos observations et nos résultats obtenus par analyse d'images sur le réseau de cytokératine, nous avons développé un modèle mathématique d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine dans lequel son architecture est fonction des contraintes mécaniques environnementales.

Ce travail de modélisation fait l'objet de la seconde partie de la thèse.

*Du modèle à la réalité:
Modèle d'organisation
morphofonctionnelle du
réseau de cytokératine*

4. Etat de l'art

La modélisation de l'organisation du cytosquelette n'est pas un sujet nouveau. La plupart des travaux traitant de ce sujet s'est intéressée à la dynamique de l'actine et, dans une moindre mesure, à la dynamique des microtubules. Nous présentons ici quelques travaux qui nous paraissent incontournables et/ou qui ont influencé la construction de notre modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine.

Pour étudier la dynamique du réseau de microfilaments, différentes approches ont été envisagées: des approches moléculaires, des approches mécaniques, des approches moléculaires incluant l'effet de l'environnement extracellulaire et des approches structurales.

Dans Dufort et Lumsden (1993), la polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine, ainsi que les interactions entre une armée de protéines régulatrices et les microfilaments sont étudiées dans un modèle d'automate cellulaire [100], exposant les dynamiques spatiales et temporelles du cytosquelette d'actine (transition sol-gel) [25, 24].

En 1994, Civelekoglu et Edelstein-Keshet ont développé un modèle décrivant la formation et les changements d'organisation du cytosquelette d'actine [17]. L'organisation spontanée des filaments d'actine en réseaux parallèles et/ou orthogonaux, ainsi que la transition entre ces deux types de structure sont étudiées. Ils ont montré qu'un changement rapide, sous certaines conditions, dans les paramètres représentant les interactions biochimiques (affinités des molécules, taux d'association ou de dissociation) est suffisant pour rompre la stabilité d'une distribution isotrope et entraîner la formation rapide d'un réseau de filaments assemblés parallèlement ou orthogonalement. Les propriétés au niveau moléculaire définissent la structure macromoléculaire et l'organisation des réseaux d'actine en structure de faisceaux de filaments arrangés parallèlement ou de gel de filaments ordonnés orthogonalement.

Ces deux modèles ont été et sont actuellement les références et points de départ de beaucoup de modèles utilisant les mécanismes moléculaires pour expliquer la réorganisation des réseaux de microfilaments.

En 1996, Mogilner et Edelstein-Keshet ont développé une classe de modèle, dont le modèle exposé dans [17] est un cas particulier, pour étudier le comportement dynamique d'ensembles d'objets dont les interactions sont dépendantes de leurs orientations angulaires ainsi que de leurs positions spatiales [55]. Dans cette classe de modèle, des

processus comme l'alignement, la formation de motifs et l'agrégation sont décrits par un ensemble d'équations aux dérivées partielles incluant un terme de convolution dont le noyau représente l'intensité des interactions entre les objets selon les valeurs d'angles et de distances. Ce type de modèle est utilisable pour l'étude, à un niveau moléculaire, de l'organisation des réseaux de microfilaments.

En 1998, Spiros et Edelstein-Keshet ont testé leurs précédents modèles [17, 55], pour les valeurs biologiques des paramètres [79].

L'auto-organisation angulaire des réseaux de microfilaments a également été étudiée par Geigant *et al.* (1998), via une équation intégral-différentielle de Boltzmann et comme paramètres les seules interactions entre les filaments d'actine [32].

D'autres modèles se sont intéressés à la distribution des longueurs des filaments d'actine selon l'activation des processus de polymérisation, de dépolymérisation et de fragmentation des microfilaments sous l'action de la gelsoline [28, 30].

D'autres approches ont ensuite pris en compte les effets de l'environnement extracellulaire sur l'organisation du réseau de microfilaments.

La première approche de ce type a été celle développée par Sherratt et Lewis (1993) [74]. Ils ont modélisé l'alignement spontané des filaments d'actine en réponse à l'anisotropie des champs de stress externes et internes. Dans ce modèle non dynamique, la réponse spontanée du réseau d'actine aux champs de stress dépend d'un unique paramètre représentant la résistance du réseau de filaments d'actine et des protéines associées. Le rôle des protéines associées à l'actine et leurs interactions avec les microfilaments ne sont pas considérés explicitement. Cette approche est une approche mécanique fondée sur le bilan des forces du système.

Dans le même esprit mais en considérant les mécanismes moléculaires, Suciu *et al.* (1997) ont proposé un modèle qui reprend le modèle de Civelekoglu et Edelstein-Keshet (1994) [17], en l'étendant pour prendre en compte l'effet d'une force externe sur le cytosquelette d'une cellule endothéliale [82]. Ce modèle est sous la forme d'un système d'équations intégral-différentielles décrivant la dynamique des filaments d'actine, les protéines associées à l'actine et la dérive des protéines transmembranaires dues aux forces externes s'appliquant sur la membrane plasmique. Ils ont montré que l'effet d'une force externe altère la dynamique des filaments ancrés aux protéines transmembranaires, ce qui est suffisant pour rompre la stabilité du réseau isotropique et favoriser la formation d'une structure en faisceaux de filaments agencés parallèlement.

En 2000, Wang a développé un modèle afin de définir la relation entre la réorganisation du réseau d'actine d'une cellule et les déformations du substrat agissant sur la cellule sous l'hypothèse qu'un filament individuel d'actine est pré-tendu, extensible et linéairement élastique [93].

Plusieurs modèles ont également été proposés pour étudier la dynamique des microtubules se fondant principalement sur les mécanismes moléculaires [11, 29, 45, 56, 62, 71]. Peu de travaux se sont intéressés à l'organisation structurale de ce type de réseau.

En 1990, Robert *et al.* ont proposé un modèle d'auto-organisation spatiale du réseau

de microtubules induite par un gradient de concentration de la tubuline qui est généré par la croissance des polymères [62].

La plupart des modèles s'est focalisée sur la dynamique de polymérisation des microtubules ou sur leurs caractéristiques physiques [45]. Bolterauer *et al.* (1996) ont modélisé l'assemblage et le désassemblage des microtubules par des fonctions stochastiques [11]. Enfin, Sept *et al.* (1999) ont développé un modèle étudiant les oscillations des microtubules (quantité totale de tubuline assemblée) fondé sur les cinétiques chimiques.

D'autres types d'approches complètement différentes, participant de ce que nous pourrions nommer approche structurale, ont été développées à partir du concept de tenségrité défini en 1993 par Ingber [42]. La tenségrité suppose que les connexions moléculaires entre les récepteurs d'adhésion de la membrane cellulaire, les réseaux interconnectés du cytosquelette et la matrice nucléaire fournit un chemin pour un transfert des signaux mécaniques à travers la cellule, cette structure est considérée initialement soumise à des forces qui se distribuent sur l'ensemble de la structure. Les modèles s'appuyant sur ce paradigme et utilisant les structures de tenségrité ne fournissent pas une explication de l'organisation structurale et de l'interconnexion du cytosquelette, mais ils donnent un mécanisme possible pour comprendre la réponse d'une cellule à un stress [92, 97, 98]. Ainsi ces modèles proposent de décrire et de quantifier le comportement global de la cellule, soumise à des conditions de stress mécaniques, résultant des déformations du cytosquelette.

Plus généralement, des modèles pour des structures de type réseau, dont l'architecture est influencée par l'environnement, ont été développés pour étudier leur construction et/ou leur organisation spatiale. Ces modèles concernent des domaines différents comme le développement des plantes, la mise en place d'un réseau de neurones, l'organisation des fibres constituant la matrice extracellulaire.

Les plantes peuvent être conceptualisées comme des structures de branchement (branches, racines...) assimilables à des réseaux. L'interaction avec l'environnement est un facteur déterminant du développement des plantes. Mech et Prusinkiewicz (1996) [53], ont développé un cadre général de modélisation qui utilise la méthodologie des systèmes de Lindenmayer, sorte de grammaire générative également appelés les L -systèmes [61], qu'ils ont étendu rendant possible un échange bidirectionnel entre les plantes et leur environnement (Open L-systems). Cette méthodologie considère les plantes et leur environnement comme deux processus séparés qui communiquent et échangent des informations. Cette méthodologie est appliquée à la modélisation du développement des racines dans le sol en fonction des concentrations d'eau dans le sol et à la modélisation du développement de plusieurs arbres en compétition pour l'espace et la lumière. Ce type de modèle considère que les plantes interagissent avec l'environnement par un échange rétroactif d'informations, où l'environnement affecte la plante et réciproquement la plante affecte l'environnement.

En 1997, Vaario *et al.* ont proposé un modèle de formation de structures neuronales conduite par leur environnement qui est modélisé par des champs de concentration

régis par un processus de diffusion [87]. La construction des structures neuronales est contrôlée par un processus d'agrégation (Diffusion Limited Aggregation) [69]. Le contrôle par l'environnement réduit l'apport génétique et permet une évolution plus rapide.

De nombreux modèles d'alignement des fibres de la matrice extracellulaire, formant un réseau qui est créé, maintenu et modelé par des cellules appelées fibroblastes, ont été proposés [20, 21, 58]. Ce phénomène d'alignement est crucial lors des processus de cicatrisation des tissus. Dans ces modèles, l'environnement est constitué de cellules gouvernant l'organisation des fibres (colagène) de la matrice extracellulaire.

Les principales approches de modélisation d'organisation de structure de type réseau de la littérature ainsi exposées, nous proposons, dans cette seconde partie de la thèse, une approche originale d'organisation structurale du réseau de cytokératine induite par son environnement, qui combine différents aspects des approches existantes.

Notre *modèle mathématique d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine d'une cellule épithéliale* sous des conditions mécaniques données, est exposé et les concepts de modélisation utilisés sont discutés dans le Chapitre 5. Dans le Chapitre 6, un modèle de simulation, dérivé du modèle mathématique, est décrit. Les résultats des expériences numériques, illustrant le comportement du modèle sont présentés et discutés dans le Chapitre 7.

5. Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine

Nous formulons dans ce Chapitre un modèle mathématique d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine d'une cellule épithéliale. Ce modèle propose l'établissement du réseau de cytokératine dans une organisation structurale spécifique induite par les conditions mécaniques. Ce modèle a pour but de caractériser la relation entre l'architecture de ce réseau et les conditions mécaniques environnementales, qui reflète sa fonction mécanique.

Sommaire

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.1 | Concepts de modélisation | 88 |
| 5.2 | Domaine cellule et ses composants | 94 |
| 5.3 | Equations du modèle | 95 |
| 5.4 | Synthèse protéique | 98 |
| 5.5 | Diffusion protéique | 107 |
| 5.6 | Initiation de filaments | 108 |
| 5.7 | Polymérisation des filaments | 112 |
| 5.8 | Consommation du pool soluble | 117 |
| 5.9 | Discussion sur les concepts de modélisation | 118 |

L'organisation spécifique des réseaux de filaments intermédiaires cytoplasmiques ainsi que leurs propriétés rhéologiques, qui sont décrites dans le Chapitre d'Introduction, suggèrent leur rôle dans la transduction des signaux mécaniques de l'environnement cellulaire vers le noyau et dans le maintien de l'intégrité cellulaire [70]. De plus lors de la première partie de la thèse, nous avons établi, via les résultats de la caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques par des méthodes d'analyse d'images, que le réseau de cytokératine est une structure dépendante de l'environnement mécanique [60, 90].

Ainsi notre hypothèse de travail suppose que les filaments intermédiaires et plus spécifiquement les cytokératines pourraient être impliqués dans une fonction mécanique incluant la mécanotransduction par la voie structurale (mécanique) et la préservation

de l'intégrité de la cellule. Explicitement, le réseau de cytokératine réorganise son architecture en réponse aux modifications mécaniques de l'environnement extracellulaire [43, 84, 85, 95]. De cette façon, il convertit les contraintes extracellulaires en variations architecturales tout en maintenant l'intégrité cellulaire.

Sous ces hypothèses, notre but est de proposer un *modèle d'organisation morphofonctionnelle des réseaux de filaments intermédiaires* qui suppose que l'organisation structurale d'un réseau spécifique de cytosquelette dépend de sa fonction biologique et que les contraintes mécaniques régulent la synthèse des protéines cytosquelettiques. En d'autres termes, nous proposons un modèle de construction de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires induite par les conditions mécaniques présentes dans l'environnement intra/extracellulaire.

5.1 Concepts de modélisation

A la fin de la mitose, une fois que la télophase est achevée, la cellule se divise en deux cellules filles (*cytodiérèse*). A cet instant l'enveloppe nucléaire des cellules filles vient juste de se former.

Notre but ici est de modéliser l'établissement du réseau de cytokératine à partir de cet instant, qui est dans la suite nommé l'*instant initial* du modèle, et est noté T_0 . Le domaine temporel $[T_0, T_0 + T_{max}]$ du modèle correspond à la durée de doublement d'une cellule, T_{max} .

Le domaine spatial représente l'espace occupé par une cellule. Une cellule est supposée constituée d'une membrane cellulaire, d'un cytoplasme, d'un noyau et de son enveloppe nucléaire. Plus précisément, notre modèle s'applique à une cellule épithéliale dont la fonction de revêtement implique une polarité baso-apicale divisant la membrane plasmique en 3 domaines: la face basale en contact avec la matrice extracellulaire, les faces latérales en contact avec les cellules adjacentes et la face apicale en contact avec la lumière de l'organe.

L'environnement mécanique intra/extracellulaire dépend à la fois du temps et de l'espace. Les différents types de contraintes, supposées agir sur la cellule, s'appliquent à des positions spatiales spécifiques. De même, les instants d'activation des différentes contraintes sont distribués dans le domaine temporel. A partir de l'instant initial T_0 (la fin de la cytodiérèse), il est supposé qu'un champ centripète de force s'établit autour du noyau afin de maintenir l'intégrité nucléaire. Après un certain temps, la cellule se différencie en cellule épithéliale et acquiert des desmosomes et des hémidesmosomes. Les desmosomes forment des plaques de quelques microns de diamètre sur les faces latérales de la cellule [75]. Les hémidesmosomes se situent sur la face basale de la cellule, ce sont des plaques d'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire [78]. On peut alors supposer que ces jonctions adhérentes transmettent les tensions qui s'appliquent sur ces régions. Les régions d'action et les instants d'activation d'une contrainte dépendent de la nature de cette contrainte. Les forces de cohésion préservant l'intégrité nucléaire

et actives dans la région périnucléaire s'appliquent dès l'instant initial T_0 du modèle. Les contraintes résultant des jonctions, qui s'appliquent aux hémidesmosomes et aux desmosomes sont activées au début de la différenciation de la cellule.

Notre hypothèse de travail pose que l'action d'un stimulus mécanique intervient dans la régulation de la *synthèse* des protéines cytosquelettiques (synthétisées par des polyribosomes libres dans le cytoplasme). Le processus de synthèse peut être conceptualisé comme un phénomène de renforcement qui préserve l'équilibre homéostatique. Lorsqu'un stress externe est appliqué à une cellule, cette dernière réagit en synthétisant des protéines dans le but de construire un réseau cytosquelettique capable de préserver son intégrité. Il est supposé que l'application d'une contrainte active la synthèse protéique (la synthèse de monomères) dans la région périnucléaire. Les protéines sont tout d'abord transportées le long des réseaux de microtubules ou de microfilaments, de la région périnucléaire vers les régions d'action de contrainte [12]. Aux sites où agissent des contraintes, une oligomérisation (un assemblage latéral) de protéines en *tétramères* prend place [33, 40]. Enfin, les tétramères sont libérées dans le cytoplasme. Les tétramères sont les sous-unités solubles de cytokératine et constituent ce que l'on appelle le *pool soluble* (Fig. 5.1(a)). Dans le modèle, l'ensemble de ces événements constitue ce que nous nommerons le *processus de synthèse*. Ce processus de synthèse est contrôlé et modulé à différents niveaux par divers facteurs.

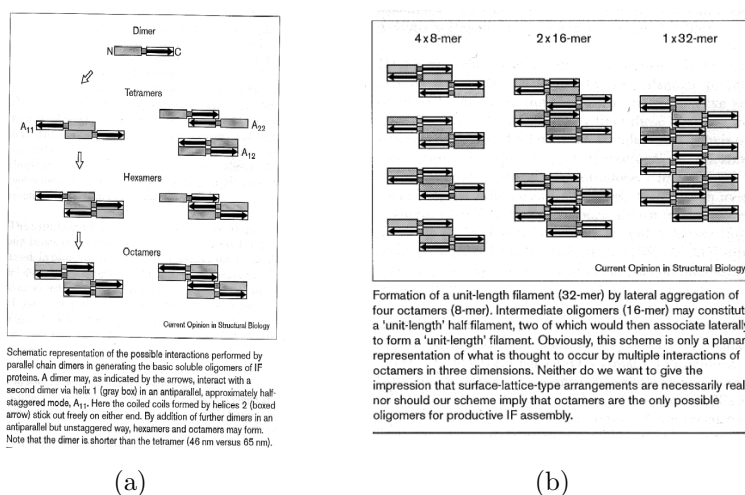


FIG. 5.1 *Sous-unités du pool soluble et du pool insoluble. (a) représente les assemblages possibles des dimères de filaments intermédiaires dont celui donnant des tétramères (sous-unités du pool soluble). (b) décrit l'assemblage des ULF (sous-unités du pool insoluble). Ce schéma est tiré de l'article de Herrmann et Aebi [39]*

Dans un premier temps, le processus de synthèse est contrôlé par des concentrations limites. L'activation et l'inactivation de la synthèse est dirigée par le niveau de concentration en tétramères dans la cellule. Les *sources de synthèse* (régions d'oligomérisation en tétramères) sont associées aux régions de contraintes. Par conséquent, l'activation

d'une source est dépendante de l'instant d'activation de la contrainte s'y appliquant. De plus, l'intensité de la synthèse à une source dépend de l'intensité de la contrainte s'y appliquant. La synthèse des protéines est également modulée par la distance séparant la source de la région périnucléaire. Plus précisément, il a été supposé que la vitesse de convergence du processus de synthèse à son intensité maximale est inversement proportionnelle à la distance la séparant de la région périnucléaire.

Une fois constitué le pool soluble se propage à travers le cytoplasme à partir des sources de synthèse (ou régions de contrainte) selon un processus de *diffusion*. A l'instant initial T_0 , il est supposé que la cellule fille ne possède pas de réseau de cytokératine, celui-ci s'étant désassemblé lors de la mitose dans la cellule mère [31, 64, 101]. Le cytoplasme est considéré comme un fluide visqueux, incompressible et Newtonien (*i.e.*, à viscosité et densité constantes). De plus les cytokératines sont des protéines cytoplasmiques, ce qui veut dire que la synthèse ainsi que la diffusion du pool soluble sont confinées au compartiment du cytoplasme. Par conséquent, lors de la diffusion aucun flux transmembranaire ne peut avoir lieu.

En conclusion, l'évolution du pool soluble est régie par deux processus, un processus de synthèse et un processus de diffusion. Les champs de concentration de pool soluble, résultant de la synthèse et de la diffusion, peuvent être conceptualisés comme l'expression des champs de force intracellulaires engendrés par l'environnement mécanique intra/extracellulaire.

Les sous-unités du pool soluble sont les précurseurs, les briques de construction des filaments de cytokératine [38]. Huit tétramères s'apparient latéralement pour former une entité que l'on nomme filament de longueur unitaire (unit-length filament), *ULF* [39] (Fig. 5.1(b)). Les *ULF* sont les sous-unités des filaments, les sous-unités du *pool insoluble* (le pool des filaments). Ces sous-unités de filament s'associent longitudinalement (bout à bout) pour donner des filaments intermédiaires de 10nm de diamètre et de longueur variable [40, 41].



Dans notre modèle, il est supposé que les tétramères forment instantanément des *ULF*; par conséquent seul l'assemblage longitudinal des *ULF*, à partir des points d'initiation ou en tête de filaments, est décrit. La première étape de la construction des filaments consiste en l'*initiation de filaments*.

Simultanément à la diffusion du pool soluble, des filaments sont initiés en des sites selon leur susceptibilité. La susceptibilité d'une position intracellulaire évalue sa potentialité à initier un filament. La *susceptibilité d'initiation de filament* d'une position spatiale dépend de son niveau de concentration en pool soluble et du fait que cette position soit ou non déjà occupée par un filament. Si la concentration en pool soluble à une position donnée est inférieure à la concentration minimale (correspondant à 8 tétramères) qui est nécessaire à la constitution d'un *ULF*, alors l'initiation de filament ne peut pas avoir lieu à cette position. De la même manière, l'initiation de filament, à une position, n'est pas possible si celle-ci a déjà été traversée par un filament. L'initiation effective

d'un filament à une position est liée à la comparaison de sa susceptibilité à un critère spécifiant les régions prioritaires d'initiation. Lorsqu'un filament a effectivement été initié à une position, une proportion de pool soluble, correspondant à la concentration nécessaire à la constitution d'un *ULF*, est consommée.

La seconde étape du processus de construction des filaments est l'*assemblage longitudinal* (ou polymérisation des filaments) des *ULF* à la tête des filaments à partir de leurs points d'initiation. Le développement des filaments procède par une *croissance apicale*: les filaments croissent à partir de leurs parties terminales que l'on appelle têtes de filament. La formation du réseau de cytokératine résulte d'un phénomène d'anastosome entre les filaments, la polymérisation des filaments n'est pas un processus de branchement. L'anastosome est la jonction entre la tête d'un filament et le corps d'un autre filament ou entre deux têtes de filaments. Ces connexions ne sont pas décrites dans le modèle, elles sont attendues comme un comportement émergent.

L'assemblage longitudinal des *ULF* est dirigé à la fois par les champs de concentration de pool soluble et par le comportement morphologique des filaments eux-mêmes (ou mémoire de forme). Autrement dit, la croissance d'un filament est conjointement gouvernée par son environnement (facteur exogène) et par son état interne (facteur endogène).

Les champs de concentration de pool soluble reflètent les champs de force présents dans le domaine intracellulaire. Comme le réseau de cytokératine maintient l'intégrité cellulaire en luttant contre l'environnement mécanique extracellulaire, la croissance des filaments est partiellement contrôlée par les *gradients de concentration* dont les orientations sont la représentation des lignes de forces intracellulaires. Cette contribution de l'environnement inclut également un processus aléatoire qui modélise l'*agitation moléculaire*.

Un filament qui ondule ne peut pas soudainement adopter un comportement totalement rectiligne. La mémoire de forme des filaments, qui enregistre l'histoire du *comportement morphologique des filaments*, dirige également la pousse des filaments. Selon les situations, le contrôle de la pousse des filaments alterne entre un contrôle environnemental et un contrôle par les filaments eux-mêmes, ou les deux types de contrôle s'expriment conjointement. Un filament arrête de pousser lorsque sa tête atteint la membrane cellulaire. Lors de l'addition d'un *ULF* à la tête d'un filament, une proportion de pool soluble nécessaire à la constitution d'un *ULF* est consommée à la position de la pousse.

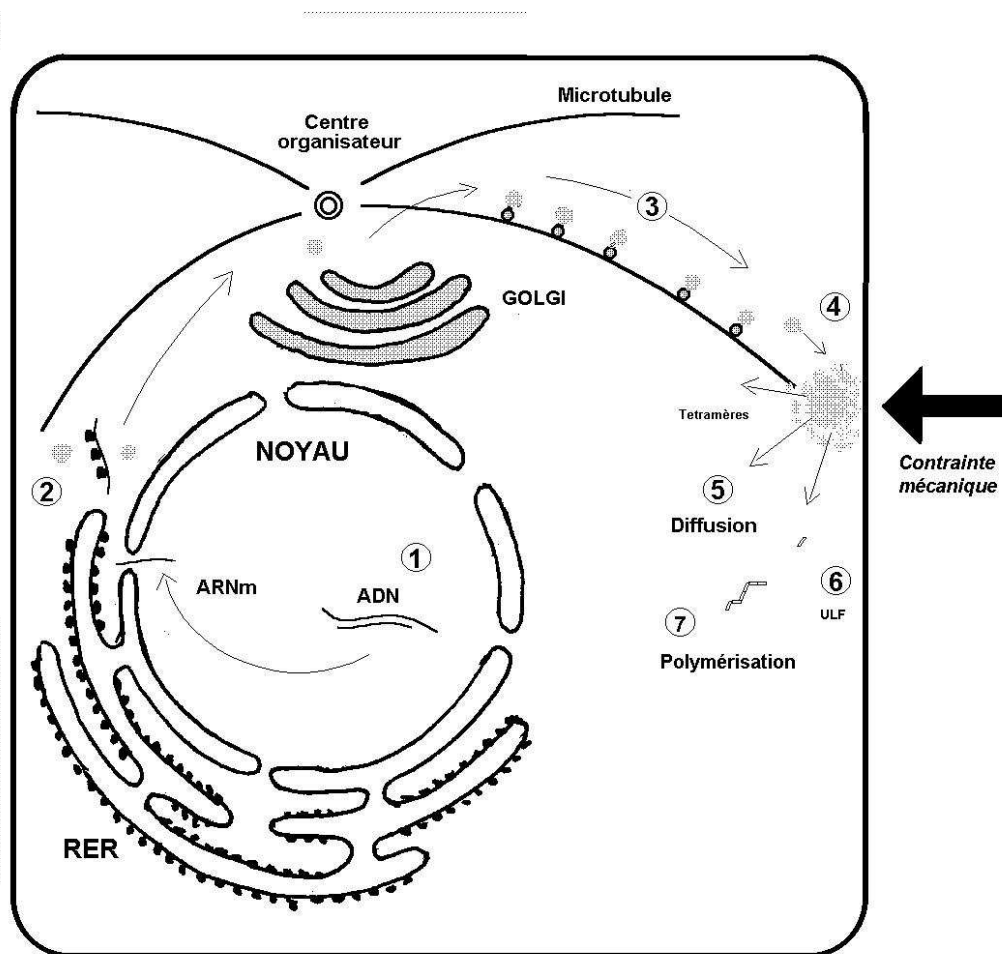


FIG. 5.2 *Modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine. L'application d'une contrainte mécanique active une synthèse de protéines en région périnucléaire: (1) Transcription, (2) Traduction. Les protéines sont ensuite transportées le long des réseaux de microtubules jusqu'aux régions de contraintes mécaniques (3). (4) représente l'oligomérisation des protéines en tétramères et leur libération dans le cytoplasme. Les tétramères sont alors soumises à un processus de diffusion à travers le cytoplasme selon la loi de Fick (5). Les tétramères s'assemblent latéralement pour former des ULF (sous-unités du pool insoluble) (6). Pour finir, la polymérisation des filaments (7) est réalisée par assemblage longitudinal d'ULF.*

En résumé, le modèle proposé dirige simultanément deux processus agissant dans la cellule (l'environnement mécanique extracellulaire et ses effets sur le domaine intracellulaire, et la construction du réseau cytosquelettique), et repose sur plusieurs hypothèses:

Régulation de la synthèse protéique: l'action d'une contrainte (force) régule la synthèse protéique: une synthèse des protéines est initiée lors de l'application d'une contrainte à la cellule (processus de renforcement).

Contrôle de la synthèse protéique: la synthèse des protéines est activée ou inactivée selon les niveaux de concentrations limites.

Diffusion moléculaire dans le cytoplasme: les éléments du pool soluble se propagent à partir des sources de synthèse à travers le cytoplasme selon la loi de Fick.

Pas de flux transmembranaire: les éléments du pool soluble sont confinés au cytoplasme.

Condition de la polymérisation: la polymérisation des filaments est soumise à une condition de concentration minimale en pool soluble permettant la constitution d'une sous-unité de filament, d'un *ULF*.

Formation apicale: la polymérisation des filaments de cytokératine se restreint à la tête des filaments.

Contrôle conjoint de la polymérisation: la polymérisation des filaments est simultanément dirigée par l'environnement et par les filaments eux-mêmes.

Arrêt de la polymérisation: la condition d'arrêt de la polymérisation d'un filament est que le filament atteigne la membrane cellulaire (son ancrage à la membrane cellulaire).

La gestion du pool soluble reflétant l'environnement mécanique, et la construction du réseau cytosquelettique (Fig. 5.2) sont modélisés par deux processus différents qui sont couplés. L'environnement module la formation des filaments et réciproquement la croissance des filaments altère l'environnement par la consommation de pool soluble.

5.2 Domaine cellule et ses composants

Une *cellule épithéliale* est représentée par un ensemble convexe $\Omega \subset \mathbb{R}^3$, appelé le domaine cellule, contenant un sous-ensemble N ouvert et convexe modélisant le *noyau* ($N \subset \Omega$).

La *membrane cellulaire* $\partial\Omega$ est représentée comme la frontière du domaine cellule Ω et l'*enveloppe nucléaire* ∂N est définie comme la frontière du domaine noyau N . Un sous-ensemble P non connexe de l'enveloppe nucléaire ∂N représente la *région périnucléaire*.

Les *desmosomes* (jonctions cellule-cellule) et les *hémidesmosomes* (jonctions cellule-matrice extracellulaire) sont définis comme deux sous-ensembles (respectivement D et H) non connexes de la membrane cellulaire $\partial\Omega$.

Le *cytoplasme* est un sous-ensemble Θ non simplement connexe, donc non convexe du domaine cellule Ω , défini comme $\Theta = \Omega \setminus N$. La frontière $\partial\Theta$ du domaine cytoplasme Θ correspond à l'union de la membrane cellulaire $\partial\Omega$ et de l'enveloppe nucléaire ∂N ($\partial\Theta = \partial\Omega \cup \partial N$). Le domaine cytoplasme Θ est supposé rempli d'un milieu homogène (incompressible et newtonien, densité et viscosité constante), simulant le gel cytoplasmique.

Ces différents ensembles, de même que leurs propriétés topologiques, sont récapitulés dans le Tableau 5.1.

| | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Cellule | Ω | Convexe |
| Noyau | $N \subset \Omega$ | Ouvert, convexe |
| Cytoplasme | $\Theta = \Omega \setminus N$ | Non simplement connexe, non convexe |
| Membrane cellulaire | $\partial\Omega$ | |
| Enveloppe nucléaire | $\partial N = \bar{N} \setminus N$ | |
| Région périnucléaire | $P \subset \partial N$ | Non connexe |
| Desmosomes | $D \subset \partial\Omega$ | Non connexe |
| Hémidesmosomes | $H \subset \partial\Omega$ | Non connexe |

TAB. 5.1 *Domaine cellule et ses composants. Les différents domaines définis dans le modèle de cellule épithéliale et leurs propriétés topologiques.*

Les définitions, dans le cas discret, de la connexité et de la convexité, qui sont généralisables au cas continu, sont données dans le chapitre suivant à la page 125. Seule la définition d'un ensemble non simplement connexe est donnée ci-dessous.

Définition 5.2.1 *Un ensemble est dit non simplement connexe s'il est non homotopique à un point, c'est à dire que l'ensemble a un trou.*

Le modèle s'intéressant uniquement aux réseaux cytosquelettiques cytoplasmiques, notre domaine de travail effectif se restreint au domaine cytoplasme Θ .

5.3 Equations du modèle

Le modèle dirige simultanément deux processus, l'environnement mécanique intracellulaire et ses effets sur le domaine extracellulaire, et l'établissement du réseau de cytokératine. Chaque processus est associé à la dynamique d'un des pools précédemment défini (le pool soluble et le pool insoluble). La dynamique du pool soluble représente le comportement de l'environnement mécanique extracellulaire et ses répercussions sur le domaine intracellulaire. La dynamique du pool insoluble gouverne la construction des filaments et l'établissement du réseau de cytokératine. Ces deux processus sont modélisés par un système d'équations intégrées-différentielles de type réaction-diffusion.

Avant de procéder à la formulation du modèle, nous faisons une hypothèse simplificatrice concernant le domaine temporel. Dans la Section 5.1, nous avons défini ce dernier comme étant $[T_0, T_0 + T_{max}]$. Cet intervalle de temps représente la durée de doublement d'une cellule, entre la fin de la cytotérièse et sa division. Dans toute la suite de ce chapitre, nous supposons que $T_0 = 0$, et travaillons ainsi dans le domaine temporel $[0, T_{max}]$, que nous notons $[T_0, T_{max}]$ pour éviter toutes confusions.

Notation 5.3.1 *Le modèle utilise deux variables d'état, définies sur le produit du domaine spatial Ω par le domaine temporel $[T_0, T_{max}]$:*

- la variable d'état $C(X, t)$ représente la densité de pool soluble au point $X \in \Omega$ au temps t , également appelée concentration en pool soluble et définie comme le nombre de tétramères (sous-unités de pool soluble) par unité de volume.

$$C : \Omega \times [T_0, T_{max}] \subset \mathbb{R}^4 \rightarrow \mathbb{R}^+$$

- la variable d'état $X_\beta(t)$ représente la position, au temps t , de la tête du filament initié au point $\beta \in \Omega$ et à un instant $d_i(\beta) \leq t$.

La fonction $d_i(\cdot)$ attribuée à chaque filament son instant d'initiation, elle est définie plus en détail à la page 112.

Remarque – La variable d'état $C(X, t)$ est liée à la description du pool soluble alors que la variable d'état $X_\beta(t)$ décrit le pool insoluble.

Le modèle d'établissement du réseau de cytokératine en fonction des conditions mécaniques extracellulaires s'énonce alors de la manière suivante, sur le domaine $\Omega \times [T_0, T_{max}]$:

$$\frac{\partial C(X,t)}{\partial t} = D\left(\Delta_X C\right)(X,t) + \mathcal{F}(X,t) - \sigma_{min} \mathbb{1}_{\mathcal{B}(t) \cup \rho(t)}(X) \quad (5.1)$$

sous la condition initiale

$$\forall X \in \Omega, C(X, T_0) = \Gamma(X) \quad (5.2)$$

et la condition aux limites

$$\frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial\Theta} = 0 \quad (5.3)$$

ET

$$\frac{dX_\beta(t)}{dt} = \begin{cases} \mathcal{E}(X_\beta(t), t) \left[\frac{\left(\nabla_X C\right)(X_\beta(t), t) + \left\| \left(\nabla_X C\right)(X_\beta(t), t) \right\| v}{\left\| \left(\nabla_X C\right)(X_\beta(t), t) \right\| + \epsilon} \right. \\ \left. + \frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)} \frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon} \right] & \forall \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t) \\ 0 & \forall \beta \in \mathcal{I}_b(t) \end{cases} \quad (5.4)$$

sous la condition initiale

$$X_\beta(d_i(\beta)) = \beta \quad (5.5)$$

L'équation (5.1) rend compte de l'environnement mécanique et de ses effets sur le domaine intracellulaire. L'équation (5.4) gouverne la construction des filaments de cytokératine qui a lieu par assemblage longitudinal d'*ULF*.

Détaillons maintenant les différents termes intervenant dans la description de ces deux mécanismes. L'équation (5.1) décrit l'évolution au cours du temps de la densité de pool soluble à une position spatiale (terme de gauche de l'équation). La dynamique du pool soluble dépend de la conjonction de trois processus: la *synthèse* de pool soluble, la *diffusion* du pool soluble selon un coefficient de diffusion D et enfin la *consommation* de pool soluble due à une initiation ou à une pousse de filament.

$$\begin{aligned} \frac{\partial C(X,t)}{\partial t} = & \underbrace{D(\Delta_X C)(X,t)}_{\text{diffusion protéique}} + \underbrace{\mathcal{F}(X,t)}_{\text{synthèse protéique}} \\ & - \underbrace{\left(\underbrace{\sigma_{min} \mathbb{1}_{\mathcal{B}(t)}(X)}_{\text{initiation}} + \underbrace{\sigma_{min} \mathbb{1}_{\rho(t)}(X)}_{\text{assemblage longitudinal}} \right)}_{\text{consommation de pool soluble}} \end{aligned} \quad (5.6)$$

avec la condition initiale

$$\forall X \in \Omega, C(X, T_0) = \Gamma(X) \quad (5.7)$$

qui suppose qu'au temps initial du processus, la cellule (c'est à dire le cytoplasme) contienne un pool de cytokératine libre distribué selon $\Gamma(\cdot)$. De plus, l'équation (5.6) doit être complétée par des conditions aux limites. Ces conditions aux limites traduisent le fait que la cytokératine est confinée au cytoplasme. Aucun flux transmembranaire n'est permis. Cette condition est traduite par les conditions aux limites de Neuman.

$$\frac{\partial C}{\partial n}|_{\partial\Omega} = 0 \quad (5.8)$$

La constante σ_{min} correspond à la concentration de pool soluble nécessaire à la constitution d'un *ULF*. L'équation (5.6) utilise dans son terme de consommation deux ensembles, $\mathcal{B}(t)$ et $\rho(t)$. Ces deux ensembles, que nous définissons dès à présent, assurent le couplage entre le pool soluble et le pool insoluble.

Définition 5.3.1 *L'ensemble $\mathcal{B}(t)$ est l'ensemble des conditions initiales des solutions (filaments) initiées au temps t , il est défini de la manière suivante:*

$$\mathcal{B}(t) = \{\beta : \mathcal{R}(\beta)(t) = 1\}$$

La fonction $\mathcal{R}(\beta)(t)$ détermine le recrutement des nouveaux points d'initiation de filament, elle est explicitée dans la Section 5.6.

Autrement dit, $\mathcal{B}(t)$ est l'ensemble des points β où un filament est initié au temps t .

Définition 5.3.2 *L'ensemble $\rho(t)$ est l'ensemble des têtes de filaments de conditions initiales β qui ont effectivement poussé au temps t .*

$$\rho(t) = \{X_\beta(t) : \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t), \frac{\partial X_\beta}{\partial t}|_t \neq 0\}$$

Les équations (5.6–5.8) dirigent la dynamique du pool soluble de cytokératine, elles génèrent des champs scalaires de concentrations de pool soluble.

L'équation (5.4) dirige la pousse des filaments de cytokératine qui a lieu par assemblage longitudinal d'*ULF* à la tête des filaments. La position, au temps t , de la tête du filament initié à la position spatiale β quelque temps avant est donnée par $X_\beta(t)$. La dynamique du filament initié au point β dépend du fait que ce filament ait atteint ou non la membrane cellulaire $\partial\Omega$. Lorsque la tête du filament est située dans le cytoplasme, cette condition se traduit par $\beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t)$, alors la pousse du filament est dirigée par la première équation du système (5.4).

Définition 5.3.3 *L'ensemble $\mathcal{I}(t)$ est l'ensemble des conditions initiales des solutions (filaments) initiées avant l'instant t , il est défini de la manière suivante:*

$$\mathcal{I}(t) = \{\beta : \mathcal{R}(\beta)(s) = 1, \text{ pour un } s, s < t\}$$

Définition 5.3.4 L'ensemble $\mathcal{I}_b(t)$ est l'ensemble des conditions initiales des solutions initiées avant l'instant t et ayant atteint la membrane cellulaire quelque temps avant l'instant t

$$\mathcal{I}_b(t) = \{\beta \in \mathcal{I}(t) : X_\beta(s) \in \partial\Omega, \text{ pour un } s, s \leq t\}$$

La première équation du système (5.4) est constituée de deux parties.

La première partie $\mathcal{E}(X_\beta(t), t)$ représente la *potentialité de l'environnement* à construire une sous-unité de filament (*ULF*). Si l'environnement ne contient pas suffisamment de matière première aux environs de la tête du filament, la pousse n'aura pas lieu.

La seconde partie, qui détermine la direction et l'amplitude de la pousse du filament, est composée d'une *contribution de l'environnement* et d'une *contribution du filament*.

$$\frac{dX_\beta}{dt} = \underbrace{\mathcal{E}(X_\beta(t), t)}_{\text{potentialité}} \left[\underbrace{\frac{\left(\nabla_X C \right) (X_\beta(t), t) + \left\| \left(\nabla_X C \right) (X_\beta(t), t) \right\| v}{\left\| \left(\nabla_X C \right) (X_\beta(t), t) \right\| + \epsilon}}_{\text{contribution de l'environnement}} + \underbrace{\frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)} \frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon}}_{\text{contribution du filament}} \right] \quad (5.9)$$

où ϵ est une constante définie telle que $0 < \epsilon \ll 1$ et $d_i(\beta)$ qui est décrit plus en détail dans la Section 5.7, représente l'instant d'initiation du filament de condition initiale β . v est un vecteur aléatoire tridimensionnel qui modélise l'agitation moléculaire et la fonction $\kappa(\cdot)$ représente la courbure du filament.

Le filament adopte un comportement stationnaire, lorsque la tête d'un filament atteint la membrane cellulaire $\partial\Omega$. Cette situation est traduite par $\beta \in \mathcal{I}_b(t)$.

$$\frac{dX_\beta}{dt} = 0 \quad (5.10)$$

Les équations (5.9) et (5.10) dirigent la construction des filaments par un assemblage longitudinal d'*ULF* ayant lieu en région apicale des filaments (têtes des filaments).

Toutes les fonctions et les ensembles utilisés dans la définition du modèle sont repris dans le Tableau 5.2. Les paramètres utilisés dans le modèle sont énumérés dans le Tableau 5.3.

Dans les Sections suivantes, les différents termes composant les équations (5.6–5.10) sont explicités.

5.4 Synthèse protéique

Les conditions mécaniques environnementales régulent la synthèse protéique. Il est supposé que l'action d'une contrainte (force) active la synthèse protéique.

| | | |
|---------------------|--|----------|
| $C(X,t)$ | Densité de pool soluble au point X au temps t | page 95 |
| $\Gamma(X)$ | Densité de pool soluble au point X à l'instant initial T_0 | page 107 |
| $\mathcal{F}(X,t)$ | Fonction de synthèse de protéines au point X au temps t | page 101 |
| $\phi(X,t)$ | Nature de la synthèse de protéine au point X au temps t | page 101 |
| $\varphi(X)$ | Intensité de la synthèse de protéine au point X | page 102 |
| $T(X)$ | Instant d'activation des contraintes au point X | page 103 |
| $d(X,N)$ | Distance entre le point X et le noyau N | page 104 |
| $\chi(t)$ | Contrôle de la synthèse de protéine au temps t | page 104 |
| $\mathcal{Q}(t)$ | Quantité totale de CK synthétisée depuis l'instant initial T_0 jusqu'au temps t | page 106 |
| $\mathcal{C}(t)$ | Consommation totale de pool soluble depuis l'instant initial T_0 jusqu'au temps t | page 106 |
| $X_\beta(\cdot)$ | Filament initié en β | page 112 |
| $X_\beta(t)$ | Tête, au temps t , du filament initié en β | page 113 |
| $\lambda(X,t)$ | Susceptibilité d'initiation de filament du point X au temps t | page 109 |
| $\mathcal{S}(t)$ | Union de tous les filaments au temps t | page 108 |
| $p(\cdot)$ | Fonction seuil | page 109 |
| $\mathcal{R}(X)(t)$ | Fonction de recrutement pour l'initiation de filament au point X au temps t | page 109 |
| $\mathcal{B}(t)$ | Ensemble des conditions initiales des solutions initiées au temps t | page 97 |
| $\mathcal{I}(t)$ | Ensemble des conditions initiales des solutions initiées avant le temps t | page 97 |
| $\mathcal{I}_b(t)$ | Ensemble des conditions initiales des solutions initiées avant le temps t et ayant atteint la membrane cellulaire quelque temps avant le temps t | page 98 |
| $d_i(\beta)$ | Instant d'initiation du filament de condition initiale β | page 112 |
| $d_b(\beta)$ | Instant de terminaison du filament de condition initiale β | page 112 |
| $\mathcal{E}(X,t)$ | Potentialité de l'environnement au point X et au temps t | page 113 |
| $\kappa(X)$ | Courbure du filament au point X | page 117 |
| $\rho(t)$ | Ensemble des nouvelles têtes qui ont effectivement poussé au temps t | page 97 |
| v | Vecteur de contribution aléatoire résultant de l'agitation des filaments | page 114 |

TAB. 5.2 *Ensembles et fonctions utilisés dans le modèle. La colonne de droite référence le numéro de page à laquelle l'élément est défini.*

| | |
|----------------|---|
| l | Longueur d'arête du domaine cellule Ω |
| D | Coefficient de diffusion du pool soluble à travers le cytoplasme |
| σ_{min} | Concentration minimale de pool soluble nécessaire à la constitution d'un <i>ULF</i> |
| \bar{C} | Concentration maximale de cytokératine dans une cellule |
| η | Ratio de pool soluble par rapport à la cytokératine totale |
| π | Fraction de la concentration maximale \bar{C} utilisée pour initier la dynamique |
| t_p | Instant d'activation du champ centripète actif dans la région périnucléaire |
| t_h | Instant d'activation des contraintes s'exerçant aux zones d'hémidesmosome |
| t_d | Instant d'activation des contraintes s'exerçant aux zones de desmosome |
| φ_p | Intensité de la synthèse de protéines des sources appartenant à la région périnucléaire |
| φ_h | Intensité de la synthèse de protéines des sources appartenant aux régions d'hémidesmosome |
| φ_d | Intensité de la synthèse de protéines des sources appartenant aux régions de desmosome |
| $p(\cdot)$ | Fonction seuil |
| $\ v\ $ | Intensité de la contribution aléatoire résultant de l'agitation moléculaire |

TAB. 5.3 Paramètres utilisés dans le modèle.

Dans notre modèle, trois contraintes différentes sont prises en compte:

- les forces de cohésion, préservant l'intégrité du noyau, qui s'appliquent dans la région périnucléaire (P) et forment un champ de force autour du noyau,
- les contraintes s'exerçant sur les jonctions adhérentes cellule-matrice extracellulaire, les hémidesmosomes (H),
- les contraintes s'exerçant sur les jonctions adhérentes cellule-cellule, les desmosomes (D).

La première étape de l'édification du réseau de cytokératine est la synthèse du pool soluble, qui est le matériel de construction des filaments. La fonction de synthèse $\mathcal{F}(\cdot)$, qui est un membre de l'équation (5.6), ne décrit pas exactement au sens moléculaire le processus de synthèse protéique, mais englobe une série d'étapes concourantes à ce processus:

- régulation de la synthèse des protéines par les conditions mécaniques extracellulaires, la synthèse (assemblage des protéines) a lieu dans la région périnucléaire,
- migration des protéines le long des réseaux de microtubules ou de filaments d'actine (transport intracellulaire) à partir de la région périnucléaire vers les régions de contrainte,
- oligomérisation des protéines en tétramères et libération des tétramères (constitution du pool soluble) dans le cytoplasme au niveau des régions de contrainte,
- contrôle (activation ou inactivation) de la synthèse des protéines par des concentrations limites.

Ainsi, la fonction de synthèse $\mathcal{F}(\cdot)$ intègre la localisation spatiale de la synthèse, le mode de production et les conditions d'arrêt. Elle est définie $\forall X \in \Omega$ et $\forall t \geq 0$ par:

$$\mathcal{F}(X,t) = \phi(X,t)\chi(t) \quad (5.11)$$

Cette fonction $\mathcal{F}(\cdot)$ est constituée de deux parties: une fonction $\phi(\cdot)$ dépendant de l'espace et du temps, qui représente le mode de synthèse protéique; et une fonction du temps $\chi(\cdot)$, qui contrôle le flux de la synthèse selon les niveaux des concentrations limites.

Plus précisément, $\phi(\cdot)$ dirige le mode de synthèse des protéines, qui varie selon la position spatiale dans la cellule et selon le temps (Fig. 5.4). Elle est définie $\forall X \in \Omega$ et $\forall t \geq 0$ par:

$$\phi(X,t) = \begin{cases} \varphi(X) \left(1 - e^{-\frac{(t-T(X))^2}{d(X,N)}}\right) & \text{si } t > T(X) \text{ et } X \in \Theta \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (5.12)$$

$\phi(\cdot)$ est donc le produit d'une fonction logistique dépendante du temps, ayant des paramètres spatiaux, et d'une fonction constante par ensembles $\varphi(\cdot)$. Détaillons maintenant les différents termes de $\phi(\cdot)$.

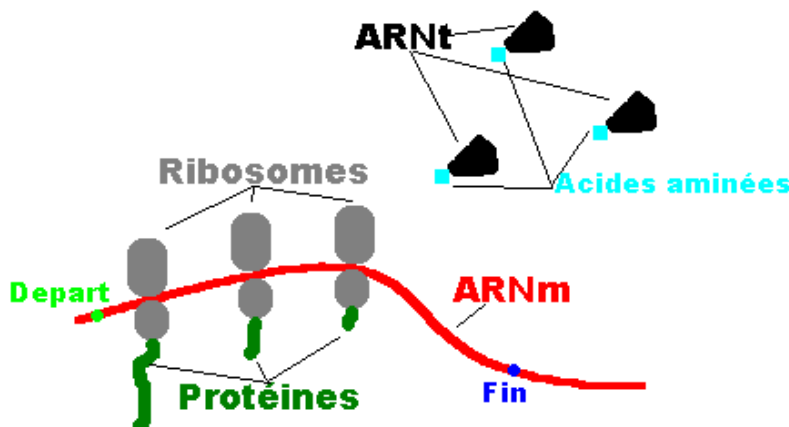


FIG. 5.3 *Processus de synthèse des protéines: assemblage polyribosomal (association de plusieurs ribosomes). Une molécule spécifique d'ARN de transfert (ARNt) est liée à un des 20 acides aminés usuels. Une molécule d'ARN messenger (ARNm), qui est une copie de l'ADN, traverse un ribosome (2 sous-unités) pas à pas de manière à ce que sa séquence nucléotidique soit traduite en une séquence correspondante d'acides aminés, amenés par les ARNt, pour créer une chaîne protéique donnée. La séquence à traduire débute au point "Départ" et se termine au point "Fin".*

- La synthèse $\phi(\cdot)$ à une position spatiale X est définie selon une condition d'appartenance au compartiment cytoplasmique ($X \in \Theta$ or $X \notin \Theta$).

Interprétation – *La synthèse des protéines, qui est réalisée via des polyribosomes libres (Fig. 5.3), est confinée au compartiment cytoplasmique.*

- La fonction $\varphi(\cdot)$ décrit l'activité des sources de synthèse, nommée intensité de la synthèse. La synthèse protéique est régulée par les conditions mécaniques agissant sur la cellule: la synthèse est initiée par l'action d'une contrainte. L'intensité de la fonction de synthèse, représentée par la valeur de la fonction $\varphi(\cdot)$ en un point X , est proportionnelle à l'intensité de la contrainte s'appliquant en ce point. L'intensité de la synthèse est donc d'autant plus importante que l'intensité de la contrainte appliquée est grande. Ceci implique que l'intensité de la synthèse n'est pas homogène en l'espace, puisque les différentes contraintes envisagées n'ont pas la même intensité. Ainsi,

$$\varphi(X) = \begin{cases} \varphi_d & X \in D \\ \varphi_h & X \in H \\ \varphi_p & X \in P \\ 0 & X \notin D \cup H \cup P \end{cases}$$

Les intensités des contraintes n'ont pas été précisément quantifiées, mais un ordre de grandeur est établi entre les trois types de contraintes considérées: les contraintes s'appliquant aux régions de desmosome sont supposées les plus intenses; par contre les contraintes agissant autour du noyau dans la région périnucléaire sont supposées les plus faibles. Par conséquent,

$$\varphi_d > \varphi_h > \varphi_p$$

Ces inégalités reflètent la relation entre l'intensité des contraintes et le flux de synthèse. La valeur de $\varphi(X)$ au point X dépend de la position spatiale de X dans la cellule. L'ensemble $D \cup H \cup P$ (desmosomes, hémidesmosomes et région périnucléaire) des sources de synthèse est défini comme un sous-ensemble du compartiment cytoplasme Θ car la synthèse est confinée au cytoplasme. Si aucune contrainte ne s'applique à un point X du cytoplasme ($X \in \Theta \setminus (D \cup H \cup P)$) alors l'intensité de la synthèse $\varphi(\cdot)$ en ce point est égale à zéro, et le processus de synthèse n'aura jamais lieu en ce point X , soit $\forall t, \mathcal{F}(X,t) = 0$.

Interprétation – *L'intensité de la synthèse de protéines à une position spatiale X est supposée proportionnelle à l'intensité des contraintes s'appliquant à cette position.*

- Les positions spatiales et les instants d’activation des sources de synthèse (zones d’oligomérisation de protéines en tétramères) sont associées aux régions d’application des contraintes agissant sur la cellule et à leurs instants d’activation.

$T(\cdot)$ décrit les instants d’activation des différentes contraintes qui sont supposées agir sur la cellule. $T : \Theta \rightarrow [T_0, T_{max}]$ est définie telle que :

$$T(X) = \begin{cases} t_p & X \in P \\ t_h & X \in H \\ t_d & X \in D \\ T_{max} & X \notin D \cup H \cup P \end{cases}$$

t_p représente l’instant d’activation du champ centripète de force de cohésion, agissant dans la région périnucléaire. Ce champ de force préserve l’intégrité nucléaire. t_p est proche de l’instant T_0 initial du modèle, les forces maintenant l’intégrité du noyau s’appliquant dès la fin de la cytodierèse. L’instant d’activation t_h des contraintes s’appliquant sur les hémidesmosomes, correspond à l’établissement des hémidesmosomes, qui est bien supérieur à T_0 (la cellule est différenciée). Il est supposé que l’instant d’activation t_d des contraintes qui s’appliquent sur les desmosomes a un ordre de grandeur similaire à celui de t_h .

Nous supposons qu’en tout autre emplacement du cytoplasme ($X \notin D \cup H \cup P \Leftrightarrow X \in \Theta \setminus (D \cup H \cup P)$), aucune contrainte ne s’applique. Pour une raison de cohérence des domaines de définition des fonctions $\phi(\cdot)$, $\varphi(\cdot)$ et $T(\cdot)$, cette hypothèse se traduit par l’assignation des instants d’activation, de ces points, à la borne supérieure du domaine temporel.

Ainsi, les instants d’activation des contraintes sont liés par la relation suivante.

$$T_0 \approx t_p \ll t_h \leq t_d$$

Interprétation – *Nous supposons que la synthèse débute uniquement autour du noyau, dans la région périnucléaire, peu de temps après la fin de la cytodierèse. Après un certain temps, la cellule est différenciée, et la synthèse est initiée au niveau des jonctions adhérentes (desmosomes et d’hémidesmosomes).*

- Les protéines sont synthétisées dans la région périnucléaire. Elles sont ensuite transportées à l’aide des moteurs moléculaires le long du réseau de microtubules ou le long du réseau de microfilaments (actine) de la région périnucléaire vers les régions d’action de contrainte. Ce transport a une influence sur la valeur de la fonction de synthèse, influence que nous décrivons de manière indirecte. La distance entre la source de synthèse et la région périnucléaire module la synthèse : plus cette distance est importante, plus la synthèse met du temps à atteindre son intensité maximale. Le terme $d(X, N)$, qui représente la distance entre une position

intracytoplasmique X et le noyau N , définit la pente de la fonction logistique de l'équation (5.12). $1/d(\cdot)$ représente la vitesse de convergence de la synthèse à son intensité maximale en définissant exactement la pente de la fonction logistique. Plus la valeur de $d(\cdot)$ à la position X est petite (proche de 0), plus la pente de la fonction logistique, caractérisant la fonction de synthèse à la source X , est raide.

Interprétation – *La pente de la fonction logistique, qui est inversement proportionnelle à la distance séparant une position intracytoplasmique du noyau, rend compte de l'effet sur la synthèse du processus de transport des protéines de la région périnucléaire vers les sources de synthèse.*

En pratique, $d(\cdot)$ est une pseudo-distance, définie $\forall X \in \Theta$ par:

$$d(X, N) = d_\epsilon(X, N) + \epsilon \quad (5.13)$$

où $d_\epsilon(X, N)$ est la distance euclidienne d'un point X à l'ensemble N et ϵ est une constante définie telle que $0 < \epsilon \ll 1$.

La fonction de synthèse $\mathcal{F}(\cdot)$ est donc modulée par la fonction $\phi(\cdot)$ qui intègre la position spatiale des contraintes, leur instant d'activation ainsi que leur intensité (Fig. 5.4).

De plus, $\mathcal{F}(\cdot)$ prend en compte le contrôle de la synthèse $\chi(\cdot)$ par des concentrations limites. Définissons tout d'abord la fonction seuil $\mathcal{H}(x)$, également appelée fonction d'Heaviside:

$$\mathcal{H}(x) = \begin{cases} 0 & x < 0 \\ 1 & x \geq 0 \end{cases} \quad (5.14)$$

Au moyen d'un jeu de fonctions d'Heaviside, le contrôle de la synthèse $\chi(\cdot)$ est défini $\forall t \geq 0$ par:

$$\chi(t) = \mathcal{H}(\bar{C} - Q(t)) \left[\mathcal{H}(\pi\bar{C} - Q(t)) + \mathcal{H}\left(\frac{1}{1-\eta}C(t) - Q(t)\right) \mathcal{H}(Q(t) - \pi\bar{C}) \right] \quad (5.15)$$

On vérifie aisément que $\chi(\cdot)$ est à valeurs dans $\{0,1\}$, puisque si $\mathcal{H}(\pi\bar{C} - Q(t)) = 1$, alors $\mathcal{H}(Q(t) - \pi\bar{C}) = 0$ et inversement, et donc le terme somme ne peut prendre que les valeurs 0 ou 1. Par conséquent, $\chi(\cdot)$ est une fonction à valeurs booléennes, qui va agir comme un "interrupteur" de la synthèse. Ce contrôle de la synthèse repose sur un certain nombre de paramètres que nous explicitons à présent.

La constante \bar{C} représente la concentration maximale de cytokératine (pools soluble et insoluble) dans une cellule. La constante η est la fraction de pool soluble dans une cellule:

$$\eta = \frac{\mu g \text{ total de CK soluble}}{\mu g \text{ total de CK dans une cellule}}$$

Dans la littérature, η est souvent estimée à 0.05 [15]. Pour finir, la constante $\pi \in [0,1]$ est un paramètre utilisé pour initier le processus. Une fraction π de la concentration maximale \bar{C} est injectée dans le cytoplasme afin d'initier la dynamique. Les fonctions

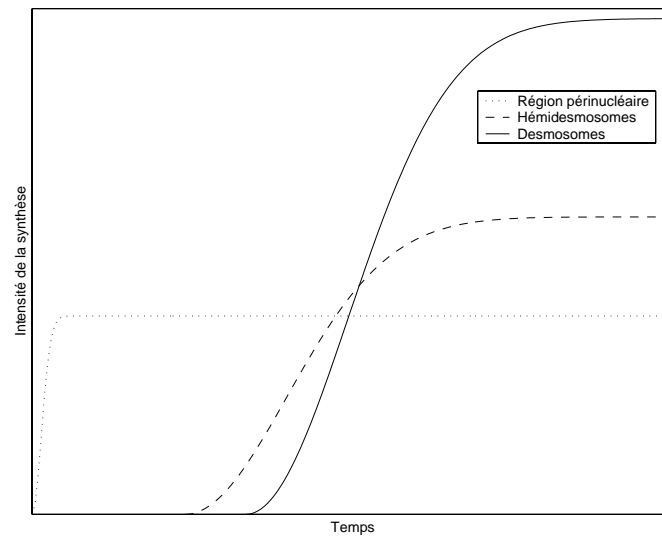


FIG. 5.4 Représentation graphique de $\phi(\cdot)$, le mode de synthèse des protéines, comme une fonction du temps selon les localisations spatiales dans la cellule: région périnucléaire, hémidesmosomes, et desmosomes. Le mode de synthèse varie selon les positions spatiales en terme d'instant d'activation, de vitesse de convergence à l'intensité maximale, et d'intensité maximale. L'activation de la synthèse en une position dépend de l'instant d'activation de la contrainte s'appliquant en cette position. La vitesse de convergence de la synthèse à son intensité maximale, en un point, est dirigée par $1/d(\cdot)$ qui est l'inverse de la distance de ce point au noyau. L'intensité maximale de la synthèse en un point est associée à l'intensité de la contrainte s'appliquant en ce point. Pour toutes les autres positions spatiales non spécifiques, la synthèse est toujours égale à zéro.

d'Heaviside $\mathcal{H}(\cdot)$ jouent comme nous l'avons mentionné, un rôle d'interrupteur de la synthèse selon le niveau des différents pools de cytokératine dans la cellule. Les différents termes de $\chi(\cdot)$ interviennent selon les principes que nous exposons maintenant.

- Il est supposé qu'une quantité de tétramères (égale à la fraction π de la concentration limite \bar{C}) peut être synthétisée, via $\phi(\cdot)$, avant tout autre type de contrôle afin d'initier la dynamique. Le processus de synthèse est alors activé via l'expression suivante qui est un terme de l'équation (5.15) contrôlant la synthèse:

$$\mathcal{H}(\pi\bar{C} - Q(t)) \quad (5.16)$$

La fonction $Q(t)$ décrit la quantité totale de cytokératine dans la cellule au temps t : il s'agit des cytokératines qui étaient déjà présentes dans la cellule à l'instant initial T_0 du modèle ou qui ont été produites entre T_0 et l'instant t .

$$Q(t) = \int_{\Omega} \Gamma(u) \int_{T_0}^t \phi(u,v) dv du \quad (5.17)$$

La fonction $\Gamma(\cdot)$ représente la distribution initiale (5.7) des densités de pool soluble dans la cellule à l'instant T_0 . Autrement dit, $Q(t)$ décrit le bilan des pools soluble et insoluble au temps t .

- Lorsque le pool soluble de cytokératine atteint une concentration critique dans le cytoplasme, la synthèse protéique est arrêtée [34]. Au temps t , la synthèse est permise tant que la quantité $Q(t)$, définie par (5.17), est inférieure à la concentration limite \bar{C} . Cette hypothèse est modélisée par le premier terme du membre droit de l'équation (5.15).

$$\mathcal{H}(\bar{C} - Q(t))$$

- D'après la littérature [15], le pool soluble représente au moins une fraction η de la cytokératine totale dans la cellule, ce qui s'exprime $\frac{Q(t) - \mathcal{C}(t)}{Q(t)} \geq \eta$. Par le biais de la fonction d'Heaviside, cette condition s'écrit:

$$\mathcal{H}\left(\frac{1}{1-\eta}\mathcal{C}(t) - Q(t)\right) > 0 \quad (5.18)$$

La fonction $\mathcal{C}(t)$ représente la consommation totale de pool soluble depuis l'instant initial T_0 jusqu'au temps t . Cette consommation résulte de l'assemblage latéral des tétramères en *ULF*, ayant lieu au moment de l'initiation des filaments et au moment de l'assemblage longitudinal des *ULF* en filaments afin de construire le réseau de cytokératine [40]. Autrement dit, la fonction $\mathcal{C}(t)$ peut être considérée comme la quantité totale de pool insoluble au temps t dans le domaine cellule Ω .

$$\mathcal{C}(t) = \int_{T_0}^t \sigma_{min} \int_{\Omega} \mathbb{1}_{\rho(s) \cup \mathcal{B}(s)}(\iota) d\iota ds \quad (5.19)$$

Le contrôle par le ratio de pool soluble par rapport à la cytokératine totale, défini dans l'inéquation (5.18), est uniquement initié après la phase d'activation du processus de synthèse. Ce contrôle retardé est défini par la combinaison de (5.18) et de l'expression $\mathcal{H}(Q(t) - \pi\bar{C})$ qui est la contraposée de l'équation (5.16).

Pour résumer, la fonction de synthèse, qui est définie par l'équation (5.11), contrôlée et modulée respectivement par les fonctions χ et ϕ , génère le pool soluble qui est constitué d'éléments tétramériques.

5.5 Diffusion protéique

La propagation dans le cytoplasme des sous-unités de pool soluble produites lors de la phase de synthèse protéique est conceptualisée comme un transport de matière par diffusion moléculaire dans un milieu: diffusion d'une solution (tétramères) dans un solvant (cytoplasme). Les tétramères se propagent dans le cytoplasme à partir des zones de haute densité vers des zones de faible densité selon la loi de Fick [68]. Afin de générer cette propagation dans le domaine cellule Ω et dans le domaine temporel $[T_0, T_{max}]$, un modèle de diffusion est utilisé.

$$\begin{aligned} \frac{\partial C(X,t)}{\partial t} &= D \left(\Delta_X C \right) (X,t) + \mathcal{F}(X,t) \\ &= D \left(\frac{\partial^2 C(X,t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(X,t)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C(X,t)}{\partial z^2} \right) + \mathcal{F}(X,t) \end{aligned} \quad (5.20)$$

où la fonction $C : \Omega \times \mathbb{R}^+ \rightarrow \mathbb{R}$, représente la densité de sous-unités de cytokératine libre (pool soluble), $X = (x,y,z)$ est une position spatiale du domaine cellule Ω et D est le coefficient de diffusion des sous-unités de pool soluble dans le cytoplasme. Enfin \mathcal{F} représente le terme de synthèse (le terme source) du modèle de diffusion, défini par l'équation (Eq.5.11). La viscosité du cytoplasme est supposée constante ce qui implique un coefficient de diffusion D constant.

Le modèle de diffusion, décrit par l'équation (5.20), est considéré avec la condition initiale suivante.

$$C(x,y,z,T_0) = \Gamma(x,y,z) \quad \forall (x,y,z) \in \Omega \quad (5.21)$$

La fonction $\Gamma(\cdot)$ représente la distribution initiale de la concentration de pool soluble dans le compartiment cytoplasme Θ . A l'instant initial T_0 du modèle, il est supposé qu'une cellule possède uniquement un pool soluble, formé d'agrégats non filamenteux, qui provient du désassemblage total du réseau de la cellule mère lors de la mitose [31, 64, 101]. Nous supposons en outre que la concentration en pool soluble dans la cellule est initialement faible, bien inférieure à la concentration $\pi\bar{C}$ dont l'atteinte peut désactiver le processus de synthèse. Ainsi la fonction $\Gamma(\cdot)$ est définie de la façon suivante. $\Gamma : \Omega \subset \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^+$ est telle que:

$$\begin{aligned} \Gamma(X) &= 0 \quad \forall X \in \Omega \setminus \Theta \\ \int_{\Theta} \Gamma(u) du &\ll \pi\bar{C} \end{aligned} \quad (5.22)$$

De plus, le processus de diffusion est soumis aux conditions aux limites suivantes.

$$\frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial\Theta} = 0 \Leftrightarrow \begin{cases} \frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial\Omega} = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial N} = 0 \end{cases} \quad (5.23)$$

Les conditions aux limites de Neumann, définies par l'équation (5.23), confinent la diffusion au cytoplasme. Aucun échange entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire de même qu'entre le cytoplasme et le noyau n'est permis (pas de flux transmembranaires, pas de fuites).

L'équation (5.20), complétée par les conditions initiales et aux limites (5.21) et (5.23), dirige uniquement le processus de propagation des sous-unités de pool soluble dans le cytoplasme. Ce jeu d'équations génère des champs scalaires de concentration de pool soluble. Une densité de pool soluble est assignée à chaque position spatiale X du domaine cellule Ω . Les champs de concentration peuvent être assimilés à la représentation des champs de force intracellulaires engendrés par l'environnement mécanique extracellulaire. Autrement dit, l'environnement mécanique extracellulaire est traduit en terme de champs de concentration en pool soluble. Le pool soluble de sous-unités de cytokératine, précurseurs des filaments, est assimilé à des *morphogènes* pour les structures cytosquelettiques [86]. La construction du réseau de cytokératine repose sur ces champs de concentration de tétramères.

5.6 Initiation de filaments

La construction du réseau de cytokératine débute par une phase d'initiation de filaments, qui est la première étape du processus de formation des filaments. Les positions intracellulaires sont évaluées afin de déterminer leur susceptibilité à initier des filaments. La susceptibilité d'initiation de filament à une position spatiale dépend du fait que la position soit déjà occupée ou non par un filament et du niveau de concentration $C(\cdot)$ de pool soluble en cette position. Par la suite, cette susceptibilité est soumise à un critère de stratégie d'initiation par le biais d'une fonction de recrutement, afin de décider de l'initiation effective d'un filament en cette position spatiale.

La *susceptibilité* $\lambda(\beta, t)$ *d'initiation de filament* d'une position intracellulaire β au temps t , correspond à sa capacité à initier un filament. Cette capacité, ce potentiel dépend en premier lieu de l'état d'occupation de la position β . Il est nécessaire en effet que cette dernière ne soit pas, au temps t , déjà traversée par un filament. Par ailleurs, le potentiel d'une position spatiale β dépend également d'un critère de concentration minimale en pool soluble, en deçà de laquelle la susceptibilité d'initiation de filament de β est nulle (Fig. 5.5).

Définition 5.6.1 Soit $\mathcal{S}(t)$ l'ensemble constitué de l'union de tous les filaments au temps t , cet ensemble peut alors se définir comme:

$$\mathcal{S}(t) = \bigcup \{X_\beta(s) : \beta \in \mathcal{B}(\sigma), \sigma \leq s \leq t\}$$

La susceptibilité $\lambda(\cdot)$ d'initiation de filament est définie $\forall \beta \in \Omega$ et $\forall t \geq 0$ par:

$$\lambda(\beta, t) = \begin{cases} 0 & \text{si } C(\beta, t) \leq \sigma_{min} \\ \mathbb{1}_{\Omega \setminus \mathcal{S}(t)}(\beta) [1 - e^{-a(C(\beta, t) - \sigma_{min})^2}] & \text{si } C(\beta, t) > \sigma_{min} \end{cases} \quad (5.24)$$

où $a > 0$ est une constante définissant le comportement de la susceptibilité (la pente de la fonction logistique). L'ensemble $\mathcal{S}(t)$ représente l'union de tous les filaments au temps t .

La fonction caractéristique $\mathbb{1}_{\Omega \setminus \mathcal{S}(t)}(\cdot)$ vérifie l'appartenance d'une position spatiale donnée β à l'ensemble $\mathcal{S}(t)$. Si la position β appartient à $\mathcal{S}(t)$, c'est à dire que la position spatiale β est déjà traversée par un filament, alors jamais aucun autre filament ne pourra être initié en β .

Il est supposé que 8 tétramères voisins s'associent spontanément dans un assemblage latéral (Fig. 5.1), formant instantanément un *ULF* [40]. La constante σ_{min} représente la concentration critique de pool soluble, correspondant à 8 tétramères par unité de volume. Ce niveau de concentration est nécessaire à l'assemblage latéral des tétramères en *ULF*. En deçà de ce niveau σ_{min} , ni l'initiation ni l'assemblage longitudinal ne peuvent avoir lieu. L'assemblage latéral des tétramères n'est pas décrit par le modèle, seul l'assemblage longitudinal des *ULF* est explicité, ce qui constitue le sujet de la Section suivante. L'assemblage latéral est uniquement pris en compte dans l'équilibrage du pool soluble.

La fonction de recrutement $\mathcal{R}(\cdot)$ est définie $\forall \beta \in \Omega$ et $\forall t \geq 0$ par:

$$\mathcal{R}(\beta)(t) = \mathcal{H}(\lambda(\beta, t) - p(\beta, t)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \lambda(\beta, t) < p(\beta, t) \text{ (pas d'initiation en } \beta) \\ 1 & \text{si } \lambda(\beta, t) \geq p(\beta, t) \text{ (initiation en } \beta) \end{cases} \quad (5.25)$$

Par le biais d'une fonction d'Heaviside qui est définie par (5.14), $\mathcal{R}(\cdot)$ compare la susceptibilité $\lambda(\beta, t)$ d'une position spatiale β au temps t à une fonction seuil $p(\cdot)$ à valeurs dans $]0, 1]$.

Cette fonction seuil $p(\cdot)$ peut être de nature très variée: une fonction constante ou une fonction dépendant de l'espace. Ces différentes stratégies permettent la spécification ou non de régions d'initiation de filaments. La non spécification de régions d'initiation est donnée par une fonction seuil $p(\cdot)$ constante telle que $\forall (\beta, t), p(\cdot) = b$ avec $b \in]0, 1]$.

La spécification de régions d'initiation est donnée par une fonction dépendant de l'espace, $p(\cdot)$ peut être définie comme une fonction directement ou inversement proportionnelle à la distance séparant une position spatiale β du noyau, $\forall (\beta, t)$ telle que

$$p(\beta, t) = u \times dist(\beta, N) + b$$

pour $u \leq \frac{1}{\max_{Y \in \Omega} [dist(Y, N)]}$ et $0 \leq b \leq 1$, où $dist(\cdot)$ représente une distance discrète. Lorsque le coefficient u est strictement positif, l'initiation des filaments est favorisée autour du noyau dans la région périnucléaire (Fig. 5.6). Par contre, un coefficient u strictement négatif favorise l'initiation des filaments dans le cortex cellulaire (Fig. 5.6).

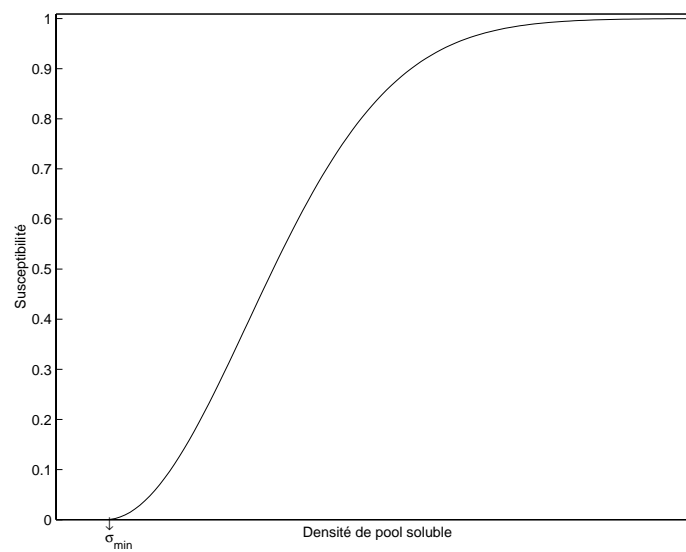


FIG. 5.5 *Susceptibilité d'initiation de filaments $\lambda(\cdot)$, pour une position inoccupée par les filaments, une fonction de la densité de pool soluble. Si la densité de pool soluble à une position est inférieure à σ_{min} , la susceptibilité d'initiation de filament est égale à zéro et l'initiation de filament n'est pas possible. σ_{min} est la concentration minimale permettant la constitution d'un ULF.*

En conclusion, selon les cas l'initiation de filaments peut être confinée autour du noyau ou dans le cortex cellulaire. La fonction seuil $p(\cdot)$ permet de définir des stratégies d'initiation.

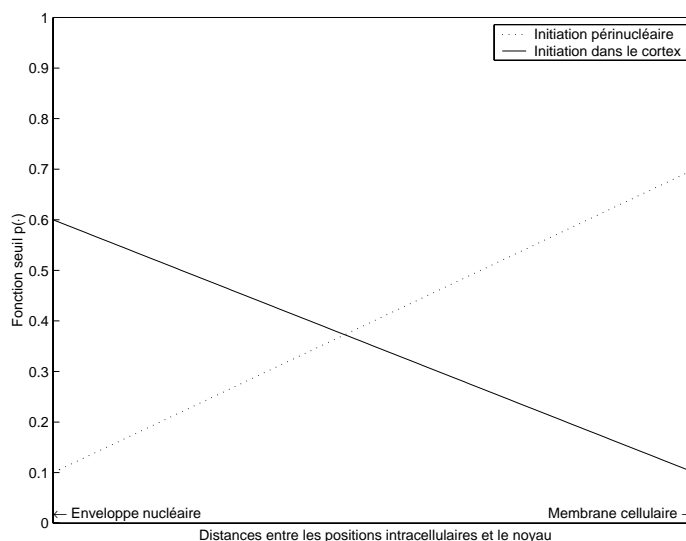


FIG. 5.6 *Fonctions seuil $p(\cdot)$ dépendantes de l'espace permettant de spécifier différentes stratégies d'initiation de filaments. La fonction nommée "Initiation périnucléaire" favorise l'initiation des filaments dans la région périnucléaire. Par contre, la fonction notée "Initiation dans le cortex" favorise l'initiation des filaments dans le cortex cellulaire, région située sous la membrane cellulaire.*

Au temps t , un filament est initié à la position spatiale β lorsque la fonction de recrutement $\mathcal{R}(\beta)(t)$ est égale à 1 à cette position à cet instant. $\mathcal{B}(t)$ est l'ensemble des positions spatiales β telles que $\mathcal{R}(\beta)(t) = 1$ au temps t , c'est à dire que $\mathcal{B}(t)$ est l'ensemble des conditions initiales β des filaments $X_\beta(\cdot)$ initiés au temps t (Déf. 5.3.1). L'ensemble $\mathcal{I}(t)$ des conditions initiales β des filaments $X_\beta(\cdot)$ initiés avant le temps t (Déf. 5.3.3) peut également être exprimé comme $\mathcal{I}(t) = \bigcup_{0 \leq s < t} \mathcal{B}(s)$.

Pour un filament initié à une position β au temps t , une proportion de pool soluble équivalente à σ_{min} est consommée en β au temps t , c'est à dire que le pool soluble est converti en pool insoluble (en filament). Le terme $\sigma_{min} \mathbb{1}_{\mathcal{B}(t)}(X)$ de l'équation (5.6) qui dirige le pool soluble, décrit la consommation de pool soluble lors de l'initiation des filaments. Ce terme établit un couplage entre l'équation du pool soluble (5.6) et l'équation du pool insoluble (5.9).

5.7 Polymérisation des filaments

La formation des filaments se fait par un assemblage longitudinal d'*ULF* qui a lieu en zone apicale des filaments, c'est à dire à partir des points d'initiation et plus tard à partir des têtes de filaments. Le contrôle de l'assemblage longitudinal est simultanément assuré par l'environnement intracellulaire et le filament lui-même.

La contribution de l'environnement au contrôle de l'assemblage longitudinal repose sur la topographie des champs de concentration de pool soluble. Elle est définie comme un suivi du gradient de concentration de pool soluble qui est modulé par des perturbations résultant de l'agitation moléculaire. Cette agitation moléculaire est modélisée par un processus aléatoire.

La contribution du filament au contrôle de l'assemblage longitudinal repose sur la mémoire de forme du filament. La forme du filament est modélisée par la courbure moyenne le long du filament. La contribution du filament au contrôle de la croissance des filaments prend également en compte la vitesse de pousse des filaments au temps $t_- = t - \delta$, pour $0 < \delta \ll 1$.

Posons tout d'abord quelques définitions.

Définition 5.7.1 Notons $d_i(\cdot)$ (resp. $d_b(\cdot)$) la fonction qui associe un instant d'initiation (resp. de terminaison) t_0 (resp. t_∞) à chaque condition initiale β .

$$\begin{aligned} \mathcal{I}(t) &\rightarrow [T_0, T_{max}] \\ d_i : \beta &\rightarrow d_i(\beta) = t_0 \\ d_b : \beta &\rightarrow d_b(\beta) = t_\infty \end{aligned}$$

Remarque – L'instant de terminaison peut également être défini comme $d_b(\beta) = \inf_t \{t > d_i(\beta) : X_\beta(t) \in \partial\Omega\}$. Explicitement, le filament de condition initiale β atteint la membrane cellulaire (la frontière du domaine cellule $\partial\Omega$) à l'instant $d_b(\beta) = t_\infty$.

Interprétation – Lorsqu'un filament atteint la membrane cellulaire il s'ancre à celle-ci et son développement est stoppé. Par contre, lorsqu'un filament atteint l'enveloppe nucléaire il peut continuer à se développer.

Définition 5.7.2 Pour tout $\beta \in \mathcal{I}(t)$, notons $X_\beta(\cdot)$ le filament (la solution) de condition initiale β initié à la position β au temps $d_i(\beta) = t_0 < t$.

Définition 5.7.3 Pour tout $\beta \in \mathcal{I}(t)$, un filament $X_\beta(\cdot)$ est une trajectoire (courbe) dans l'espace qui peut être définie sous forme paramétrique par rapport au temps t :

$$\forall t \geq d_i(\beta) = t_0 \quad X_\beta(t) = x_\beta(t)\vec{e}_x + y_\beta(t)\vec{e}_y + z_\beta(t)\vec{e}_z$$

où \vec{e}_x , \vec{e}_y et \vec{e}_z forment la base unitaire de \mathbb{R}^3 .

Remarque – La trajectoire d'un filament de condition initiale β est complètement décrite lorsque l'on fait croître les valeurs du paramètre t de $t_0 = d_i(\beta)$ à $t_\infty = d_b(\beta)$.

Définition 5.7.4 Pour tout $\beta \in \mathcal{I}(t)$, $X_\beta(t)$ représente, au temps t , la tête du filament de condition initiale β , initié au temps $d_i(\beta) = t_0 < t$.

Définition 5.7.5 Pour tout $\beta \in \mathcal{I}(t)$, $X_\beta(t_0)$ représente la position d'initiation (condition initiale) du filament, c'est à dire $\beta = X_\beta(t_0)$.

La formation des polymères de cytokératine (filaments) est apicale: l'assemblage longitudinal des *ULF* est confiné à la tête des filaments, autrement dit le développement des filaments est restreint aux $X_\beta(t) \forall \beta \in \mathcal{I}(t)$, les têtes des filaments de condition initiale β .

Soit $X_\beta(\cdot) = x_\beta(\cdot)\vec{e}_x + y_\beta(\cdot)\vec{e}_y + z_\beta(\cdot)\vec{e}_z$ un filament de condition initiale $\beta \in \mathcal{I}(t)$, l'assemblage longitudinal de ce filament est décrit par le système d'équations suivant:

$$\frac{dX_\beta(t)}{dt} = \begin{cases} 0 & \forall \beta \in \mathcal{I}_b(t) \\ \mathcal{E}(X_\beta(t), t) \left[\frac{(\nabla_X C)(X_\beta(t), t) + \|(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)\|v}{\|(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)\| + \epsilon} + \frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)} \frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon} \right] & \forall \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t) \end{cases}$$

Lorsque la condition initiale β appartient à l'ensemble $\mathcal{I}_b(t)$ (Déf 5.3.4), c'est à dire que la solution (le filament) $X_\beta(\cdot)$ a atteint la frontière $\partial\Omega$ du domaine cellule, alors la solution $X_\beta(\cdot)$ adopte un comportement stationnaire $X_\beta(t) = X_\beta(t_\infty)$, $t_\infty \leq t$. Cette stationnarité modélise l'arrêt de la polymérisation du filament lorsque celui-ci atteint la membrane $\partial\Omega$ de la cellule.

Tant que les solutions (les filaments) n'ont pas atteint la frontière $\partial\Omega$ du domaine cellule, elles ont un comportement non stationnaire. Dans ce cas, plusieurs composants contribuent au contrôle de l'assemblage longitudinal des filaments: l'environnement intracellulaire et les filaments eux-mêmes.

En premier lieu, la capacité de l'environnement à assurer la constitution d'un *ULF* doit être vérifiée. La fonction $\mathcal{E}(X_\beta(t), t)$ modélise la *potentialité de l'environnement* à former les filaments. Elle est définie par:

$$\mathcal{E}(X_\beta(t), t) = \begin{cases} 0 & \text{si } \int_{\mathcal{V}(X_\beta(t))} (C(V, t) - \sigma_{min}) dV < 0 \\ 1 & \text{si } \int_{\mathcal{V}(X_\beta(t))} (C(V, t) - \sigma_{min}) dV \geq 0 \end{cases} \quad (5.26)$$

La quantité $\int_{\mathcal{V}(X_\beta(t))} (C(V, t) - \sigma_{min}) dV$ jauge l'état local des concentrations de l'environnement, dans le voisinage $\mathcal{V}(X_\beta(t))$ de la tête du filament $X_\beta(t)$. Au temps t , lorsque $\int_{\mathcal{V}(X_\beta(t))} (C(V, t) - \sigma_{min}) dV$ est inférieur à zéro autour de la tête de filament de condition initiale β , aucun assemblage longitudinal ne peut se faire à cette position: la quantité σ_{min} de pool soluble, nécessaire à l'assemblage latéral en *ULF*, n'est pas disponible dans

le voisinage $\mathcal{V}(X_\beta(t))$ de la tête du filament. La pousse du filament ne peut alors pas avoir lieu en $X_\beta(t)$ au temps t , ce qui se traduit par le fait que $\frac{\partial X_\beta}{\partial t}|_t = 0$. Dans cette situation, la solution adopte un comportement de type stationnaire au temps t , mais ce comportement n'est pas définitif.

Définition 5.7.6 *L'ensemble $\rho(t)$ constitué des têtes de filament qui ont effectivement poussé à l'instant t , précédemment défini dans la Définition 5.3.2 comme:*

$$\rho(t) = \{X_\beta(t) : \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t), \frac{\partial X_\beta}{\partial t}|_t \neq 0\}$$

peut aussi se définir de la manière suivante:

$$\rho(t) = \{X_\beta(t) : \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t), \mathcal{E}(X_\beta(t), t) = 1\}$$

Une fois assuré que la constitution d'une sous-unité de filament (*ULF*) peut être réalisée, l'assemblage longitudinal d'un nouvel *ULF* en tête du filament doit être décidé. L'environnement et le filament contribuent conjointement à la formation du filament. Détaillons maintenant ces différentes contributions.

La contribution de l'environnement décrit l'état de l'environnement intracellulaire en terme de champs de densités de pool soluble et d'agitation moléculaire.

La contribution de l'environnement est définie par le vecteur

$$\frac{(\nabla_X C)(X_\beta(t), t) + \|(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)\|v}{\|(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)\| + \epsilon}$$

qui correspond à la somme du gradient local de concentration de pool soluble à la tête $X_\beta(t)$ du filament de condition initiale β au temps t ($(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)$) et d'un vecteur tridimensionnel aléatoire v .

Ce gradient local de concentration de pool soluble pointe vers la direction dans laquelle la concentration $C(\cdot)$ augmente le plus rapidement, au point $X = X_\beta(t)$.

L'expression de l'agitation moléculaire, qui est modélisée par le vecteur v , est modulée par l'amplitude de l'environnement, $\|(\nabla_X C)(X_\beta(t), t)\|$. Le vecteur v est un vecteur tridimensionnel aléatoire qui suit une loi uniforme sur $[-u, u]^3 \subset \mathbb{R}^3$ pour $u \in \mathbb{R}^+$, et v est défini tel que sa norme $\|v\|$ soit assez petite. En effet, cette contribution stochastique n'est jamais une composante dominante de la contribution environnementale.

La contribution de l'environnement à l'assemblage longitudinal des *ULF* s'exprime

alors explicitement de la manière suivante:

$$\begin{pmatrix} \frac{\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x} + \sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2}}{\sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2} + \epsilon}} v_x \\ \frac{\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y} + \sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2}}{\sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2} + \epsilon}} v_y \\ \frac{\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z} + \sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2}}{\sqrt{\left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial C(X_\beta(t),t)}{\partial z}\right)^2} + \epsilon}} v_z \end{pmatrix}$$

où ϵ est une constante telle que $0 < \epsilon \ll 1$.

Interprétation – *La contribution de l'environnement au contrôle de la pousse des filaments est définie par le gradient local de concentration de pool soluble à la tête des filaments, perturbé par l'agitation moléculaire proportionnellement à l'amplitude de l'environnement.*

La contribution du filament au contrôle de la formation des filaments, décrite par

$$\frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)} \frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon}$$

est composée de deux parties: l'une fixant la direction de la pousse et l'autre spécifiant l'amplitude de la pousse.

La direction de la pousse est donnée par le vecteur

$$\frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon}$$

Ce vecteur pointe dans la direction du vecteur tangent à la solution $X_\beta(\cdot)$ au point $X = X_\beta(t)$, tête du filament de condition initiale β , au temps t . La dérivée

$$X'_\beta(t_-) = \begin{pmatrix} x'_\beta(t_-) \\ y'_\beta(t_-) \\ z'_\beta(t_-) \end{pmatrix}$$

de la trajectoire de condition initiale β est définie comme la dérivée à gauche de $X_\beta(\cdot)$ au point $X = X_\beta(t)$, qui est approximée comme suit: $x'_\beta(t_-) = \frac{x_\beta(t) - x_\beta(t-\delta)}{\delta}$, pour $\delta > 0$,

assez petit. Le vecteur, fixant la direction de la pousse du filament de condition initiale β , induit par la contribution du filament, s'écrit alors de la manière suivante $\forall t \geq t_0 + \delta$, où t_0 est l'instant d'initiation du filament:

$$\frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon} = \begin{pmatrix} \frac{x_\beta(t-\delta) - x_\beta(t)}{\sqrt{(x_\beta(t-\delta) - x_\beta(t))^2 + (y_\beta(t-\delta) - y_\beta(t))^2 + (z_\beta(t-\delta) - z_\beta(t))^2 + \delta\epsilon}} \\ \frac{y_\beta(t-\delta) - y_\beta(t)}{\sqrt{(x_\beta(t-\delta) - x_\beta(t))^2 + (y_\beta(t-\delta) - y_\beta(t))^2 + (z_\beta(t-\delta) - z_\beta(t))^2 + \delta\epsilon}} \\ \frac{z_\beta(t-\delta) - z_\beta(t)}{\sqrt{(x_\beta(t-\delta) - x_\beta(t))^2 + (y_\beta(t-\delta) - y_\beta(t))^2 + (z_\beta(t-\delta) - z_\beta(t))^2 + \delta\epsilon}} \end{pmatrix}$$

Sur l'intervalle $[t_0, t_0 + \delta)$, t_0 représentant l'instant d'initiation du filament de condition initiale β , $\frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\|}$ n'est pas défini, cependant il est supposé égal au vecteur nul $\vec{0}$ sur l'intervalle tout entier.

Interprétation – Le vecteur $\frac{X'_\beta(t_-)}{\|X'_\beta(t_-)\| + \epsilon}$, qui induit la direction de l'assemblage des ULF selon la contribution des filaments, représente la vitesse de pousse du filament $X_\beta(\cdot)$ au temps t prenant en compte le passé au travers de la dérivée à gauche.

L'amplitude de la pousse induite par la contribution des filaments est donnée par le scalaire

$$\frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)}$$

qui représente la courbure moyenne le long du filament de condition initiale β à partir de l'instant de son initiation $d_i(\beta)$ jusqu'au temps t .

Nous rappelons donc tout d'abord ici la définition de la courbure.

Définition 5.7.7 Soit une courbe T dans l'espace définie de la manière suivante:

$$T(t) = x(t)\vec{e}_x + y(t)\vec{e}_y + z(t)\vec{e}_z = (x(t), y(t), z(t))$$

où t est un paramètre arbitraire. Les dérivées première et seconde de la courbe T par rapport à t s'expriment comme:

$$\frac{dT(t)}{dt} = T'(t) = \begin{pmatrix} x'(t) \\ y'(t) \\ z'(t) \end{pmatrix}, \quad \frac{d^2T(t)}{dt^2} = T''(t) = \begin{pmatrix} x''(t) \\ y''(t) \\ z''(t) \end{pmatrix}$$

Alors le carré de la courbure κ de la courbe T au point de paramètre t peut se calculer

par la formule suivante:

$$\begin{aligned}\kappa^2(T(t)) &= \frac{T'(t)^2 T''(t)^2 - (T'(t) T''(t))^2}{T'(t)^6} \\ &= \frac{(x'(t)^2 + y'(t)^2 + z'(t)^2)(x''(t)^2 + y''(t)^2 + z''(t)^2) - (x'(t)x''(t) + y'(t)y''(t) + z'(t)z''(t))^2}{(x'(t)^2 + y'(t)^2 + z'(t)^2)^3}\end{aligned}\quad (5.27)$$

La fonction $\kappa(X_\beta(t))$, qui représente la courbure du filament de condition initiale β à sa tête au temps t , est définie d'après l'expression (5.27) comme suit:

$\forall t \geq t_0 + 2\delta$ où t_0 est le temps d'initiation du filament:

$$|\kappa(X_\beta(t))| = \sqrt{\frac{X'_\beta(t_-)^2 X''_\beta(t_-)^2 - (X'_\beta(t_-) X''_\beta(t_-))^2}{X'_\beta(t_-)^6}} \quad (5.28)$$

La dérivée seconde $X''_\beta(t_-)$ de la trajectoire de condition initiale β , est définie comme la dérivée à gauche de $X'_\beta(t_-)$ telle que $x''_\beta(t_-) = \frac{x_\beta(t) - 2x_\beta(t-\delta) + x_\beta(t-2\delta)}{\delta^2}$, pour $\delta > 0$, assez petit. Sur l'intervalle $[t_0, t_0 + 2\delta)$, $\kappa(X_\beta(t))$ n'est pas définie, elle est supposée être égale à zéro sur l'intervalle tout entier. Le scalaire $\frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)}$ rend compte de la mémoire de forme du filament. Si sa valeur est proche de zéro et converge régulièrement vers zéro, alors la solution de condition initiale β , a un comportement de type rectiligne.

Interprétation – Le scalaire $\frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_\beta(u))| du}{t - d_i(\beta)}$ retrace l'histoire morphologique du filament et évalue la "force" du filament afin de fixer l'amplitude de la contribution du filament au contrôle de l'assemblage longitudinal des ULF.

De même que l'étape d'initiation des filaments, l'assemblage longitudinal d'un ULF à la tête d'un filament est un processus consommateur de pool soluble. Au temps t , une quantité σ_{min} de pool soluble est consommée à chaque tête de filaments qui ont effectivement poussé. L'ensemble des têtes qui ont été effectivement créées au temps t est noté $\rho(t)$. Ce processus de consommation de pool soluble est décrit par le terme $\sigma_{min} \mathbb{1}_{\rho(t)}(X)$ de l'équation (5.6).

5.8 Consommation du pool soluble

Lors de la phase d'initiation des filaments et lors de la phase de pousse des filaments, le pool soluble est consommé, permettant l'assemblage latéral des tétramères en ULF. Les éléments du pool soluble sont convertis en éléments du pool insoluble (Fig. 5.1):



La consommation totale, à partir de l'instant initial T_0 jusqu'au temps t , est définie par l'équation (5.19). Le taux de consommation de pool soluble, au temps t , s'exprime de

la manière suivante:

$$\frac{\partial \mathcal{C}(t)}{\partial t} = \sigma_{min} \int_{\Omega} \mathbb{1}_{\rho(t) \cup \mathcal{B}(t)}(t) dt \quad (5.29)$$

Cette expression montre qu'au temps t et en tous les sites d'initiation de filament $\mathcal{B}(t)$ et d'assemblage longitudinal $\rho(t)$, la variation de pool soluble correspond à σ_{min} . Cette consommation de pool soluble, à un instant t , représente le terme de couplage des deux équations dirigeant le pool soluble (5.6) et la construction des filaments (5.9).

5.9 Discussion sur les concepts de modélisation

Le modèle que nous proposons décrit l'organisation structurale du réseau de cytotkératine dirigée par les contraintes mécaniques extracellulaires (Fig. 5.7). L'optique de ce modèle reflète l'implication du réseau de filaments intermédiaires dans le maintien de la stabilité mécanique et de l'intégrité des cellules [16, 19, 26]. Le réseau de filaments intermédiaire répond à l'environnement mécanique extracellulaire en s'organisant en des configurations spécifiques, comme un mécanisme de renforcement, afin de préserver l'intégrité cellulaire et de transmettre les signaux mécaniques de l'environnement extracellulaire au noyau. A notre connaissance, ce travail est le premier modèle dynamique d'édification du réseau de filaments intermédiaires d'une cellule en prenant en compte le lien entre la fonction et la structure des filaments intermédiaires.

Le modèle proposé se particularise du cadre général des systèmes dynamiques, en définissant un domaine temporel borné $[T_0, T_{max}]$; de ce fait, nous nous plaçons dans le cadre d'un horizon fini.

Dans notre modèle, nous avons supposé un ensemble de contraintes mécaniques agissant sur la cellule. Cet ensemble comprend des contraintes résultant des jonctions adhérentes entre les cellules adjacentes (desmosomes) et entre la cellule et la matrice extracellulaire (hémidesmosomes), et des forces de cohésion, en région périnucléaire, préservant l'intégrité cellulaire.

Comment l'intégrité nucléaire est préservée, n'est pas encore totalement élucidé. Certains auteurs suggèrent un rôle prééminent du réseau de filaments intermédiaires [70]. Pour prendre en compte ce phénomène dans la construction du modèle, un champ centripète de force de cohésion, agissant en région périnucléaire, a été supposé.

Dans notre modèle, le processus de production des tétramères, appelé la synthèse de protéines, comprend plusieurs étapes, parmi lesquelles

- la migration des protéines le long des réseaux de microfilaments ou de microtubules [12] du noyau vers les régions de contraintes,
- l'oligomérisation des protéines en tétramères suivie d'une libération de ces derniers dans le cytoplasme au niveau des régions de contraintes.

Ces deux hypothèses peuvent respectivement être considérées de façon différente sans modifier le modèle:

- au lieu de la migration des protéines vers les régions de contraintes, nous pouvons

supposer une migration des ARN messagers, le long des réseaux de microfilaments ou de microtubules vers les régions de contrainte [46, 57],

- au lieu d’une oligomérisation des protéines suivie d’une libération des tétramères dans le cytoplasme au niveau des régions de contraintes, nous pouvons proposer une synthèse de protéines aux régions de contraintes. Les sources de synthèse deviennent alors les lieux de synthèse des protéines. L’intensité de la synthèse, proportionnelle à l’intensité de la contrainte, est alors comparable au produit de la quantité de polyribosomes libres par unité de volume par la vitesse de synthèse d’un polyribosome.

La diffusion des protéines, une autre hypothèse importante du modèle, pourrait être transformée en un processus de percolation (diffusion guidée par un réseau) le long de réseaux modélisant les réseaux de microfilaments ou de microtubules.

Pour un ensemble donné de contraintes mécaniques, le cytoplasme est considéré comme un fluide homogène incompressible Newtonien (densité et viscosité constantes). Par contre, selon les conditions envisagées, le cytoplasme fluctue entre la phase liquide (sol) et la phase solide (gel). Ces fluctuations influent uniquement sur la vitesse de propagation des sous-unités de pool soluble dans le cytoplasme, c’est à dire sur le coefficient de diffusion des sous-unités dans le cytoplasme. Dans notre modèle, le coefficient de diffusion est donc supposé constant tout au long d’une même réalisation, et l’équation de diffusion est ainsi une équation linéaire.

La définition du coefficient de diffusion D est posée par la relation de Stokes-Einstein comme suit:

$$D = \frac{kT}{f} \quad (5.30)$$

où k est la constante de Boltzmann, T est la température absolue en degrés Kelvin et f est le coefficient de friction moléculaire. Le coefficient de friction moléculaire f dépend de la forme de la molécule [83]. Les sous-unités de cytokératine sont des molécules cylindriques.

Pour une molécule cylindrique, le coefficient de friction f est défini comme suit:

$$f = \frac{3\Pi\eta L(1 - \frac{3d^2}{2L^2})^{1/2}}{\ln\left(\sqrt{\frac{3}{2}}\frac{L}{d}[1 + (1 - \frac{3d^2}{2L^2})^{1/2}]\right)} \quad (5.31)$$

où η est la viscosité du cytoplasme, L est la longueur de la molécule cylindrique et d est le diamètre de la molécule.

En remplaçant f par (5.31) dans l’équation (5.30), nous obtenons l’expression du coefficient D de diffusion des sous-unités de pool soluble dans le cytoplasme.

$$D = \frac{kT \ln\left(\sqrt{\frac{3}{2}}\frac{L}{d}[1 + (1 - \frac{3d^2}{2L^2})^{1/2}]\right)}{3\Pi\eta L(1 - \frac{3d^2}{2L^2})^{1/2}}$$

Le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la viscosité η du cytoplasme (la viscosité intervient dans le dénominateur). Le coefficient de diffusion est d'autant plus grand que la viscosité du milieu est faible.

A l'initiation du processus, la diffusion se produit dans un milieu homogène, le cytoplasme est supposé dépourvu de réseau cytosquelettique. Petit à petit un réseau de cytokératine se construit et donc le cytoplasme devient un milieu de plus en plus hétérogène. De plus, la synthèse des protéines induit une augmentation de la concentration du pool soluble. L'augmentation de la concentration du pool soluble ainsi que le développement du réseau au cours du temps impliquent une augmentation de la viscosité du cytoplasme.

Donc, une des améliorations possibles serait d'utiliser un coefficient de diffusion non constant, défini comme une fonction décroissante du temps. Dans ce cas, l'équation de diffusion ne serait plus une équation linéaire, mais une équation non-linéaire.

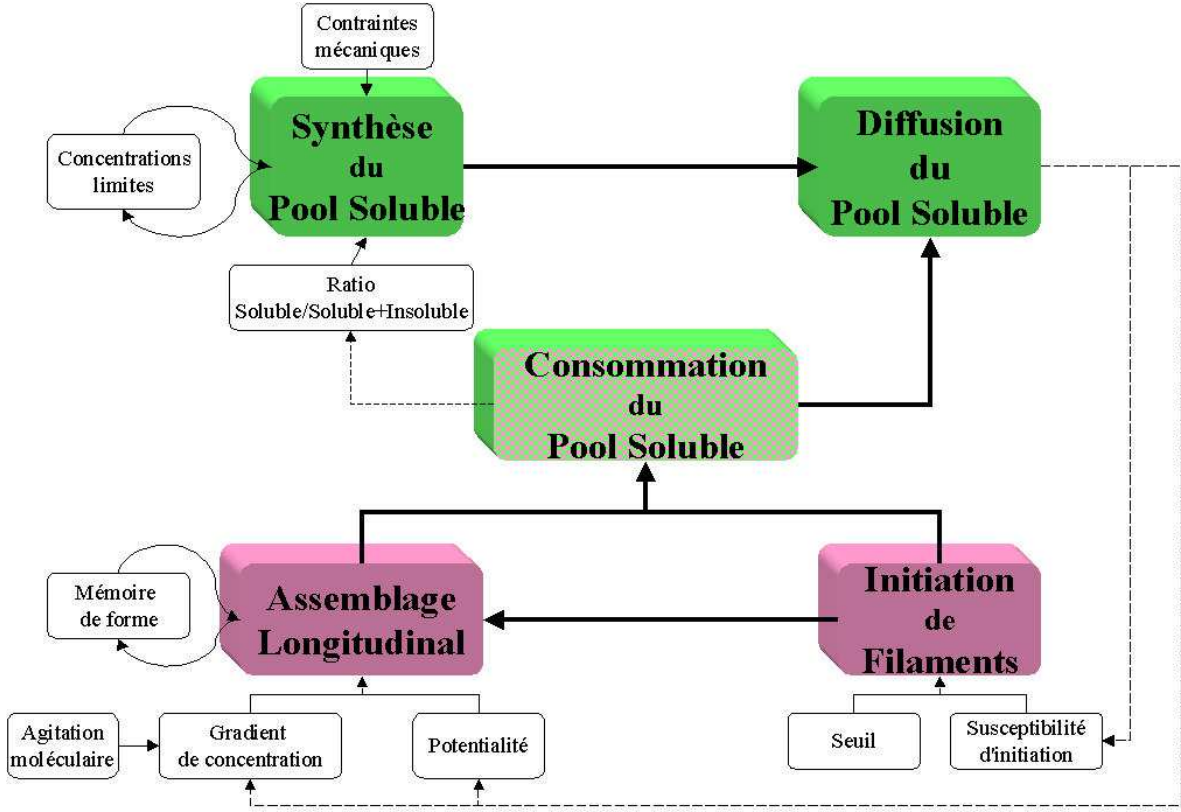


FIG. 5.7 Schéma récapitulatif des éléments constituant le modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytotokératine.

6. Simulations numériques

Dans ce Chapitre, nous proposons un modèle de simulation dérivé du modèle mathématique d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine, développé dans le Chapitre 5.

Sommaire

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.1 | Adimensionnalisation du modèle | 124 |
| 6.2 | Discrétisation du domaine de définition du modèle | 124 |
| 6.3 | Résolution numérique de l'équation de diffusion | 129 |
| 6.3.1 | Schéma de discrétisation | 129 |
| 6.3.2 | Consistance | 131 |
| 6.3.3 | Stabilité | 131 |
| 6.3.4 | Convergence | 133 |
| 6.3.5 | Résolution numérique | 134 |
| 6.4 | Modèle de simulation | 134 |
| 6.5 | Discussion | 137 |

Le modèle mathématique continu d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine, exposé dans le Chapitre 5, est sous la forme d'un système d'équations intégro-différentielles dont l'un des termes est une équation aux dérivées partielles, une équation parabolique de diffusion.

Les méthodes de résolution des équations aux dérivées partielles sont classées en deux familles qui diffèrent par leur principe: les méthodes d'approximation d'équations et les méthodes d'approximation de solutions. Ces méthodes de résolution approchée conduisent à des algorithmes numériques destinés à être implémentés en langage informatique et permettent d'obtenir des simulations numériques.

Le modèle de simulation, dérivé du modèle mathématique, utilise des méthodes d'approximation d'équations encore appelées méthodes aux différences finies. Ces méthodes procèdent par la discrétisation des équations continues. Ce Chapitre expose les différentes étapes nécessaires à l'obtention d'une solution numérique, ainsi que les conditions assurant la représentativité de la solution numérique de l'équation de diffusion discrétisée.

6.1 Adimensionnalisation du modèle

Avant de traiter le problème numériquement, il est souhaitable de rendre adimensionnelles les équations (5.1–5.4) du modèle continu, afin que les échelles de temps et de longueur varient entre 0 et 1.

En définissant les paramètres suivants

$$\tilde{x} = \frac{x}{l}, \quad \tilde{y} = \frac{y}{l}, \quad \tilde{z} = \frac{z}{l}, \quad \tilde{t} = \frac{D}{l^2}t \quad (6.1)$$

où $l = \sqrt[3]{|\Omega|}$ et en introduisant le paramètre

$$\varpi = \frac{l^2}{D}$$

alors le problème adimensionnel à résoudre est (omission des tildes pour plus de lisibilité):

$$\frac{\partial C(X,t)}{\partial t} = \left(\Delta_X C \right)(X,t) + \varpi (\mathcal{F}(X,t) - \sigma_{min} \mathbb{1}_{\mathcal{B}(t) \cup \rho(t)}(X)) \quad (6.2)$$

sous les conditions

$$\forall X \in \Omega, \quad C(X, T_0) = \Gamma(X) \quad (6.3)$$

et

$$\frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial \Theta} = 0 \quad (6.4)$$

$$\frac{dX_{\beta}(t)}{dt} = \begin{cases} \mathcal{E}(X_{\beta}(t), t) \left[\frac{(\nabla_X C)(X_{\beta}(t), t) + \|(\nabla_X C)(X_{\beta}(t), t)\|_v}{\|(\nabla_X C)(X_{\beta}(t), t)\| + \epsilon} + \frac{\int_{d_i(\beta)}^t |\kappa(X_{\beta}(u))| du}{t - d_i(\beta)} \frac{X'_{\beta}(t_-)}{\|X'_{\beta}(t_-)\| + \epsilon} \right] & \forall \beta \in \mathcal{I}(t) \setminus \mathcal{I}_b(t) \\ 0 & \forall \beta \in \mathcal{I}_b(t) \end{cases} \quad (6.5)$$

Nous posons $F(\cdot)$, la fonction composée des termes de synthèse et de consommation de pool soluble, qui est utilisée par la suite.

$$F(X,t) = \mathcal{F}(X,t) - \sigma_{min} \mathbb{1}_{\mathcal{B}(t) \cup \rho(t)}(X) \quad (6.6)$$

Toute l'étude numérique, qui suit, s'applique au modèle adimensionnel défini par les équations (6.2–6.5). En premier lieu, il faut définir le domaine spatial adimensionnel et le domaine temporel adimensionnel du modèle et les discrétiser. En second lieu, un schéma de discrétisation permettant d'approximer le modèle continu doit être défini.

6.2 Discrétisation du domaine de définition du modèle

Le domaine de définition du modèle est constitué du produit du domaine spatial et du domaine temporel qui s'exprime comme $\Omega \times [T_0, T_{max}]$. Ces deux domaines spatial et

temporel sont adimensionnalisés en utilisant les relations définies dans (6.1). Ils doivent maintenant être discrétisés.

Le domaine spatial adimensionnel du modèle qui correspond au domaine cellule Ω est représenté par un cube unité $\Omega = [0,1] \times [0,1] \times [0,1]$. La discrétisation du domaine spatial est réalisée par la construction d'une grille discrète cubique pourvue d'un maillage carré, dans l'espace xyz (coordonnées spatiales cartésiennes), qui recouvre Ω . La grille est formée d'un ensemble de lignes parallèles aux axes ox , oy et oz dont les intersections définissent les points du maillage (ou noeuds). La longueur de l'intervalle séparant deux points de maillage dans la direction ox (resp. la direction oy , resp. la direction oz) est uniforme et donnée par Δx (resp. Δy , resp. Δz). Le domaine cellule est envisagé comme un milieu isotrope, ce qui revient à dire $\Delta x = \Delta y = \Delta z = \delta$. L'espacement δ entre deux points du maillage est appelé le pas spatial de discrétisation. Ce pas spatial de discrétisation dépend de la taille des simulations autrement dit du nombre de points de maillage par lignes parallèles à la direction ox . Soit $I \in \mathbb{N}$ le nombre de points de maillage discrétisant l'arête du domaine dans la direction ox , alors le pas spatial de discrétisation δ est défini comme suit:

$$\delta = \Delta x = \frac{1}{I - 1} \quad (6.7)$$

Un point du maillage peut alors se définir comme:

$$(x_i, y_j, z_k) = (i\delta, j\delta, k\delta) \quad i, j, k = 0, 1, \dots, I$$

Le maillage de discrétisation est constitué de noeuds supposés représentatifs du volume unité $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z = \delta^3$.

Afin de reconstituer la topologie de la cellule, chaque noeud du maillage est défini comme appartenant à un compartiment spécifique de la cellule postulé dans la Section 5.2. Chaque noeud est défini comme un point nucléaire, un point de l'enveloppe nucléaire, un point périnucléaire, un point cytoplasmique, un point de la membrane cellulaire, un point de desmosomes ou un point d'hémidesmosome (Fig. 6.2).

Posons tout d'abord quelques définitions:

Définition 6.2.1 *Un ensemble discret X est dit convexe si quels que soient x et y appartenant à X , tous les arcs minimaux (ou chemins minimaux) de la trame (ou maillage) entre x et y appartiennent à X .*

Définition 6.2.2 *Un ensemble discret X est dit connexe si quels que soient x et y appartenant à X , il existe un chemin entre x et y dont tous les points appartiennent à X .*

Ces deux définitions reposent sur le type de voisinage considéré. Deux types de voisinage ont été utilisés, l'un pour le processus environnemental de diffusion et l'autre pour le processus de construction des filaments.

Le système de voisinage utilisé pour simuler le processus de diffusion est un voisinage $N_6(\cdot)$ en 6–connexité qui attribue à un point 6 voisins (Fig. 6.1(a)), et il est défini de la manière suivante:

$$N_6(p) = \{p' \in \Omega \mid \text{dist}(p,p') \leq \delta\} \quad (6.8)$$

Le système de voisinage utilisé lors des processus de pousse des filaments est un voisinage $N_{26}(\cdot)$ en 26–connexité qui affecte à un point 26 voisins (Fig. 6.1(b)), il se définit comme suit:

$$N_{26}(p) = \{p' \in \Omega \mid \text{dist}(p,p') \leq \sqrt{3}\delta\} \quad (6.9)$$

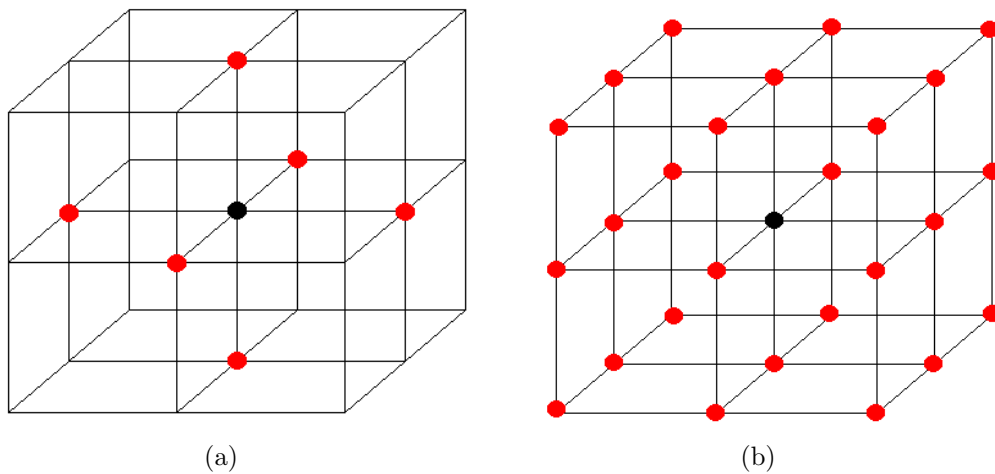


FIG. 6.1 *Systèmes de voisinage utilisés dans le modèle de simulation. (a) représente le voisinage $N_6(\cdot)$ d'un point courant en 6-connexité. (b) représente le voisinage $N_{26}(\cdot)$ d'un point courant en 26-connexité.*

L'ensemble N des points nucléaires constitue un sous-ensemble convexe de l'ensemble des noeuds du maillage. Ce sous-ensemble, de forme cubique, est positionné a priori dans la cellule. L'arête du domaine noyau correspond, d'après le rapport nucléo–cytoplasmique, à une proportion de l'arête du domaine cellule variant de $\frac{1}{3}$ à $\frac{1}{2}$.

L'ensemble des noeuds de l'enveloppe nucléaire, appelé ∂N , sont des points du maillage n'appartenant pas à l'ensemble N des points nucléaires mais ayant au moins un voisin appartenant à N .

Les points de la région périnucléaire P sont des points, ayant au moins un voisin qui appartient à l'enveloppe nucléaire ∂N , et choisis tels que toute paire de points de cet ensemble soit non connexe.

Les noeuds de la membrane cellulaire $\partial\Omega$ sont définis comme les points ayant au moins l'une de ses coordonnées spatiales égales à x_0 ou x_I , y_0 ou y_I , z_0 ou z_I . Les noeuds composants les coins et les arêtes du domaine cellule (du maillage cubique) ne sont pas considérés comme des points du domaine spatial de définition, ils sont ignorés et dits "inexistants".

Les noeuds desmosomes (resp. hémidesmosomes) sont des points choisis aléatoirement parmi les noeuds ayant au moins un voisin appartenant à l'une de deux faces latérales (x_0 ou x_I) du domaine cellule (resp. à la face basale (z_0) du domaine cellule). Chaque plaque de desmosome constitue un sous-ensemble convexe.

Par défaut, tous les autres points non précédemment catégorisés sont des noeuds du cytoplasme Θ . L'ensemble des points de la frontière $\partial\Theta$ du domaine cytoplasme est constitué de l'union de l'ensemble des noeuds de l'enveloppe nucléaire et de l'ensemble des noeuds de la membrane cellulaire.

Tous les noeuds du maillage, exceptés les noeuds nucléaires et les noeuds dits inexistants (arêtes et coins du maillage), sont considérés comme des points ayant un "caractère cytoplasmique". Dans le modèle, le domaine de travail se restreint au domaine cytoplasmique, donc seuls les points ayant un "caractère cytoplasmique" constituent le domaine de travail et interviennent dans les différents processus. Le domaine de travail ainsi défini est un ensemble connexe.

L'étiquetage, décrit ci-dessus, de tous les noeuds du maillage selon leur appartenance à un compartiment cellulaire permet d'attribuer une fonction à chacun des noeuds; car l'appartenance à un compartiment spécifique du domaine cellule dote le point de caractéristiques particulières comme:

- source de synthèse et site transporteur (en terme de diffusion) pour les noeuds périnucléaires, de desmosome et d'hémidesmosome,
- site uniquement transporteur pour les noeuds du cytoplasme proprement dit,
- site de non échange pour les points de la frontière cytoplasmique (noeuds de l'enveloppe nucléaire et de la membrane cellulaire),
- site interdit pour les noeuds nucléaires et dits inexistants (arêtes du maillage).

De la même façon, le domaine temporel adimensionnel du modèle doit être subdivisé, afin de le discrétiser, en $N \in \mathbb{N}$ unité de temps tel que $(N - 1) \times \Delta t = T_{max}$. Le pas temporel de discrétisation (ou pas de temps) se définit en fonction des conditions de stabilité déduites des approximations de la solution de l'équation de diffusion.

Le domaine de définition $\Omega \times [T_0, T_{max}]$ ainsi discrétisé, il nous faut maintenant trouver une formulation de remplacement des équations adimensionnelles continues (6.2–6.5) qui permet de calculer les valeurs de densité en pool soluble aux noeuds du domaine spatial pour tous les instants du domaine temporel ainsi que les trajectoires discrètes décrites par les filaments. Autrement dit, il nous faut trouver un schéma de discrétisation (opérateur discret) capable d'approximer les solutions du modèle continu (6.2–6.5) aux noeuds du maillage pour les différents instants. L'équation (6.2) contient une sous-équation aux dérivées partielles parabolique (équation de diffusion). Comme la discrétisation des équations aux dérivées partielles n'est pas triviale, nous détaillons dans la Section suivante la résolution numérique de l'équation de diffusion.

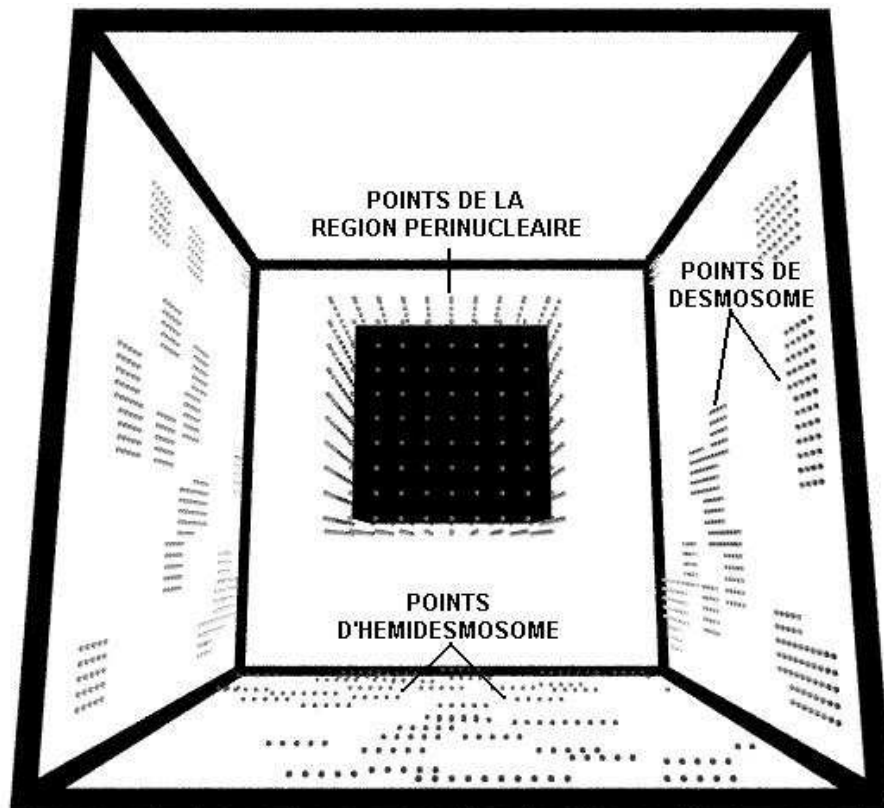


FIG. 6.2 *Discretisation du domaine cellule. Le cube noir positionné au centre de la cellule représente le noyau N. Les points gris entourant le noyau sont les noeuds de la région périnucléaire P. Sur les faces latérales du domaine cellule, les points gris représentent les noeuds des régions de desmosome D. Sur la face basale du domaine cellule, les points gris symbolisent les noeuds des régions d'hémidesmosomes H. Les noeuds cytoplasmiques sans autre caractère ne sont pas symbolisés sur cette Figure pour des raisons de lisibilité. Toutes les régions noires, représentant le noyau et les arêtes du domaine cellule n'appartiennent pas au domaine de travail.*

6.3 Résolution numérique de l'équation de diffusion par des méthodes d'approximation d'équations

Nous avons signalé, en introduction, l'existence de familles de méthodes de résolution des équations aux dérivées partielles. Nous avons choisi de résoudre numériquement l'équation adimensionnelle (6.2) par des méthodes d'approximation d'équations que l'on appelle aussi méthodes aux différences finies.

La forme homogène de l'équation adimensionnelle (6.2) est représentée par l'expression suivante

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (6.10)$$

qui est une équation de diffusion classique (équation de la chaleur).

Notation 6.3.1 On note $C_{i,j,k}^n$ la solution approximée de l'équation (6.10) au point de maillage (x_i, y_j, z_k, t_n) .

$$C_{i,j,k}^n = C(i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z, n\Delta t) \quad (6.11)$$

$C_{i,j,k}^n$ représente l'approximation de la solution exacte $C(x, y, z, t)$ de l'équation (6.10) au temps $n\Delta t$ au noeud $(i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z)$.

La résolution numérique de l'équation (6.10) procède par la définition d'un schéma de discrétisation. Avant de considérer que la solution du schéma de discrétisation est une approximation valable de la solution de l'équation (6.10), le schéma de discrétisation doit vérifier certaines conditions:

- le schéma de discrétisation doit représenter correctement l'équation d'origine (consistance)
- la solution du schéma de discrétisation au cours des itérations doit rester une solution du schéma de discrétisation (stabilité)
- la solution du schéma de discrétisation doit être une approximation convenable de la solution exacte (convergence)

6.3.1 Schéma de discrétisation

L'équation linéaire tridimensionnelle de diffusion (6.10), qui correspond à la forme homogène de l'équation (6.2), est mise sous forme discrétisée en remplaçant les dérivées partielles par des approximations discrètes aux différences.

En posant $C(., t) : t \mapsto C(x, y, z, t)$, on peut écrire les développements en série de Taylor:

$$C_{i,j,k}^{n+1} = C_{i,j,k}^n + \frac{\Delta t}{1!} \left(\frac{\partial C}{\partial t} \right)_{i,j,k}^n + \frac{\Delta t^2}{2!} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial t^2} \right)_{i,j,k}^n + \theta(\Delta t^3) \quad (6.12)$$

L'expression (6.12) représente l'approximation de la valeur de $C(x,y,z,t+1)$ à partir de sa valeur au point t selon la notation (6.11).

De même en posant $C(x,.) : x \mapsto C(x,y,z,t)$, on peut également écrire les développements en série de Taylor:

$$\begin{aligned} C_{i+1,j,k}^n &= C_{i,j,k}^n + \frac{\Delta x}{1!} \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{i,j,k}^n + \frac{\Delta x^2}{2!} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)_{i,j,k}^n + \frac{\Delta x^3}{3!} \left(\frac{\partial^3 C}{\partial x^3} \right)_{i,j,k}^n \\ &+ \frac{\Delta x^4}{4!} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial x^4} \right)_{i,j,k}^n + \frac{\Delta x^5}{5!} \left(\frac{\partial^5 C}{\partial x^5} \right)_{i,j,k}^n + \theta(\Delta x^6) \end{aligned} \quad (6.13)$$

L'expression (6.13) représente l'approximation de $C(x+1,y,z,t)$ autour du point x selon la notation (6.11).

$$\begin{aligned} C_{i-1,j,k}^n &= C_{i,j,k}^n - \frac{\Delta x}{1!} \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{i,j,k}^n + \frac{\Delta x^2}{2!} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)_{i,j,k}^n - \frac{\Delta x^3}{3!} \left(\frac{\partial^3 C}{\partial x^3} \right)_{i,j,k}^n \\ &+ \frac{\Delta x^4}{4!} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial x^4} \right)_{i,j,k}^n - \frac{\Delta x^5}{5!} \left(\frac{\partial^5 C}{\partial x^5} \right)_{i,j,k}^n + \theta(\Delta x^6) \end{aligned} \quad (6.14)$$

L'expression (6.14) représente l'approximation de $C(x-1,y,z,t)$ autour du point x selon la notation (6.11).

L'équation (6.12) donne une approximation discrète de la dérivée $\left(\frac{\partial C}{\partial t} \right)_{i,j,k}^n$:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t} \right)_{i,j,k}^n = \frac{C_{i,j,k}^{n+1} - C_{i,j,k}^n}{\Delta t} - \frac{\Delta t}{2} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial t^2} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta t^2) \quad (6.15)$$

De même si l'on fait la somme des équations (6.13) et (6.14), l'approximation discrète de $\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)_{i,j,k}^n$ est obtenue:

$$\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)_{i,j,k}^n = \frac{C_{i-1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i+1,j,k}^n}{\Delta x^2} - \frac{\Delta x^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial x^4} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta x^4) \quad (6.16)$$

De la même manière, des approximations de $\left(\frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right)_{i,j,k}^n$ et $\left(\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right)_{i,j,k}^n$ sont calculées.

Ces approximations sont incorporées dans l'équation (6.10):

$$\begin{aligned} &\frac{C_{i,j,k}^{n+1} - C_{i,j,k}^n}{\Delta t} - \frac{\Delta t}{2} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial t^2} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta t^2) = \\ &\left(\frac{C_{i-1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i+1,j,k}^n}{\Delta x^2} - \frac{\Delta x^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial x^4} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta x^4) \right. \\ &+ \frac{C_{i,j-1,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j+1,k}^n}{\Delta y^2} - \frac{\Delta y^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial y^4} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta y^4) \\ &\left. + \frac{C_{i,j,k-1}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j,k+1}^n}{\Delta z^2} - \frac{\Delta z^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial z^4} \right)_{i,j,k}^n - \theta(\Delta z^4) \right) \end{aligned} \quad (6.17)$$

Alors le schéma de discrétisation aux différences finies obtenu est:

$$\begin{aligned} \frac{C_{i,j,k}^{n+1} - C_{i,j,k}^n}{\Delta t} = & \frac{C_{i-1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i+1,j,k}^n}{\Delta x^2} + \frac{C_{i,j-1,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j+1,k}^n}{\Delta y^2} \\ & + \frac{C_{i,j,k-1}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j,k+1}^n}{\Delta z^2} \end{aligned} \quad (6.18)$$

Ce schéma est un schéma explicite à deux niveaux de temps $n\Delta t$ et $(n+1)\Delta t$, il peut être également écrit de la manière suivante:

$$\begin{aligned} C_{i,j,k}^{n+1} = & C_{i,j,k}^n + \Delta t \left(\frac{C_{i-1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i+1,j,k}^n}{\Delta x^2} + \frac{C_{i,j-1,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j+1,k}^n}{\Delta y^2} \right. \\ & \left. + \frac{C_{i,j,k-1}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j,k+1}^n}{\Delta z^2} \right) \end{aligned} \quad (6.19)$$

6.3.2 Consistance

L'équation aux dérivées partielles (6.10) est remplacée par le schéma aux différences finies (6.18). Si le schéma considéré représente effectivement l'équation, alors ce schéma est dit consistant.

L'erreur de troncature $R(\cdot)$ (ou erreur de discrétisation) est la différence entre le schéma de discrétisation (6.18) et l'équation d'origine (6.17):

$$\begin{aligned} R(C) = & \frac{\Delta t}{2} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial t^2} \right)_{i,j,k} - \frac{\Delta x^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial x^4} \right)_{i,j,k} - \frac{\Delta y^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial y^4} \right)_{i,j,k} - \frac{\Delta z^2}{12} \left(\frac{\partial^4 C}{\partial z^4} \right)_{i,j,k} \\ & + \theta(\Delta t^2) + \theta(\Delta x^4) + \theta(\Delta y^4) + \theta(\Delta z^4) \end{aligned} \quad (6.20)$$

elle représente l'erreur qui est faite lorsqu'un opérateur continu est approximé par un opérateur discret.

L'approximation de l'équation d'origine par le schéma de discrétisation est consistante, si l'erreur de troncature $R(\cdot)$ tend vers zéro lorsque les pas de discrétisation (spatiaux et temporel) tendent vers zéro.

$$(\Delta x, \Delta y, \Delta z, \Delta t) \rightarrow 0 \Rightarrow R(C) \rightarrow 0$$

Sous l'hypothèse de milieu isotrope, l'erreur de troncature (6.20) est de l'ordre de $\theta(\Delta t) + \theta(\Delta x^2)$.

Donc l'approximation de l'équation (6.17) par le schéma (6.18) est consistante ou cohérente. Le schéma (6.18) représente exactement l'équation d'origine (6.10) lorsque les pas de discrétisation tendent vers zéro.

6.3.3 Stabilité

La stabilité d'un schéma numérique implique que la solution soit bornée quand $\Delta t \rightarrow 0$. L'étude de la stabilité du schéma considéré (6.18), est faite par le principe de Von

Neumann, qui consiste à introduire une perturbation dans la solution. Cette perturbation est supposée développable en série de Fourier et la contribution de chaque variable indépendante (x , y , z et t) peut être séparée. La perturbation est de la forme:

$$\psi(t)e^{i\alpha x}e^{i\beta y}e^{i\gamma z}$$

où α , β et γ sont des constantes positives.

En posant $C_{i,j,k}^n = \psi(t)e^{i\alpha x}e^{i\beta y}e^{i\gamma z}$, la perturbation est introduite dans le schéma de discrétisation:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(t + \Delta t) - \psi(t)}{\Delta t} e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} = & \psi(t) \left(\frac{e^{i\alpha(x-\Delta x)} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} - 2e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} + e^{i\alpha(x+\Delta x)} e^{i\beta y} e^{i\gamma z}}{\Delta x^2} \right. \\ & + \frac{e^{i\alpha x} e^{i\beta(y-\Delta y)} e^{i\gamma z} - 2e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} + e^{i\alpha x} e^{i\beta(y+\Delta y)} e^{i\gamma z}}{\Delta y^2} \\ & \left. + \frac{e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma(z-\Delta z)} - 2e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} + e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma(z+\Delta z)}}{\Delta z^2} \right) \end{aligned} \quad (6.21)$$

en posant $r_x = \frac{\Delta t}{\Delta x^2}$, $r_y = \frac{\Delta t}{\Delta y^2}$ et $r_z = \frac{\Delta t}{\Delta z^2}$, on obtient:

$$\begin{aligned} \left(\psi(t + \Delta t) - \psi(t) \right) e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} = & \psi(t) \left(r_x e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} \left(e^{i\alpha\Delta x} + e^{-i\alpha\Delta x} - 2 \right) \right. \\ & + r_y e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} \left(e^{i\beta\Delta y} + e^{-i\beta\Delta y} - 2 \right) \\ & \left. + r_z e^{i\alpha x} e^{i\beta y} e^{i\gamma z} \left(e^{i\gamma\Delta z} + e^{-i\gamma\Delta z} - 2 \right) \right) \end{aligned} \quad (6.22)$$

compte tenu de la relation $e^{i\alpha\Delta x} + e^{-i\alpha\Delta x} = 2\cos(\alpha\Delta x)$, on a alors:

$$\psi(t + \Delta t) = \psi(t) \left(1 + 2r_x \left(\cos(\alpha\Delta x) - 1 \right) + 2r_y \left(\cos(\beta\Delta y) - 1 \right) + 2r_z \left(\cos(\gamma\Delta z) - 1 \right) \right)$$

par la relation $\cos(\alpha\Delta x) - 1 = -2\sin^2\left(\frac{\alpha\Delta x}{2}\right)$, on obtient alors:

$$\psi(t + \Delta t) = \psi(t) \left(1 - 4r_x \sin^2\left(\frac{\alpha\Delta x}{2}\right) - 4r_y \sin^2\left(\frac{\beta\Delta y}{2}\right) - 4r_z \sin^2\left(\frac{\gamma\Delta z}{2}\right) \right)$$

La stabilité du schéma est assurée si la solution $\psi(t)$ reste bornée lorsque $\Delta \rightarrow 0$. Cette condition peut être également exprimée via la notion de facteur d'amplification ξ .

Le facteur d'amplification est le rapport de deux termes correspondant à une même solution prise à deux instants consécutifs $n\Delta t$ et $(n+1)\Delta t$. Si ce rapport est borné ($|\xi| \leq 1$), alors les erreurs inévitables faites entre le temps passé et le temps présent ne s'amplifient pas, les solutions restent du même ordre.

Le facteur d'amplification ξ est donc égal à:

$$\xi = \frac{\psi(t + \Delta t)}{\psi(t)} = 1 - 4r_x \sin^2\left(\frac{\alpha \Delta x}{2}\right) - 4r_y \sin^2\left(\frac{\beta \Delta y}{2}\right) - 4r_z \sin^2\left(\frac{\gamma \Delta z}{2}\right)$$

La stabilité est assurée si $-1 \leq \xi \leq 1$.

$$-1 \leq 1 - 4r_x \sin^2\left(\frac{\alpha \Delta x}{2}\right) - 4r_y \sin^2\left(\frac{\beta \Delta y}{2}\right) - 4r_z \sin^2\left(\frac{\gamma \Delta z}{2}\right) \leq 1$$

L'inégalité de droite étant toujours vérifiée, la condition de stabilité se restreint à:

$$-1 \leq 1 - 4r_x \sin^2\left(\frac{\alpha \Delta x}{2}\right) - 4r_y \sin^2\left(\frac{\beta \Delta y}{2}\right) - 4r_z \sin^2\left(\frac{\gamma \Delta z}{2}\right)$$

Sous l'hypothèse de milieu isotrope, $r_x = r_y = r_z$, la condition de stabilité est:

$$r_x = \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \leq \frac{1}{6} \quad (6.23)$$

Les nombres r_x , r_y et r_z sont appelés le nombre de Courant.

Le pas Δx est fixé lors de la discrétisation spatiale (Eq. 6.7), il faut que le pas de temps Δt soit suffisamment petit pour assurer la stabilité du schéma.

$$\Delta t \leq \frac{\Delta x^2}{6} \quad (6.24)$$

Le choix de $r_x > \frac{1}{6}$ conduit à un schéma instable, *i.e.* à l'obtention de valeurs aberrantes pour les concentrations adimensionnelles en sous-unités de cytokératine libre, les erreurs s'amplifient à chaque pas de temps. Par contre pour un choix de $r_x \leq \frac{1}{6}$, les solutions restent bornées. Le schéma considéré est conditionnellement stable.

6.3.4 Convergence

Un schéma aux différences finies est convergent si la différence entre la solution exacte et la solution approchée tend vers 0 quand les pas de discrétisation tendent vers 0.

$$(\Delta x, \Delta y, \Delta z, \Delta t) \rightarrow 0 \implies \left(C_{i,j,k}^n - C(i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z, n\Delta t) \right) \rightarrow 0$$

Théorème 6.3.1 (Théorème de Lax) *Pour un problème linéaire et bien posé, la consistance et la stabilité sont nécessaires et suffisantes pour assurer la convergence.*

Le schéma explicite d'Euler (6.18), choisi pour approximer le problème linéaire (6.10), est consistant et conditionnellement stable (6.23), alors selon le théorème de Lax, le schéma considéré est convergent sous la condition de stabilité ($\frac{\Delta t}{\Delta x^2} \leq \frac{1}{6}$), avec une erreur de troncature d'ordre $\theta(\Delta t) + \theta(\Delta x^2)$ (sous l'hypothèse de milieu isotrope).

6.3.5 Résolution numérique

Lorsque les schémas de discrétisation possèdent les propriétés de consistance, stabilité et convergence, ils peuvent alors être résolus numériquement. Plusieurs méthodes permettent de simuler le processus de diffusion. Deux de ces méthodes, utilisant un schéma de discrétisation explicite, sont exposées: la méthode Liebmann et la méthode de relaxation.

Le premier algorithme simule le processus de diffusion par la méthode de Liebmann (page 134). La constante ϵ , appelée la tolérance, est définie telle que $\epsilon \gg 0$ permet la convergence du processus.

Algorithme 4 Algorithme de simulation du processus de diffusion: méthode de Liebmann

Répéter

Pour $k = 0$ à N **Faire**

Pour $j = 0$ à N **Faire**

Pour $i = 0$ à N **Faire**

$$C_{i,j,k}^{m+1} = C_{i,j,k}^m + \frac{\Delta t}{\delta^2} (C_{i+1,j,k}^m + C_{i-1,j,k}^m + C_{i,j+1,k}^m + C_{i,j-1,k}^m + C_{i,j,k+1}^m + C_{i,j,k-1}^m - 6C_{i,j,k}^m)$$

Fin Pour

Fin Pour

Fin Pour

Jusqu'à $|C_{ijk}^{m+1} - C_{ijk}^m| \leq \epsilon$

Le second algorithme simule le processus de diffusion par la méthode de relaxation (page 135). Le facteur λ de relaxation est défini tel que $1 \leq \lambda \leq 2$.

6.4 Modèle de simulation

La solution numérique de l'équation (6.2) est obtenue, pour tous les noeuds de caractéristique transporteur, en utilisant le schéma explicite aux différences finies (6.19) (opérateur de différences finies décentrées "amont" pour le temps et opérateur de différences finies centrées pour l'espace) pour approcher la forme homogène (6.10), sous l'hypothèse de milieu isotrope ($\Delta x^2 = \Delta y^2 = \Delta z^2 = \delta$), et les formes discrétisées des

Algorithme 5 Algorithme de simulation du processus de diffusion: méthode de relaxation

Boucle

Pour $k = 0$ à N **Faire**

Pour $j = 0$ à N **Faire**

Pour $i = 0$ à N **Faire**

$$\tilde{C}_{i,j,k}^{n+1} = C_{i,j,k}^n + \frac{\Delta t}{\delta^2} (C_{i+1,j,k}^n + C_{i-1,j,k}^n + C_{i,j+1,k}^n + C_{i,j-1,k}^n + C_{i,j,k+1}^n + C_{i,j,k-1}^n - 6C_{i,j,k}^n)$$

$$C_{i,j,k}^{n+1} = \lambda \tilde{C}_{i,j,k}^{n+1} + (1 - \lambda) C_{i,j,k}^n$$

Fin Pour

Fin Pour

Fin Pour

Fin Boucle

termes de synthèse et de consommation (6.6).

$$C_{i,j,k}^{n+1} = C_{i,j,k}^n + \Delta t \left(\frac{C_{i+1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i-1,j,k}^n}{\delta^2} + \frac{C_{i,j+1,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j-1,k}^n}{\delta^2} + \frac{C_{i,j,k+1}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j,k-1}^n}{\delta^2} \right) + \Delta t \varpi F_{i,j,k}^n \quad (6.25)$$

où $F_{i,j,k}^n$ est l'approximation de la fonction $F(\cdot)$ au point (x_i, y_j, z_k, t_n) .

La condition initiale (6.3) est approximée par $C_{i,j,k}^0 = \Gamma$ pour tout i, j et k . Γ est une constante positive réelle à valeurs dans $[0,1]$.

Le schéma explicite d'Euler (6.25) représente la solution numérique de l'équation (6.2) qui peut être utilisé aux noeuds du cytoplasme n'appartenant pas à la frontière. Aux points appartenant à la frontière du cytoplasme, les conditions aux limites, qui sont définies dans l'équation (6.4), modifient le schéma de la solution numérique.

Pour les conditions s'appliquant sur la frontière externe $\partial\Omega$ du domaine cytoplasme Θ , des points artificiels ont été ajoutés au domaine cytoplasme, $x_{-1} = 0 - \delta$ et $x_{I+1} = 1 + \delta$ dans la direction ox , $y_{-1} = 0 - \delta$ et $y_{I+1} = 1 + \delta$ dans la direction oy , et $z_{-1} = 0 - \delta$ et $z_{I+1} = 1 + \delta$ dans la direction oz .

Les conditions aux bord de Neumann (6.4) sont alors approximées comme suit:

$$\frac{\partial C}{\partial n} \Big|_{\partial\Omega} = 0 \Leftrightarrow \begin{cases} -\frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x=x_0} \simeq -\frac{C_{1,j,k}^n - C_{-1,j,k}^n}{2\delta} = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x=x_I} \simeq \frac{C_{I+1,j,k}^n - C_{I-1,j,k}^n}{2\delta} = 0 \\ -\frac{\partial C}{\partial y} \Big|_{y=y_0} \simeq -\frac{C_{i,1,k}^n - C_{i,-1,k}^n}{2\delta} = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial y} \Big|_{y=y_I} \simeq \frac{C_{i,I+1,k}^n - C_{i,I-1,k}^n}{2\delta} = 0 \\ -\frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=z_0} \simeq -\frac{C_{i,j,1}^n - C_{i,j,-1}^n}{2\delta} = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=z_I} \simeq \frac{C_{i,j,I+1}^n - C_{i,j,I-1}^n}{2\delta} = 0 \end{cases} \quad (6.26)$$

Les dérivées normales aux faces qui sont perpendiculaires à l'axe ox (resp. yo , resp. zo) donnent la condition $C_{i-1,j,k}^n = C_{i+1,j,k}^n$ (resp. $C_{i,j,-1,k}^n = C_{i,j,+1,k}^n$, resp. $C_{i,j,k-1}^n = C_{i,j,k+1}^n$), aux points de coordonnées spatiales x_0 et x_I (resp. y_0 et y_I , resp. z_0 et z_I), qui est utilisée dans le schéma explicite (6.25) [81]. Nous procédons de la même façon pour approximer les conditions aux bords de Neumann s'appliquant aux noeuds de la frontière interne ∂N du domaine cytoplasme.

Le nombre de Courant est utilisé comme critère de stabilité des solutions numériques, et permet de déterminer la valeur maximale du pas de temps Δt (6.24). En outre, le pas de temps Δt doit être plus grand que l'échelle de temps d'assemblage latéral des tétramères en *ULF* (un processus qui n'est pas décrit dans le modèle). Pour tous les noeuds du domaine cytoplasme, le processus de diffusion est résolu numériquement en utilisant ce schéma explicite itéré avec l'algorithme de Liebmann [37].

Nous notons $\mathcal{F}_{i,j,k}^n$ l'approximation de la fonction de synthèse $\mathcal{F}(\cdot)$ au point (x_i, y_j, z_k, t_n) . Pour tous les points (x_i, y_j, z_k, t_n) du maillage, la quantité de pool soluble sécrétée dans un volume unité est évaluée à travers la fonction $\mathcal{F}_{i,j,k}^n$. La dégradation du pool soluble au point (x_i, y_j, z_k, t_n) dépend de l'initiation de filament ou de la pousse de filament à ce point. L'occurrence de l'un de ces deux événements, au point (x_i, y_j, z_k, t_n) , implique qu'une densité de pool soluble égale à σ_{min} est consommée.

Pour tous les points (x_i, y_j, z_k, t_n) , la susceptibilité d'initiation de filaments est calculée par l'expression donnée par l'équation (5.24) et est comparée à la fonction de seuil $p(\cdot)$.

Tous les points (x_i, y_j, z_k, t_n) vérifiant l'équation (5.25) deviennent des points d'initiation de filaments et par conséquent des points filaments: le noeud $(x_i, y_j, z_k) = \beta$, au temps t_n , est le site d'initiation d'un filament. Simultanément au processus de diffusion, l'initiation et la pousse des filaments sont réalisées en des points du maillage: une trajectoire (un filament) est un chemin discret du maillage. Contrairement aux processus environnementaux, les processus de construction des filaments utilisent un maillage en 26-connectivité (Eq. 6.9).

Pour toutes iterations $n\Delta t$, à toutes les têtes de filaments n'ayant pas encore atteint la frontière du domaine, la trajectoire de croissance est calculée selon l'équation (5.9). Si la densité moyenne de pool soluble autour de la tête d'un filament est inférieure à σ_{min} , le filament ne se développe pas. Pour toutes têtes $X_\beta(t)$ de filaments en croissance, l'approximation du gradient local de concentration est obtenue par différence centrée.

Le vecteur aléatoire tridimensionnel v , qui modélise les perturbations de l'environnement intracellulaire résultant de l'agitation moléculaire, est obtenu par un tirage aléatoire sous les conditions suivantes: les composantes v_x , v_y et v_z de v sont indépendantes, des variables aléatoires uniformément distribuées, à valeurs dans $[-\sqrt{3}\delta, \sqrt{3}\delta]$. Le vecteur v est alors normalisé et multiplié par un scalaire $\vartheta > 0$ dont la valeur est inférieure à 1, nous avons donc $\|v\| = \vartheta$. La valeur de ϑ est choisie arbitrairement de façon à ce que l'amplitude de l'agitation moléculaire reste dans des bornes admissibles, afin d'éviter que la stochasticité devienne le processus principal déterminant la dynamique.

La courbure le long du filament $X_\beta(\cdot)$ est calculée, à chaque tête $(x_i^\beta, y_j^\beta, z_k^\beta, t_n)$, selon l'équation (5.28) qui est approximée par des opérateurs de différences finies premières décentrées "amont" [22], et des opérateurs de différences finies secondes centrées, au point filament $(x_{i'}^\beta, y_{j'}^\beta, z_{k'}^\beta, t_{n-1})$. De la même façon, le vecteur tangent à une tête de filament donné est approximé par un opérateur de différences finies premières décentrées "amont" au point précédent le dernier point du filament.

6.5 Discussion

Le modèle de simulation proposé, résultant de la discrétisation du modèle mathématique d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine, travaille en coordonnées cartésiennes car le domaine spatial de définition est extrêmement compliqué ainsi que les conditions aux bords s'appliquant à l'équation du pool soluble.

Nous avons utilisé un schéma de discrétisation explicite pour résoudre numériquement l'équation de diffusion. Ce schéma est conditionnellement stable, mais d'une grande simplicité, alors que d'autres schémas (par exemple, le schéma implicite pur) existent avec de meilleures qualités quant à la stabilité (schéma inconditionnellement stable), mais nécessitent des calculs plus longs.

Tous les calculs de consistance, stabilité et convergence développés dans ce Chapitre sont largement repris dans de nombreux ouvrages dans les cas monodimensionnel et bidimensionnel [49, 68].

Le modèle de simulation est implémenté en langage *C*, compilé et exécuté sur un Pentium III 600Mhz pourvu de 128M de mémoire. Le programme *C* génère deux types de fichiers, l'un contenant les densités de pool soluble en chaque noeud du maillage, et l'autre composé des coordonnées spatiales des noeuds qui constituent les chemins discrets correspondant aux filaments. Des résultats de simulations numériques sont exposés dans le Chapitre suivant.

7. Résultats expérimentaux

Dans ce Chapitre, nous présentons un certain nombre de résultats d'expériences numériques réalisées à partir de l'implémentation du modèle de simulation exposé dans le Chapitre 6. Une étude quantitative du comportement du modèle est effectuée en examinant les variations de paramètres de quantification sous l'effet de certains paramètres du modèle. Enfin, les résultats obtenus sont discutés.

Sommaire

| | | |
|------------|---|------------|
| 7.1 | Quelques résultats expérimentaux | 139 |
| 7.1.1 | Champs de concentration de pool soluble | 140 |
| 7.1.2 | Réseau de cytokératine | 142 |
| 7.2 | Etude quantitative du comportement du modèle | 147 |
| 7.2.1 | Effet du coefficient de diffusion | 149 |
| 7.2.2 | Effet de la stratégie d'initiation de filaments | 149 |
| 7.2.3 | Effet de l'agitation moléculaire | 151 |
| 7.2.4 | Effet du pas de temps | 154 |
| 7.3 | Discussion sur les résultats | 157 |

Dans ce Chapitre, nous présentons quelques uns des résultats numériques obtenus par le modèle de simulation exposé dans le Chapitre 6. Ensuite, une étude quantitative du comportement du modèle en fonction de certains de ses paramètres est proposée. Pour conclure, nous discutons des résultats obtenus.

7.1 Quelques résultats expérimentaux

Les simulations numériques sont réalisées sur une grille tridimensionnelle pourvue d'un maillage cubique, qui représente une cellule épithéliale, formée de noeuds dont le nombre varie de 20 à 100 par face selon la taille de la simulation. Tous les résultats présentés dans ce Chapitre sont obtenus à partir de simulations effectuées sur une grille constituée de 60 noeuds par face et utilisant les valeurs de paramètres données dans le Tableau 7.1. Dans ce cas, pour une longueur d'arête de cellule égale à $20\mu m$ [1], le pas de discrétisation spatial correspond à $\delta = 3.4 \times 10^{-1}\mu m$.

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| l | $20\mu m$ |
| \bar{C} | $0.5 - 0.9\%$ |
| η | 5% |
| π | $20 - 50\%$ |
| t_p | $T_0 = 0$ minutes |
| t_h | 15 minutes |
| t_d | 20 minutes |
| T_{max} | 2160 minutes |
| φ_p | 0.85 tétramères par unité de volume |
| φ_h | 1 tétramères par unité de volume |
| φ_d | 1.5 tétramères par unité de volume |

TAB. 7.1 Valeurs des paramètres utilisés dans les simulations.

Les résultats des simulations sont donnés sous deux formes, l'une décrit les champs de concentration dans le domaine intracellulaire résultant de l'environnement extracellulaire (Fig. 7.1), l'autre représente le réseau de cytokératine (Fig. 7.2–7.4).

7.1.1 Champs de concentration de pool soluble

Les champs de concentration de pool soluble sont visualisés par des représentations volumétriques dans lesquelles les densités de pool soluble sont représentées par des niveaux de gris, où le gris foncé (noir) correspond à de basse densité et le gris clair (blanc) correspond à de haute intensité (Fig. 7.1).

La Figure 7.1 comporte six sous-figures, qui sont les représentations volumétriques des champs de concentration de pool soluble pour le jeu de paramètres suivant " $D = 5 \times 10^{-3} \mu m^2 s^{-1}$, $\Delta t = 3.7 s$ ", pour six temps différents. Cette Figure permet de visualiser l'évolution des champs de concentration de pool soluble au cours du temps.

Une représentation volumétrique permet de visualiser un objet tridimensionnel en ne représentant que certains plans de cet objet, en l'occurrence les trois plans représentés ont respectivement les caractéristiques suivantes $x = 58$, $y = 33$ et $z = 1$ (Fig. 7.1). Le plan défini par $y = 33$ contient le noyau qui apparaît alors comme un carré noir.

La sous-figure 7.1(a) décrit l'état des champs de concentration de pool soluble à 15 minutes. A cet instant, seul le champ centripète de force autour du noyau, préservant l'intégrité nucléaire, est actif. Par conséquent, la synthèse est confinée autour du noyau.

La sous-figure 7.1(b) correspond à l'état du pool soluble après 30 minutes. A cet instant, les hémidesmosomes et les desmosomes sont en place. Les zones gris clair sur les surfaces latérales (resp. sur la surface basale) représentent les plaques de desmosome (resp. les plaques d'hémidesmosome). Ces régions correspondent à d'autres régions de synthèse protéique que celles situées autour du noyau. L'intensité de la synthèse est plus importante aux desmosomes qu'aux hémidesmosomes.

La sous-figure 7.1(c) représente les champs de concentration de pool soluble à 60

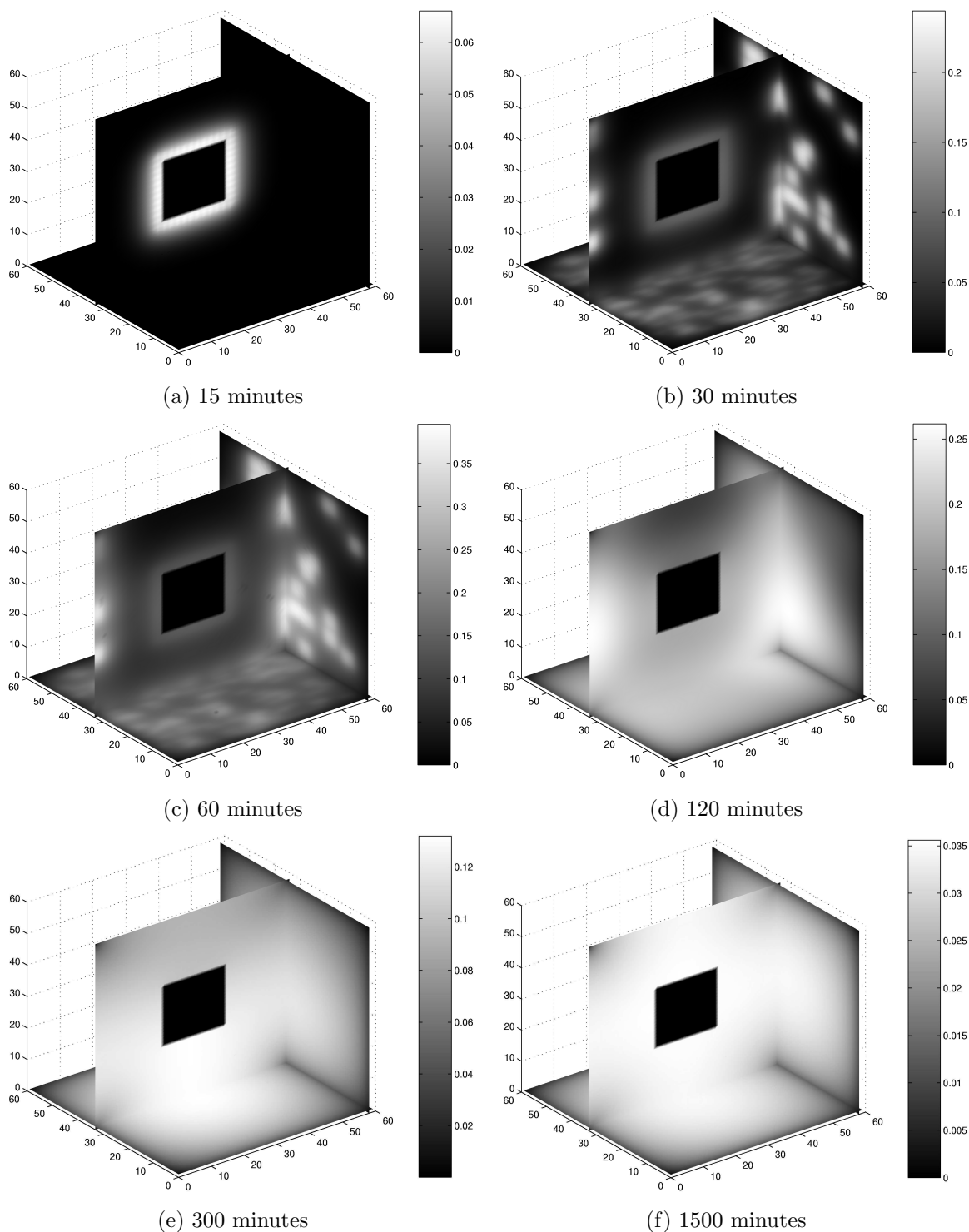


FIG. 7.1 *Champs de concentration de pool soluble à différents temps ($D = 5 \times 10^{-3} \mu^2 s^{-1}$, $\Delta t = 3.7s$). Les densités de pool soluble sont représentées selon une échelle de niveaux de gris décrite par les palettes.*

minutes, la synthèse se poursuit et le pool soluble se propage à travers le cytoplasme.

La sous-figure 7.1(d) présente l'état du pool soluble à 120 minutes, le processus de diffusion se poursuit, par contre la synthèse est terminée.

Les sous-figures 7.1(e) et 7.1(f) décrivent le pool soluble à respectivement 300 et 1500 minutes. A ces instants, le pool soluble se propage toujours dans le cytoplasme en s'approchant de l'homogénéisation des concentrations.

Nous notons que la condition d'absence de flux transmembranaire est bien respectée, le pool soluble est bien confiné au compartiment cytoplasme (Eq. 5.3). Le noyau est toujours dépourvu de pool soluble (Fig. 7.1(a)–7.1(e)), et la conservation de la masse est bien vérifiée.

Simultanément à la diffusion du pool soluble dans le compartiment cytoplasme, le réseau de cytokératine se construit.

7.1.2 Réseau de cytokératine

La visualisation du réseau de cytokératine est réalisée par images de synthèse (Fig. 7.2–7.4), qui sont générées au moyen du logiciel de visualisation de scènes 3D par lancé de rayon, PovRay¹. Par ce procédé, un filament est construit à partir d'un assemblage de cylindres, mis bout à bout, dont les extrémités correspondent à deux points consécutifs du chemin discret correspondant à ce filament.

La Figure 7.2 présente l'établissement au cours du temps du réseau de cytokératine dans une cellule épithéliale. Le réseau, montré dans cette Figure, correspond à la simulation présentée par la Figure 7.1 ($D = 5 \times 10^{-3} \mu^2 s^{-1}$, $\Delta t = 3.7s$). La stratégie d'initiation de filaments choisie est une initiation dans le cortex cellulaire. La sous-figure 7.2(a) représente le réseau de cytokératine après 40 minutes. A cet instant, quelques filaments sont initiés dans le cortex cellulaire à partir des plaques de desmosome. Ensuite, les filaments tapissent les plaques de desmosome (Fig. 7.2(b)) avant de se propager dans le cytoplasme (Fig. 7.2(c)). Un réseau s'établit alors progressivement dans la cellule, reliant la membrane cellulaire à la région périnucléaire (Fig. 7.2(d)–7.2(f)). Après 104 minutes, le réseau de cytokératine est stabilisé (Fig. 7.2(f)).

Pour une initiation dans le cortex cellulaire, les filaments s'initient à partir des plaques de desmosome et d'hémidesmosome, ils commencent par tapisser ces plaques avant de se propager dans le compartiment cytoplasmique et former un réseau reliant la membrane cellulaire à la région périnucléaire (Fig. 7.2).

La Figure 7.3 représente l'établissement du réseau de cytokératine au cours du temps d'une cellule épithéliale, pour une stratégie d'initiation de filaments en région périnucléaire avec un coefficient de diffusion $D = 10^{-2} \mu^2 s^{-1}$ et un pas de temps $\Delta t = 1s$. Après 4

1. Persistence Of Vision. <http://www.povray.org/>

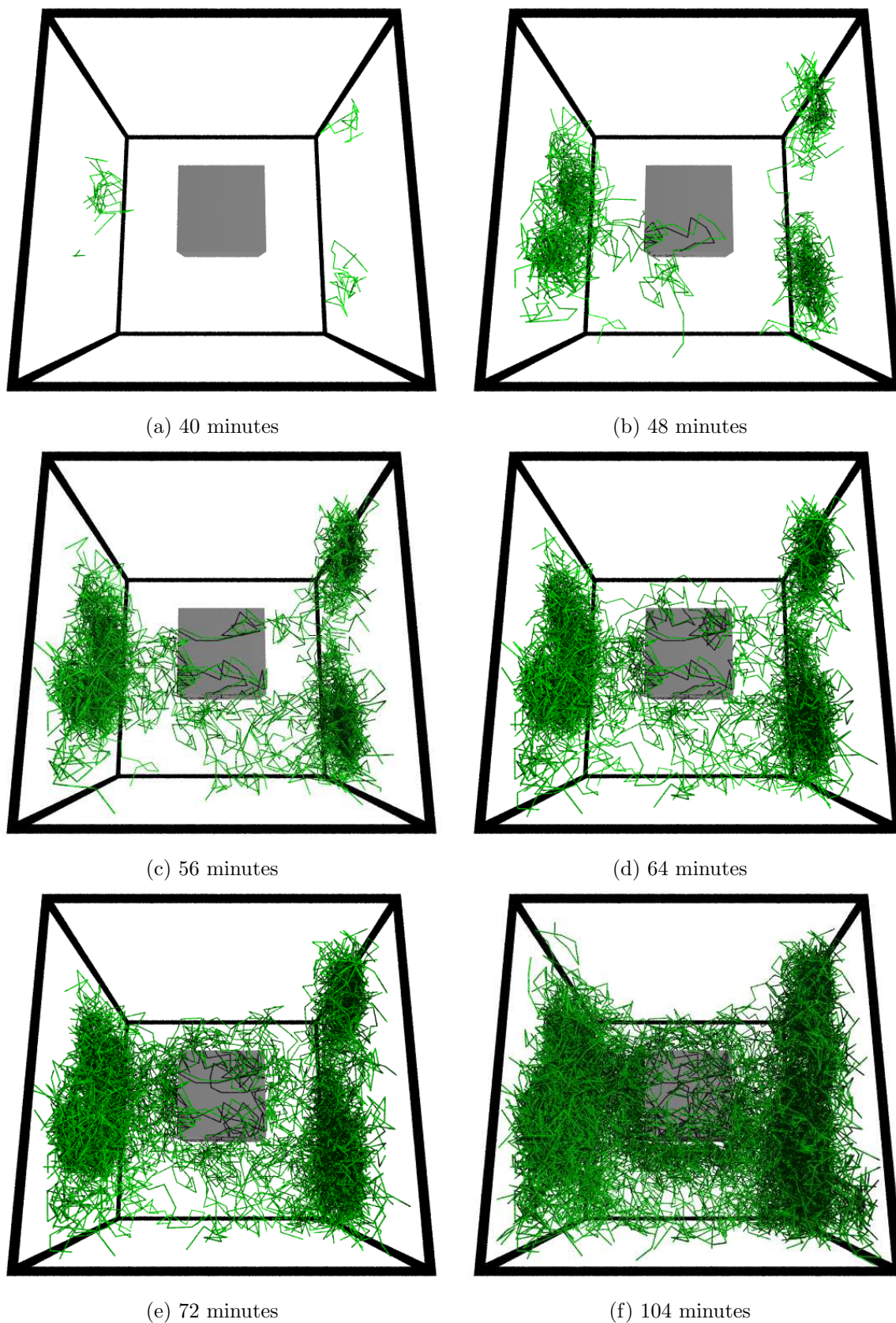


FIG. 7.2 Réseau de cytotéatine à différents instants, pour les paramètres de la Figure 7.1. La stratégie d'initiation de filaments spécifie une initiation dans le cortex cellulaire.

minutes, quelques filaments sont initiés dans la région périnucléaire et courent autour du noyau (Fig. 7.3(a)). Un réseau très dense se construit peu à peu dans la région périnucléaire, formant une cage autour du noyau (Fig. 7.3(a)–7.3(c)). Ensuite, les filaments se propagent dans le cytoplasme et un réseau, reliant la région périnucléaire à la membrane cellulaire, s'établit (Fig. 7.3(d)–7.3(f)). Après 36 minutes, le réseau de cytokératine est stabilisé (Fig. 7.3(f)).

Pour une initiation en région périnucléaire, les filaments s'initient dans la région périnucléaire et forment une sorte de cage, de filet, entourant le noyau, avant de se propager dans le cytoplasme pour former un réseau reliant l'enveloppe nucléaire à la membrane cellulaire (Fig. 7.3).

La Figure 7.4 décrit l'évolution au cours du temps du réseau de cytokératine pour un même coefficient de diffusion et un même pas de temps que la Figure 7.3 avec une stratégie d'initiation sans spécification de région d'initiation ($p(\cdot)$ est une fonction constante). Après 22 minutes, des filaments sont initiés dans le cortex cellulaire à partir des plaques de desmosome et d'hémidesmosome (zones intracellulaires où l'intensité de la synthèse est plus importante) (Fig. 7.4(a)). Comme précédemment, la propagation des filaments dans le cytoplasme à partir du cortex est devancée par un tapissage des plaques de desmosome et d'hémidesmosome (Fig. 7.4(b)). Après 26 minutes, des filaments sont initiés en région périnucléaire (Fig. 7.4(c)). Ensuite, après 30 minutes, un réseau, reliant la membrane cellulaire à la région périnucléaire, s'établit progressivement (Fig. 7.4(d)–7.4(f)). Après 42 minutes, le réseau de cytokératine est stabilisé (Fig. 7.4(f)).

Pour une initiation sans spécification de régions particulières, les filaments sont tout d'abord initiés à partir des plaques de desmosome, ensuite les filaments se développent à partir des plaques d'hémidesmosome et finalement à partir de la région périnucléaire. Les filaments tapissent les plaques de desmosome et d'hémidesmosome avant de se propager dans le cytoplasme et former un réseau reliant la membrane cellulaire à l'enveloppe nucléaire (Fig. 7.4).

Selon les valeurs de certains paramètres du modèle (le coefficient de diffusion, la stratégie d'initiation de filaments...), le réseau de cytokératine adopte des architectures différentes et un comportement dynamique différent. Afin d'identifier les effets de ces paramètres sur le comportement du modèle et plus particulièrement sur l'architecture du réseau de cytokératine, nous avons réalisé une étude quantitative.

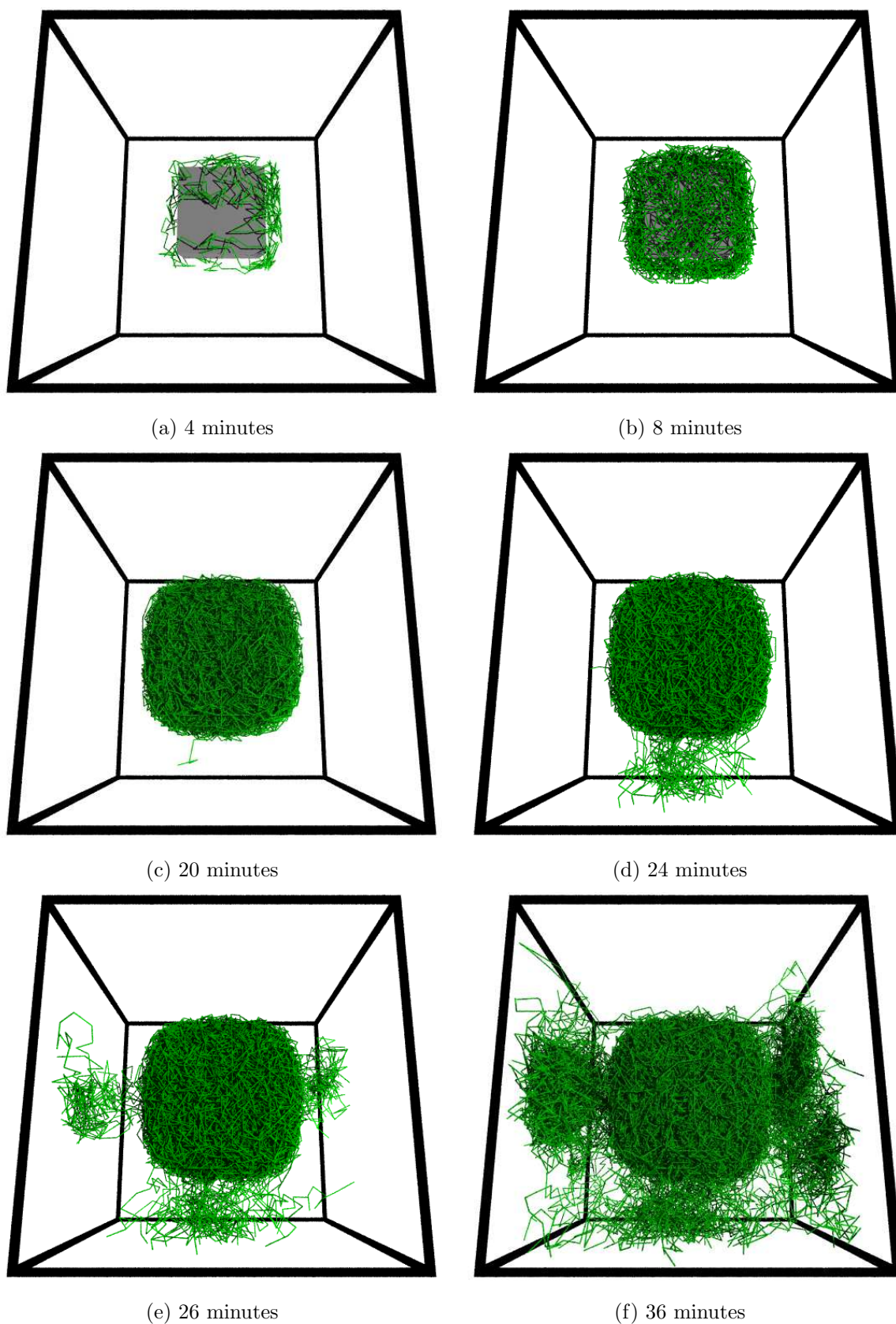


FIG. 7.3 Réseau de cytotkératine à différents instants, pour un coefficient diffusion $D = 10^{-2} \mu^2 s^{-1}$ et un pas de temps de discrétisation $\Delta t = 1s$. La stratégie d'initiation de filaments spécifie une initiation en région périnucléaire.

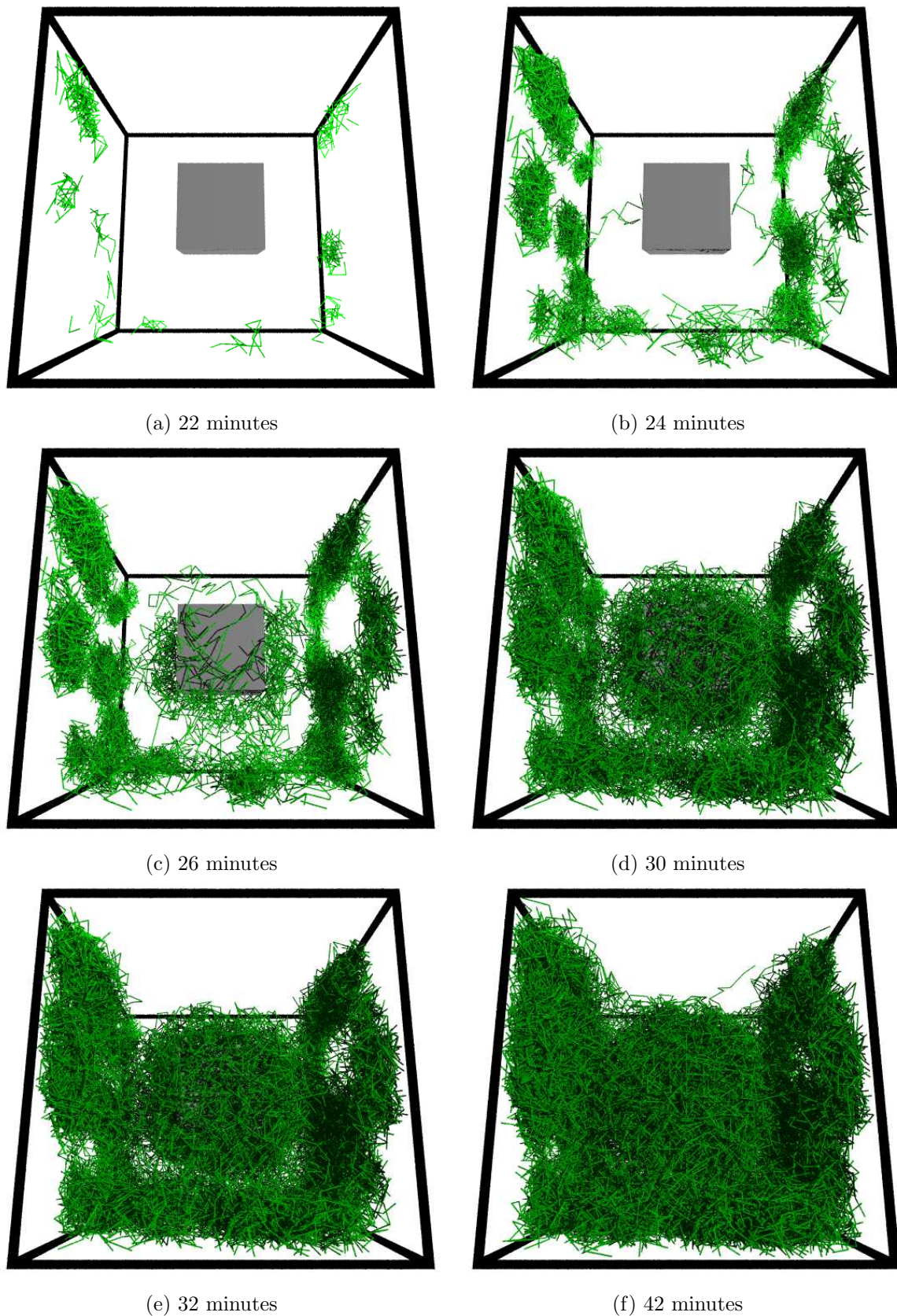


FIG. 7.4 Réseau de cytokératine à différents temps, pour les mêmes paramètres que la Figure 7.3 sauf pour la fonction seuil $p(\cdot)$ qui est une fonction constante $p(\cdot) = 0.2$ (pas de spécification spatiale d'initiation).

7.2 Etude quantitative du comportement du modèle

Afin de quantifier l'architecture des réseaux de cytokératine selon les valeurs des paramètres du modèle, ce qui revient à étudier quantitativement le comportement du modèle, nous avons extrait plusieurs paramètres relatifs aux réseaux et aux filaments:

- le nombre total de filaments,
- la longueur moyenne des filaments,
- la courbure moyenne des filaments.

Définition 7.2.1 *Le nombre total de filaments à l'instant t , noté $\mathcal{N}(t)$, est défini comme le nombre de filaments constituant le réseau, initiés depuis T_0 jusqu'à l'instant t inclus.*

Interprétation – *Le nombre total de filaments $\mathcal{N}(t)$ représente exactement le cardinal de l'union des ensembles $\mathcal{B}(t)$ (Déf 5.3.1) et $\mathcal{I}(t)$ (Déf 5.3.3):*

$$\mathcal{N}(t) = \#(\mathcal{B}(t) \cup \mathcal{I}(t))$$

Définition 7.2.2 *La longueur totale d'un filament $X_\beta(\cdot)$ est définie comme sa longueur d'arc et est calculée de la manière suivante [37]:*

$$\mathcal{A}(X_\beta(\cdot)) = \int_{d_i(\beta)}^{d_b(\beta)} \sqrt{x'_\beta(t)^2 + y'_\beta(t)^2 + z'_\beta(t)^2} dt$$

Définition 7.2.3 *La longueur moyenne des filaments à l'instant t , notée $\mathcal{L}(t)$, est la somme des longueurs des filaments à l'instant t pondérée par le nombre total de filaments à l'instant t .*

$$\mathcal{L}(t) = \frac{1}{\mathcal{N}(t)} \sum_{\beta \in \mathcal{B}(t) \cup \mathcal{I}(t)} \int_{d_i(\beta)}^t \sqrt{x'_\beta(u)^2 + y'_\beta(u)^2 + z'_\beta(u)^2} du$$

Définition 7.2.4 *La courbure moyenne d'un filament est calculée comme la somme des courbures (Eq. 5.27) en chacun des points du filament pondérées par la longueur d'arc correspondant.*

Définition 7.2.5 *La courbure moyenne des filaments à l'instant t , notée $\mathcal{K}(t)$, est la somme des courbures moyennes de chaque filament pondérée par le nombre total de filaments.*

En utilisant ces paramètres de quantification, les effets de différents paramètres du modèle sur son comportement, c'est à dire sur l'architecture du réseau de cytokératine,

peuvent être observés. Les paramètres dont l'influence est examinée sont le coefficient de diffusion D , la stratégie d'initiation des filaments $p(\cdot)$ et l'agitation moléculaire $\|v\| = \vartheta$.

Par ailleurs, l'effet du pas de discrétisation du temps Δt , qui n'est pas à proprement dit un paramètre du modèle mais un paramètre de simulation, est observé afin de déterminer son influence sur les résultats des expériences.

Dans toute la suite de cette Section, les Figures (7.5–7.7) comportent trois sous-figures dont les légendes sont respectivement:

- (a) représente l'évolution au cours du temps du nombre total de filaments $\mathcal{N}(t)$ constituant le réseau jusqu'à la stabilisation du processus de construction.
- (b) décrit la variation en fonction du temps de la longueur moyenne des filaments $\mathcal{L}(t)$ jusqu'à la stabilisation du processus de construction.
- (c) montre en fonction du temps la courbure moyenne des filaments $\mathcal{K}(t)$ jusqu'à stabilisation du processus de construction.

7.2.1 Effet du coefficient de diffusion

Afin d'identifier l'effet du coefficient de diffusion D sur la construction du réseau de cytokératine, plusieurs simulations sont réalisées pour les mêmes valeurs de paramètres et des coefficients de diffusion différents.

Le pool soluble s'accumule d'autant plus dans les régions de synthèse que le processus de diffusion est lent, et par conséquent, l'initiation de filaments débute d'autant plus tôt. Pour un coefficient de diffusion $D = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, l'initiation commence au bout de 6 minutes, alors que pour un coefficient de diffusion de $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, l'initiation prend 30 minutes avant de débiter (Fig. 7.5(a)).

De plus, le nombre total de filaments est aussi sensible à la diffusion. Le nombre total de filaments, à la stabilisation du processus de construction des filaments, est d'autant plus petit que le processus de diffusion est rapide. Pour un coefficient de diffusion de $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, le nombre de filaments atteint le nombre de 2535, tandis que pour $D = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, le nombre de filaments est égal à 11060 à la stabilisation (Fig. 7.5(a)).

En outre, la longueur moyenne des filaments n'est pas très sensible à la valeur du coefficient de diffusion. La longueur moyenne des filaments varie de 14.20 ± 20.85 , pour un coefficient de $D = 10^{-2} \mu^2\text{s}^{-1}$, à 19.49 ± 96.82 , pour un coefficient de $D = 10^{-3} \mu^2\text{s}^{-1}$ (Fig. 7.5(b)).

Par contre, la courbure moyenne des filaments semble augmenter avec le coefficient de diffusion (Fig. 7.5(c)). Les filaments adoptent un comportement d'autant plus rectiligne que le coefficient de diffusion est petit.

La valeur de $D^* = 10^{-3} \mu^2\text{s}^{-1}$ divise l'ensemble des valeurs de coefficient de diffusion en 2 régions. Pour $D < D^*$ (resp. $D > D^*$), le modèle adopte sensiblement le même comportement: les mêmes valeurs de temps de stabilisation et les mêmes valeurs de stabilisation.

7.2.2 Effet de la stratégie d'initiation de filaments

Selon la stratégie d'initiation choisie, les filaments sont initiés dans le cortex cellulaire (Fig. 7.2), en région périnucléaire (Fig. 7.3), ou n'importe où dans le cytoplasme (lors de la non spécification de régions particulières d'initiation) (Fig. 7.4). Afin d'identifier l'effet des stratégies d'initiation de filaments sur la construction du réseau de cytokératine, plusieurs simulations sont réalisées avec les mêmes valeurs de paramètres et des fonctions seuils $p(\cdot)$ différentes.

La stratégie d'initiation de filaments semble influencer ni la longueur moyenne ni la courbure moyenne des filaments, même si une stratégie d'initiation en région périnucléaire aboutit à des filaments sensiblement plus longs et plus ondulés (Figs. 7.6(b)–7.6(c)).

Le paramètre $p(\cdot)$ agit seulement sur les instants d'initiation de la construction des filaments et sur le nombre total de filaments. Une initiation en région périnucléaire des filaments commence 6 minutes plus tôt qu'une initiation dans le cortex cellulaire. Le

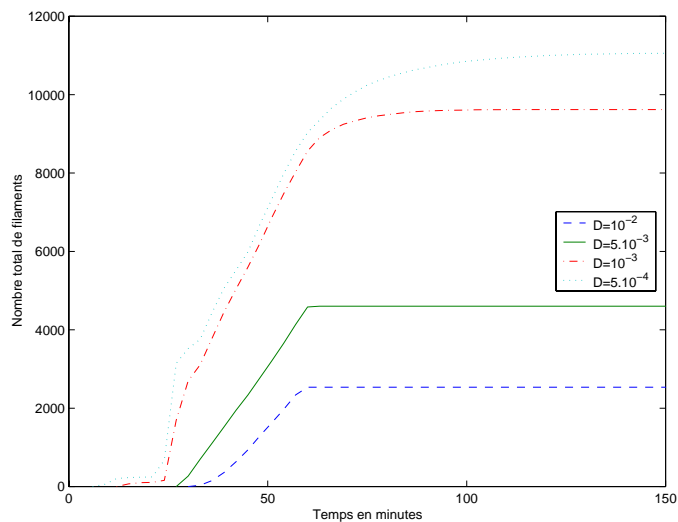
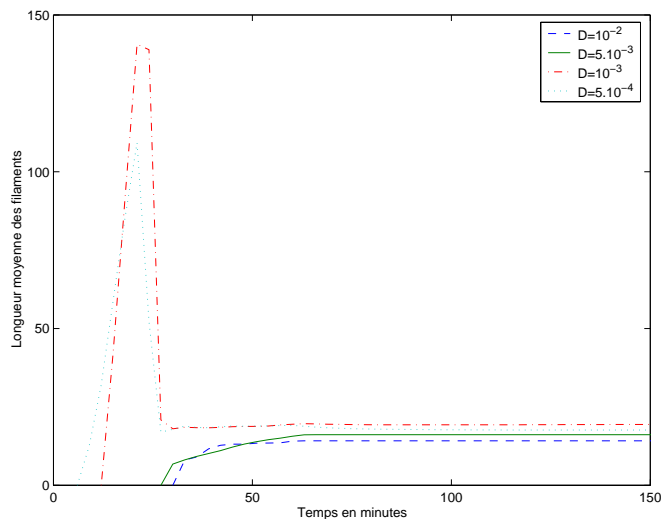
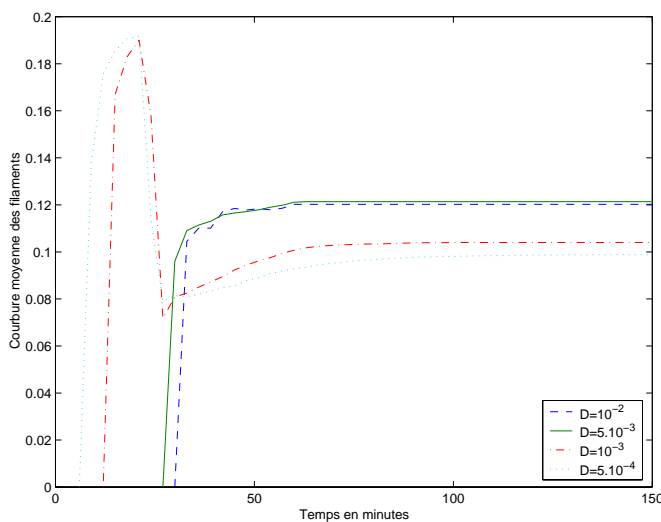
(a) $\mathcal{N}(t)$ (b) $\mathcal{L}(t)$ (c) $\mathcal{K}(t)$

FIG. 7.5 *Effet du coefficient D de diffusion. Représentation des paramètres de quantification pour des valeurs différentes de coefficient de diffusion, pour un même pas de temps $\Delta t = 1.8s$, avec une stratégie d'initiation périnucléaire et une intensité d'agitation moléculaire $\|v\| = 0.25$.*

nombre total de filaments est plus grand lors d'une initiation dans le cortex cellulaire (Fig. 7.6(a)).

Quelque soit la stratégie d'initiation de filaments choisie, le processus de construction des filaments se stabilise à la même valeur de temps.

7.2.3 Effet de l'agitation moléculaire

Afin d'identifier l'effet de l'intensité de l'agitation moléculaire sur la construction du réseau de cytokératine, plusieurs simulations sont réalisées avec les mêmes valeurs de paramètres et des intensités $\|v\|$ de l'agitation moléculaire différentes ($\vartheta \in \{5 \times 10^{-3}, 0.1, 0.25, 0.5\}$).

Une agitation moléculaire négligeable ($\|v\| = 5 \times 10^{-3}$) implique l'initiation de nombreux filaments (7190 filaments contre 1972 pour $\|v\| = 0.25$, ou contre 3454 pour $\|v\| = 0.5$, Fig. 7.7(a)) qui atteignent une longueur moyenne très faible (1.29 ± 0.75 , Fig. 7.7(b)) avec une courbure moyenne très grande (Fig. 7.7(c)).

Si l'agitation moléculaire est présente mais reste faible, le nombre total de filaments dépend légèrement de l'intensité de l'agitation moléculaire: 1972 filaments pour une intensité de $\|v\| = 0.25$ contre 1815 filaments pour $\|v\| = 0.1$ (Fig. 7.7(a)). Cependant, lorsque l'agitation moléculaire commence à être importante, le nombre de filaments augmente considérablement, 3454 filaments pour une intensité de $\|v\| = 0.5$.

L'intensité de l'agitation moléculaire affecte fortement la longueur moyenne des filaments: une longueur moyenne de 3.95 ± 8.4 pour une intensité de $\|v\| = 0.5$, contre 14.32 ± 19.02 pour $\|v\| = 0.25$, ou contre 57.64 ± 62.99 pour $\|v\| = 0.1$ (Fig. 7.7(b)). Une faible perturbation permet d'obtenir des filaments plus longs qui adoptent un comportement quasi-rectiligne (Fig. 7.7(c)).

Les filaments sont d'autant plus courts et d'autant plus ondulés que l'intensité de l'agitation moléculaire est importante.

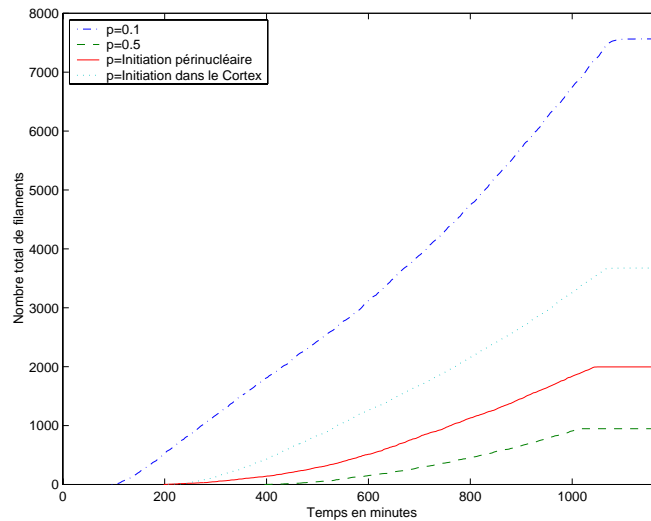
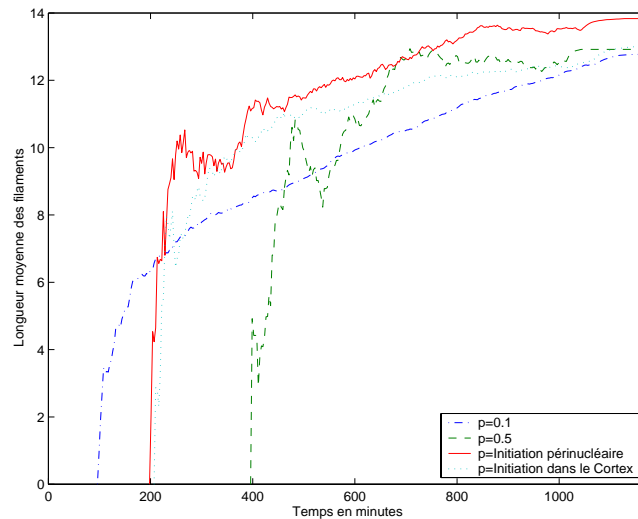
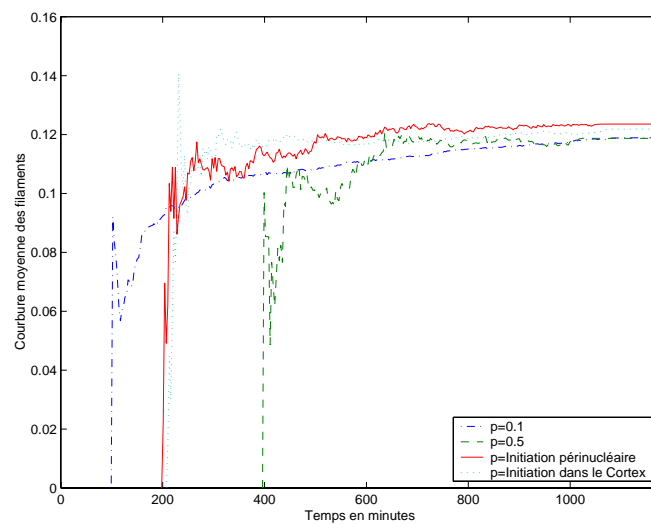
(a) $\mathcal{N}(t)$ (b) $\mathcal{L}(t)$ (c) $\mathcal{K}(t)$

FIG. 7.6 *Effet de la stratégie d'initiation de filaments. Représentations des paramètres de quantification pour différentes stratégies d'initiation pour le même coefficient de diffusion $D = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, le même pas de temps $\Delta t = 37\text{s}$ et la même agitation moléculaire $\|v\| = 0.25$.*

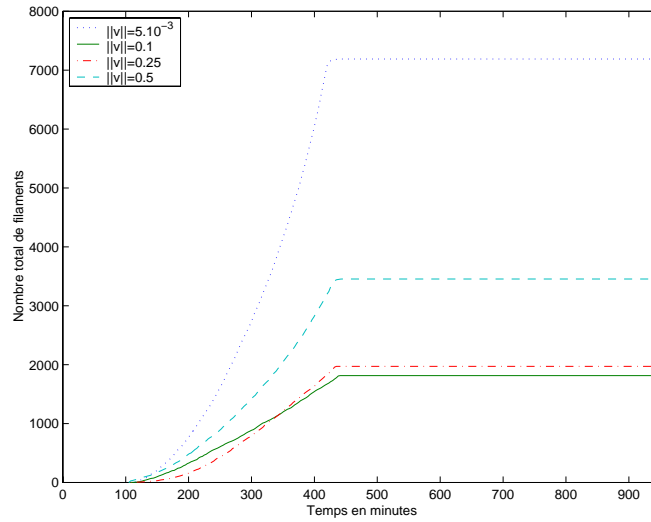
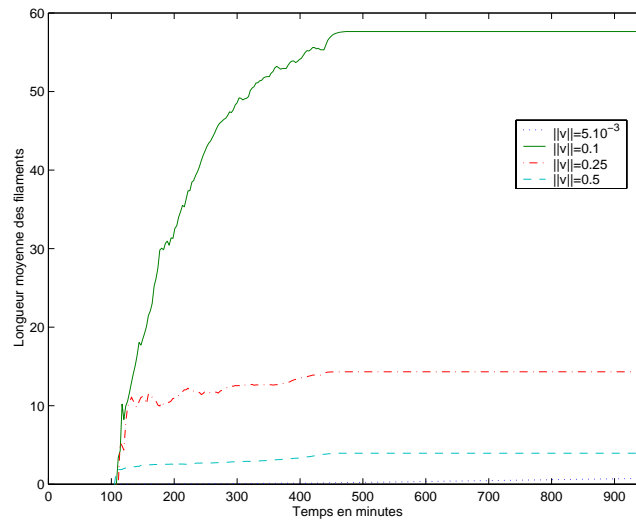
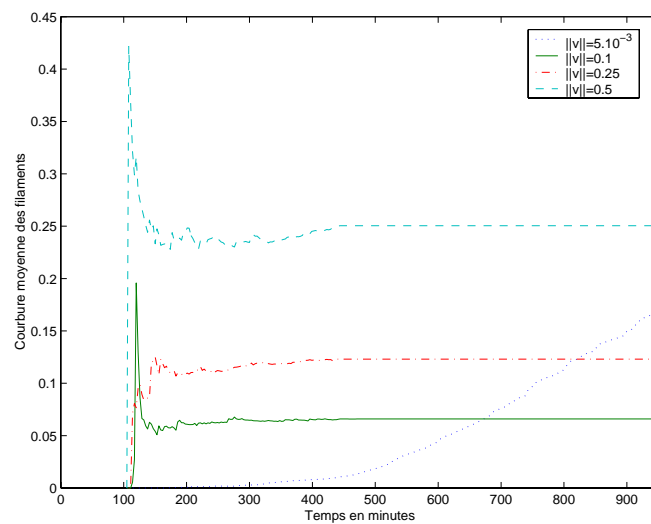
(a) $\mathcal{N}(t)$ (b) $\mathcal{L}(t)$ (c) $\mathcal{K}(t)$

FIG. 7.7 *Effet de l'agitation moléculaire $\|v\|$. Représentations des paramètres de quantification pour différentes intensités d'agitation moléculaire pour un même coefficient de diffusion $D = 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ et un même pas de temps $\Delta t = 18\text{s}$ avec une initiation en région périnucléaire.*

7.2.4 Effet du pas de temps

Le pas de discrétisation du temps Δt , paramètre inhérent à l'approche numérique, peut influencer les réalisations des expériences. Afin d'identifier l'effet de celui-ci sur la construction du réseau de cytokératine, plusieurs simulations sont réalisées avec les mêmes valeurs de paramètres et des pas de temps différents. Les Figures 7.8 et 7.9 représentent respectivement les résultats obtenus pour deux ensembles de simulations réalisées avec deux différentes valeurs de coefficient de diffusion, respectivement $D = 5 \times 10^{-4} \mu m^2 s^{-1}$ et $D = 10^{-2} \mu m^2 s^{-1}$, et pour des valeurs différentes de pas de temps Δt .

Nous remarquons que le processus est initié d'autant plus vite, et se stabilise d'autant plus vite que le pas Δt de temps est petit. Dans le cas où $D = 10^{-2} \mu m^2 s^{-1}$, pour un pas de temps $\Delta t = 0.5s$, le processus de construction commence au bout de 6 minutes et il se stabilise après 28 minutes tandis qu'à cet instant, si $\Delta t = 1.8s$, le processus de construction n'a même pas été initié (Fig. 7.9(a)).

De plus, le nombre total de filaments est d'autant plus grand que le pas de temps est petit. Dans le cas où $D = 5 \times 10^{-4} \mu m^2 s^{-1}$, pour $\Delta t = 10s$, le nombre total de filaments est égal à 7311 alors que pour $\Delta t = 37s$ le nombre de filaments est 1997 (Fig. 7.8(a)). De la même manière, dans le cas où $D = 10^{-2} \mu m^2 s^{-1}$, pour $\Delta t = 0.5s$, le nombre total de filaments est égal à 5147 alors que pour $\Delta t = 1.8s$ le nombre de filaments est 2157 (Fig. 7.9(a)).

Un pas de temps petit par rapport à la valeur maximale de pas de temps (Eq. 6.24) imposée par le critère de stabilité (tel que $\Delta t = 10s$ pour $D = 5 \times 10^{-4} \mu m^2 s^{-1}$) (resp. $\Delta t = 0.5s$ pour $D = 10^{-2} \mu m^2 s^{-1}$) génère des filaments plus longs (Fig. 7.8(b) et 7.9(b)) avec un comportement rectiligne (Fig. 7.8(c) et 7.9(c)).

Non seulement le pas de temps influence le processus de diffusion, mais il influence aussi le processus de construction. Les processus sont d'autant plus rapides que le pas de discrétisation de temps est petit.

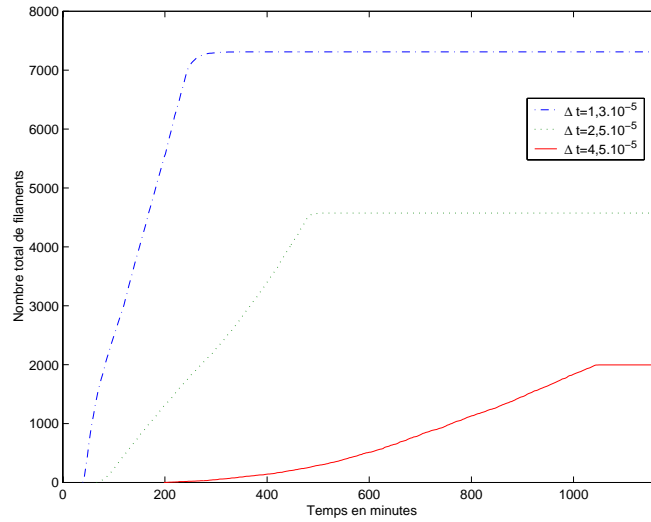
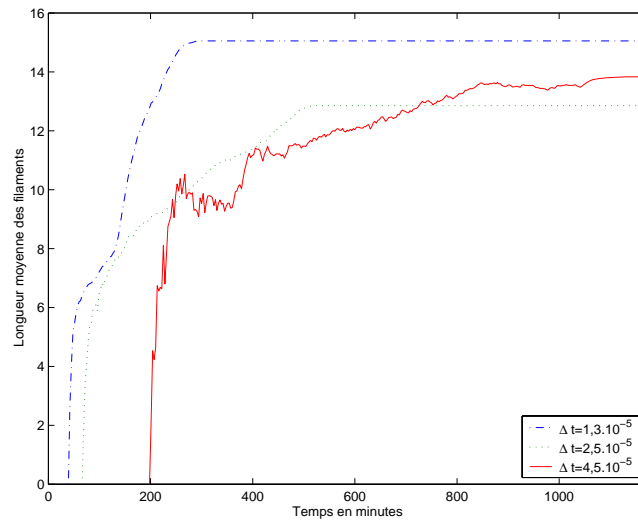
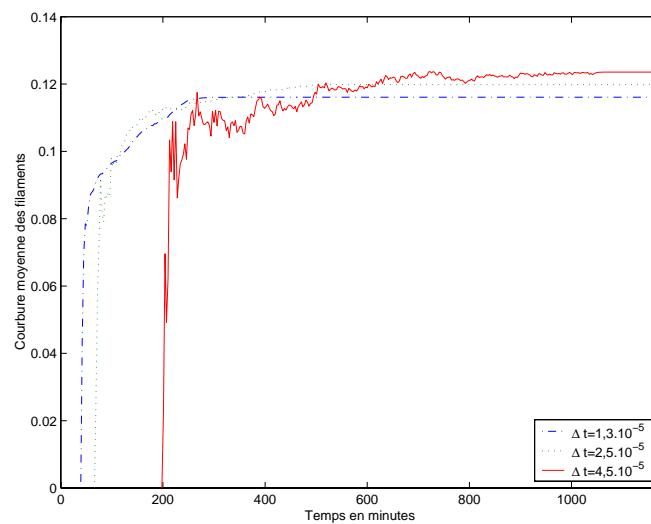
(a) $\mathcal{N}(t)$ (b) $\mathcal{L}(t)$ (c) $\mathcal{K}(t)$

FIG. 7.8 *Effet du pas de temps Δt . Représentations des paramètres de quantification pour différentes valeurs de pas de temps pour un même coefficient de diffusion $D = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, une stratégie d'initiation en région périnucléaire, et une agitation moléculaire de $\|v\| = 0.25$.*

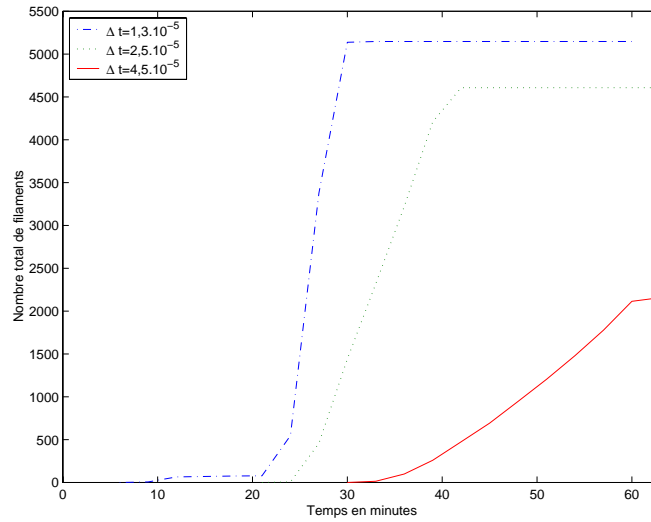
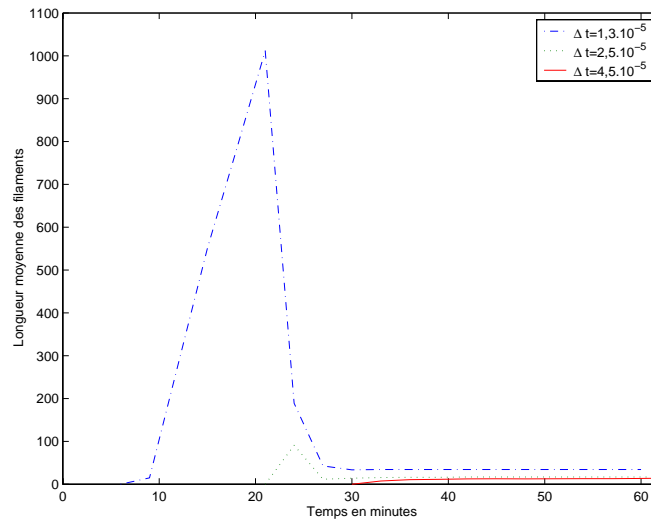
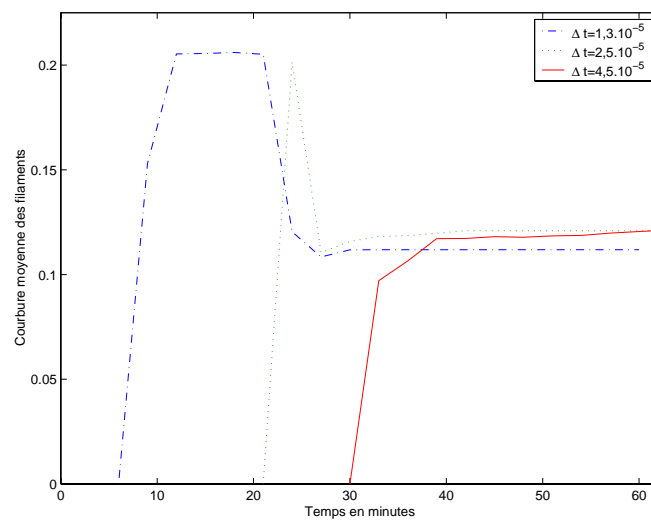
(a) $\mathcal{N}(t)$ (b) $\mathcal{L}(t)$ (c) $\mathcal{K}(t)$

FIG. 7.9 *Effet du pas de temps Δt . Représentations des paramètres de quantification pour différentes valeurs de pas de temps pour un même coefficient de diffusion $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, une stratégie d'initiation en région périnucléaire et une agitation moléculaire de $\|v\| = 0.25$.*

7.3 Discussion sur les résultats

Les résultats obtenus lors des simulations, montrent des filaments qui encerclent le noyau et rayonnent à travers le cytoplasme, reliant finalement l'enveloppe nucléaire à la membrane cellulaire aux niveaux des régions d'ancrage (desmosomes et hémidesmosomes).

En région périnucléaire, les filaments ont tendance à pousser tangentiellement et forment de ce fait une cage autour du noyau. Ce phénomène est également observé dans la réalité (Fig. 1(c), 3.1(a) et 3.2) [36].

Les filaments s'interconnectent entre eux (anastomose) pour former un réseau. La constitution du réseau est un phénomène émergent non décrit par le modèle.

Selon les localisations intracytoplasmiques, le réseau est plus au moins dense: nous observons une augmentation de la densité du réseau en région périnucléaire ainsi que dans les régions d'ancrage. Par conséquent, les architectures de réseau de cytokératine obtenues sont en accord avec les réseaux de cytokératine observés lors de l'étape de caractérisation [60, 90].

En outre, nous observons que les paramètres du modèle influencent l'architecture du réseau ainsi que la morphologie des filaments.

Comme attendu, la stratégie d'initiation des filaments affecte principalement le démarrage du processus de construction ainsi que le nombre de filaments initiés, sans modifier leur morphologie. Quelle que soit la stratégie d'initiation choisie, les filaments se développent et construisent un réseau à travers la cellule qui relie la membrane cellulaire et l'enveloppe nucléaire (Fig. 7.2–7.4).

Les filaments adoptent un comportement d'autant plus relaxé (ondulé) que le coefficient de diffusion ($D > 10^{-3} \mu m^2 s^{-1}$) ou l'agitation moléculaire sont importants. Cependant, une agitation moléculaire négligeable conduit à des réseaux constitués de filaments très courts et très ondulés, les filaments ont tendance à boucler.

La longueur moyenne des filaments est principalement influencée par l'agitation moléculaire. Cette dernière est le paramètre de quantification ayant la plus grande variabilité. En général, le comportement des filaments est d'autant plus rectiligne que leur longueur est importante.

Une diffusion lente, ou une agitation moléculaire négligeable impliquent une densification du réseau (augmentation du nombre total de filaments). Ces situations (diffusion lente et/ou agitation moléculaire négligeable), qui pourraient correspondre à un ralentissement du métabolisme provoqués par une baisse de température, nous incitent à réaliser de nouvelles expériences sur des cellules cultivées à basses températures.

Enfin, concernant l'aspect numérique, l'effet du pas de temps sur les résultats obtenus souligne la nécessité d'une analyse qualitative approfondie du modèle mathématique.

La durée des simulations est proportionnelle à la taille du maillage et inversement proportionnelle à la taille du pas de temps. Selon les cas, elle peut varier de quelques minutes à une journée.

Discussion et perspectives

Nous discutons de quelques limitations de notre travail, et des améliorations envisageables pour y remédier.

Approche déductive

L'approche déductive est une démarche descriptive utilisant des supports de type images numériques dont la qualité est dépendante des systèmes optiques et des techniques de marquages.

Résolution spatiale

Les coupes optiques numérisées sont composées de pixels dont la taille correspond à $0.091\mu m$ pour le niveau de résolution utilisé. Or le diamètre d'un filament intermédiaire est équivalent à $10nm$. Par conséquent, les réseaux visualisés par microscopie confocale à ce niveau de résolution sont constitués de plusieurs filaments agrégés (environ une dizaine de filaments) formant des sortes de cables, de faisceaux. Des techniques de déconvolution pourraient sans doute améliorer la résolution de manière significative. Cependant, l'individualisation d'un filament seul n'est pas possible en microscopie confocale, son pouvoir de résolution est bien inférieur à la taille de ce type de structures.

Limitation de la caractérisation

La vimentine, un autre type de filaments intermédiaires exprimé par les cellules endothéliales, s'organise en réseaux de faisceaux de filaments dont l'épaisseur (la largeur) est beaucoup plus faible que ceux de cyto kératine. Nos algorithmes d'analyse d'images qui font largement intervenir le paramètre de largeur des structures, sont peu efficaces dans le cas de la vimentine.

La méthodologie de caractérisation est utilisable pour les deux autres types de réseaux cytosquelettiques: les réseaux de microfilaments et de microtubules. La qualité de la caractérisation dépend principalement de l'épaisseur des structures composant les réseaux. L'étude de microfilaments organisés en faisceaux ou fibres de stress ne pose pas de problème, par contre lorsqu'ils sont en phase de gel leur étude est difficile par cette méthodologie, une approche texture semblerait être plus efficace.

D'autres méthodologies d'analyse d'images, comme des algorithmes utilisant la géométrie différentielle, pourraient améliorer la caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques en permettant l'extraction automatique de la largeur des filaments [80].

Généralisation tridimensionnelle

La méthodologie de caractérisation, que nous avons développée, utilise des représentations bidimensionnelles d'objets tridimensionnels, de ce fait, les qualités des images ainsi que leurs niveaux de coupe optique doivent être déterminés avec une grande rigueur.

Les cellules étudiées étaient très aplaties, étalées (cellules pavimenteuses) et les coupes optiques étaient réalisées à des niveaux où les réseaux cytosquelettiques pouvaient être assimilés à un réseau bidimensionnel: soit dans les plans tangents au noyau pour les réseaux périnucléaires soit dans la lame cytoplasmique périphérique pour les réseaux des dispositifs de jonctions ou les réseaux de protrusions.

Dans le cas de cellules cubiques ou prismatiques, le cytosquelette est une structure tridimensionnelle. Une étude pertinente, permettant une analyse dans son intégralité, c'est à dire sans condition sur les zones d'acquisitions, doit être tridimensionnelle. De ce fait, notre méthodologie de caractérisation devra être généralisée en trois dimensions.

La généralisation 3D de l'approche filament, fondée sur une définition d'objet curviligne, ne devrait pas poser trop de problèmes. Une courbe dans l'espace est aisément définissable.

Par contre, la primitive maille, qui induit l'approche maillage, est plus difficile à définir dans l'espace tridimensionnel. En effet, les mailles 3D ne peuvent être définies par un contour continu. Cependant, la notion de maille 3D peut être approchée par un concept de boule maximale inscrite dans les espaces ménagés par le réseau.

Approche inductive

L'approche inductive est une démarche prédictive s'appuyant sur des hypothèses qui sont les résultats de l'approche déductive.

Concepts de modélisation

Notre modèle envisage la fonction mécanique du réseau de cytokératine seulement à un niveau macroscopique. Afin de refléter l'interaction des voies biochimique et mécanique de la mécanotransduction, le modèle pourrait être affiné pour prendre en compte les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Certains des concepts de modélisation utilisés peuvent aisément être réinterprétés sans modifier le modèle d'organisation morphofonctionnelle du réseau de cytokératine.

Dans le modèle que nous proposons, la polymérisation du réseau est partiellement guidée par un gradient de morphogènes (tétramères). La mise en place de ce gradient résulte de deux mécanismes de transport en direction opposée. Les matériaux doivent tout d'abord être acheminés vers les régions de contrainte (transport actif, intervention des moteurs moléculaires, étape **3** de la Figure 5.2) afin de réaliser un différentiel de

concentration, puis ensuite les matériaux doivent se disperser (transport passif par diffusion selon la loi de Fick, étape 5 de la Figure 5.2) autour des régions de contrainte pour réaliser le gradient de morphogènes.

Dans notre modèle, les matériaux déplacés sont les morphogènes eux-mêmes (étape 3 de la Figure 5.2), qui sont synthétisés à proximité du noyau. L'autre alternative est de considérer que les matériaux déplacés ne sont pas les morphogènes eux-mêmes mais leurs précurseurs. Ainsi les ARN messagers pourraient être transportés sous forme de polyribosomes libres vers les régions de contrainte [46, 57]. Pour poursuivre cette réinterprétation, l'oligomérisation des protéines en tétramères suivie d'une libération de ces derniers dans le cytoplasme au niveau des régions de contrainte, est alors modifiée en une synthèse de protéines aux régions de contrainte. Les sources de synthèse deviennent alors les lieux de synthèse de protéines. L'intensité de la synthèse, proportionnelle à l'intensité de la contrainte, est comparable au produit de la quantité de polyribosomes libres par unité de volume par la vitesse de synthèse d'un polyribosome.

Le gradient découle d'un transport passif par diffusion (étape 5 de la Figure 5.2) dans le cytoplasme considéré comme homogène. En réalité le cytoplasme est fortement encombré par de nombreux organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules...), cet encombrement pourrait aisément être pris en compte en interdisant des voxels du compartiment cytoplasmique. L'encombrement résultant de la construction du réseau de cytokératine pourrait également être pris en compte par un coefficient de diffusion décroissant en fonction du temps. D'une autre manière, un transport actif pourrait également être envisagé le long des réseaux de microfilaments ou de microtubules [12]. Ce transport moléculaire le long des réseaux de microfilaments ou de microtubules pourrait permettre la considération des interconnexions et des interactions entre les trois différents réseaux ainsi que des phénomènes d'encombrement du cytoplasme dus aux organites (processus de percolation, c'est à dire une diffusion s'effectuant le long de réseaux préexistants).

Approche déterministe / stochastique

Notre modèle est un modèle déterministe comportant des composantes stochastiques telles que la spécification des régions de contraintes et l'agitation moléculaire. La contribution stochastique est principalement présente dans la définition du domaine spatial.

La composante stochastique (agitation moléculaire), qui intervient dans la dynamique propre du modèle, est intégrée de façon à ce qu'elle ne domine pas la contribution déterministe. Seuls des processus relatifs à l'environnement comportent une composante stochastique. Même en limitant sa contribution, il apparaît dans les résultats des simulations qu'elle joue un rôle important dans l'édification du réseau de cytokératine.

Par ailleurs, de la même façon que le coefficient de diffusion, qui est un paramètre lié à l'agitation moléculaire (Eq. 5.30), la contribution stochastique pourrait être envisagée comme une fonction du temps.

Rigidité et déformabilité des filaments

Les têtes des filaments décrivent une trajectoire au cours du temps. Ces trajectoires évoluent dans le temps au sens d'un prolongement, et non au sens d'une déformation. De ce fait, le modèle proposé produit des filaments de configuration rigide, statique et non déformable qui peuvent se prolonger. Cette propriété se justifie par le fait que le modèle propose l'édification d'un réseau pour un ensemble invariant de contraintes mécaniques.

Une des améliorations de ce modèle pourrait envisager la déformation d'un réseau en appliquant un ensemble de contraintes mécaniques variables ainsi qu'en ajoutant des interactions locales entre le corps des filaments et l'environnement.

En définissant un ensemble de contraintes mécaniques variables et en élaborant un système de redistribution des contraintes dans un épithélium, nous pourrions envisager de construire les réseaux de cytokératine des différentes cellules adjacentes et d'en étudier les interactions.

Emergence

Le réseau de filaments intermédiaires et l'environnement peuvent être considérés comme deux domaines contigus dont les influences mutuelles se croisent au niveau des têtes de filaments (couplage ponctuel). Ce couplage ponctuel établit une relation réciproque (circulaire) dans laquelle les deux domaines se spécifient mutuellement. Ainsi la concentration de pool soluble détermine la formation des filaments qui en retour modifient la concentration de pool soluble. De cette réflexivité (ou réciprocité) émerge une unité cohérente. Le couplage entre le réseau de filaments intermédiaires et l'environnement réalise ainsi les conditions d'émergence communes aux structures autopoïétiques. Notons que les relations entre le local (tétramères) et le global (réseau) sont réalisées par la mémoire de forme des filaments qui s'exprime aux points de couplage (têtes des filaments). Par ces propriétés de réflexivité environnement – réseau et local – global, notre modèle rejoint le concept de morphocycle développé par Varela [89], où les propriétés locales ou globales sont considérées de manière simultanée. Les actions locales ont pour effet global de produire une matrice qui en retour modifie ces actions locales.

Interactions entre approche inductive et déductive

Afin de valider le modèle proposé, les résultats des simulations devront être comparés aux données biologiques. Pour réaliser ce travail, deux options s'offrent à nous. La première est de développer un logiciel simulant le procédé de la microscopie confocale, qui serait capable de fournir une coupe bidimensionnelle à partir des résultats tridimensionnels des simulations. Les images ainsi obtenues pourraient être soumises aux mêmes procédures de quantification qui ont été utilisé sur les données biologiques afin de caractériser la topologie des réseaux et la morphologie des filaments. Il sera en

particulier possible de déterminer si les motifs architecturaux spécifiquement localisés dans la cellule sont retrouvés.

La seconde option, qui est préférable, est de développer et généraliser la méthodologie de caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques en trois dimensions.

Par ailleurs, la modélisation pourrait être envisagée comme une aide à l'extraction automatique de filaments spécifiques. Par le concept de mémoire de forme, le problème du choix de la direction à suivre lors de la rencontre d'un point de branchement (page 51) pourrait être résolu automatiquement.

Conclusion

L'objet de cette thèse est l'étude de l'implication des filaments intermédiaires dans la fonction de mécanotransduction s'exerçant via un mécanisme de réorganisation de la structure du réseau en réponse aux changements mécaniques de l'environnement extracellulaire.

Nous avons appréhendé ce problème biologique selon deux approches: une approche descriptive (caractérisation de la variabilité de l'architecture des réseaux cytosquelettiques selon les conditions mécaniques) et une approche prédictive (modélisation de l'organisation morphofonctionnelle des réseaux de cytokératine).

Cette démarche bipartite, qui nous a paru nécessaire pour l'étude d'un problème biologique, est significative des biomathématiques. De plus, les méthodes originales développées empruntent largement à un grand nombre de domaines comme l'analyse d'images, les mathématiques discrètes et continues, l'analyse numérique, la biomécanique et l'informatique... Cette confluence des domaines utilisés reflète bien la difficulté et la richesse de la démarche biomathématique.

La méthodologie de caractérisation de l'architecture des réseaux cytosquelettiques, développée lors du Chapitre 2, comporte trois approches, qui découlent de problématiques différentes, et permettent une caractérisation aussi exhaustive que possible des différents aspects de l'architecture des réseaux cytosquelettiques. Ainsi cette méthodologie caractérise l'architecture cytosquelettique en terme de morphologie des filaments, de structure de maille, de densité et de connexion des réseaux. Cette méthodologie a été appliquée lors de deux différentes études.

Les deux applications de cette méthodologie, évoquées dans le Chapitre 3, ont permis de caractériser la variabilité de l'architecture des réseaux de filaments intermédiaires reflétant l'existence d'une relation entre l'organisation structurale des réseaux de cytokératine et les conditions mécaniques extracellulaires.

Le modèle, proposé dans le Chapitre 5, décrit l'organisation du réseau de cytokératine dirigée par les conditions mécaniques extracellulaires. Notre modèle reflète l'implication du réseau de filaments intermédiaires dans le maintien de la stabilité mécanique et de l'intégrité des cellules [26, 16, 19]. Le réseau de filaments intermédiaires répond à l'environnement mécanique extracellulaire en s'organisant en des configurations spécifiques, comme un mécanisme de renforcement, afin de préserver l'intégrité cellulaire et de transmettre les signaux mécaniques de l'environnement extracellulaire au noyau. A notre connaissance, ce travail est le premier modèle dynamique prenant en compte l'édification du réseau de filaments intermédiaires en établissant un lien entre la fonction et la structure des filaments intermédiaires.

Les résultats obtenus par les simulations, qui sont exposés au Chapitre 7, montrent que le réseau de cytokératine encercle bien le noyau et rayonne à travers le cyto-

plasme, reliant finalement l'enveloppe nucléaire à la membrane cellulaire aux niveaux des régions d'ancrage (desmosomes et hémidesmosomes). Selon les localisations intracytoplasmiques, le réseau est plus au moins dense: nous observons une augmentation de la densité du réseau en région périnucléaire ainsi que dans les régions d'ancrage. Par conséquent, les architectures de réseau de cytokératine obtenues sont compatibles avec les réseaux de cytokératine observés dans les cellules [60, 90].

Notre modèle mathématique permet une première validation de l'hypothèse, émise et observée lors de l'étape de caractérisation, de l'implication des réseaux de filaments intermédiaires dans une fonction mécanique. Leur architecture est bien dépendante et même induite par les contraintes mécaniques environnementales. La mécanotransduction par variations architecturales semble une hypothèse plausible.

Bibliographie

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing INC, New York and London, 1983.
- [2] S. Bagley, M.W. Golberg, J.M. Cronshaw, S.A. Rutherford, and T.D. Allen. The nuclear pore complex. *J. Cell Sci.*, 113:3885–3886, 2000.
- [3] M. Beil, T. Irinopoulou, J. Vassy, and G. Wolf. A dual approach to structural texture analysis in microscopic images. *Comput. Methods Programs Biomed.*, 48:211–219, 1995.
- [4] S. Beucher. Watersheds of function and picture segmentation. In *IEEE Int. Conf. On Acoustics, Speech and Signal Processing*, pages 1928–1931, Paris, 1982.
- [5] S. Beucher. Extrema of grey tone functions and mathematical morphology. Technical Report 793, Ecole des Mines, Fontainebleau., 1983.
- [6] S. Beucher. *Segmentation D'images et Morphologie Mathématique*. PhD thesis, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, 1990.
- [7] S. Beucher and C. Lantuéjoul. Use of watersheds in contour detection. In *International Workshop on Image Processing*, Rennes, 1979. CCETT/IRISA.
- [8] M. Bissel, H. Hall, and G. Parry. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.*, 99:31–68, 1982.
- [9] S. Bloom, V.G. Lockard, and M. Bloom. Intermediate filament-mediated stretch-induced changes in chromatin: A hypothesis for growth initiation in cardiac myocytes. *J. Mol. Cardiol.*, 28:2123–2127, 1996.
- [10] J. Bogaert, R. Rousseau, P. Van Hecke, and I. Impens. Alternative area-perimeter ratios for measurement of 2D shape compactness of habitats. *Appl. Math. Comput.*, 111:71–85, 2000.
- [11] H. Bolterauer, H.-J. Limbach, and J.A. Tuszynski. From stochastic to coherent assembly of microtubules: Models and new results. *Bioelectrochem. Bioenergetics*, 41:71–76, 1996.
- [12] S.T. Brady. Neurofilaments run sprints not marathons. *Nature Cell Biol.*, 2:43–45, 2000.
- [13] D. Bray. *Cell Movements*. Garland Publishing INC, New York and London, 1992.

- [14] M. Carmo-Fonseca, A.J. Cidadao, and J.F. David-Ferreira. Filamentous cross-bridges link intermediate filaments to the nuclear pore complexes. *Eur. J. Cell Biol.*, 45:282–290, 1988.
- [15] C.F. Chou, C.L. Riopel, L.S. Rott, and M.B. Omary. A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J. Cell Sci.*, 105:433–444, 1993.
- [16] Y.H. Chou and R.D. Goldman. Intermediate filaments on the move. *J. Cell Biol.*, 150:101–105, 2000.
- [17] G. Civelekoglu and L. Edelstein-Keshet. Modelling the dynamics of f-actin in the cell. *Bull. Math. Biol.*, 56:587–616, 1994.
- [18] M. Coster and J.-L. Chermant. *Précis D'analyse D'images*. Editions CNRS, Paris, 1989.
- [19] P.A. Coulombe, O. Bousquet, L. Ma, S. Yamada, and D. Wirtz. The 'Ins' and 'Outs' of intermediate filament organization. *Trends in Cell Biol.*, 10:420–428, 2000.
- [20] J.C. Dallon, J. Sherratt, and P. Maini. Mathematical modelling of extracellular matrix dynamics using discrete cells: Fibers orientation and tissue regeneration. *J. Theor. Biol.*, 199:449–471, 1999.
- [21] J.C. Dallon and J. A. Sherratt. A mathematical model for spatially varying extracellular matrix alignment. *SIAM J. Appl. Math.*, 61:506–527, 2000.
- [22] J.-A. Désidéri. *Modèles Discrets et Schéma Itératifs: Application Aux Algorithmes Multigrilles et Multidomaines*. HERMES, Paris, 1998.
- [23] H. Digabel and C. Lantuéjoul. Iterative algorithms. In J.-L. Chermant, editor, *Quantitative Analysis of Microstructures in Materials Sciences, Biology and Medicine.*, pages 85–99, Stuttgart, 1978. Dr. Riederer-Verlag GmbH.
- [24] P. A. Dufort and C. J. Lumsden. High microfilament concentration results in barbed-end ADP caps. *Biophys. J.*, 65:1757–1766, 1993.
- [25] P. A. Dufort and C.J. Lumsden. Cellular automaton model of the actin cytoskeleton. *Cell Motility Cytoskeleton*, 25:87–104, 1993.
- [26] B. Eckes, D. Dogic, E. Colucci-Guyon, N. Wang, A. Maniotis, D. Ingber, A. Merckling, F. Langa, M. Aumailley, A. Delouvé, V. Kotliansky, C. Babinet, and T. Krieg. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 111:1897–1907, 1998.
- [27] W. Eckstein. Generalized gray-morphology for the extraction of high objects. In *4-Th Open German-Russian Workshop on Pattern Recognition and Image Understanding*, Valday, Russia, 1996.
- [28] L. Edelstein-Keshet and G.B. Ermentrout. Models for the length distribution of actin filaments I: Simple polymerization and fragmentation. *Bull. Math. Biol.*, 60:449–475, 1998.

- [29] L. Edelstein-Keshet and G.B. Ermentrout. Models for spatial polymerization dynamics of rod-like polymers. *J. Math. Biol.*, 40:64–96, 2000.
- [30] G.B. Ermentrout and L. Edelstein-Keshet. Models for the length distribution of actin filaments II: Polymerization and fragmentation by gelsolin acting together. *Bull. Math. Biol.*, 60:477–503, 1998.
- [31] W.W. Franke, E. Schmid, C. Grund, and B. Geiger. Intermediate filament proteins in nonfilamentous structures: Transient disintegration and inclusion of subunit proteins in granular aggregates. *Cell*, 30:103–113, 1982.
- [32] E. Geigant, K. Ladizhansky, and A. Mogilner. An integrodifferential model for orientational distributions of f-actin in cells. *SIAM J. Appl. Math.*, 59:787–809, 1998.
- [33] N. Geisler, J. Schunemann, K. Weber, M. Haner, and U. Aebi. Assembly and architecture of invertebrate cytoplasmic intermediate filaments reconcile features of vertebrate cytoplasmic and nuclear lamin-type intermediate filaments. *J. Mol. Biol.*, 282:601–617, 1998.
- [34] S.D. Georgatos. Dynamics of intermediate filaments: Recent progress and unanswered questions. *FEBS 12124*, 318:101–107, 1993.
- [35] M. Golay. Hexagonal parallel pattern transformation. *IEEE Transactions on Computers*, 18:733–740, 1969.
- [36] R.D. Goldman, S. Khuon, Y.H. Chou, P. Opal, and P.M. Steinert. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.*, 134:971–983, 1996.
- [37] J.W. Harris and H. Stocker. *Handbook of Mathematics and Computational Science*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 1998.
- [38] M. Hatzfeld and M. Burba. Function of type I and type II keratin head domains: Their role in dimer, tetramer and filament formation. *J. Cell Sci.*, 107:1959–1972, 1994.
- [39] H. Herrmann and U. Aebi. Intermediate filament assembly: Fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:177–185, 1998.
- [40] H. Herrmann and U. Aebi. Intermediate filaments and their associates: Multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12:79–90, 2000.
- [41] H. Herrmann, M. Haner, M. Brettel, N.O. Ku, and U. Aebi. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J. Mol. Biol.*, 286:1403–1420, 1999.
- [42] D.E. Ingber. Cellular tensegrity: Defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 104:613–627, 1993.
- [43] D.E. Ingber. Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.*, 59:575–599, 1997.

- [44] P.A. Janmey, U. Euteneuer, P. Traub, and M. Schliwa. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.*, 113:155–160, 1991.
- [45] I.M. Janosi, D. Chretien, and H. Flyvbjerg. Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *Eur. Biophys. J.*, 27:501–513, 1998.
- [46] R.P. Jansen. RNA-cytoskeletal associations. *FASEB*, 13:455–466, 1999.
- [47] M.W. Klymkowsky. Weaving a tangled web: The interconnected cytoskeleton. *Nature Cell Biol.*, 1:121–123, 1999.
- [48] K. Krickeberg. *Petit Cours de Statistique*. Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [49] A. Le Pourhiet. *Résolution Numérique Des Équations Aux Dérivées Partielles: Une Première Approche*. Cepadues Editions, Toulouse, France, 1998.
- [50] S. Leviardi. In *Trans. Syst. Man. Cybern.*, page 292. SMC 1, 1971.
- [51] L. Ma, J. Xu, P.A. Coulombe, and D. Wirtz. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J. Biol. Chem.*, 274:19145–19151, 1999.
- [52] A. Maniotis, C. Chen, and D. Ingber. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:849–854, 1997.
- [53] R. Mech and P. Prusinkiewicz. Visual models of plants interacting with their environment. In ACM SIGGRAPH, editor, *Computer Graphics Proceedings, Annual Conference Series*, pages 397–410, New Orleans, Louisiana, 1996. ACM SIGGRAPH.
- [54] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10:128–138, 1988.
- [55] A. Mogilner and L. Edelstein-Keshet. Spatio-angular order in populations of self-aligning objects: Formation of oriented patches. *Physica D*, 89:346–367, 1996.
- [56] A. Mogilner and G. Oster. The polymerization ratchet model explains the force-velocity relation for growing microtubules. *Eur. Biophys. J.*, 28:235–242, 1999.
- [57] Y. Oleynikov and R.H. Singer. RNA localization: Different zipcodes, same postman? *Trends in Cell Biol.*, 8:381–383, 1998.
- [58] L. Olsen, P.K. Maini, J.A. Sherratt, and J. Dallon. Mathematical modelling of anisotropy in fibrous connective tissue. *Math. Biosci.*, 158:145–170, 1999.
- [59] N. Panté and U. Aebi. Exploring nuclear pore complex structure and function in molecular detail. *J. Cell Sci.*, 19:1–11, 1995.
- [60] S. Portet, J. Vassy, M. Beil, G. Millot, A. Hebbache, J.P. Rigaut, and D. Schoevaert. Quantitative analysis of cytokeratin network topology in the MCF7 cell line. *Cytometry*, 35:203–213, 1999.
- [61] P. Prusinkiewicz and A. Lindenmayer. *The Algorithmic Beauty of Plants*. Springer, New York, Berlin, 1990.
- [62] C. Robert, M. Bouchiba, R. Robert, R.L. Margolis, and D. Job. Self organization of the microtubule network. a diffusion based model. *Biol. Cell*, 68:177–181, 1990.

- [63] C. Ronse. *Mathematical Morphology: Theory and Applications*, chapter Openings: main properties, and how to construct them. Oxford University Press, New York, haralick, r.m. edition, 1996.
- [64] E.R. Rosevear, M. McReynolds, and R.D. Goldman. Dynamic properties of intermediate filaments: Disassembly and reassembly during mitosis in baby hamster kidney cells. *Cell Motil. Cytoskelet.*, 17:150–166, 1990.
- [65] C.D. Roskelley, P.Y. Desprez, and M. Bissell. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:12378–12382, 1994.
- [66] C.D. Roskelley, A. Srebrow, and M. Bissell. A hierarchy of ECM-mediated signaling tissue-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:736–747, 1995.
- [67] K.J. Ryan and S.R. Wentz. The nuclear pore complex: A protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12:361–371, 2000.
- [68] E. Saadjan. *Phénomènes de Transport et Leurs Résolutions Numériques*. Polytechnica, Paris, France, 1998.
- [69] L.M. Sander. Fractal growth processes. *Nature*, 322:789–793, 1986.
- [70] A.J. Sarria, J.G. Lieber, S.K. Nordeen, and R.M. Evans. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J. Cell Sci.*, 107:1593–1607, 1994.
- [71] D. Sept, H.J. Limbach, H. Bolterauer, and J.A. Tuszynski. A chemical kinetics model for microtubule oscillations. *J. Theor. Biol.*, 197:77–88, 1999.
- [72] J. Serra. *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Academic Press, London, 1982.
- [73] J. Serra. *Image Analysis and Mathematical Morphology. II: Theoretical Advances*. Academic Press, 1988.
- [74] J. A. Sherratt and J. Lewis. Stress-induced alignment of actin filaments and the mechanics of cytogel. *Bull. Math. Biol.*, 55:637–654, 1993.
- [75] E.A. Smith and E. Fuchs. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.*, 141:1229–1241, 1998.
- [76] P. Soille. *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer Verlag, 1999.
- [77] R.R. Sokal and F.J. Rohlf. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman, New York, 1981.
- [78] A. Sonnenberg, A.A. de Melker, A.M. Martinez de Velasco, H. Janssen, J. Calafat, and C.M. Niessen. Formation of hemidesmosomes in cells of a transformed murine mammary tumor cell line and mechanisms involved in adherence of these cells to laminin and kalinin. *J. Cell Sci.*, 106:1083–1102, 1993.
- [79] A. Spiros and L. Edelstein-Keshet. Testing a model for the dynamics of actin structures with biological parameter values. *Bull. Math. Biol.*, 60:275–305, 1998.

- [80] C. Steger. Extracting curvilinear structures: A differential geometric approach. *Fourth European Conference on Computer Vision. Lectures Notes Comput. Sci.*, 1024:630–641, 1996.
- [81] J.C. Strikwerda. *Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations*. Wadsworth and Brooks, California, 1989.
- [82] A. Suciu, G. Civelekoglu, Y. Tardy, and J.J. Meister. Model for the alignment of actin filaments in endothelial cells subjected to fluid shear stress. *Bull. Math. Biol.*, 59:1029–1046, 1997.
- [83] C. Tanford. *Physical Chemistry of Macromolecules*. Wiley, New York, 1961.
- [84] O. Thoumine and A. Ott. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J. Cell Sci.*, 110:2109–2116, 1997.
- [85] O. Thoumine, T. Ziegler, P.R. Girard, and R.M. Nerem. Elongation of confluent endothelial cells in culture: The importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp. Cell Res.*, 219:427–441, 1995.
- [86] A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. Roy. Soc., B* 237:37–72, 1952.
- [87] J. Vaario, A. Onitsuka, and K. Shimohara. Formation of neural structures. In P. Husbands and I Harvey, editors, *The Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life*, pages 214–223. The MIT Press, 1997.
- [88] L.J. Van Vliet and B.J.H. Verwer. A contour processing method for fast binary neighbourhood operations. *Pattern Recognition Letters*, 7:27–36, 1988.
- [89] F. Varela, H. Maturana, and R. Uribe. Autopoiesis: The organization of living systems, its characterization and a model. *Biosystems*, 5:187–, 1974.
- [90] J. Vassy, S. Portet, M. Beil, G. Millot, F. Fauvel-Lafève, A. Karniguian, G. Gasset, T. Irinopoulou, F. Calvo, J.P. Rigaut, and D. Schoevaert. The effect of microgravity on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7. *FASEB J. Express*, 15, 2001.
- [91] L. Vincent and P. Soille. Watershed in digital space: An efficient algorithm based on immersion simulation. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Intell.*, 13:583–597, 1991.
- [92] K.Y. Volokh, O. Vilnay, and M. Belsky. Tensegrity architecture explains linear stiffening and predicts softening of living cells. *J. Biomechanics*, 33:1543–1549, 2000.
- [93] J.H.C. Wang. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: A mathematical modeling and experimental study. *J. Theor. Biol.*, 202:33–41, 2000.
- [94] N. Wang, J.P. Butler, and D.E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260:1124–1127, 1993.

-
- [95] N. Wang and D.E. Ingber. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys. J.*, 66:2181–2189, 1994.
- [96] N. Wang and D. Stamenovic. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening and growth. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 279:188–194, 2000.
- [97] S. Wendling, C. Oddou, and D. Isabey. Stiffening response of a cellular tensegrity model. *J. Theor. Biol.*, 196:309–325, 1999.
- [98] S. Wendling, E. Planus, V.M. Laurent, L. Barbe, A. Mary, C. Oddou, and D. Isabey. Role of cellular tone and microenvironmental conditions on cytoskeleton stiffness assessed by tensegrity model. *Eur. Phys. J. AP*, 9:51–62, 2000.
- [99] G. Wiche. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.*, 111:2477–2486, 1998.
- [100] S. Wolfram. *Theory and Applications of Cellular Automata*. World Scientific, Singapore, 1986.
- [101] M. Yoon, R.D. Moir, V. Prahlad, and R.D. Goldman. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J. Cell Biol.*, 1:147–157, 1998.

Annexes

A. Notions de morphologie mathématique

La morphologie mathématique repose sur la théorie des ensembles et emprunte largement à la topologie et à la théorie des graphes.

La morphologie mathématique utilise des opérations ensemblistes pour transformer l'image. Deux catégories de transformations sont utilisées:

- Transformations ensemblistes classiques
- Transformations en tout ou rien utilisant un élément structurant

Concept de morphologie mathématique: étudier les interactions entre des ensembles à analyser et d'autres ensembles de forme et de taille connue, les éléments structurants.

A.1 Morphologie mathématique sur les images binaires

Une image binaire est une fonction $f(x,y)$, où $f(x,y)$ représente la valeur du signal au point (pixel) $(x,y) \in D_f$. La valeur $f(\cdot)$ d'un pixel d'une image binaire est égale à 1 ou à 0 selon que le pixel appartient à l'objet ou au fond

$$f : D_f \subset \mathbb{N}^2 \rightarrow \{0,1\}$$

L'image inverse est définie comme suit:

$$f^c(x,y) = 1 - f(x,y)$$

A.1.1 Transformations ensemblistes classiques

Soit un ensemble U , l'ensemble de tous les éléments. X et Y sont des sous-ensembles de U .

- Union: $X \cup Y = \{x : x \in X \text{ ou } x \in Y\}$

- Intersection: $X \cap Y = \{x : x \in X \text{ et } x \in Y\}$
- Complémentation: $X^C = \{x : x \in U \text{ et } x \notin X\}$
- Différence symétrique: $X \setminus Y = X \cup Y - X \cap Y = \{x : x \in X \text{ et } x \notin Y\}$

A.1.2 Transformations en Tout ou Rien par un élément structurant

Soit X un objet défini par l'ensemble des points constituant cet objet; et S un élément de géométrie connue, appelé élément structurant.

L'application d'une transformation en Tout ou Rien à un ensemble X suit le processus suivant:

- S est déplacé de manière à ce que son origine (son centre) parcoure toutes les positions de l'espace
- Pour chaque position, une question relative à l'union, à l'intersection ou à l'inclusion de S dans X ou avec X est posée. La réponse sera positive ou négative, d'où le nom de transformation en Tout ou Rien.
- \Rightarrow L'ensemble des points correspondant à une réponse positive constitue le transformé de X

Une transformation en Tout ou Rien, notée $X \otimes S$, ne donne pas un paramètre caractérisant la structure de X mais un nouvel ensemble, une nouvelle image.

Hypothèses de construction des transformations en Tout ou Rien

Soit T une transformation

Invariance par translation: Transformations insensibles à la position d'origine des coordonnées, un objet doit être reconnu quelle que soit sa position dans l'espace,
 $T(Trans_{\vec{k}}(X)) = Trans_{\vec{k}}(T(X))$

Compatibilité avec les homothéties: Un objet doit être reconnu quel que soit son éloignement. $(\frac{1}{k}T_k(kX) = T_1(X))$

Connaissance locale uniforme: Les objets sont observés dans un champ d'observation Z

Continuité monotone: Le rapprochement de l'ensemble X de l'ensemble Y entraîne le rapprochement des transformés

Propriétés des transformations en Tout ou Rien

Soit T une transformation en Tout ou Rien, elle peut avoir les propriétés suivantes:

Transformation croissante: $X \subset Y \Rightarrow T(X) \subset T(Y)$

Transformation extensive: $X \subset T(X)$

Transformation idempotente: $T(T(X)) = T(X)$

Transformation homotopique: T ne modifie pas le nombre de connexité N , nombre d'Euler, $N(T(X)) = N(X)$

Transformation préservant la connexité: X connexe $\Rightarrow T(X)$ connexe

Elément structurant

L'idée de base de la morphologie mathématique est de confronter les objets à analyser à un autre objet de forme connue, l'élément structurant. Chaque élément structurant correspond à une configuration donnée, l'application, c'est à dire la confrontation, de cet élément structurant sur l'objet à analyser permet de détecter toutes les occurrences de cette configuration présentes dans l'objet. Voici quelques éléments structurants:

$$\begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{array} \qquad \begin{array}{ccc} * & 1 & * \\ 1 & 1 & 1 \\ * & 1 & * \end{array}$$

$$\begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ & & 1 & * & 1 \end{array}$$

Le symbole $*$ peut représenter indifféremment un point objet 1 ou un point du fond 0.

A.1.3 Erosion

Pour chaque position x de l'espace, la question suivante est posée: est-ce que S_x (l'élément structurant S centré sur le point x) est complètement inclus dans l'ensemble X ? $S_x \subset X$? L'ensemble des positions x correspondant à des réponses positives forme un nouvel ensemble $E(X)$ appelé érodé de X .

$$E(X) = X \ominus S = \{x : S_x \subset X\}$$

L'érosion consiste à mettre à 0 la valeur des pixels si l'élément structurant centré sur ce pixel n'est pas entièrement inclus dans l'objet.

Propriétés de l'érosion:

- Transformation anti-extensive: $E(X) \subset X$
- Transformation croissante: $X \subset Y \Rightarrow E(X) \subset E(Y)$
- Transformation non homotopique car elle ne préserve pas le nombre de connexité
- Pour un élément ayant la forme d'un disque, l'érosion déplace la frontière de l'objet vers l'intérieur, d'une distance égale au rayon du disque.

Le nombre de connexité est le nombre de composantes connexes d'une image diminué du nombre de trous.

A.1.4 Dilatation

Pour chaque position x de l'espace, la question suivante est posée: S_x touche-t-il l'ensemble X ? autrement dit, $S_x \cap X \neq \emptyset$?

S_x représente l'élément structurant de configuration S , centré sur x .

L'ensemble des positions x correspondant à des réponses positives forme un nouvel ensemble $D(X)$ appelé le dilaté de X .

$$D(X) = X \oplus S = \{x : S_x \cap X \neq \emptyset\}$$

La dilatation consiste à mettre à 1 la valeur du pixel si l'élément structurant centré sur ce pixel touche le bord de l'objet.

Propriétés de la dilatation:

- Transformation extensive: $X \subset D(X)$
- Transformation croissante: $X \subset Y \Rightarrow D(X) \subset D(Y)$
- Transformation non homotopique car elle ne préserve pas le nombre de connexité
- La frontière du dilaté est le lieu des centres géométriques de S_x lorsque S_x touche X
- Pour un élément ayant la forme d'un disque, la dilatation déplace la frontière de l'objet vers l'extérieur, d'une distance égale au rayon du disque.

Remarque – Une érosion (dilatation) par un élément structurant de taille n est équivalente à n érosions (dilatations) par un élément structurant de taille 1.

Les transformations érosion et dilatation sont duales pour la complémentation ($\overline{X \oplus S} = \bar{X} \ominus S$). Construire le dilaté d'un objet revient à construire l'érodé de son complémentaire, le fond.

Dilatation et Erosion géodésique

Soit un ensemble $Y \subset X$. On appelle dilatation de Y par S selon les principes géodésiques de X ou dilatation géodésique de Y par S selon X , notée $D_X(Y)$, l'ensemble des points x tels que, x appartenant à X , S centré en x , c'est à dire S_x , forme une intersection non vide avec Y .

$$D_X(Y) = \{x \in X, S_x \cap Y \neq \emptyset\}$$

De la même manière, on définit l'érosion géodésique notée $E_X(Y)$:

$$E_X(Y) = \{x \in X, S_x \subset Y\}$$

L'érosion et la dilatation géodésiques sont deux transformations duales pour la complémentation par X .

$$E_X(Y) = X \setminus D_X(Y)$$

Remarque – L'ensemble X reste invariant par les dilatations et érosions géodésiques:
 $E_X(X) = D_X(X) = X$

A.1.5 Ouverture

L'ouverture, notée $O(\cdot)$, est une érosion suivie d'une dilatation:

$$O(X) = (X \ominus S) \oplus S$$

L'ouverture est une transformation ayant les propriétés suivantes:

- Transformation anti-extensive: $O(X) \subset X$
- Transformation croissante: $X \subset Y \Rightarrow O(X) \subset O(Y)$
- Transformation idempotente: $O(O(X)) = O(X)$
- Transformation non homotopique.

Les spécificités de l'ouverture sont:

- Elimine les petites particules
- Supprime les aspérités (adoucit les contours)
- Sépare les objets
- Réalise un filtre morphologique.

A.1.6 Fermeture

La fermeture, notée $F(\cdot)$, est une dilatation suivie d'une érosion:

$$F(X) = (X \oplus S) \ominus S$$

La fermeture est une transformation ayant les propriétés suivantes:

- Transformation extensive ($X \subset F(X)$)
- Transformation croissante ($X \subset Y \Rightarrow F(X) \subset F(Y)$)
- Transformation idempotente ($F(F(X)) = F(X)$)
- Transformation non homotopique.

Les spécificités de la fermeture sont:

- Elimine les échancrures
- Bouche les trous
- Regroupe les objets proches
- Réalise un filtre morphologique.

Remarque – Dilatation, érosion, ouverture et fermeture sont des opérations non homotopiques car elles ne préservent pas la connexité.

A.1.7 Transformations de voisinage

Une transformation de voisinage par la famille V consiste à attribuer la valeur 1 (c'est à dire attribuer la propriété point objet) à chaque point de la trame ayant une configuration appartenant à la famille de voisinage.

$$X \otimes V_x(X) = \begin{cases} 1 & V_x(X) \in V \\ 0 & V_x(X) \notin V \end{cases}$$

où $V_x(X)$ est la configuration de voisinage de l'image binaire X centrée sur le point x .

Remarque – Une transformation de voisinage sera homotopique si la configuration de voisinage utilisée est homotopique.

Configurations de voisinage

Une configuration de voisinage est le voisinage élémentaire d'un point, dans lequel chaque emplacement prend la valeur 0 ou 1 (0 correspond à des points du fond, 1 correspond à des points objets).

$$L = \begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ * & 1 & * \\ 0 & 0 & 0 \end{array} \text{ est une configuration de voisinage}$$

Les configurations de voisinage peuvent être regroupées en famille V . On note $\frac{\pi^k}{4}L$ la famille de voisinage déduite de L par la rotation d'angle $k\frac{\pi}{4}$:

$$\begin{array}{ccc} \begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ * & 1 & * \\ 0 & 0 & 0 \end{array} & \begin{array}{ccc} 1 & 1 & * \\ 1 & 1 & 0 \\ * & 0 & 0 \end{array} & \begin{array}{ccc} 1 & * & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & * & 0 \end{array} \\ \\ \begin{array}{ccc} * & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & * \end{array} & \begin{array}{ccc} 0 & 0 & 0 \\ * & 1 & * \\ 1 & 1 & 1 \end{array} & \begin{array}{ccc} 0 & 0 & * \\ 0 & 1 & 1 \\ * & 1 & 1 \end{array} \\ \\ \begin{array}{ccc} 0 & * & 1 \\ 0 & 1 & 1 \\ 0 & * & 1 \end{array} & \begin{array}{ccc} * & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & * \end{array} & \end{array}$$

L'élément structurant L est homotopique, il conduit à des transformations homotopiques qui préservent le nombre de composantes connexes et le nombre de trous de chaque composante connexe.

Remarque – Pour la trame hexagonale, 2^7 configurations de voisinage sont possibles. Pour la trame carrée, 2^9 configurations de voisinage sont possibles.

A.1.8 Amincissement

L'aminçissement, notée \bigcirc , consiste en la suppression de tout pixel de l'objet ayant une configuration donnée, définie par la configuration de voisinage V (élément structurant).

$$X \bigcirc V = X \setminus (X \otimes V)$$

L'aminçissement est une transformation anti-extensive: $(X \bigcirc V) \subset X$.

Squelettisation

La notion de squelette peut être illustrée par la propagation du feu de prairie: si X est une prairie d'herbe sèche, en tout point du contour de X on allume simultanément un feu qui se propage de manière isotrope dans X ; lorsque deux fronts indépendants de feu se rencontrent en un point, le feu s'éteint en ce point faute de combustible. Tous les points d'extinction constituent le squelette de X . Le squelette de X représente l'ossature de X .

L'aminçissement itéré avec l'élément structurant L (alphabet de Golay), dans toutes les directions jusqu'à stabilisation (jusqu'à idempotence) conduit au squelette homotopique de l'image.

$$\text{Cas de la trame hexagonale: } \theta = \frac{\pi}{3} \text{ et } L = \begin{array}{ccc} & 1 & 1 \\ * & & 1 & * \\ & 0 & & 0 \end{array}$$

$$Sq(X) = (X \underline{\bigcirc} L)_{\infty} = ((((((X \bigcirc \theta^0 L) \bigcirc \theta^1 L) \bigcirc \theta^2 L) \bigcirc \theta^3 L) \bigcirc \theta^4 L) \bigcirc \theta^5 L)_{\infty}$$

$$\text{L'élément structurant } M = \begin{array}{ccc} & 1 & * \\ 1 & & 1 & 0 \\ & 1 & & * \end{array} \text{ peut également être utilisé.}$$

Les squelettes homotopiques ont les caractéristiques suivantes:

- Les squelettes obtenus par aminçissement homotopique ont une épaisseur d'un point image
- Chaque point du squelette possède en général deux voisins, sauf pour des points particuliers (points multiples, points terminaux)
- Les éléments L et M sont des configurations de voisinages homotopiques, alors cette transformation est homotopique (préserve la connéxité et le nombre de connéxité)

Propriétés de la squelettisation:

- La squelettisation est ni croissante ni décroissante
- La squelettisation est anti-extensive: $Sq(X) \subset X$
- La squelettisation est une transformation idempotente: $Sq(Sq(X)) = Sq(X)$

Le squelette est très sensible au bruit (irrégularités de formes), c'est pourquoi il est souvent suivi d'un ébarbulage.

Ebarbulage

L'ébarbulage consiste à supprimer n pixels à chaque extrémité du squelette. Cette opération s'effectue par un amincissement du squelette, itéré n fois dans toutes les directions, avec l'élément structurant E .

$$Y = (Sq(X) \underline{\circ} E_6)_n$$

A.1.9 Épaississement

L'épaississement, notée \odot , consiste en l'ajout de pixels à l'objet ayant une configuration donnée, définie par la configuration de voisinage V (élément structurant).

$$X \odot V = X \cup (X \otimes V)$$

L'épaississement est une transformation extensive: $(X \odot V) \supset X$.

Remarque – Amincissement et Épaississement sont deux transformations duales pour la complémentation: $X \odot V = (X^c \circ V^c)^c$.

Les éléments structurants n'étant pas en général isotropes, si on veut effectuer une transformation isotrope, on itère les amincissements ou les épaississements avec les 7 éléments déduits de la configuration choisie par rotation de $\frac{\pi}{4}$ (cas de la maille carrée).

Squelette par zones d'influence

Soit X un ensemble constitué de particules individuelles X_i . A chaque particule X_i , on peut associer une zone d'influence Y_i telle que tous les points y formant Y_i soient plus proches des X_i que de n'importe quel autre X_j , $j \neq i$:

$$Y_i = \cup \{y : d(y, x_i) < d(y, x_j), j \neq i\}$$

Le squelette par zones d'influence de l'ensemble X , noté $SKIZ(X)$, est par définition le complémentaire de l'union de tous les Y_i (zone d'influence):

$$SKIZ(X) = [\cup_i (Y_i)]^c$$

Ce squelette par zone d'influence partitionne le plan en autant de parties qu'il y a de particules dans X (= frontière des zones d'influence).

Squelette par zone d'influence \Leftrightarrow Diagramme de Voronoi Généralisé

$$SKIZ(X) = (((X \underline{\circ} L_6^c)_\infty \underline{\circ} E_6^c)_\infty)^c = ((X^c \underline{\circ} L_6)_\infty \underline{\circ} E_6)_\infty$$

Si des particules X_i sont restreintes à des points, l'élément M^c sera utilisé dans l'épaississement à la place de L^c .

A.1.10 Détection de points particuliers

Dans un squelette homotopique, chaque point possède en général deux voisins, sauf pour des points particuliers:

- points isolés
- points extrêmes du squelette
- points de branchement: points triples ou points quadruples

Ces points peuvent être intéressants à localiser.

Points extrêmes du squelette:

A cette famille de point correspond une configuration de voisinage (ou élément structurant), définie dans l'alphabet de Golay, qui permet de détecter ces points au travers d'une transformation en Tout ou Rien.

$$E = \begin{array}{ccc} * & 0 & * \\ 0 & 1 & 0 \\ * & * & * \end{array}$$

aux rotations près (trame carrée en 4-connexité).

Points de branchement du squelette:

Les points multiples d'un squelette pour la maille carrée sont soit des points triples, soit des points quadruples. Si l'on veut détecter les points de branchement du squelette sans distinction, on pourra utiliser la configuration de voisinage suivante:

$$\begin{array}{ccc} * & 1 & * \\ 1 & 1 & 1 \\ * & * & * \end{array}$$

aux rotations près.

Points isolés:

Ce type de point peut être détecté par la configuration de voisinage suivante:

$$I = \begin{array}{ccc} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{array}$$

A.1.11 Alphabet de Golay

L'alphabet de Golay représente une nomenclature des éléments structurants utilisés en morphologie mathématique.

| Configuration de Voisinage | Amincissement | Epaississement | Transformation en Tout ou Rien |
|---|--|---|--------------------------------|
| $L = \begin{matrix} & 1 & 1 \\ * & & * \\ & 0 & 0 \end{matrix}$ | Squelette homotopique | Squelette par zone d'influence L^c avec E^c | |
| $M = \begin{matrix} & 1 & * \\ 1 & & 0 \\ & 1 & * \end{matrix}$ | Squelette homotopique (moins utilisé, nombreuses branches parasites) | Epaississement à partir de points isolés: M^c | |
| $D = \begin{matrix} & 0 & * \\ 0 & 1 & 1 \\ & 0 & * \end{matrix}$ | Marqueur homotopique | Enveloppe quasi-convexe D^c | |
| $C = \begin{matrix} & 1 & * \\ 1 & 0 & * \\ & 1 & * \end{matrix}$ | | Enveloppe fortement convexe hexagonale | |
| $E = \begin{matrix} * & * \\ 0 & 1 & 0 \\ & 0 & 0 \end{matrix}$ | Ebarbulage | Squelette par zone d'influence E^c avec L^c | Points extrêmes du squelette |
| $I = \begin{matrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ & 0 & 0 \end{matrix}$ | Détruit les points isolés | Remplit les trous d'un pixel I^c | Points isolés |
| $F = \begin{matrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 & 1 \\ & 1 & 0 \end{matrix}$ | | | Points triples |
| $H = \begin{matrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ & 1 & 1 \end{matrix}$ | Contour | | Dilatation Erosion |
| $R = \begin{matrix} * & * \\ * & 1 & 0 \\ & * & * \end{matrix}$ | Erosion linéaire | Dilatation linéaire R^c | |

A.2 Morphologie mathématique sur les images en niveaux de gris

Une image en niveaux de gris est définie par une fonction $f(x,y)$, où $f(x,y)$ représente l'amplitude du signal au point (x,y) .

$$f : D_f \subset \mathbb{N}^2 \rightarrow \{0,1,\dots,t_{max}\}$$

L'image inverse est définie comme suit:

$$f^c(x,y) = t_{max} - f(x,y)$$

A.2.1 Dilatation et Erosion

L'érosion d'une image en niveaux de gris f est définie par:

$$E(f)(x) = \inf\{f(u) : f(u) \in S_x\}$$

\iff Attribuer à chaque point x du domaine D_f la valeur inférieure que prend $f(x)$ dans le voisinage de x défini par l'élément structurant S_x

La dilatation d'une image en niveaux de gris f est définie par:

$$D(f)(x) = \sup\{f(u) : f(u) \in S_x\}$$

\iff Attribuer à chaque point x du domaine D_f la valeur supérieure que prend $f(x)$ dans le voisinage de x défini par l'élément structurant S_x

A.2.2 Ouverture et Fermeture

L'ouvert d'une image en niveaux de gris f est définie par: $O(f) = (f \ominus S) \oplus S$

$$O(f)(x) = \sup \inf\{f(z) : y \in S_x, z \in S_y\}$$

Le fermé d'une image en niveaux de gris f est définie par: $F(f) = (f \oplus S) \ominus S$

$$F(f)(x) = \inf \sup\{f(z) : y \in S_x, z \in S_y\}$$

A.2.3 Chapeau haut de forme

La transformation en chapeau haut de forme est une transformation qui s'appuie sur la différence entre l'image initiale et son ouvert (sélection des sommets en fonction de leur épaisseur) suivie d'un seuillage (conservation des sommets ayant une hauteur suffisante).

$$T(f) = \{x : [f(x) - O(f)(x)] \geq t\}$$

Par variation de la taille de l'élément structurant et/ou de la valeur de seuillage t , la transformation en chapeau haut de forme permet une sélection ciblée des objets. Cette transformation est insensible aux faibles variations de niveaux de gris.

A.2.4 Amincissement et Epaisseur

Soit L la configuration de voisinage définie par la nomenclature de Golay. Chaque configuration de voisinage L peut être scindée en deux sous configurations L_n et L_b , la première contenant les points égaux à 1 (noirs) et la seconde les points égaux à 0 (blancs). Alors l'amincissement de l'image f est défini de la manière suivante:

$$(f \circ L)(x) = \begin{cases} \sup[f(x_n)] & \text{si } \sup[f(x_n)] < f(x) \leq \inf[f(x_b)] \\ f(x) & \text{sinon} \end{cases}$$

A.2.5 Gradient morphologique

Le gradient morphologique d'une image en niveaux de gris f est obtenu par la différence entre le dilaté de f et l'érodé de f :

$$\rho_S(f) = \frac{(f \oplus S) - (f \ominus S)}{2}$$

Le gradient morphologique permet d'extraire les variations maximales de niveaux de gris dans un voisinage prédéfini. Ce qui conduit à une détection des contours (zones de contraste). Le gradient morphologique est un filtre passe-haut, il est très sensible au bruit.

B. Quantitative analysis of cytokeratin network topology in the MCF7 cell line

Quantitative Analysis of Cytokeratin Network Topology in the MCF7 Cell Line

Stéphanie Portet,^{1*} Jany Vassy,¹ Michael Beil,² Guy Millot,³ Abdelhamid Hebbache,¹ Jean Paul Rigaut,¹ and Damien Schoenberger¹

¹Laboratoire d'Analyse d'Images en Pathologie Cellulaire, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France

²Department of Internal Medicine I, University of Ulm, Ulm, Germany

³Laboratoire de Pharmacologie, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France

Received 23 April 1998; Revision Received 17 August 1998; Accepted 14 October 1998

Background: In the MCF7 human breast cancer cell line, several patterns of cytokeratin networks are observed, depending on the intracellular localization. Our hypothesis is that architectural variations of cytokeratin networks depend on local tensions or forces appearing spontaneously in the cytoplasm. The aim of this work was to discriminate between the different patterns and to quantify these variations.

Materials and Methods: Image analysis procedures were developed to extract cytokeratin filament networks visualized by immunofluorescence and confocal microscopy. Two methods were used to segment sets of curvilinear objects. The first, the "mesh-approach," based on classical methods of mathematical morphology, takes into account global network topology. The second, the "filament-approach" (novel), is meant to account for individual element morphology. These methods and their combination allow the computation of several features at two levels of geometry: global (network topology) and local (filament morphology).

Results: Variations in cytokeratin networks are characterized by their connectivity, density, mesh structure, and filament shape. The connectivity and the density of a network describe its location in a local "stress-force" zone or in a "relaxed" zone. The mesh structure characterizes the intracellular localization of the network. Moreover, the filament shape reflects the intracellular localization and the occurrence of a "stress-force" zone.

Conclusions: These features permitted the quantitation of differences within the network patterns and within the specific filament shapes according to the intracellular localization. Further experiments on cells submitted to external forces will test the hypothesis that the architectural variations of intermediate filaments reflect intracytoplasmic tensions. Cytometry 35:203–213, 1999. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

Key terms: cytoskeleton; cytokeratin; tensegrity; confocal microscopy; image analysis; curvilinear structures; network topology; filament morphology

Recent reports assume that not only chemical but also mechanical influences from the cellular environment could have profound effects on gene activity and act on cell differentiation and proliferation (1–4). Both physical and biochemical signal transductions have been used to explain the mechanical influences of the extracellular matrix (5). Structural transductions involve an "extended tissue matrix" which includes extracellular matrix, nuclear matrix, and cytoskeleton (6–9). Cytoplasmic cytoskeleton would be an intermediate between extracellular and nuclear matrix, and alterations of the nuclear matrix influence finally the transcriptional activity of specific genes (10,11). Physicochemical properties, coiled-coil structure (reviewed by Stewart (12)), and viscoelastic properties (13) of intermediate filaments suggest that they may play a role in determining the stiffness of epithelial cells (14,15). They may therefore be the best candidates, among other components of the cytoskeleton, for a possible structural and mechanical transduction of signals

from the environment (16). Assuming that mechanotransduction is mediated by the cytoskeleton, physical changes in the cellular environment would be reflected by structural variations of cytoskeleton architecture and, more specifically, of intermediate filaments.

The MCF7 human breast cancer cell line was widely investigated, especially for studying growth regulation. These cells maintained estrogen receptors and expressed cytokeratin but not vimentin as intermediate filaments (17,18). In MCF7, local intracytoplasmic variations in cytokeratin networks are observed (19), and different network patterns appear in specific intracytoplasmic loca-

Grant sponsor: Ligue Nationale contre le Cancer; Grant sponsor: Centre National d'Etudes Spatiales.

*Correspondence to: Stéphanie Portet, Laboratoire AIPC, UP7, Institut d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.

E-mail: portet@chu-stlouis.fr

tions. Our hypothesis is that these architectural changes (network connectivity, density and mesh structure, and filament shape) probably depend on local cytoplasmic tensions or forces. In a further step, we will investigate variations induced experimentally by physical changes of the cellular environment (work in progress).

In previous work (20–22), image analysis procedures were defined in order to describe variations of cytokeratin networks in rat hepatocytes during fetal development. These approaches were not designed to discriminate between different patterns inside individual cells. In the present work, we developed image analysis procedures allowing the detection of subtle local variations in cytokeratin networks of MCF7, depending on the intracellular localization. High-resolution confocal microscopy of immunofluorescent visualization of cytokeratins and computerized image analysis offer the opportunity of such a study.

The cytokeratin network can be regarded at two levels, global (network topology: properties of the set of elements) and local (filament morphology: properties of the elements). We developed two methods of segmentation taking into account these two levels, respectively: 1) the “mesh-approach,” based on mathematical morphology, relying on the cytoskeletal network viewed as a connected graph; and 2) the novel “filament approach,” relying on the individual elements of the network. A combination of the two methods provides a powerful tool for analyzing cytokeratin networks. Variations in cytokeratin networks can be characterized by 1) the degree of connectivity, 2) the density of the network, 3) the mesh structure, and 4) the filament shape. The aim of the present work was to quantitate the local variations of cytokeratin architectures and to discriminate between the different patterns observed: three patterns, corresponding to three specific intracytoplasmic localizations, were selected and compared by means of a nonparametric Mann-Whitney test with respect to topological and morphological features.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures

The MCF7 cell line, derived from a human breast carcinoma (23), was grown for 24 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), supplemented with 10% fetal calf serum (Boeringer, Mannheim, Germany), containing 2 mM glutamine (Gibco), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Gibco).

Immunofluorescence Staining

Cell cultures were fixed for 10 min at 20°C in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer.

The indirect immunolocalization procedure was used. After 15 min washing in phosphate-buffered saline (PBS), a 30-min preincubation was carried out with 60 mg/ml bovine serum albumin (Sigma, France) and 0.1% saponin (Sigma) to avoid nonspecific labeling. Cells were incubated overnight at 4°C in a mouse monoclonal antibody

anti-C8 (C-5301, Sigma) diluted at 1/50 in PBS containing 0.1% saponin. After washing for 3 × 10 min in PBS, mouse IgG were visualized by a 2-h incubation at 20°C in 1/50 lissamine rhodamine (LRSC) and conjugated donkey anti-mouse IgG (715–085150, Jackson Laboratories).

After washing, cell cultures were mounted in Mowiol (Calbiochem, France).

Confocal Microscopy and Image Acquisition

Fluorescent cytokeratin filaments were visualized by an MRC-600 (BioRad, UK) confocal scanning laser system, mounted on a Nikon microscope equipped with a Plan Apochromat immersion objective (×60) with a high numerical aperture (1.4).

The 514-nm wavelength of the multiple-line argon ion laser beam (25 mW) was used for LRSC excitation. Red fluorescence was detected using a long-pass filter (OG 550).

Image acquisitions were carried out using discrete photon counting (24) by the Comos software package (BioRad), with a scan speed of 1 frame/s (768 × 512 pixels). Fast photon counting allows a sharp visualization of weak labels even with the highest (x, y) sampling density (11 pixels/µm). Each confocal image of 768 × 512 pixels and 256 gray levels was obtained by averaging 20 frames.

Fifty images (768 × 512 pixels) were collected where several architectural patterns of cytokeratin network appeared (Fig. 1b). From these, smaller images (100 × 100 pixels) were selected according to intracytoplasmic localization: 1) in hemidesmosome (extracellular matrix-cell contact) or desmosome (cell-cell contact) zones (Fig. 1b,c), 2) in leading margin zones of spreading cell, without intercellular contact (Fig. 1a,d), and 3) in zones around the nucleus (Fig. 1b,e).

Twenty images (100 × 100 pixels, 83 µm²), for each location observed, were studied (Fig. 1c–e).

Image Analysis

In this preliminary work, with culture cells flattened and the zones under investigation located in a specific plane (near the nuclear envelope or areas of substratum-cell contacts, Fig. 1a), image analysis procedures were carried out on two-dimensional (2D) images. A new method for extracting filament structures was developed. This method is based on two geometry levels, the mesh level (network topology: properties of the set of elements) and the filament level (filament morphology: properties of the elements). The mesh level represents a global approach (“mesh-approach”), while the filament level deals with features of mesh elements (“filament-approach”).

All programs were developed using the software package AMBA (IBSB, Berlin, Germany), running on a 300-MHz Pentium II.

The “Mesh-Approach”

The gray scale image *I* is considered as a topographic surface, where the altitude of a pixel is given by its gray value (25). The filament network is represented as the network of crest lines. Supposing that the network is a

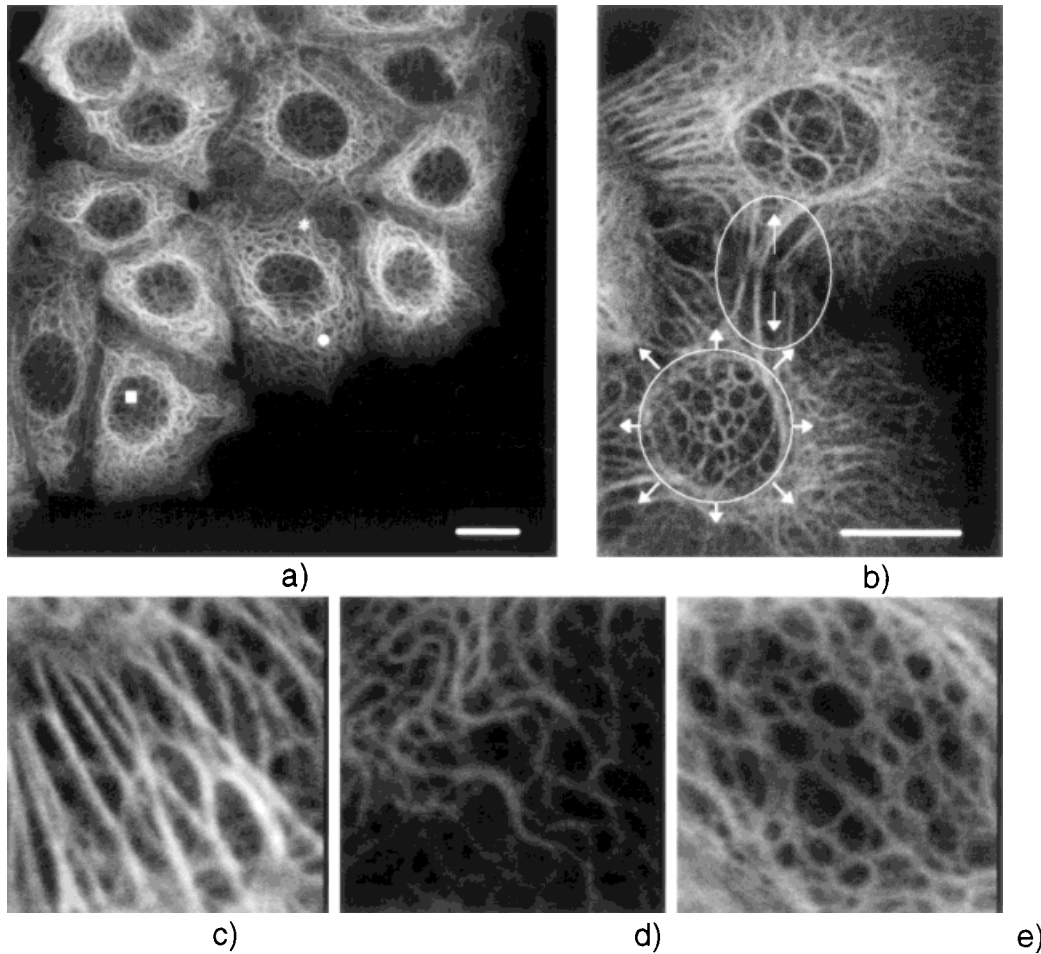


FIG. 1. a: The cyokeratin (C_8) network in MCF7 is formed by cross-linked filaments. ● marks the leading margin zones of spreading cell, without contact. ■ labels the zones around the nucleus. * spots the hemidesmosome (extracellular matrix-cell contact) or desmosome (cell-cell contact) zones. Low magnification (4 pixels/ μm), scale bar is 10 μm . b: Two cells connect to each other in desmosome zones (inside the ellipse). The confocal section is achieved in a plane located under the nucleus (inside the circle) and, therefore, the C_8 network is observed. Arrows indicate the direction of the supposed local intracytoplasmic stress-forces in a selected area. High magnification (11 pixels/ μm), scale bar is 10 μm . c-e: Focusing on the three patterns of cyokeratin observed in MCF7. c: Cytokeratin filaments in desmosome zone: "rectilinear" pattern. d: Cytokeratin filaments in a spreading zone of cytoplasm: "wave-like" pattern. e: Cytokeratin filaments around the nucleus: "alveolar" pattern. Resolution is 11 pixels/ μm ; each image represents an area of 83 μm^2 .

connected graph, the aim of this approach is to extract its topological features. The watershed method seems to be appropriate, because it results in a pixel-width line preserving the summits of images (26). The watershed segmentation is prone to oversegmentation due to noise effects. Thus, we performed a preprocessing step. It consists of a closing (27,28) with a structuring element whose size depends on the object width (Fig. 2a-c).

Following preprocessing, the watershed method for gray scale images is applied, using an iterative homotopic thinning operation until idempotence (29). This thinning lowers the gray scale of pixels belonging to the side of crests, but does not affect gray values of summits and valleys. Finally, a gray scale image with the crest lines (water partings) surrounding homogeneous regions (watersheds) is obtained (Fig. 2d-f).

Despite the preprocessing, the result is still oversegmented. Therefore, a region-merging algorithm has been developed and applied in addition (see Appendix 1).

The result of the "mesh-approach" is a unit-width mainly connected line (Fig. 2g-i).

Region-merging algorithm. The region-merging algorithm compares two neighboring regions and unifies them by erasing water partings. The gray scale altitudes of two adjacent regions A_1 and A_2 are compared. If the altitude difference $A_1 - A_2$ is lower than a threshold R , A_1 and A_2 are compared with the mean altitude A_L along the crest line separating them. If $\min(A_L - A_1, A_L - A_2)$ is lower than a threshold M , the crest line section is erased. The sensitivity of the algorithm depends on the parameters R and M defined by the user (see Appendix 1).

The "Filament-Approach"

In order to preserve the morphology of filaments, we designed a novel two-step method, the "filament-approach." The gray scale image is first filtered using a nonlinear filter Ψ (see Appendix 2), which was designed

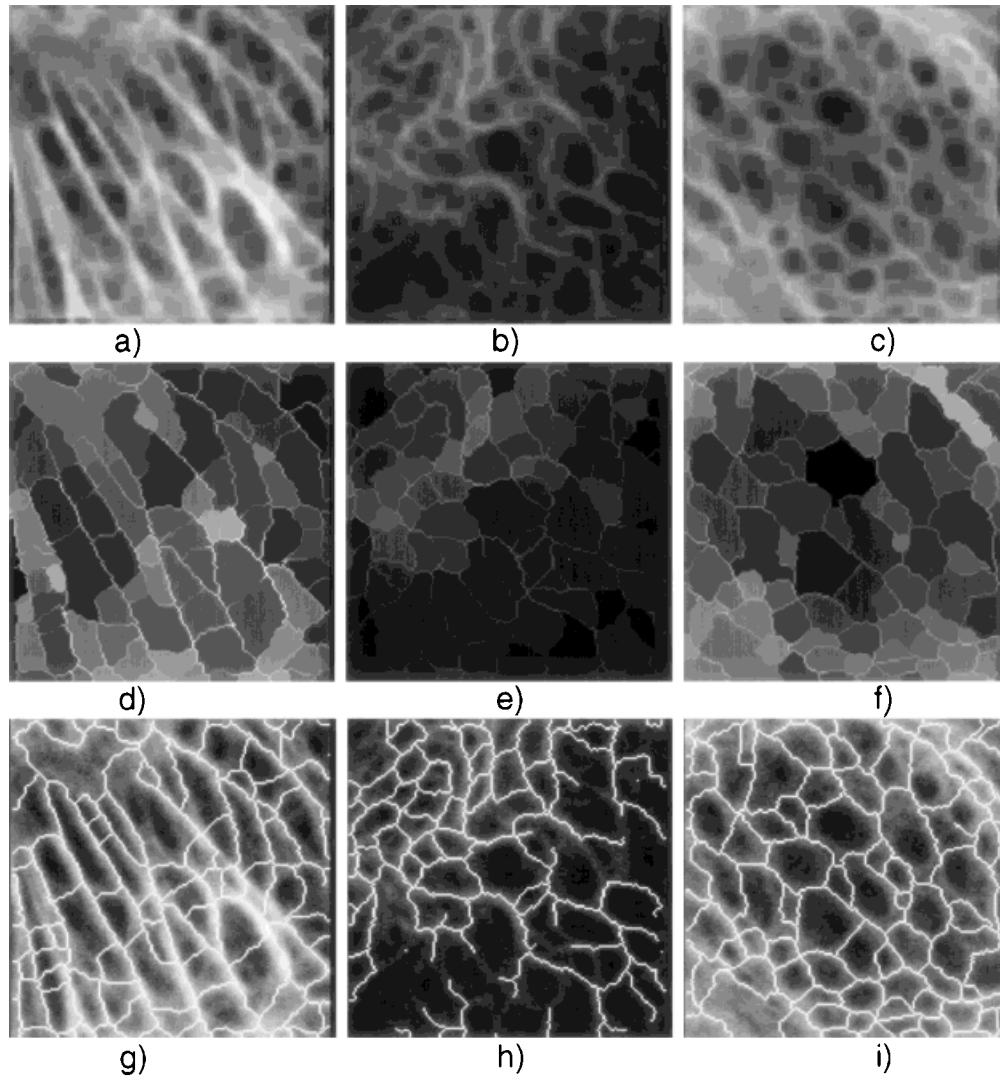


FIG. 2. Steps of the "mesh-approach" for the three patterns. a,d,g: "rectilinear" pattern. b,e,h: "wave-like" pattern. c,f,i: "alveolar" pattern. a-c: Gray level morphological closing with a structuring element of size 5×5 , since the filaments within the gray scale images have a mean width of 7 pixels (Fig. 1c-e). d-f: Results of watershed method for gray scale images: gray scale images with the crest lines (water parting) surrounding homogeneous regions (watersheds). g-i: Results of "mesh-approach" after the region-merging algorithm step.

to detect local maxima thicker than one pixel. In the second step, the line elements (curvilinear elements) are reconstructed in a dynamic thresholding procedure combined with mathematical morphology operations (see Appendix 3). The results of the "filament-approach" are represented in Figure 3d-f.

Nonlinear filter of the "filament-approach." A simple thresholding is first used to suppress background noise. The filter Ψ is composed of two steps, a selection step and a decision step (see Appendix 2). The selection step processes the gray values to characterize the topology within a neighborhood. The pixels are assigned to either line pixels or background pixels in the decision step. The final image, obtained by application of Ψ , is a gray scale image of the crest lines neighborhood (Fig. 3a-c).

Reconstruction of the curvilinear elements (filaments). The last step of the "filament-approach" consists of a dynamic thresholding combined with

mathematical morphology transformations. This procedure contains a variable decision domain, i.e., the decision rules depend on the gray values. With this method, the lower the threshold value, the smaller the decision domain, i.e., the darkest pixels are unfavored. The pixels selected according to the criterion ϕ are marked for further processing (see Appendix 3). A circular dilation step allows the restoration of connectivity without favoring a specific direction (30). To obtain a network of digital lines, the last step is an anchored skeletonization (20).

Combination of Methods

Since both methods preserve complementary network properties (topology of network for the "mesh-approach" and morphology of individual element for the "filament-

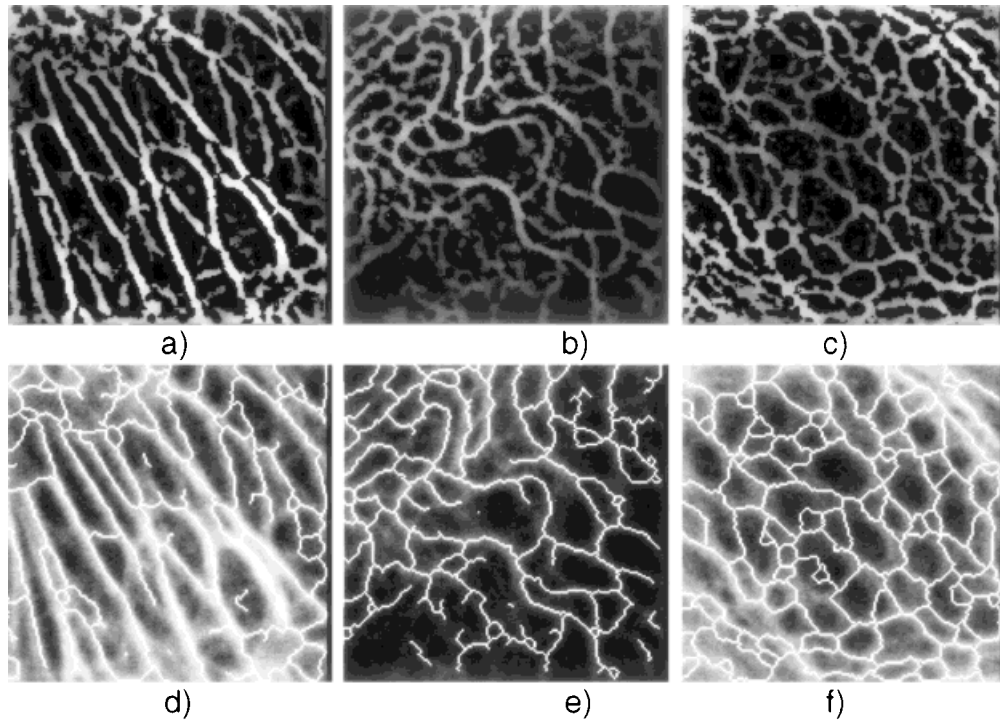


FIG. 3. Steps of "filament-approach" for the three patterns. a, d: "rectilinear" pattern. b, e: "wave-like" pattern. c, f: "alveolar" pattern. a-c: Results of the nonlinear filter of the "filament-approach." d-f: Results of "filament-approach" after the reconstruction of the curvilinear elements.

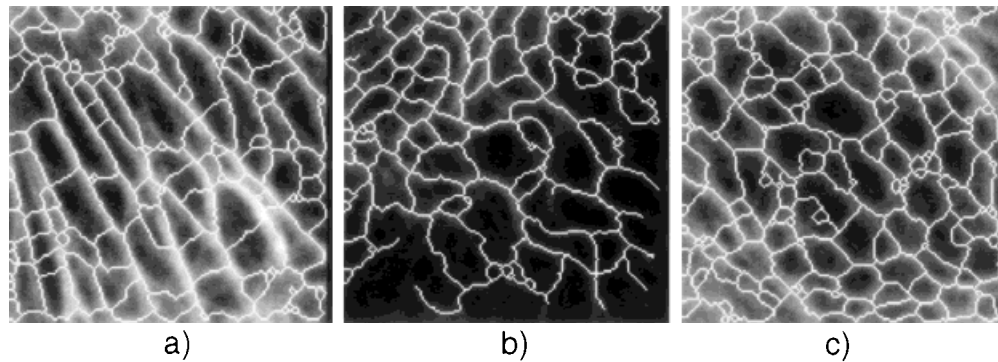


FIG. 4. Results of the combination of methods for the three patterns. a: "rectilinear" pattern. b: "wave-like" pattern. c: "alveolar" pattern. The combination of methods preserves both network topology and individual filament morphology.

approach"), the two methods were combined in order to take advantage of the two properties.

Due to the difference in the segmentation process, a simple union of the two images does not provide unit-width lines. Therefore, the image resulting from an overlay has to be further processed to obtain digital lines. This is performed by a dilation followed by a binary skeletonization (28):

$$S_c = (((S_m \cup S_f) \oplus B)OL),$$

where S_m is a "mesh-approach" segmented image, S_f is a "filament-approach" segmented image, B is a structuring element, and L is a Golay alphabet structuring element

(30). The result S_c of the combination is shown in Figure 4a-c.

Feature Extraction

The following features are defined to describe the topology and morphology of the network:

| | |
|--|----------|
| number of connection points | N_{cp} |
| total length of detected filaments | L_f |
| number of regions surrounded by detected filaments | N_r |
| areas of regions surrounded by detected filaments | A_r |
| curvature | C |

In order to obtain standard values for the feature curvature (C), we interactively selected filaments which were characteristic for the various patterns. From each "filament-approach" segmented image, we extracted a filament of characteristic shape. The extraction was obtained by an interactive program. First, the starting point of the filament was chosen. The program carried out the tracking of the filament from the starting point to the first branching point. From each branching point met, the user must decide which branch to follow.

From these extracted filaments, the curvature distributions for the three specific shapes were obtained. The computation of the curvature was achieved with the classical geometrical method of construction of the osculating circle (31). The curvature sign depends on the location of the osculating circle relative to the curve.

In addition to the primary features, we computed the following features: connecting index (I_c), mean length of filaments enclosing a region (L_r), and mean elongation factor (E_f) (30).

$$I_c = \frac{L_f}{N_{cp}}$$

$$L_r = 2 \times \frac{L_f}{N_r}$$

$$E_f = \frac{d \max}{d \min'}$$

$d \max$ and $d \min$ are the Feret diameters in two directions (30).

The seven features (N_{cp} , I_c , L_f , N_r , A_r , L_r , and E_f) were determined from the combination of methods. On the other hand, the computation of the curvature (C) was determined from the "filament-approach" results.

Statistical Analysis

With the aim of discriminating between two patterns depending on the topological and morphological features, we chose to use the Mann-Whitney test because this test allows the test of equality of location of two feature samples (32). The test of equality of location of two feature samples is obtained by showing that one of two random variables, representing the feature of a given pattern, is stochastically larger than the other, representing the feature of another pattern (33): a random variable A is said to be stochastically larger than a random variable B if $\forall z P(B \leq z) \leq P(A \leq z)$. In others words, the realizations of the random variable are larger than the realizations of the random variable B in probability.

The level of significance for each comparison was 0.05.

The statistical analysis was performed using the Stat2005 software package (Unilog, Grenoble, France).

RESULTS

Architectural Changes of Cytokeratin Networks

Figure 1a represents a global view of the cytokeatin (C_8) network in MCF7 cells: * spots the hemidesmosome

(extracellular matrix-cell contact) or desmosome (cell-cell contact) zones, ■ labels the zones around the nucleus, and ● marks the leading margin zones of spreading cell, without contact. In Figure 1b, two cells connect to each other in desmosome zones (inside the ellipse). At a higher magnification (Fig. 1c–e), local architectural changes correspond to at least three patterns of networks: "rectilinear," "wave-like," and "alveolar" patterns. The "rectilinear" pattern appears in desmosome zones and is composed of unidirectionally-oriented objects, like straight lines (anisotropic pattern) (Fig. 1c). It could be related to tension created when adjacent cells connect to each other (Fig. 1a*, Fig. 1b inside the ellipse: arrows indicate the direction of supposed forces). A "wave-like" pattern appears in isolated cells and is formed by cross-linked objects comparable to curvilinear structures (Fig. 1d). It seems to be present in "relaxed" zones of cytoplasm, when cells are isolated and hemidesmosomes are probably not yet established (Fig. 1a ●). The "alveolar" pattern forms a basket-like network around the nucleus and is composed of adjacent-linked closed curves (isotropic pattern) (Fig. 1e). The "alveolar" pattern seems to maintain nucleus position and probably to protect it from compression (Fig. 1a ■, Fig. 1b inside the circle).

Network Extraction

The segmented images of cytokeatin represent networks of interconnected curvilinear or linear structures. The three segmentation methods provide a skeleton, i.e., a pixel-width line representing the network (Figs. 2g–i, 3d–f, 4a–c).

The cytokeatin networks have two levels of organization: 1) the higher level, corresponding to the network topology (the "mesh-approach" correctly models the topology); and 2) the lower level, corresponding to the morphology of the individual filaments. The "filament-approach" allows an efficient modeling of the individual filaments. A characteristic shape filament can be extracted from each pattern. It resembles a straight line in the "rectilinear" pattern (Fig. 1c), a curve in the "wave-like" pattern (Fig. 1d), and a circle in the "alveolar" pattern (Fig. 1e).

Feature Analysis

The results of statistical analysis are summarized in Table 1.

Topological Features

Both the number of connection points (N_{cp}) and the connecting index (I_c) characterize the connectivity of a network. The total length of detected filaments (L_f) and the number of regions surrounded by detected filaments (N_r) describe the network density. The mesh structure is represented by three features: areas of regions surrounded by detected filaments (A_r), mean length of filaments enclosing a region (L_r), and mean elongation factor (E_f).

Table 1
*Number of Connection Points (N_{cp}), Connecting Index (I_c), Total Length of Detected Filament (L_f), Number of Regions (N_r), Areas of Regions (A_r), Mean Length of Filaments Enclosing a Region (L_r), and Mean Elongation Factor (E_f) in the Combination of Methods Depending on the Three Patterns**

| | (R) Rectilinear pattern (n = 20) (Mean ± SD) | (W) Wave-like pattern (n = 20) (Mean ± SD) | (A) Alveolar pattern (n = 20) (Mean ± SD) | Mann-Whitney test P (significant test if P < .05) | |
|--------------|--|--|---|---|----------|
| (N_{cp}) | 99.9 ± 37.4 | 74.1 ± 19.2 | 111.9 ± 20.7 | (R-W) | .026 S |
| | | | | (R-A) | .35 NS |
| | | | | (W-A) | <.0001 S |
| (I_c) | 10.5 ± 3.3 | 12.5 ± 1.9 | 10.1 ± 1.3 | (R-W) | .014 S |
| | | | | (R-A) | .507 NS |
| | | | | (W-A) | .00015 S |
| (L_f) | 1,027.1 ± 235.4 | 895.7 ± 134.7 | 1,110.2 ± 87.2 | (R-W) | .025 S |
| | | | | (R-A) | .33 NS |
| | | | | (W-A) | <.0001 S |
| (N_r) | 25.6 ± 7.7 | 21.5 ± 6.7 | 30.7 ± 3.6 | (R-W) | .076 NS |
| | | | | (R-A) | .053 NS |
| | | | | (W-A) | <.0001 S |
| (A_r) | 310.3 ± 467.9 | 392.4 ± 503.1 | 254.7 ± 154.5 | (R-W) | .0005 S |
| | | | | (R-A) | .24 NS |
| | | | | (W-A) | .006 S |
| (L_r) | 41.5 ± 5.9 | 44.5 ± 10.9 | 36.5 ± 4.2 | (R-W) | .685 NS |
| | | | | (R-A) | .0028 S |
| | | | | (W-A) | .0026 S |
| (E_f) | 1.6 ± 0.8 | 1.5 ± 0.9 | 1.55 ± 1.1 | (R-W) | .333 NS |
| | | | | (R-A) | .0009 S |
| | | | | (W-A) | .038 S |
| (C) | -0.0001 ± 0.02 | -0.002 ± 0.04 | 0.06 ± 0.03 | (R-W) | .0076 S |
| | | | | (R-A) | <.0001 S |
| | | | | (W-A) | <.0001 S |

*Curvature (C) in the “filament-approach” depends on the three patterns. S, significant test; NS, non-significant test.

Network Connectivity

Number of connection points (N_{cp}). When combining the two methods, the Mann-Whitney test showed that both “rectilinear” and “alveolar” pattern distributions were stochastically larger (see Statistical Analysis) than the “wave-like” pattern distribution (Table 1). On the other hand, no significant difference was found between “alveolar” and “rectilinear” patterns.

The “wave-like” pattern seems to be less connected than the other patterns. The connectivity of the “alveolar” pattern is not unlike that of the “rectilinear” pattern.

Connecting index (I_c). The connecting index is computed by using the combination of the two methods. The larger the connecting index, the looser the connections of the network (Table 1). The “wave-like” pattern distribution is stochastically larger than both the “rectilinear” and “alveolar” pattern distributions: in the “wave-like” pattern, the network is less connected. The connecting index behaves in the same way in the “alveolar” and “rectilinear” patterns.

The two features of the network connectivity behave in the same way. Both patterns (“rectilinear” and “alveolar”) apparently display the same behavior. “Wave-like” patterns are less connected than the two others.

Network Density

Total length of detected filaments (L_f). The total length of detected filaments (Table 1) shows significant

differences between the “rectilinear” and the “wave-like” patterns, and between the “alveolar” and the “wave-like” patterns. The “rectilinear” and “alveolar” pattern distributions are stochastically larger than the “wave-like” pattern distribution. The network configuration of the “wave-like” pattern seems less dense than the “rectilinear” or “alveolar” patterns.

On the other hand, this feature cannot discriminate between the “rectilinear” and “alveolar” patterns. The Mann-Whitney test found no significant difference between these two patterns.

Number of regions (N_r). The number of regions is another indicator of the network density: the greater the number of regions, the denser the network (Table 1). No significant differences were found between the “rectilinear” and the “wave-like” pattern distributions. The “alveolar” pattern distribution was stochastically larger than the “wave-like” pattern distribution. Indeed, the “alveolar” pattern seemed to have a greater number of regions than the other patterns, although the difference was not significant ($P = 0.053$ for the Mann-Whitney test) between the “alveolar” pattern and the “rectilinear” pattern.

Mesh Structure

Areas of regions (A_r). The “wave-like” pattern distribution was stochastically larger than both the “rectilinear” and “alveolar” pattern distributions: the areas of regions in the “wave-like” patterns were the largest (Table 1). The

areas of region distributions did not show any significant difference between "rectilinear" and "alveolar" patterns.

Mean length of filaments enclosing a region (L_r). The mean length of filaments enclosing a region (L_r) can be linked to the perimeter of the mesh (Table 1). Both the "rectilinear" and "wave-like" pattern distributions were stochastically larger than the "alveolar" one: the perimeter in the "alveolar" pattern was smaller than in the other patterns. No significant differences were found between the "wave-like" and the "rectilinear" pattern distributions.

Mean elongation factor (E_r). The mean elongation factor is an indicator of mesh form (Table 1). Both the "rectilinear" and "wave-like" pattern distributions were stochastically larger than the "alveolar" one. The regions of "alveolar pattern" were less elongated than in the other patterns. The difference between the "rectilinear" and the "wave-like" pattern distributions was not significant. In both the "rectilinear" and the "wave-like" pattern, the mesh had analogue forms.

As for the mean length of filaments enclosing a region, the mean elongation factor showed that the distributions, coming from zones not located around the nucleus, were not significantly different.

Morphological Features

Curvature. The curvature distributions allow the determination of the characteristic shapes of filaments: a straight line in the "rectilinear" pattern, a curve in the "wave-like" pattern, and a circle in the "alveolar" pattern. For the "rectilinear" pattern, the curvature distribution (Fig. 5a) shows a characteristic shape which can be assimilated to the straight line. For the "wave-like" pattern, the distribution (Fig. 5b) is symmetrical to the y-axis. This distribution aspect is characteristic of a sinusoidal filament curve. The sum of the curvature values along a characteristic shape filament in the "alveolar" pattern is equal to 2π (i.e., the filament is a simply-connected closed curve), and the probability of finding a negative value is lower than 2% (Fig. 5c); the characteristic filament shape of the "alveolar" pattern can thus be approximated by a circle.

The Mann-Whitney test showed that the curvature distribution of the specific shape filaments in the "alveolar" pattern was stochastically larger than both the "rectilinear" and "wave-like" pattern distributions (Table 1). Moreover, the curvature distribution in the "wave-like" pattern was stochastically larger than the one in the "rectilinear" pattern.

Curvature, therefore, discriminates between the specific shapes depending on the patterns and, in addition to their distributions (Fig. 5), allows confirmation of the hypothesis on specific shapes: a straight line in the "rectilinear" pattern, a curve in the "wave-like" pattern, and a circle in the "alveolar" pattern.

DISCUSSION

This work has been focused on the quantitative analysis of cytokeratin networks whereas previous studies, dealing

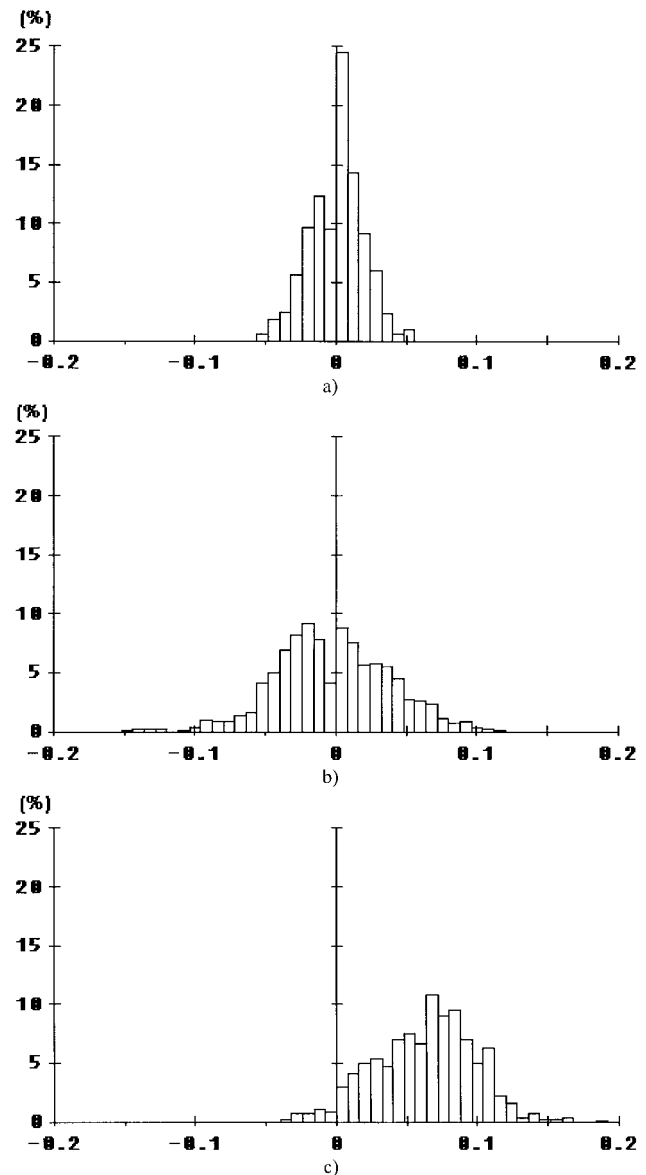


FIG. 5. Frequency distributions of the curvature values of characteristic shapes. a: "Rectilinear" pattern. b: "Wave-like" pattern. c: "Alveolar" pattern. The aspect of the curvature distributions allows the determination of characteristic shapes. a: A characteristic shape which can be likened to the straight line for the "rectilinear" pattern. b: Characteristic of a sinusoidal filament curve for the "wave-like" pattern. c: The probability of finding a negative value is lower than 2%; moreover, the sum of the curvature values along a characteristic shape filament in the "alveolar" pattern is equal to 2π (characteristic shape is a simply-connected closed curve); the characteristic filament shape of the "alveolar" pattern can thus be approximated by a circle.

with both modeling and analysis of the dynamics of cytoskeletal networks, were concerned with microfilaments (34–37) or microtubules (38) at the molecular or macromolecular level.

In this paper, two methods were described to tackle the problem of analyzing networks of curvilinear objects in gray scale images. The two methods derive from different perspectives, topological and morphological. These differ-

ent perspectives allow modeling of the network at low (local) and high (global) levels of organization. Both levels are interesting because they provide complementary information concerning the variation of the network topology and of the filament morphology. Since all features must not be considered on the same level, the feature extraction is made from a particular approach. The computation of the curvature is achieved from the “filament-approach” results, as it requires a good approximation of the filament shape. The seven features (N_{cp} , I_c , L_f , N_r , A_r , L_r , and E_f) are determined from the combination of methods, as these features require a good estimation of both topology and morphology of the cytokeratin network.

Moreover, we observe that the “mesh-approach” is more efficient in isotropic zones, which are densely connected (e.g., “alveolar” pattern), than in anisotropic zones. The “mesh-approach” correctly models the topology of cytokeratin networks, but the morphology of individual filament is lost. On the other hand, the “filament-approach” is more efficient in anisotropic zones with a weaker connectivity (e.g., “rectilinear” and “wave-like” patterns). Therefore, the combination of methods presented here can be considered as providing an evaluation of the results of the two individual approaches. Image analysis therefore appears a powerful tool to estimate cytoskeleton architecture. Cytoskeleton segmentation could be further improved using other image analysis steps, such as differential geometry-based algorithms (39), allowing the extraction of the filament width. Our methods could be used to segment other types of filaments of cytoskeleton (microfilaments, microtubules, and vimentin) or other types of curvilinear structure networks (e.g., vessels from angiography) by adapting the parameter values, depending on the size of objects and on the mean gray scale of images.

In this work, we used confocal microscopy, rather than wide-field fluorescence microscopy, in order to increase lateral resolution for high-magnification images. On the other hand, MCF7 cultured on plastic dishes are very flat, and the sectioning capabilities of confocal microscopy were here used to analyze specific cytokeratin architecture found at specific levels, e.g., near the nuclear envelope and the substratum-cell contacts. Further generalizations of developed procedures to three-dimensional (3D) models of cytoskeletons will use the full capabilities of confocal microscopy sectioning.

In the MCF7 cell line, we observed several patterns of cytokeratin networks between isolated or confluent cells. Our hypothesis is that variations observed in the network architectures could reflect the existence of local intracytoplasmic tensions or forces, in agreement with the tensegrity paradigm of Ingber (40) or the percolation model of Forgacs (41). By means of confocal microscopy combined with image analysis, significant features, quantitating the architectural variations, are extracted and associated with the supposed intracytoplasmic forces: the “rectilinear” pattern appearing in the desmosome or hemidesmosome zone (“stress-force” zone), the “alveolar” pattern around the nucleus maintaining nucleus position and probably

protecting it from compression (“stress-force” zone), and the “wave-like” pattern appearing in isolated or spreading cells in leading margin zones (“relaxed” zone for cytokeratin filaments).

For many topological features (N_{cp} , I_c , L_f , N_r , and A_r), differences between the “rectilinear” and “alveolar” patterns are not significant. But some of them (N_{cp} , I_c , L_f , N_r , and A_r) show significant differences between the “wave-like” pattern and both the “rectilinear” and “alveolar” patterns. The patterns appearing in supposed “stress-force” zones (“rectilinear” and “alveolar”) show topological similarities for network density and connectivity. The cytokeratin network becomes increasingly denser and more connected in “stress-force” zones. Thus the connectivity and the density of the network might be modified by the occurrence of a “stress-force” zone. The mesh structure of the network also differs depending on the intracellular localization. The network pattern occurring around the nucleus (“alveolar” pattern) has a mesh structure different from the other patterns (“rectilinear” and “wave-like”). The regions are more elongated and larger in “rectilinear” and “wave-like” than in “alveolar” patterns. The mesh structures of the “rectilinear” and the “wave-like” patterns are close to each other: the differences between the two patterns are not significant for either the mean elongation factor or the number of points per region.

At a lower level (morphology of elements), different characteristic filament shapes are observed: a straight line in the “rectilinear” pattern, a curve in the “wave-like” pattern, and a circle in the “alveolar” pattern. Curvature is a highly discriminative feature. In specific “force-stress” zones (desmosome or hemidesmosome), the filaments take a fixed orientation (anisotropic) and are nearly “rectilinear.” Around the nucleus (“alveolar” pattern), the filaments have an isotropic configuration. In the cytoplasm, at a distance from the nucleus (“rectilinear” and “wave-like” patterns), the characteristic shape is never a closed curve. Therefore, the connectivity and the density of a network describe its location in a “stress-force” zone or in a “relaxed” zone. The mesh structure characterizes the intracellular localization of the network: around the nucleus or distant from the nucleus. Moreover, the filament shape reflects the intracellular localization and the occurrence of a “stress-force” zone.

In conclusion, architectural variations of cytokeratin networks seem to be related to local tensions or forces appearing spontaneously in the cytoplasm of MCF7 cells in culture. However, further experiments and cytoskeleton analysis of cells submitted to external forces (work in progress) will be necessary to prove the hypothesis that the architectural variations of intermediate filaments reflect intracytoplasmic tensions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Angela Downs-Rigaut and Theano Irinopoulou for helpful discussions.

LITERATURE CITED

1. Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 1997;59:575-599.
2. Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* 1997;110:2109-2116.
3. Thoumine O, Ziegler T, Girard PR, Nerem RM. Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp Cell Res* 1995;219:427-441.
4. Wang N, Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J* 1994;66:2181-2189.
5. Roskelley CD, Desprez PY, Bissell M. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12378-12382.
6. Bissell M, Hall H, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982;99:31-68.
7. Maniotis A, Chen C, Ingber D. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:849-854.
8. Mooney D, Langer R, Ingber D. Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *J Cell Sci* 1995;108:2311-2320.
9. Roskelley CD, Srebrow A, Bissell M. A hierarchy of ECM-mediated signalling tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:736-747.
10. Getzenberg RH. Nuclear matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. *J Cell Biochem* 1994;55:22-31.
11. Pienta KJ, Coffey DS. Nuclear-cytoskeletal interactions—evidence for physical connections between the nucleus and cell periphery and their alteration by transformation. *J Cell Biochem* 1992;49:357-365.
12. Stewart M. Intermediate filament structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:3-11.
13. Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* 1991;113:155-160.
14. Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 1996;134:971-983.
15. Nagle RB. A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis. *Mol Biol Reprod* 1994;19:3-21.
16. Bloom S, Lockard VG, Bloom M. Intermediate filament-mediated stretch-induced changes in chromatin: a hypothesis for growth initiation in cardiac myocytes. *J Mol Cardiol* 1996;28:2123-2127.
17. Curschellas E, Matter A, Regenass U. Immunolocalization of cytoskeletal elements in human mammary epithelial cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:1517-1527.
18. Sapino A, Guidoni L, Bussolati G, Marchisio PC. Oestrogen and tamoxifen induced cytoskeletal changes in breast cancer cells. *Chimioterapia* 1985;4:243-245.
19. Vassy J, Millot G, Irinopoulou T, Rigaut JP, Calvo F. MCF7 cytokeratin network architecture varies according to environmental modifications. In: Abstracts of 21st Meeting of the International Association for Breast Cancer Research, Paris. 1996. p 108.
20. Beil M, Irinopoulou T, Vassy J, Wolf G. A dual approach to structural texture analysis in microscopic images. *Comput Methods Programs Biomed* 1995;48:211-219.
21. Vassy J, Beil M, Irinopoulou T, Rigaut JP. Quantitative image analysis of cytokeratin filament distribution during fetal rat liver development. *Hepatology* 1996;23:630-638.
22. Vassy J, Irinopoulou T, Beil M, Rigaut JP. Spatial distribution of cytoskeleton intermediate filaments during fetal rat hepatocyte differentiation. *Microsc Res Tech* 1997;39:436-443.
23. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan MA. A human cell line from pleural effusion derived from a breast carcinoma. *JNCI* 1973;51:1409-1416.
24. Art J. Photon detectors for confocal microscopy. In: Pawley J, editor. *The handbook of biological confocal microscopy*. Madison: IRM Press; 1989. p 115-126.
25. Serra J. Image analysis and mathematical morphology. II: Theoretical advances. London: Academic Press; 1988. p 1-411.
26. Vincent L, Soille P. Watershed in digital space: an efficient algorithm based on immersion simulation. *IEEE Trans PAMI* 1991;13:583-597.
27. Heijmans H. Mathematical morphology: a modern approach in image processing based on algebra and geometry. *SIAM Rev* 1995;37:1-36.
28. Serra J. Image analysis and mathematical morphology. London: Academic Press; 1982. p 1-610.
29. Bleau A, De Guise J, Leblanc AR. A new set of fast algorithms for mathematical morphology. Identification of topographic features on grayscale images. *Image Understanding* 1992;56:210-229.
30. Coster M, Chermant JL. *Precis d'analyse d'images*. Paris: Editions CNRS; 1989. p 1-521.
31. Gray A. *Modern differential geometry of curves and surfaces*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p 90-95.
32. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman; 1981. p 432-434.
33. Krickeberg K. *Petit cours de statistique*. Berlin, Springer-Verlag; 1996. p 34-37.
34. Civelekoglu G, Edelstein-Keshet L. Modelling the dynamics of F-actin in the cell. *Bull Math Biol* 1994;56:587-616.
35. Dufort P, Lumsden C. How profilin/barbed-end synergy controls actin polymerization: a kinetic model of the ATP hydrolysis circuit. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996;35:309-330.
36. Satcher RL, Dewey F. Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton. *Biophys J* 1996;71:109-118.
37. Suciu A, Civelekoglu G, Tardy H, Meister JJ. Model for the alignment of actin filaments in the endothelial cells subjected to fluid shear stress. *Bull Math Biol* 1997;59:1029-1046.
38. Thomason DB, Anderson O, Menton V. Fractal analysis of cytoskeleton rearrangement in cardiac muscle during head-down tilt. *J Appl Physiol* 1996;81:1522-1527.
39. Steger C. Extracting curvilinear structures: a differential geometric approach. Fourth European Conference on Computer Vision. *Lecture Notes Comput Sci* 1996;1024:630-641.
40. Ingber DE. Cellular tensegrity—defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1993;104:613-627.
41. Forgacs G. On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation. *J Cell Sci* 1995;108:2131-2143.

APPENDIX 1

Region-Merging Algorithm

We have designed a region-merging algorithm which erases water parting sections; it makes use of branching point detection and crest line tracking (water parting tracking). The algorithm is presented in pseudocode:

For each branching point (point of crest line, having more than two neighbors belonging to crest line)

```

{
  For each crest line section (part of crest line from the
  current branching point to the first met branching point)
  {
    Computation of the mean gray level on the crest line
    section: AL
    Extraction of the two adjacent region
    altitudes: A1 and A2
    If  $|A1-A2| < R$  Then
      {
        If  $\min(|AL-A1|, |AL-A2|) < M$  Then
          {
            Erase the crest line section
          }
        }
      }
  }
}

```

R is the criterion of region to region proximity, and M is the criterion of region to frontier proximity; R and M are empirical parameters. In our images, R and M are equal to 15 (Fig. 2g-i).

APPENDIX 2

Nonlinear Filter of the "Filament-Approach"

In the selection step, for each pixel, in a neighborhood centered around itself, the number of neighbors N_{ky} whose gray value is lower or equal than the current pixel

value and S_{xy} the number of neighbors whose gray value is equal to the current pixel value are computed.

Let $I(x,y) = z_{xy}$, where z_{xy} is the gray level at position (x,y) ,

$$V(x, y)$$

$$N_{xy} = \sum_k \sum_l N_{x+ky+1}, \text{ with } N_{x+ky+1} = \begin{cases} 1 & z_{xy} \geq z_{x+ky+1} \\ 0 & z_{xy} < z_{x+ky+1} \end{cases}, k \in \{-n, \dots, n\}, l \in \{-n, \dots, n\},$$

$$S_{xy} = \sum_k \sum_l S_{x+ky+1}, \text{ with } S_{x+ky+1} = \begin{cases} 1 & z_{xy} = z_{x+ky+1} \\ 0 & z_{xy} \neq z_{x+ky+1} \end{cases}, k \in \{-n, \dots, n\}, l \in \{-n, \dots, n\};$$

The neighborhood size $((2n + 1)^2)$ depends on the width of the objects in the images: the curvilinear element must fit in the selection mask. Therefore, if the curvilinear objects have a mean width of 7 pixels (Fig. 1c-e), a window of size 9×9 pixels will be used.

In the decision step, we decide if the pixel is a local element of a ridge, with the help of decision criterion δ , and if the pixel belongs to a blurred zone with decision criterion θ . If a pixel is considered as a ridge element and does not belong to a blurred zone, it is preserved taking into account its neighborhood, i.e., a smoothing, with smaller mask size $((2m + 1)^2, m < n)$, is applied in order to reduce noise before writing this pixel in the new image I^N .

If $(N_{xy} > \delta \text{ and } S_{xy} < \theta)$ then $z_{xy}^N = \overline{z_{xy}}(x, y)$ is a local optimum (smoothing)
 else $z_{xy}^N = 0(x, y)$ is not preserved (thresholding)

with

$$\overline{z_{xy}} = \frac{1}{(2m + 1)^2} \sum_i \sum_j z_{x+iy+j}, \quad i \in \{-m, \dots, m\}, \quad j \in \{-m, \dots, m\};$$

$\sqrt{\delta}$ must be equal to the mean width of the objects in such a way that δ roughly represents the object area included in the selection mask. In Figure 3a-c, δ is equal to 49.

Therefore, θ is the detector of blurred zones (cytoplasmic gel zones or zones not belonging to the focal plane); $\sqrt{\theta}$ must be larger than the object width in order to avoid deleting too many object-points. In Figure 3a-c, θ is equal to 60. The smoothing neighborhood size $((2m + 1)^2)$ depends on the mean width of the objects in the images: the neighborhood must be included in the curvilinear element. Therefore, if the curvilinear objects have a mean

width of 7 pixels (Fig. 1c-e), a window of size 3×3 pixels will be used.

The filter Ψ detects ridges (crest line neighborhoods). It is a selective smoothing adaptive filter which operates a smoothing on zones satisfying a criterion (selective smoothing) and uses two different mask sizes (adaptive). It implements variable size masks depending on step $((2n + 1)^2)$ for the selection and $(2m + 1)^2$ for the smoothing) and it includes a decision stage.

APPENDIX 3

Reconstruction of the Curvilinear Elements in the "Filament-Approach"

For each threshold value

{
 Inf = $(1 - \tau) \times \text{Threshold}$
 Sup = $(1 + \tau) \times \text{Threshold}$
 For each $z_{xy} \in [\text{Threshold}, \text{Sup}]$
 {

$$C_{xy} = \sum_k \sum_l C_{x+ky+1}$$

$$C_{x+ky+1} = \begin{cases} 1 & z_{x+ky+1} \in [\text{Inf}, \text{Threshold}] \\ 0 & z_{x+ky+1} \notin [\text{Inf}, \text{Threshold}] \end{cases}$$

If $C_{xy} > \phi$ then z_{xy} is marked (determination of maxima of image zones corresponding to the interval $[\text{Threshold}, \text{Sup}]$)

}
 Dilation of the marked zones by a circle (in order to connect two one-pixel-distant maxima)
 Binary skeletonization (to obtain a unit-size width line)
 }

The basis of the decision domain is a neighborhood whose size depends on the mean width of the objects: the neighborhood must be included in the object. In Figure 3a-c, the preprocessed objects have a mean width of 5 pixels, so the neighborhood size is 3×3 . τ allows the variability of the depth of decision domain $[\text{Inf}, \text{Threshold}]$. The τ value depends on the mean gray level of the images. The lower the mean gray level, the higher the τ value.

| Mean gray levels | τ |
|------------------|----------------|
| 115 | 0.2 Figure 1c |
| 65 | 0.3 Figure 1e |
| 45 | 0.35 Figure 1d |

The selected pixels, according to the criterion ϕ , are marked; ϕ is an empirical parameter, equal to 5 in Figure 3d-f. The circular dilation step allows the restoration of connectivity without favoring a specific direction. The structuring element must be included in the preprocessed object; thus, the structuring element size is 3×3 . The binary skeletonization is applied on the dilated marked zones by taking the successive skeletons (Fig. 3d-f).

C. Effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7

Effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7

Vassy, J.,* Portet, S.,* Beil, M.,[†] Millot, G.,[‡] Fauvel-Lafève, F.,[§] Karniguian, A.,[§] Gasset, G.,^{||} Irinopoulou, T.,[#] Calvo, F.,[‡] Rigaut, J.P.,* Schoevaert, D.*

*AIPC Lab., Université Paris 7, IUH, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France; [†]Dept. of Internal Medicine I, University Hospital, Ulm, Germany, and IMAGENIUM, 33 rue St Roch, 75001 Paris, France; [‡]Pharmacologie Lab., IUH, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France; [§]U353 INSERM, IUH, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France; ^{||}GSBMS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; [#]U430 INSERM, Hôpital Broussais, Paris, France

Corresponding author: Jany Vassy, AIPC Lab., UP7, Institut Universitaire d'Hématologie Hôpital Saint Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France. E-mail: jvassy@chu-stlouis.fr

ABSTRACT

Because cells are sensitive to mechanical forces, weightlessness might act on stress-dependent cell changes. We hypothesized that the integration of environmental factors might induce specific cytoskeletal architecture patterns, characterized by quantitative image analysis. Human breast cancer cells MCF-7, flown in space in a photon capsule, were fixed after 1.5, 22, and 48 h in orbit. Cells subjected to weightlessness were compared with 1g in-flight and ground controls. Postflight, fluorescent labelings were performed to visualize cell proliferation (Ki-67), signal transduction (phosphotyrosine), three cytoskeleton components (microtubules, microfilaments, and intermediate filaments), and chromatin structure. Confocal microscopy and image analysis were used to quantify cycling cells and mitosis, modifications of the cyokeratin network, and chromatin structure. In weightlessness, phosphotyrosine signal transduction was lower, more cells were cycling, and mitosis was prolonged. Finally, cell proliferation was reduced as a consequence of a cell-cycle blockade. Microtubules were altered in many cells. The perinuclear cyokeratin network was more loosely 'woven', and chromatin structure was modified. The prolongation of mitosis can be explained by an alteration of microtubule self-organization in weightlessness, involving reaction-diffusion processes. The loosening of the perinuclear cyokeratin network and modification of chromatin distribution are in agreement with basic predictions of cellular tensegrity.

Key words: microgravity • image analysis

A solid body of literature now shows that the cell genotype is not the only determinant of normal and pathological cell behavior. For instance, tumor cells bearing numerous genomic abnormalities can be induced to behave in a phenotypically normal manner in response to modification of their microenvironment (1, 2). Therefore, for a cell to function normally, not only does the genotype need to be intact to some extent, with correct replication and transcription, but each cell component must also be in the right place at the right time. The location of cellular components at any time depends on the integrity and spatial organization of the cytoplasmic cytoskeleton (microtubules, MT; microfilaments, MF; and intermediate filaments, IF) and the nucleoskeleton. For

example, MT and MF are thought to be involved in mRNA localization before translation (3). The position of the nucleus inside the cell depends on the IF network (4). The nucleoskeleton or nuclear matrix, including IF lamins and other scaffold proteins, participates in the regulation of gene activity (5-9). Conversely, the integrity and the three-dimensional (3D) organizations of cytoskeleton and nucleoskeleton filaments depend on gene activity.

The organization of the nucleo- and cytoskeletons is regulated by soluble extracellular signals, as well as cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions via the initiation of biochemical and/or mechanical signaling (1, 10). Tensegrity architecture (11, 12) has frequently been used as a conceptual paradigm for cytoskeleton mechanics and mechanotransduction. Coiled-coil structure and viscoelastic properties of IF (13), especially of cyokeratins (14), suggest that IF may be the best candidates, among other components of the cytoskeleton, to ensure structural and mechanical transduction of signals from the environment (15, 16). We postulate that the integration of both biochemical and mechanical signals might induce specific cyokeratin-architecture patterns. These patterns can be characterized by quantitative image-analysis features that have previously been described by our group (15-18).

This study aims to investigate the role of gravity in signal transduction across the cytoskeleton to the nucleus. According to our hypothesis, gravity was considered as an external force and, depending whether it was applied (1g ground controls or 1g centrifuge in-flight controls) or not (weightlessness, abbreviated by μ g), the spatial organization of the cytoskeleton would be modified and, consequently, so would the cell physiology. Thus, a spaceflight experiment offers the best opportunity to address the existence of a relationship between the architecture of the cytoskeleton components (MT, MF, and IF), signal transduction and cell proliferation.

Results from previous experiments suggested that weightlessness influences cellular functions such as proliferation (19-21), signal transduction (22-24) and gene expression (25-27). From those results it could also be inferred that the observed changes depended on the cell type studied and the signal-transduction cascade involved: Free-floating T lymphocytes had a lower

mitogenic response, whereas cells attached to a substrate proliferate more (reviewed in ref 19). Moreover, the cytoskeleton was affected by weightlessness. Osteoblasts, lymphocytes, promyelocytes, and neurons cultured in weightlessness show cytoskeleton reorganization (bundles and condensed filaments), especially for MF and MT (28–31). *In vitro* experiments showed that the macroscopic self-organization of MT into stationary macroscopic patterns was gravity-dependent and that the patterns corresponded to different MT orientations (32, 33). On the basis of those observations, several different pathways could be involved to explain how gravity, or weightlessness, might affect cytoskeletal organization and cell proliferation.

The first hypothesis was that gravity would interact directly on reaction-diffusion processes, as demonstrated by Tabony and co-workers for MT (32, 33): in weightlessness, MT did not self-organize normally into stationary macroscopic patterns corresponding to different MT orientations. Thus, the orientation of elongating MT could be modified in MCF-7 cells subjected to weightlessness. This effect could affect, for example, the assembly of the mitotic spindle. Finally, cell proliferation would be altered as a result of MT changes alone.

The second hypothesis was that weightlessness would affect cell morphology and cell spreading in a more general way, and thereby modify several signaling pathways: signal transduction leading to cell proliferation; cytoskeleton architecture and tensegrity; nucleoskeleton and chromatin distributions; and gene expression.

These two hypotheses are not mutually exclusive. In our experiment, we combined immunofluorescence, confocal microscopy, and image analysis to study cell proliferation, phosphotyrosine (PTyr) signal transduction, cytoskeleton architecture, and chromatin structure of breast cancer cell line (MCF-7) subjected to 48 h of weightlessness compared with gravity (1g in-flight centrifuge and ground controls). To the best of our knowledge, very few studies have been conducted on cellular architecture under weightlessness by using quantitative image analysis.

MATERIALS AND METHODS

Hardware

We performed the experiment in the IBIS instrument (Instrument de Biologie Spatiale) developed by the CNES (French Centre National d'Etudes Spatiales) and manufactured by COMAT (Toulouse, France). IBIS was designed to function in fully automatic mode in recoverable space capsules like the photon module (TsSKB-Progress, Samara, Russia). IBIS contains two sets of cassettes: One was kept in weightlessness (10^{-5} residual gravity, μg), whereas the other was in a 1g centrifuge (1g in-flight control). However, to save energy, the centrifuge was started only when the photon capsule was in orbit, 1.5 h after the launching. Each cassette contained four biocompatible polyethylene bags (2.2 ml). In each bag was inserted a 2×3 cm Thermanox plastic coverslip (Nunc, Naperville, Ill.) and an ampoule of concentrated fixative mixture (0.8 ml). IBIS also maintained the temperature at 37°C during the experiment and at 22°C after sample fixation.

Cell culture and fixation

The MCF7 cell line, derived from a human breast carcinoma (34), was cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma), containing 2 mM glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin, 50 $\mu g/ml$ streptomycin (Sigma), and 15 mM HEPES buffer (Sigma).

Twenty-two hours before launching, cells suspended in 2.2 ml of supplemented medium were deposited into duplicate bags containing a Thermanox coverslip. Bags were sealed, and cells were allowed to adhere and spread for 6 h before the cassettes were installed in IBIS in the photon capsule at the top of the launch vehicle, 16 h before launching (**Fig. 1**). Cells were fixed in 1.5% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde (final concentration) by the automatic breaking of a fixative-containing ampoule 1.5 (t_0), 22 (t_1), or 48 h (t_2) after launching. Time t_0 , just before the 1g in-flight centrifuge started, was selected to study the effects of launching stress; for example, vibrations and acceleration.

The 1g and μg samples were compared at times t_1 and t_2 . Because both samples had been subjected to the effects of launching stress, the differences observed between them at t_1 and t_2 can be attributed to the 22 (t_1) or 48 h (t_2) of weightlessness. At the same times, cell were plated and fixed under the same conditions under the laboratory (ground controls).

Ground control and in-flight samples at times t_0 , t_1 ($t_1 1g$ and $t_1 \mu g$), and t_2 ($t_2 1g$ and $t_2 \mu g$) were compared after immunolabeling of different proteins, except for Ki-67, because of its antigen-retrieval particularities. In this case, only μg and 1g in-flight controls were compared.

Antibodies and fluorophores

Mouse monoclonal antibodies directed against Ki-67 (MIB-1), a nuclear protein associated with cycling-cells, and cytokeratin (pan-cytokeratin, clone KL1) were purchased from Immunotech (Marseilles, France). Mouse monoclonal antibodies directed against α -tubulin were bought from Amersham (Buckinghamshire, England) and rabbit polyclonal antibodies against PTyr were from Transduction laboratories (Lexington, Ky.). FITC-conjugated anti-mouse IgG and FITC-coupled anti-rabbit IgG antibodies were purchased from Sigma. Lissamine rhodamine (LRSC)-labeled anti-mouse IgG antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Pa.). All the antibodies were diluted at 1/50.

Texas red (TR) phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Ore.), which binds to filamentous actin, was used at 5×10^{-4} U/ μl . Chromomycin A₃ (CA₃, Sigma), a stoichiometric fluorescent antibiotic, specific of G-C rich regions of DNA, was diluted in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, containing MgCl₂ (100 μM CA₃, 150 mM MgCl₂).

Postflight treatments

After fixation, cells were stored at 22°C until the photon capsule returned to Earth (15 days after launching). After recovery, all fixed cells were washed in PBS for 2 h at room temperature.

Before Ki-67 could be immunolabeled, coverslips were subjected to microwave treatment in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 3×1 min at 750 W. The coverslips recovered from the photon capsule were treated simultaneously. However, because microwave treatment is not strictly reproducible, ground controls were not treated with the in-flight samples. Ki-67 labeling was not compared in these two series.

Other proteins were immunolocalized after 1% Triton X-100 treatment for 30 min. Indirect immunofluorescence labelings were performed as follows: 30 min in bovine serum albumin (6 mg/ml) blocking step; incubations with the specific antibodies overnight at 4°C in a humid chamber; incubation with fluorescent FITC or LRSC antibodies at room temperature for 3 h; and incubation with TR-phalloidin, or CA₃ at room temperature for 2 h. Thermanox coverslips were then mounted in Mowiol (Calbiochem, Meudon, France).

Confocal microscopy and image acquisition

Fluorescent labelings were visualized by an MRC-600 (BioRad, Hertfordshire, U.K.) confocal scanning laser system, mounted on a Nikon microscope equipped with a Plan Apochromat immersion objective (x 60) with a high numerical aperture (NA=1.4). The excitation wavelengths (Exc.) of the multiple-line argon ion laser beam (25 mW) and the values of the emission filters (Em.) were, respectively, for LRSC, 514 nm (Exc.) and a long pass filter (Em.) (OG 550); for CA₃, 458 nm (Exc.) and the long pass filter (Em.) (OG 550); for FITC and TR double labeling, 488 + 514 nm (Exc.) and a band pass filter (Em.) (540 DF 30); and for FITC and a long pass filter (Em.) (600 LP) for TR.

Images were acquired by using the discrete photon counting (35) of the Comos software package (BioRad, Hercules, Calif.), with a scan speed of 1 frame/s. Fast photon counting allows a sharp visualization of weak labeling, even with the highest (x, y) sampling density (11 pixels/μm).

Sampling and image analysis

Ki-67 labeling

For Ki-67 phalloidin double-labeling, confocal images of 384×512 pixels (pixel size = 1.2 μm) were obtained by averaging 10 frames. Eighty-three images were collected: t₀ (20 images), t₁1g in-flight control (14 images), t₁μg (16 images), t₂1g in-flight control (16 images) and t₂μg (17 images). Altogether, 1,435 cells were analyzed: t₀ (382 cells), t₁1g in-flight control (177 cells), t₁μg (453 cells), t₂1g in-flight control (221 cells), and t₂μg (202 cells).

Cytokeratin network

For image analysis of the cytokeratin network, each 11 pixels/μm confocal image of 768×512 pixels and 256 gray levels was obtained by averaging 20 frames. Altogether, 79 images were collected on a focal plane between the nucleus and the substrate: ground control (10 images), t₀ (12 images), t₁1g in-flight control (15 images), t₁μg (13 images), t₂1g in-flight control (17 images) and t₂μg (12 images).

From these images, 369 smaller images (100×100 pixels, 83 μm²) were selected in the perinuclear cytokeratin network: ground control (60 images), t₀ (62 images), t₁1g in-flight control (64 images), t₁μg (59 images), t₂1g in-flight control (75 images), and t₂μg (49 images).

A new method using image analysis was developed to characterize the filament structure (15). It is based on two geometric levels: The mesh level gives network topology, corresponding to the properties of the set of elements, and the filament level reflects filament morphology, corresponding to the properties of the individual elements. Several features were defined to describe the networks. To study the perinuclear cytokeratin network, we selected a focal plane between the nucleus and the coverslip and we measured areas of regions surrounded by the segmented filaments (area of meshes).

All image-analysis programs were developed by using the software package AMBA, (IBSB, Berlin, Germany) run on a 650-MHz Pentium III processor.

Chromatin structure

Central sections through the nucleus were collected with a spatial resolution of 21 pixels/μm. Quantitative analysis of DNA distribution patterns was performed by using automated image-analysis methods previously described (36). After segmentation of the nucleus and exclusion of nucleolar regions, regions with a homogeneous DNA distribution were detected by using an edge-oriented segmentation method. The feature set describing arrangement of these regions (texture) consisted of the total sizes of regions with low and high DNA densities, compactness of the regions and the ratio of low/high DNA density regions. For each group, 17–34 nuclei were analyzed.

Statistical analyses

We used StatView software to do statistical analyses. As feature distributions do not correspond to a normal Gaussian curve, nonparametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-test) were applied to compare the different in-flight experiments (t₀, t₁1g, t₁μg, t₂1g, t₂μg) and ground controls. Statistical significance was considered to be $p \leq 0.05$. When we conducted multiple comparisons, we divided the significance level (0.05) by the number of comparisons in order to decrease the type 1 error.

RESULTS

Cell spreading and proliferation

Double fluorescent labeling was used to detect simultaneously Ki-67 (nuclear antigen, found in cycling cells) and MF (TR-phalloidin) (Fig. 2). Ki-67 positive cells (cycling cells) were recognizable by their nuclear and nucleolar staining (FITC) in interphase cells (most of them, Figs. 2a, b) or by chromatin staining in mitotic cells (arrowhead, Fig. 1b). Non-cycling cells at the time of fixation were Ki-67 negative (star, Fig. 2b).

TR-phalloidin staining (Figs. 2a', b') was used to assess cell spreading and count the total number of cells (Ki-67 positive and negative one) in each image. At time t₂ (48 h after launching),

cells were more fully spread in 1g in-flight control (**Fig. 2a'**), than in μg (**Fig. 2b'**).

The fraction of cycling MCF-7 cells was calculated as the ratio of the number of Ki-67 positive cells/total number of cells (**Fig. 3**). At times t_1 and t_2 , there was no significant difference between t_0 and 1g or between t_0 and μg (both at times t_1 and t_2). But when we compared 1g in-flight controls and μg , we found that cycling cells were significantly more numerous in μg than in 1g at time t_2 ($p = 0.011$) and t_1 ($p = 0.046$).

The number of cells in a specific phase of the cell cycle is proportional to the duration of that phase. Here, the duration of mitosis was estimated by the ratio of the number of mitotic cells/number of cycling cells (**Fig. 3**). Whereas mitosis duration in 1g at both t_1 and t_2 were similar to t_0 , μg significantly prolonged it ($p=0.011$).

Cytoskeleton and signal transduction

MT

In our experiments, MT of the MCF-7 cell line was highly sensitive to weightlessness (**Figs. 5** and **6**). Compared with ground controls, in which MT were uniformly labeled on all the coverslips (**Fig. 5a**), some clusters of MCF-7 showed modified MT, even at time t_0 , 1.5 h after the launching stress (**Figs. 5b, c**). Instead of long, strongly labeled MT radiating throughout the cytoplasm, only a few filaments could be distinguished against the strong (gray) background. At the same time, labeled lamellipodia were observed in these cells (**Figs. 5c, d, 6d**). This more or less diffuse labeling could correspond to either labeled free tubulin subunits or numerous but very short MT, as visualized in high magnification images (**Figs. 6g, h**).

At time t_1 (22 h after launching), changes were found in 1g (**Fig. 5d**) and in μg (**Fig. 5f**) samples. However, cells containing long MT and clear cytoplasm were usually more numerous in 1g (**Fig. 4e**) than in μg (**Figs. 5f, g**). At time t_2 (48 h after launching), cells seemed to have reestablished normal MT in 1g (**Figs. 6a, b, c**), but not in μg (**Figs. 6d, e, f, g, h**). Differences were clearly seen in isolated cells (**Fig. 6c** vs. **Fig. 6f**). However, some cell clusters contained diffusely labeled MT in μg and in 1g controls (**Fig. 6b**). Furthermore, labeling patterns of neighboring cells showed diffuse or well-polymerized MT (**Fig. 6h**, left), whereas MF were well organized in both cell types, as demonstrated by TR-phalloidin staining (**Fig. 6h**, right). Thus, MT alterations could not be attributed to technically faulty cell fixation.

At high magnification (**Fig. 6g**), fluorescent spots—close to the limit of the light microscope resolution and sometimes aligned over about $2 \mu m$ —were seen at the cell periphery, where the cytoplasm is very thin (2- or 3- μm thick). These observations could suggest the existence of short MT, with no preferential orientation, and some seemed to be perpendicular to the substratum. This observation was in contrast to the preferential orientation toward the cell periphery and parallel to the coverslip, obvious in the ground control (**Fig. 5a**) and 1g in-flight control (**Fig. 6c**) at the cell boundary.

IF: cytokeratins

In the ground control (**Fig. 7a**), cytokeratin networks presented characteristic patterns depending on their intracellular localization. In particular, the network around the nucleus generated a constant pattern, previously described as 'alveolar' (15). It was clearly recognizable in ground control (**Fig. 7a**) and at time t_0 (**Fig. 7b**).

When confocal sections were focused through the middle of the nuclei (**Fig. 7**), cytokeratin networks were clearly observed in the 1g in-flight control (**Figs. 7c, d**) and in μg (**Figs. 7e, f**), at all the times studied (t_0, t_1, t_2). But sometimes unusual patterns were seen in μg (**Fig. 7g**) at time t_2 .

When focal sections were focused between the nucleus and the substrate (**Fig. 8**), in high magnification images, the cytokeratin networks beneath the nuclei generated the alveolar pattern seen in the ground control (**Fig. 8a**). The meshes of the network were often looser in μg (**Figs. 8d, f**) than in 1g in-flight control (**Figs. 8c, e**) mainly at time t_2 (**Figs. 8e, f**).

Quantitative image analysis of the meshes in these network (**Fig. 9**) showed that this pattern was significantly altered after 48 h of culture in μg ($t_2 1g$ vs. $t_2 \mu g$, $p=0.004$).

MF and signal transduction (PTyr)

Double-labeling (TR-phalloidin for MF and FITC for PTyr) showed that actin stress fibers were slightly more abundant in 1g in-flight control than in μg conditions (**Fig. 10a', 10b'**). In addition, in μg , PTyr labeling at the end of stress fibers seen at the cell periphery was reduced. Rather, it appeared to be concentrated in small bright spots in the cytoplasm, compared with 1g (**Fig. 10b** vs. **a**).

Chromatin structure

Chromatin distribution (excluding nucleoli) was denser in 1g in-flight control (**Fig. 11a**) than in μg (**Fig. 11b**), mainly after 48 h of culture. Quantitative image analysis (**Fig. 11c**) showed that areas of low chromatin density were larger and more numerous in μg . Statistical analysis (Kruskal–Wallis test) of the ratio of the areas of low/high chromatin density (L/H ratio) demonstrated significant differences between the groups ($p=0.0001$). The L/H ratio was significantly lower (Mann–Whitney U -test) $t_1 1g$ than $t_1 \mu g$ ($p=0.003$). In 1g in-flight controls, t_2 was significantly lower than t_1 ($p=0.001$). In contrast, the L/H ratio increased in μg significantly between t_1 and t_2 ($p=0.001$). When comparing 1g with μg , the differences were also significant ($p=0.003$ at t_1 , $p=0.001$ at t_2). Thus, μg induced the chromatin distribution to evolve in opposite ways between 22 and 48 h of culture.

DISCUSSION

If physical characteristics of the cell environment guide cell physiology (proliferation or differentiation), weightlessness (abbreviated by μg) could alter the relationships between cell structure and function. Actually, in our weightlessness experiments, MCF-7 human mammary carcinoma cell line presented several functional and structural alterations.

First, immunofluorescent labeling of Ki-67 confirmed that cell cycling was altered under weightlessness conditions. Ki-67 is a

nuclear protein widely used as a marker of cell proliferation. It is thought that Ki-67 is expressed in all cycling cells but not in resting cells (37, 38). Labeling patterns vary according to the cell-cycle phase and, during mitosis, Ki-67 labeling underline the chromosomes (**Figs. 2a, b**). Our results also showed that the increase of cycling cells in weightlessness is due to the prolongation of mitosis. As several cells in anaphase were still observed (**Fig. 2**, arrowhead), we can hypothesize that the cell cycle would be blocked only partially in G₂M.

Our observations agree with the Jurkat cell-line results obtained by Lewis et al., who used flow cytometry to demonstrate a blockade of the cell cycle in G₂M (29). Thus, there appear to be no difference between adherent (MCF-7) and free-floating (Jurkat) cells: in both cases, weightlessness led to lower cell proliferation. Moreover, in weightlessness, normal T lymphocytes did not proceed through the S and G₂+M phases of the cell cycle, as demonstrated by the quasi-null thymidine incorporation and decreased cell mobility (19, 39). Therefore, cell-cycle phase affected by a weightlessness blockade would depend on the cell type studied.

The longer MCF-7 mitosis duration could be explained by the alteration of MT in weightlessness. However, MT changes differed depending on the cell type. Lewis et al. reported that Jurkat cell MT were shortened and that MT organizing centers (MTOCs) were poorly defined. In our experiment, MT modifications were heterogeneously distributed throughout the MCF-7 population. In these cells, MT were short and not clearly distinguishable from the strong background. As for Jurkat cells, MCF-7 MT alterations were observed after launching and their normal organization was reestablished 48 h later in 1g in-flight controls. In MCF-7 cells, however, altered MT persisted in some cell clusters. This finding suggests that their dynamics were affected by weightlessness, in agreement with *in vitro* experiments reported by Tabony and co-workers (32, 33): Self-organization of MT into stationary macroscopic patterns is gravity-dependent, and the patterns correspond to different MT orientations. The resulting patterns reflect what happens during a critical period of 6 min after the onset of MT assembly. In our experiment, cells were subjected to 5g for 5 min (launching), then to weightlessness for 1.5 h before the 1g centrifuge was started (t₀). As MT turnover is 10-fold faster during mitosis compared with interphase (reviewed in (40)), alteration of MT assembly processes is particularly crucial during cell division. This faster MT turnover corresponds to density fluctuations of free tubulin subunits, and represents a window during which the system can interact with gravity (32). Cells in mitosis before the 1g centrifuge started were submitted to launching stress and 1.5 h of weightlessness (t₀), and their MT were altered. Thus, each time a cell enters into mitosis under weightlessness, MT abnormalities result. As daughter cells often form clusters, the number of clusters containing modified MT increases with the time spent in weightlessness.

Moreover, fluorescent spots and short lines, distinguishable in MCF-7 cytoplasm at higher magnification (**Fig. 6g**), would suggest the existence of short MT, in addition to free tubulin subunits, in accordance with pictures previously published by Waterman-Storer et al. (41).

We could postulate that, in weightlessness, these short MT had lost the preferential orientation toward the cell periphery and in parallel to the substrate seen in 1g (**Fig. 6c**). They could even be orientated perpendicular to the coverslip (**Fig. 6g**). This hypothesis could be in agreement with Tabony's *in vitro* experiments. In addition, MCF-7 cells usually contain more than one MTOCs and micronuclei, which would correspond to the centrosome amplification, defective G₂M cell-cycle checkpoint and micronuclei, previously described in breast cancer with BRCA1 and BRCA2 mutants (42, 43). Thus, the presence of multiple points of MT nucleation would render MCF-7 cells particularly sensitive to weightlessness.

On the one hand, unlike Jurkat cells (29, 44), DNA condensation, characteristic of apoptosis, has not been detected under our experimental conditions, but may simply not have occurred at the times studied. On the other hand, even though we did not perform a quantitative analysis, our results show that MCF-7 cells spread less well in weightlessness than 1g. At the same time, but to a lesser extent, MF organization into stress fibers and PTyr signal transductions from focal contacts seemed lower. Although our results concern only PTyr immunolocalizations, they are in agreement with the decreased proliferation signal transduction under weightlessness, as previously described for other epithelial cells (22, 23).

Several patterns of cytokeratin networks have been described in MCF-7 cells, depending on their intracellular localization (15). Our hypothesis was that architectural variations would depend on local tension or forces, in agreement with the tensegrity paradigm of Ingber (11). Quantitative image analysis procedures were previously developed to define several features characterizing the different patterns of cytokeratin filament networks (15, 17, 18). One of them, the perinuclear network pattern, is particularly constant on earth. It forms regular alveoli and the areas of these meshes were characterized by quantitative image analysis. Although other weightlessness cytoplasmic patterns were similar to those observed on Earth or in the 1g in-flight control, except for some isolated cells (**Fig. 7**), the perinuclear network was significantly more loosely woven, especially after 48 h of culture in weightlessness (**Figs. 8f, 9**). The latter findings, in association with the less extensive cell spreading, would be consistent with the basic predictions of cellular tensegrity (11, 12), particularly the role of perinuclear cytokeratin network (**Figs. 8, 9**) in mediating the transfer of mechanical signals from the cell surface to the nucleus (16, 45).

According to this tensegrity hypothesis, weightlessness might induce modifications in nuclear architecture and gene expression (8). In our experiment, quantitative analysis of chromatin structure showed that, after 48 h, weightlessness had modified DNA distribution in interphase cells. Chromatin modifications may have two effects on cell physiology: (i) gene expression and cell differentiation, subsequent to modification of nuclear organization (7, 9); and (ii) cell proliferation, following decreased mechanical signaling mediated by the cytokeratin network (16).

We summarized in **Figure 12** several mechanisms that could be involved in the effect of weightlessness on cell physiology. Weightlessness could interact directly on reaction-diffusion processes and alter MT self-organization and orientation, as

suggested by high-magnification images (**Fig. 6g**). The construction of the mitotic spindle could be disturbed by this mechanism. Consequently, under weightlessness, mitosis duration was prolonged and cell cycling slowed. The latter was also slowed by the concomitant decrease of signal transduction cascade. Both mechanisms result in decreased cell proliferation. Or the less-extensive cell spreading could lead to the loosening of the tensegrity structure, corresponding, in our experiment, to the looser perinuclear cyokeratin network. This relaxation would in turn induce modifications of the nuclear chromatin distribution. As the regulation of gene activity would depend on the 3D architecture of the nucleus, cell differentiation, and perhaps also cell proliferation, would be affected in weightlessness.

In conclusion, our observations support the hypothesis that the two mechanisms (reaction-diffusion processes and tensegrity) could be simultaneously affected by weightlessness. Such weightlessness experiments would offer a unique opportunity to verify whether it could be possible to direct a cell's physiology by modifying its morphology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express appreciation to the French Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Russian National Center for Scientific Research and Aerospace Construction (TsSKB-Progress, Samara) for overall management of the Photon 12 mission and flight experiment; the CNES and the COMAT, (Inc., Toulouse, France) for the design of IBIS instrument; the GSBMS (Groupement Scientifique en Biologie et Medecine Spatiales); and, Paul Sabatier University, Toulouse, France, with special thanks to B. Eche. We also thank A. Guell, D. Thierion, and M. Viso (CNES) for all their helpful discussions during the preparation and realization of the Photon 12 mission. This work was supported by CNES grants 793/99/CNES/7642/00 and 793/00/CNES/8092.

REFERENCES

- Lelievre, S., Weaver, V. M., Nickerson, J. A., Larabell, C. A., Bhaumik, A., Petersen, O. W., and Bissell, M. J. (1998) Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14711–14716
- Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M. J. (1997) Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.* **137**, 231–245
- Oleynikov, Y. and Singer, R. H. (1998) RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell. Biol.* **8**, 381–383
- Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., and Steinert, P. M. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **134**, 971–983
- Berezney, R. and Wei, X. (1998) The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J. Cell. Biochem.* **30-31 (Suppl.)**, 238–242
- Getzenberg, R. H. (1994) Nuclear matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. *J. Cell Biochem.* **55**, 22–31
- Spector, D. L. (1996) Nuclear organization and gene expression. *Exp. Cell Res.* **229**, 189–197
- Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., Pockwinse, S. H., and McNeil, S. (1999) Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene expression under microgravity conditions. *FASEB J.* **13 (Suppl.)**, S157–S166
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R. S., Siegel, A. J., Acharya, R., and Berezney, R. (1998) Segregation of transcriptional and replication sites into higher order domain. *Science* **281**, 1502–1506
- Roskelley, C. D., Desprez, P. Y., and Bissell, M. (1994) Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12378–12382
- Ingber, D. (1993) Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **104**, 613–627
- Ingber, D. (1999) How cells (might) sense microgravity. *FASEB J.* **13 (Suppl.)**, S3–S15
- Janmey, P.A., Euteneuer, U., Traub, P., and Schliwa, M. (1991) Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.* **113**, 155–160
- Ma, L., Xu, J., Coulombe, P.A. and Wirtz, D. (1999) Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 19145–19151
- Portet, S., Vassy, J., Beil, M., Millot, G., Hebbache, A., Rigaut, J. P., and Schoevaert, D. (1999) Quantitative analysis of cyokeratin network topology in the MCF-7 cell line. *Cytometry* **35**, 203–213
- Wang, N. and Stamenovic, D. (2000) Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening and growth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C188–C194
- Beil, M., Irinopoulou, T., Vassy, J. and Wolf, G. (1995) A dual approach to structural texture analysis in microscopic images. *Comput. Methods Programs Biomed.* **48**, 211–219
- Vassy, J., Beil, M., Irinopoulou, T. and Rigaut, J. P. (1996) Quantitative image analysis of cyokeratin filament distribution during fetal rat liver development. *Hepatology* **23**, 630–638
- Cogoli, A. and Cogoli-Greuter, M. (1997) Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **6**, 33–79
- Hughes-Fulford, M. and Lewis, M. L. (1996) Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp. Cell Res.* **224**, 103–109
- Moos, P. J., Fattaey, H. K., and Johnson, T. C. (1994) Cell proliferation inhibition in reduced gravity. *Exp. Cell Res.* **213**, 458–462
- Boonstra, J. (1999) Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *FASEB J.* **13 (Suppl.)**, S35–S42
- De Groot, R. P., Rijken, P. J., Boonstra, J., Verkleij, A. J., de Laat, S.W., and Kruijer, W. (1991) Epidermal growth factor-induced expression of c-fos is influenced by altered gravity conditions. *Aviat. Space Environ. Med.* **62**, 37–40
- Hatton, J. P., Gaubert, F., Lewis, M. L., Darsel, Y., Ohlmann, P., Cazenave, J. P., and Schmitt, D. (1999) The kinetics of translocation and cellular quantity of protein kinase C in human leukocytes are modified during spaceflight. *FASEB J.* **13 (S)**, S23–S33
- Carmeliet, G. and Bouillon R. (1999) The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts *in vitro*. *FASEB J.* **13 (Suppl.)**, S129–S134
- Nash, P. V. and Mastro, A.M. (1992) Variable lymphocyte responses in rats after space flight. *Exp. Cell Res.* **202**, 125–131
- Walther, I., Pippia, P., Meloni, M. A., Turrini, F., Mannu, F., and Cogoli, A. (1998) Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Lett.* **436**, 115–118
- Burger, E. H. and Klein-Nulend, J. (1998) Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone* **22 (5, Suppl.)**, 127S–130S
- Lewis, M. L., Reynolds, J. L., Cubano, L. A., Hatton, J. P., Lawless, B. D., and Piepmeier, E. H. (1998) Spaceflight alters

- microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **12**, 1007–1018
30. Thomason, D. B., Morrison, P. R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Booth, F. W., and Baldwin, K. M. (1992) Altered actin and myosin expression in muscle during exposure to microgravity. *J. Appl. Physiol.* **73** (2, Suppl.), 90S–93S
 31. Vico, L., Lafage-Proust, M. H., and Alexandre, C. (1998) Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo. *Bone* **22** (5, Suppl.), 95S–100S
 32. Papaseit, C., Pochon, N., and Tabony, J. (2000) Microtubule self-organization is gravity dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8364–8368
 33. Tabony, J. (1994) Morphological bifurcations involving reaction-diffusion processes during microtubule formation. *Science* **264**, 245–248
 34. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973) A human cell line from pleural effusion derived from a breast carcinoma *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409–1416
 35. Art, J. (1989) Photon detectors for confocal microscopy. In *The Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J., ed.) pp. 115–126, IRM Press: Madison, Wis.
 36. Beil, M., Irinopoulou, T., Vassy, J., and Rigaut, J. P. (1996) Application of confocal scanning laser microscopy for an automated nuclear grading of prostate lesions in three dimensions. *J. Microsc.* **183**, 231–240
 37. DuManoir, S., Guillaud, P., Camus, E., Seigneurin, D., and Brugal, G. (1991) Ki-67 labeling in post-mitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* **12**, 455–463
 38. van Dierendonck, J. H., Keijzer, R., van de Velde, C.J.H., and Conelisse, C. J. (1989) Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **49**, 2999–3006
 39. Cogoli-Greuter, M., Meloni, M. A., Sciola, L., Spano, A., Pippia, P., Monaco, G., and Cogoli, A. (1996) Movements and interactions of leukocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47**, 279–287
 40. Andersen, S.S.L. (2000) Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* **10**, 261–267
 41. Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burrige, K., and Salmon, E. D. (1999) Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nature Cell Biol.* **1**, 45–50
 42. Tutt, A., Gabriel, A., Bertwistle, D., Connor, F., Paterson, H., Peacock, J., Ross, G., and Ashworth, A. (1999) Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr. Biol.* **9**, 1107–1110
 43. Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., Harris, C. C., Ried, T. and Deng, C. X. (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BCRA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* **3**, 389–395
 44. Cubano, L. A. and Lewis, M. L. (2000) Fas/APO-1 protein is increased in space flown lymphocytes (Jurkat). *Exp. Gerontol.* **35**, 389–400
 45. Maniotis, A., Chen, C., and Ingber, D. (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 849–854

Received August 10, 2000; revised November 28, 2000.

Fig. 1

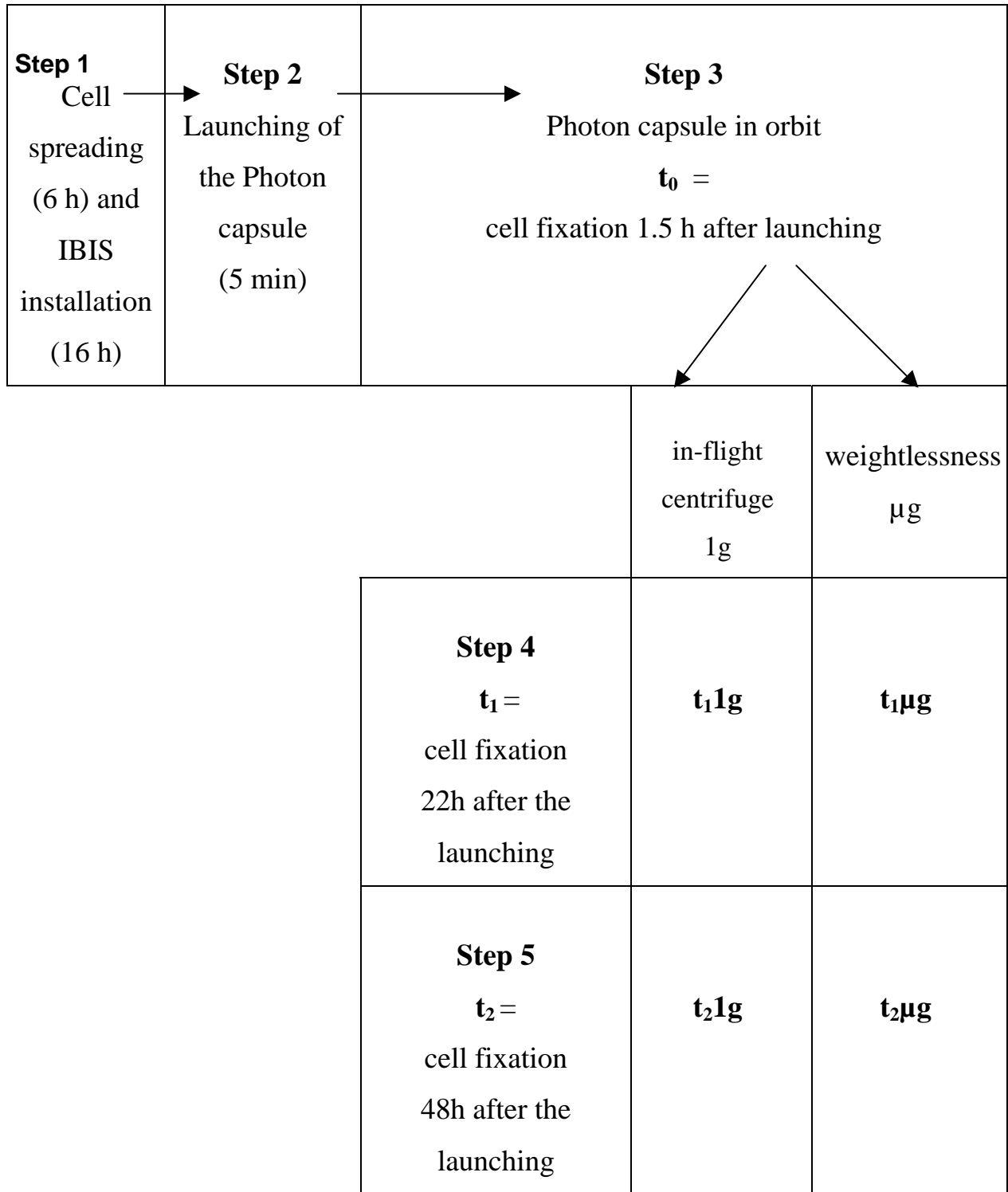


Figure 1. Schema showing the experimental protocol. Weightlessness is abbreviated by μg .

Fig. 2

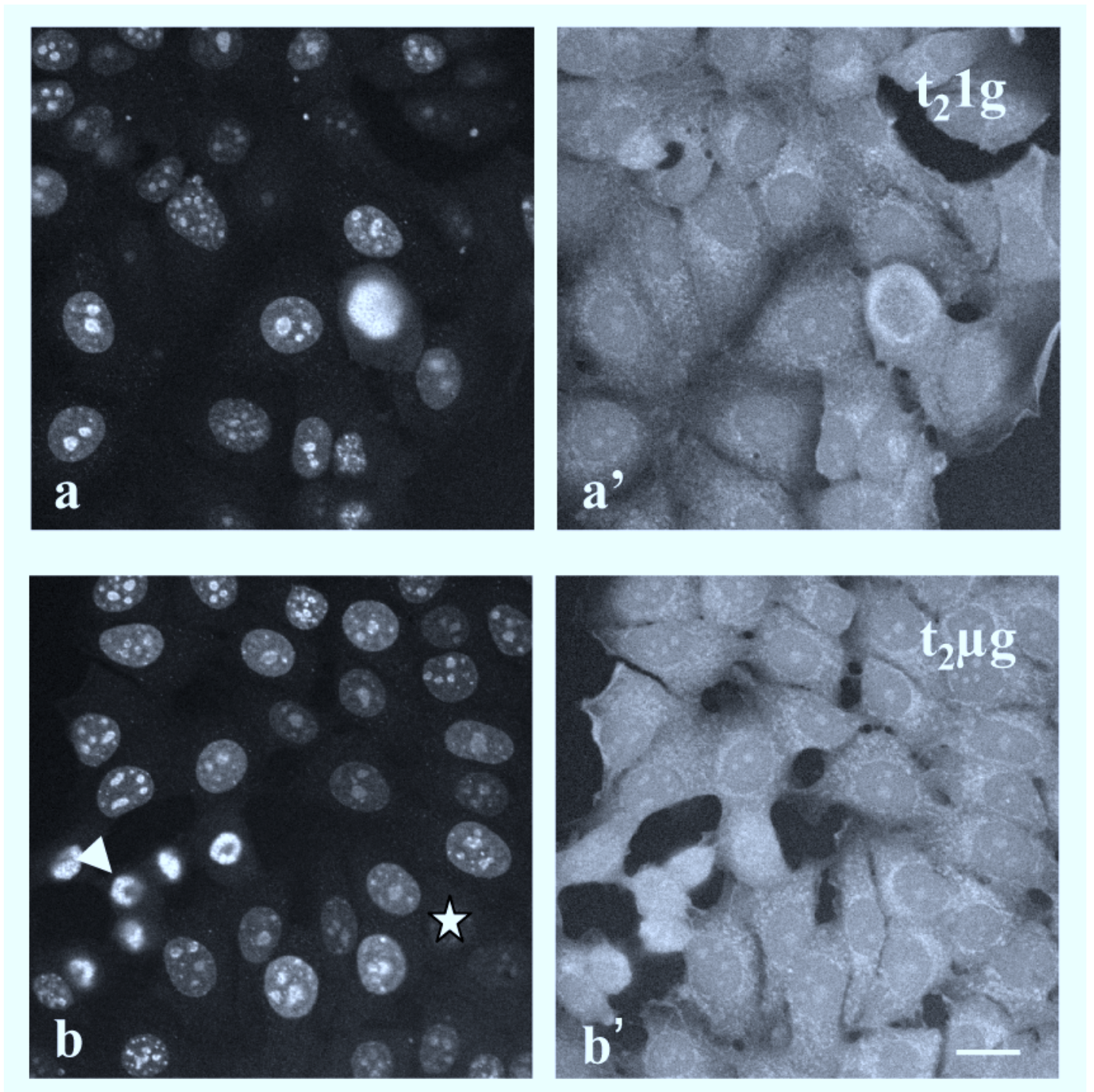


Figure 2. Cell cycling in MCF-7 cells, 48 h after launching (t_2). Scale bar is 10 μm . **1a** and **1a'** = 1g in-flight control. **1b** and **1b'** = weightlessness ($0g$). Confocal microscopy showing simultaneous visualization of Ki-67 labeled with FITC (**1a** and **1b**) and actin microfilaments (MF) stained with Texas red phalloidin (**1a'** and **1b'**). Phalloidin binding only highlights the cell periphery because the microwave treatment, necessary for Ki67 antigen retrieval, destroyed MF structure. Cells spread better in 1g control (**1a'**) than in μg (**1b'**). Ki-67 label distinguishes (i) interphase cycling cells (most of them) by their nuclear and nucleolar labeling pattern, from (ii) mitotic cells (arrowhead = chromosomes), from (iii) noncycling cells (star = negative cells). The latter are identified by phalloidin binding (Texas red).

Fig. 3

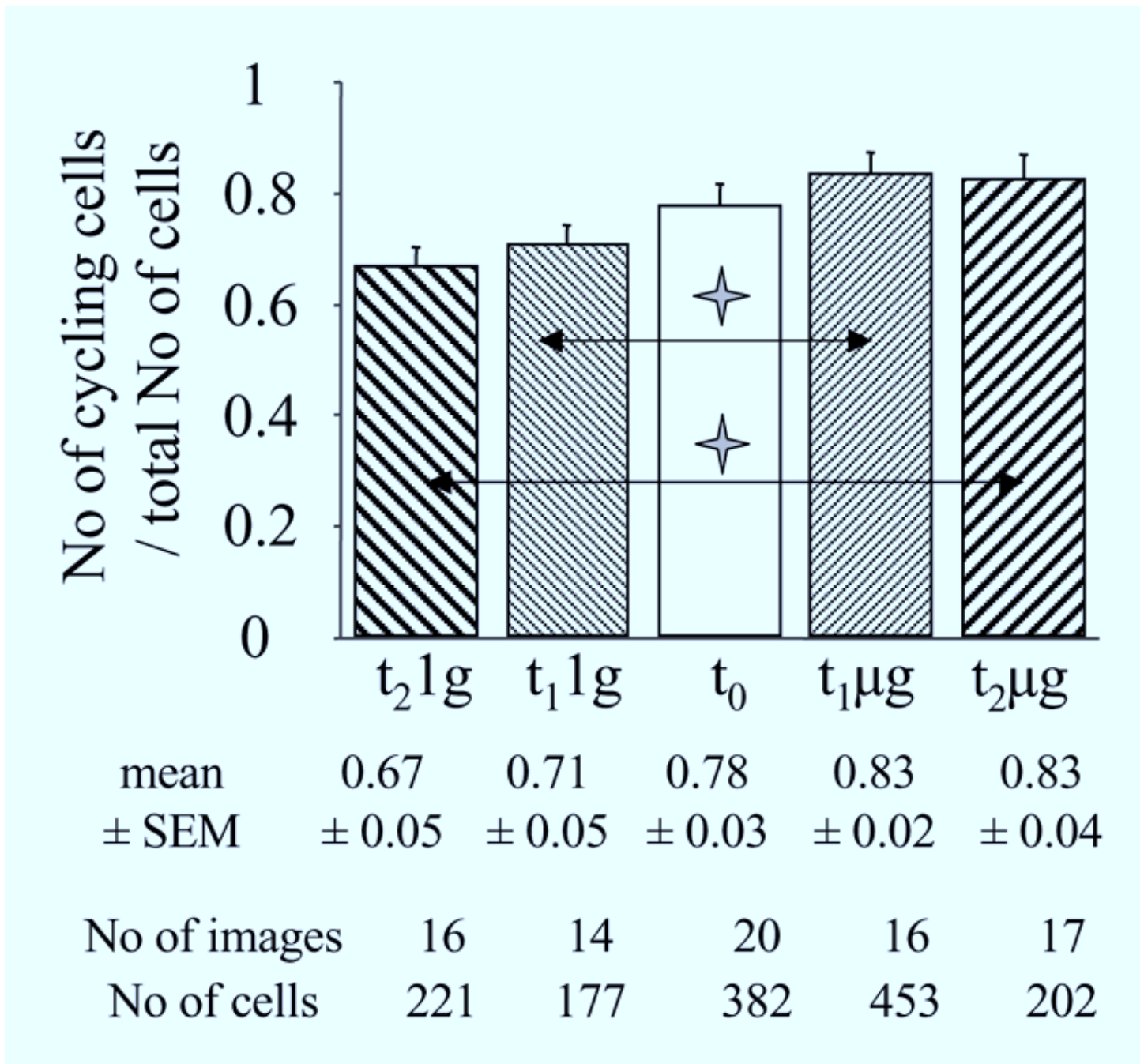


Figure 3. Quantification of cycling MCF-7 cells. At each in-flight step ($t_0 = 1.5$ h, $t_1 = 22$ h, $t_2 = 48$ h) cells were fixed in a paraformaldehyde-glutaraldehyde. Fraction of cell cycling is estimated by the ratio of the number of proliferating cells/total number of cells. Stars indicate significant differences (Mann-Whitney U test) observed between 1g control and μg at times t_1 and t_2 .

Fig. 4

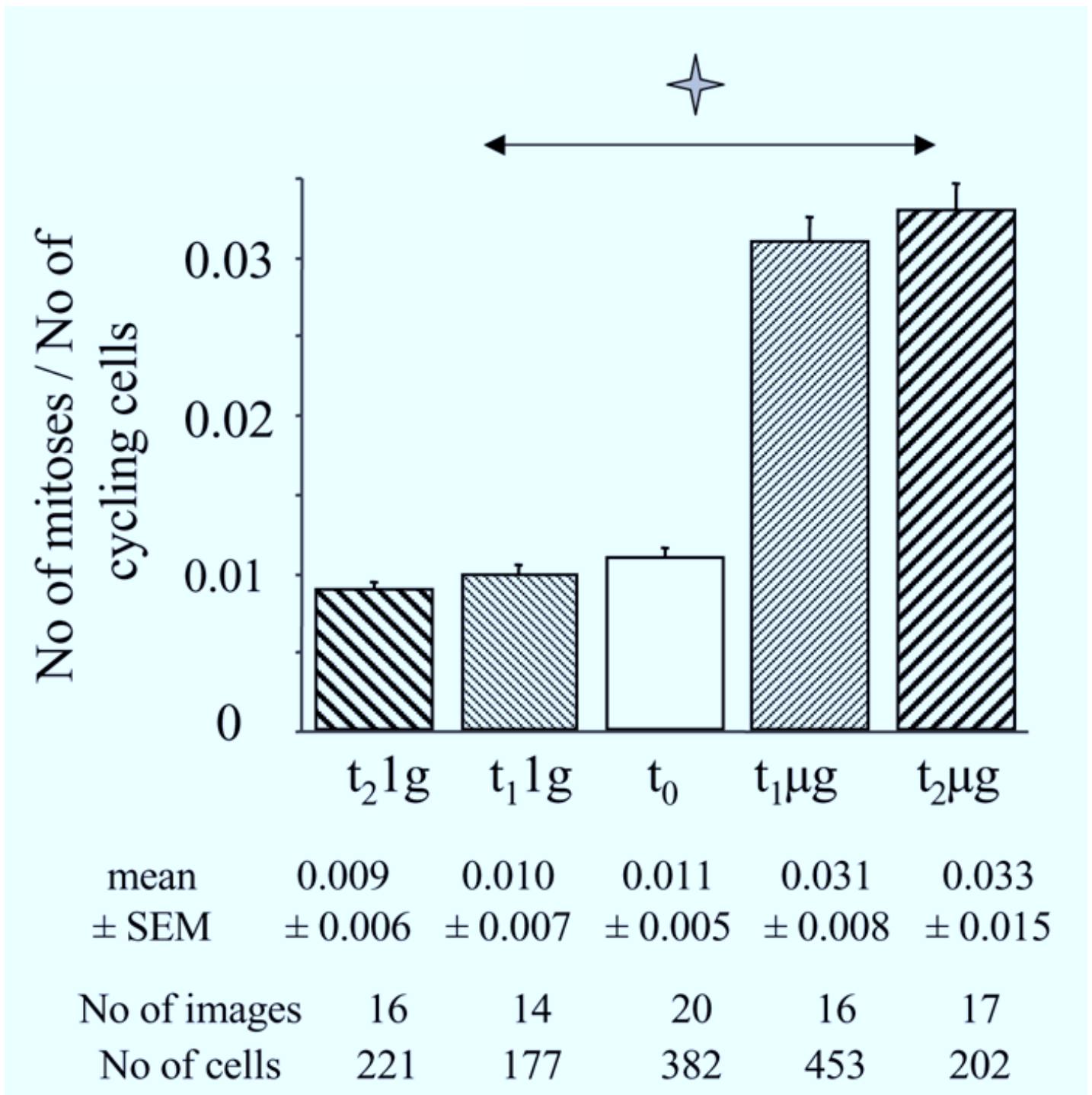


Figure 4. Duration of mitosis is estimated by the ratio of the number of mitotic cells/number of cycling cells. Stars indicate a significant difference (Mann-Whitney U test) between 1g in-flight control and μg pooling t_1 and t_2 . The significantly higher number of mitotic cells indicates that the mitosis duration is prolonged.

Fig. 5

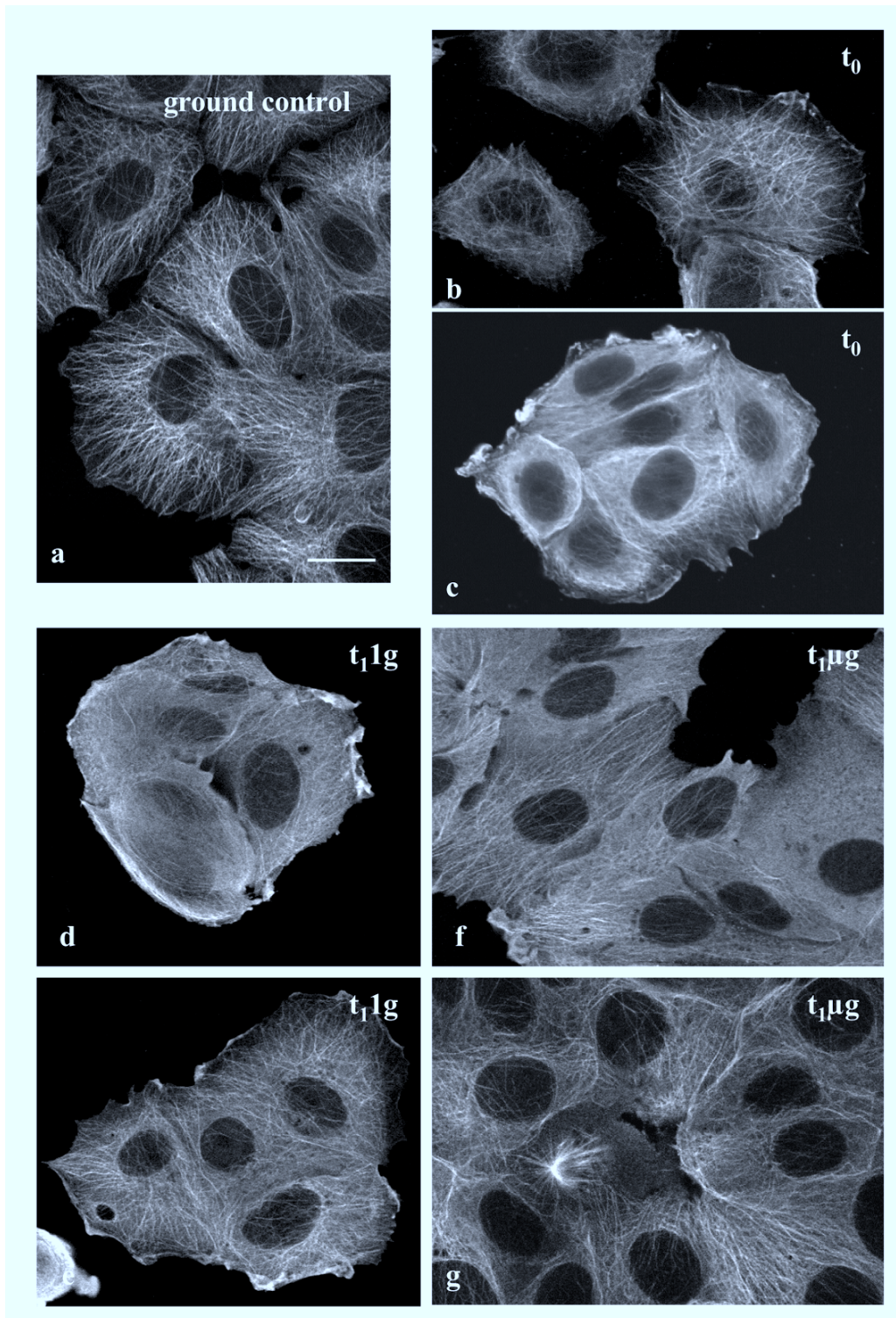


Figure 5. Visualization of α -tubulin in MCF-7 cells. Scale bar is 10 μ m. **5a** = ground control, 48 h of culture. MT are clearly visible in all MCF-7 cells, radiating throughout the cytoplasm from the perinuclear area toward the cell periphery. **5b** and **5c** = t_0 (cell fixation 1.5 h after launching). In most of the cells, MT are well preserved (**4b**), but some cell clusters show altered MT and labeled lamellipodia (**4c**). **5d** and **5e** = t_1 1g (1 g in-flight control, cell fixation 22 h after launching). Some cell clusters still show altered MT (**5d**), whereas others do not (**5e**). **5f** and **5g** = $t_1\mu$ g (μ g, cell fixation 22 h after launching). Depending on the cell cluster, MT are well preserved in interphase cells and in mitotic cells (**5g**) or indistinguishable (**5f**).

Fig. 6

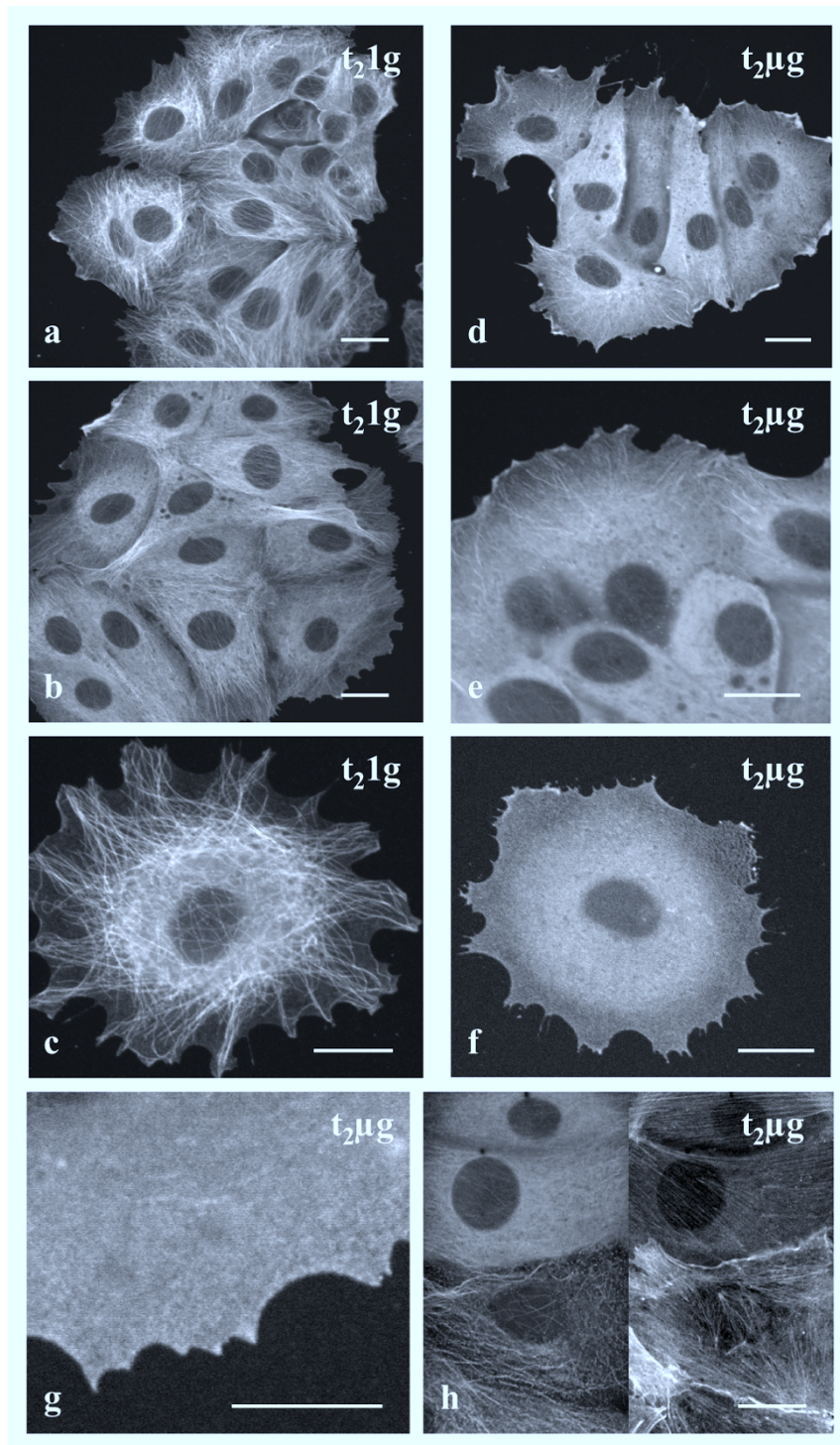


Figure 6. Visualization of α -tubulin in MCF-7 cells. Scale bar is 10 μ m. **6a, 6b, 6c** = t_21g (1g in-flight control, cell fixation 48 h after launching). **6d, 6e, 6f, 6g, 6h** = $t_2\mu g$ (μg , cell fixation 48 h after launching). **6a – 6g**: α -tubulin alone. **6h**: double labeling of α -tubulin (left, FITC) and MF (right, Texas red phalloidin). In $1g$, MT often give a diffuse labeling pattern compared with $1g$ in-flight controls (**6c**, $1g$ versus **6f**, μg). In $1g$ (**6c**), long MT are oriented parallel to the substratum. In μg (**6g**), short MT seem to have a no-preferential orientation, or appear to be perpendicular to the substrate. Some clusters of in $1g$ in-flight controls cells still contain diffuse MT (**6b**), as in μg . In addition, labeling patterns in neighboring cells (**6h**) show diffuse or well polymerized MT, whereas MF are well organized in both cell types (right). Thus the diffuse MT organization cannot be explained by faulty cell fixation. At higher magnification (**6g**), fluorescent spots, sometimes arranged in a line about 2 μ m long at the cell periphery are suggestive of the existence of short MT.

Fig. 7

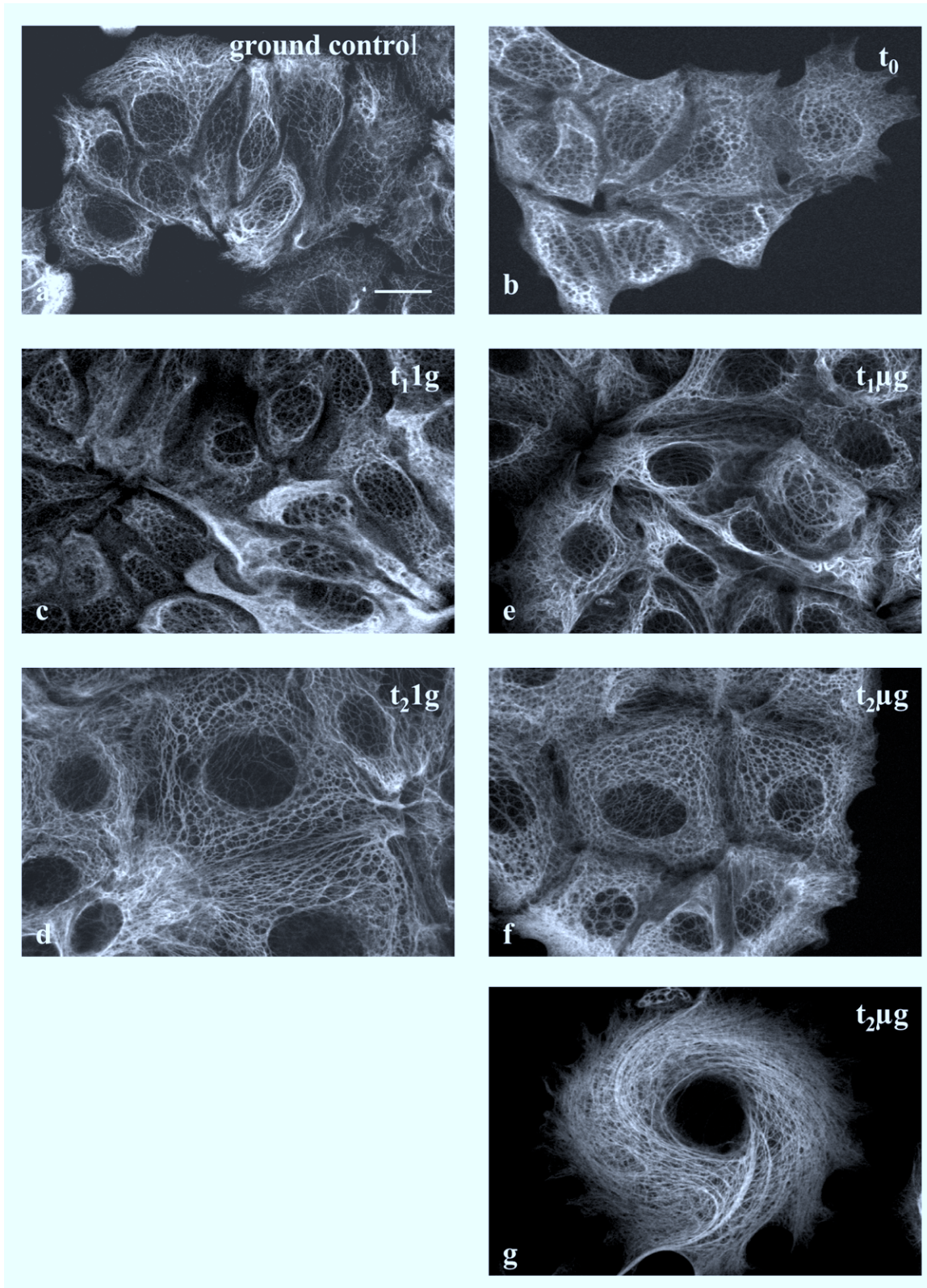


Figure 7. Cytokeratin visualization in MCF-7 cells. Scale bar is 10 μ m. Cell spreading increases with the time in culture. Focal sections were focused through the middle of nuclei. **7a** = ground control, 48 h of culture. Cytokeratin networks have characteristic patterns depending on their intracellular localization. **7b** = t₀ (cell fixation 1.5 h after launching). **7c** = t₁1g (1g in-flight control, cell fixation 22 h after launching). **7d** = t₂1g (1g in-flight control, cell fixation 48 h after launching). **7e** = t₁μg (μ g, cell fixation 22 h after launching). **7f** and **7g** = t₂μg (μ g, cell fixation 48 h after launching). The cytoplasmic cytokeratin network is similar in the ground control (**7a**), t₀ (**7b**), 1g in-flight control (**7c**, **7d**) and in μ g (**7e**, **7f**), except for some isolated cells (**7g**).

Fig. 8

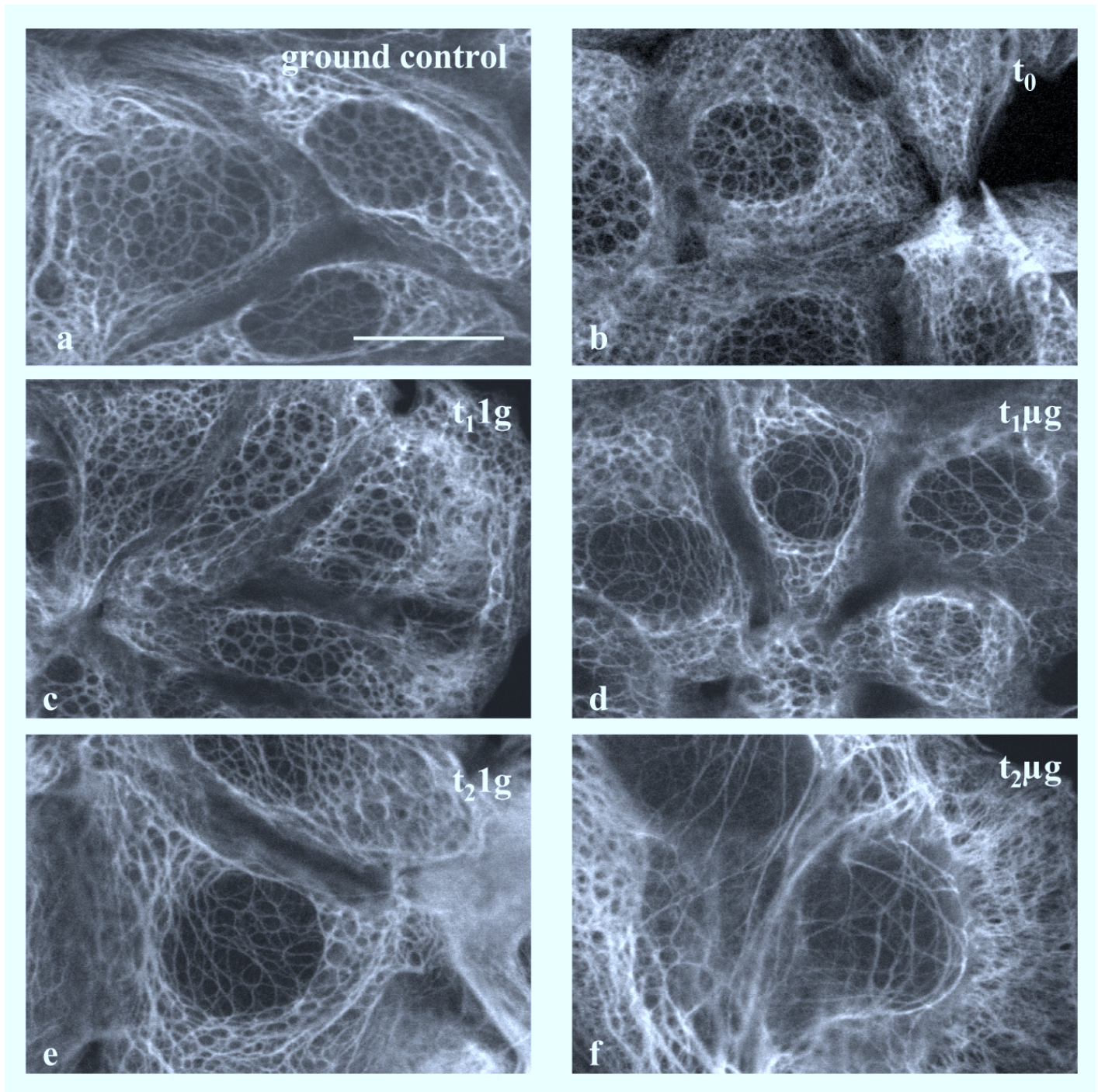


Figure 8. Visualization of the perinuclear cyokeratin network in MCF-7 cells. Scale bar is 10 μm . Focal sections were focused between the nucleus and the substrate. **8a** = ground control, 48 h of culture. **8b** = t_0 (cell fixation 1.5 h after launching). **8c** = $t_1 1g$ (1g in-flight control, cell fixation 22 h after launching). **8d** = $t_1 \mu g$ (μg , cell fixation 22 h after launching). **8e** = $t_2 1g$ (1g in-flight control, cell fixation 48 h after launching). **8f** = $t_2 \mu g$ (μg , cell fixation 48 h after launching). The meshes of cyokeratin network are looser in μg than in ground control, t_0 or 1g in-flight control.

Fig. 9

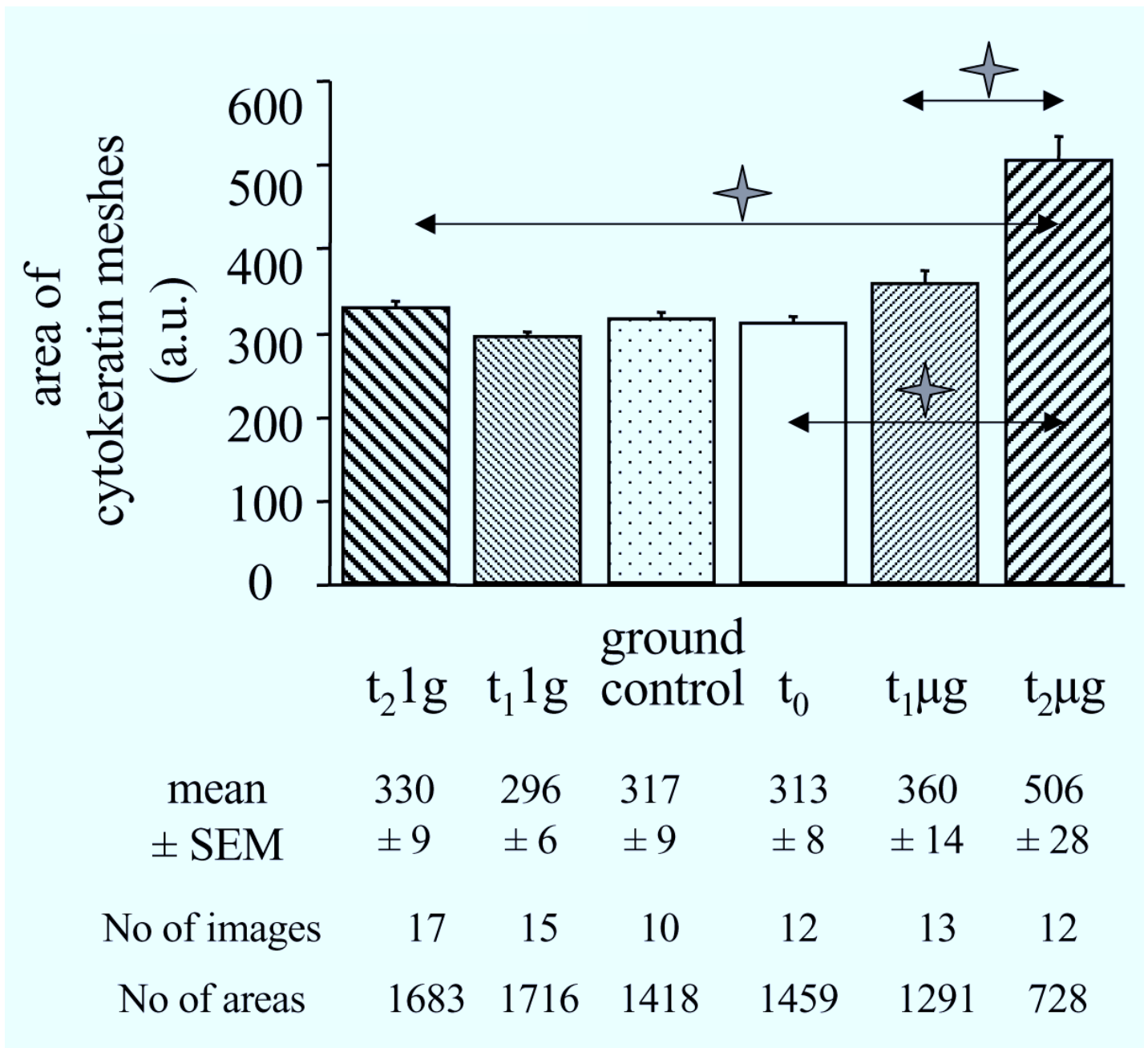


Figure 9. Quantification of perinuclear cytokeratin networks. The areas of meshes are expressed in arbitrary units: (a.u.) = areas of regions surrounded by filaments segmented by image analysis. The cytokeratin network is significantly (Mann-Whitney U test) looser in $t_2 \mu g$ than in other conditions (stars).

Fig. 10

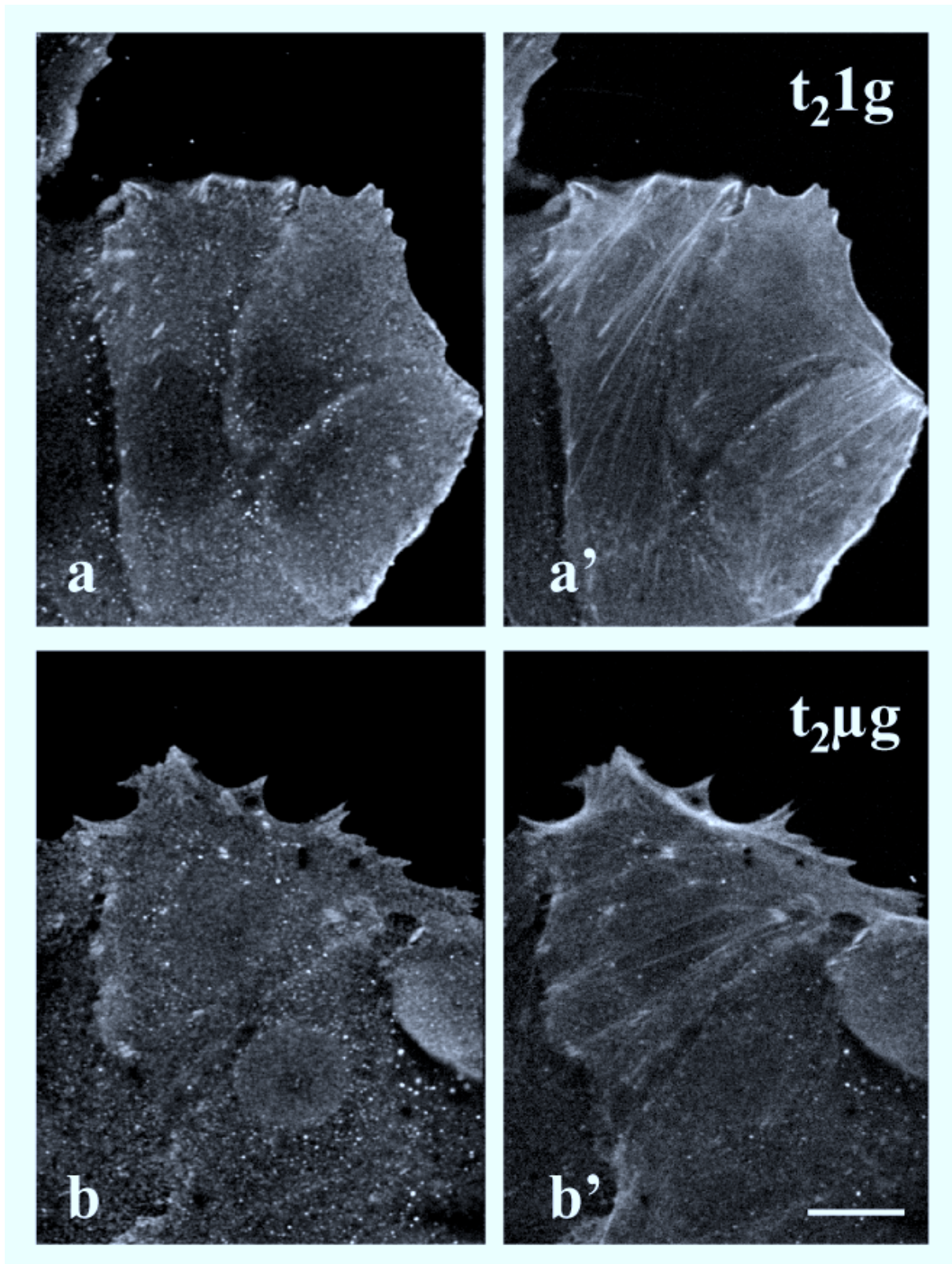


Figure 10. PTyr (a and b, FITC, left) and MF (a' and b', Texas red, right) visualizations. Scale bar is 10 μm . **10a, a'** = 1g in-flight control. **10b, b'** = μg . Actin stress fibers are slightly more plentiful in 1g control than in μg . PTyr signal transductions, located at focal contacts, are more numerous at the periphery of cells in 1g in-flight control than in μg .

Fig. 11

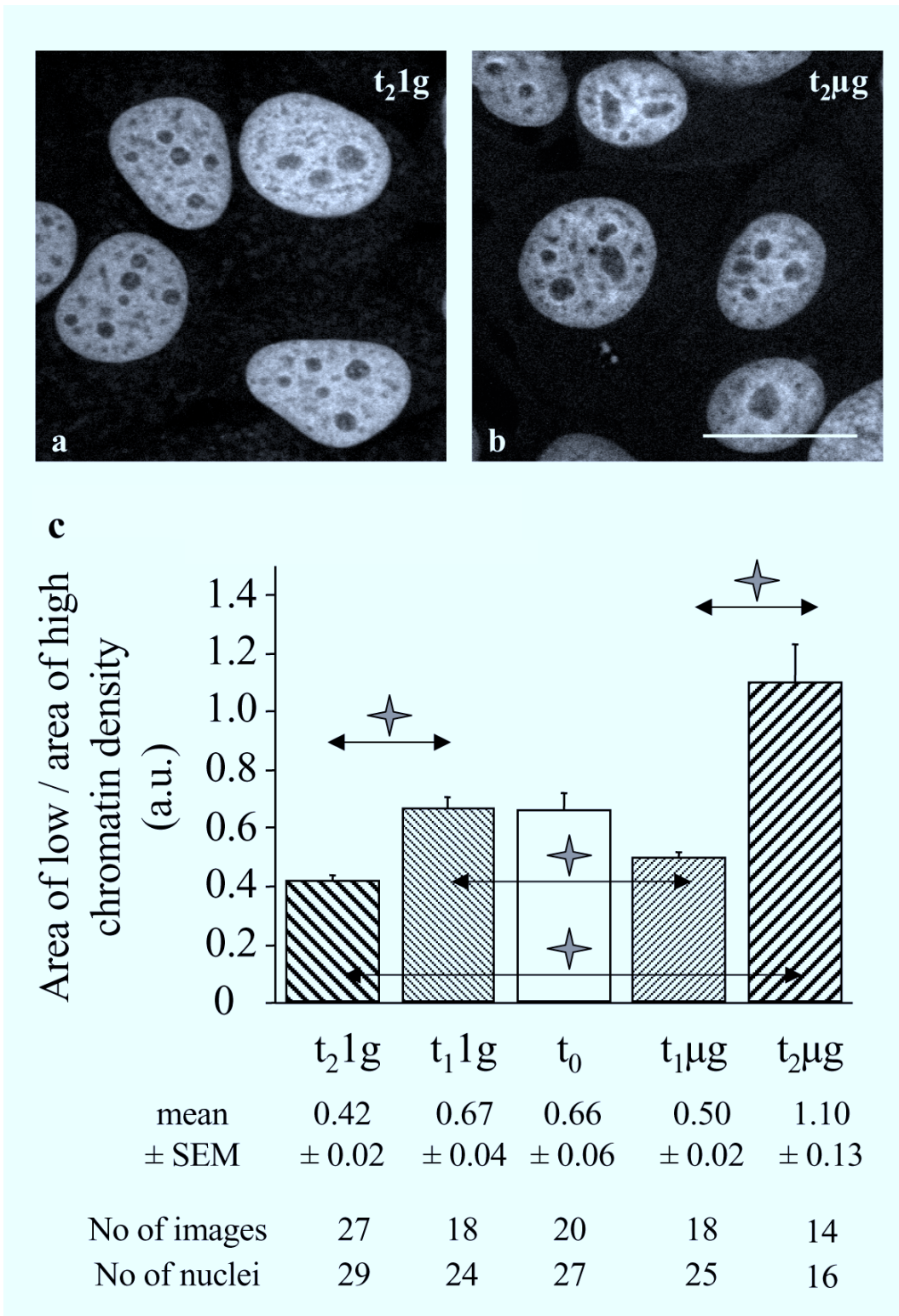


Figure 11. Chromatin texture analysis: stoichiometric DNA staining by the fluorescent antibiotic chromomycin A₃ (CA₃). **11a** = 1g in-flight control (t_2). **11b** = μg (t_2). Scale bar is 10 μm . DNA staining is more dense in the 1g in-flight control than in μg : areas of low chromatin density (excluding nucleoli) are less numerous and areas of high chromatin density more numerous in 1g in-flight control than in μg . **11c** = quantitative analysis of the ratio of low/high chromatin density areas (L/H), (a.u. = arbitrary units). No significant difference is observed between t_0 and $t_1 1g$. In 1g in-flight controls, L/H decreases significantly between t_1 and t_2 , whereas it increases significantly between t_1 and t_2 in μg . Comparing L/H between 1g and μg , differences are significant (stars) at time t_1 and t_2 . Thus, areas of low chromatin density increase after 48 h of culture in μg , like the cytokeratin perinuclear network.

Fig. 12

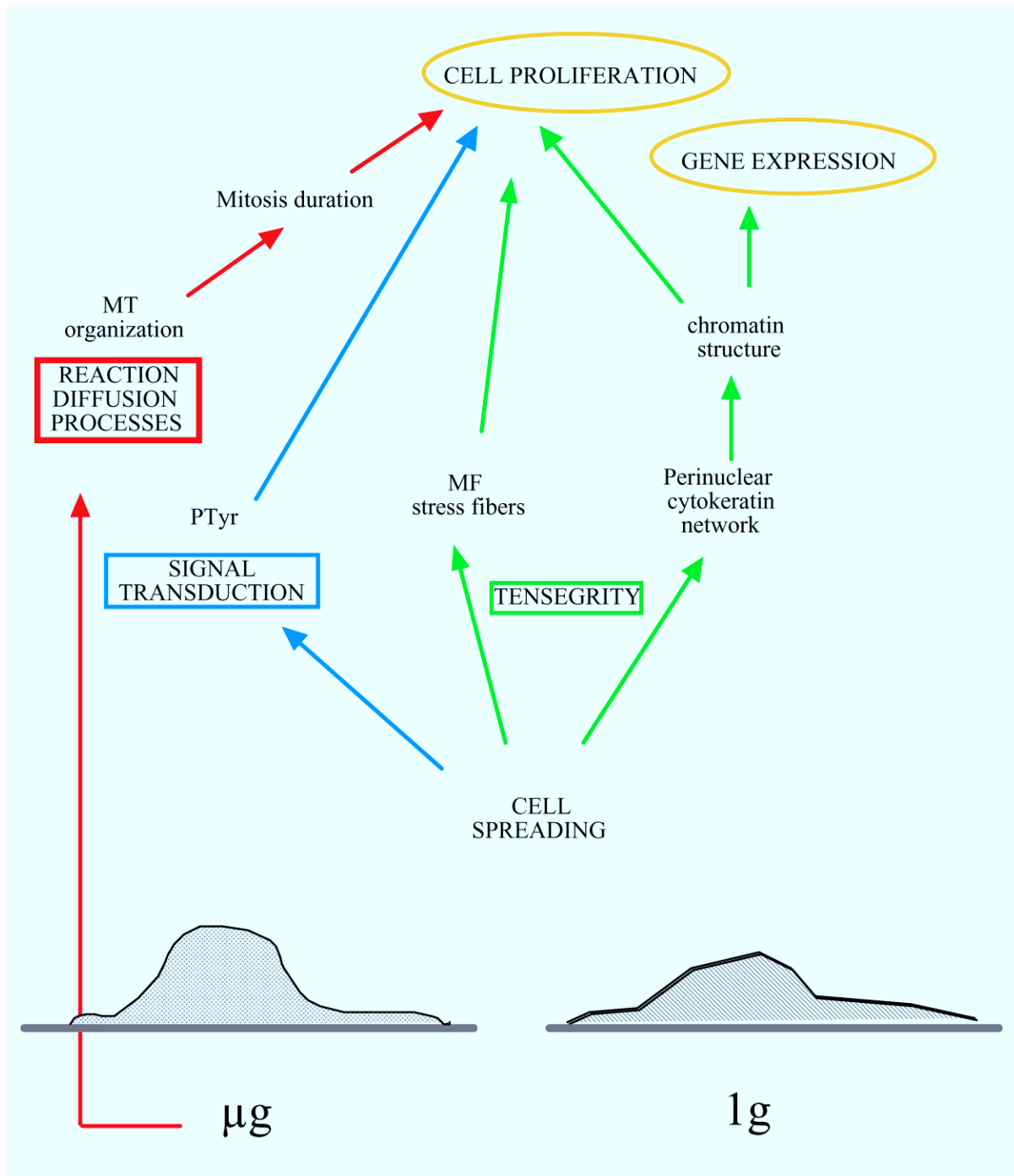


Figure 12. Diagrammatic presentation of mechanisms that might explain the effect of weightlessness on cell physiology.