



**HAL**  
open science

# Mesure des déplacements cellulaires dans les tissus non transparents : une application de la diffusion dynamique de la lumière

Benjamin Brunel

► **To cite this version:**

Benjamin Brunel. Mesure des déplacements cellulaires dans les tissus non transparents : une application de la diffusion dynamique de la lumière. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAY047 . tel-02046692

**HAL Id: tel-02046692**

**<https://theses.hal.science/tel-02046692v1>**

Submitted on 22 Feb 2019

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

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



## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA**

**COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Benjamin BRUNEL**

Thèse dirigée par **Giovanni CAPPELLO**, Chercheur CNRS DR2

préparée au sein du **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique**  
dans **l'École Doctorale Physique**

**Mesure des déplacements cellulaires  
dans les tissus non transparents, une  
application de la diffusion dynamique  
de la lumière**

**Measuring cells displacements inside  
non-transparent tissues, an application  
of dynamic light scattering**

Thèse soutenue publiquement le **29 octobre 2018**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Pierre NASSOY**

Directeur de Recherche, Laboratoire Photonique, Numérique et  
Nanosciences (LP2N - UMR 5298), Président du jury

**Monsieur Luca CIPELLETTI**

Professeur, Laboratoire Charles Coulomb (UMR 5221), Rapporteur

**Madame Valérie LOBJOIS**

Maître de Conférences, Institut des Technologies Avancées en sciences  
du Vivant (ITAV) (USR 3505), Rapporteur

**Monsieur Eric LACOT**

Professeur, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (UMR 5588),  
Examineur



# TABLE DES MATIÈRES

Table des matières . . . . .	2
<b>I Introduction</b>	<b>7</b>
I.1 Problématique . . . . .	8
I.2 Sphéroïdes sous pression : état de l'art . . . . .	13
I.2.1 Modèle de tumeur : le sphéroïde . . . . .	13
I.2.2 Sphéroïdes sous pression : résultats précédents . . . . .	15
I.3 Biologie et Optique . . . . .	19
I.3.1 Origine de la diffusion de la lumière dans les cellules . . . . .	19
I.3.2 Limite de l'optique dans les tissus biologiques . . . . .	20
I.3.3 DLS appliquée à des échantillons biologiques : état de l'art . . . . .	23
I.3.4 Méthode usuelle pour étudier la migration : le <i>tracking</i> . . . . .	24
I.4 Diffusion de la lumière . . . . .	26
I.4.1 Diffusion statique . . . . .	27
I.4.2 Transformée de Fourier . . . . .	30
I.4.3 Diffusion dynamique . . . . .	35
<b>II Méthodes</b>	<b>38</b>
II.1 Échantillons biologiques . . . . .	39
II.1.1 Modèle cellulaire : CT26 . . . . .	39
II.1.2 Culture cellulaire . . . . .	40
II.1.3 Fabrication des sphéroïdes . . . . .	41
II.1.4 Méthode choisie pour appliquer une pression . . . . .	42
II.2 Montage . . . . .	45
II.2.1 Premier montage . . . . .	45
II.2.2 Second montage . . . . .	47
II.3 Acquisition et analyse . . . . .	53
II.3.1 Acquisition . . . . .	53
II.3.2 Fonction de phase . . . . .	54
II.3.3 Théorie de la DLS . . . . .	56
II.3.4 Correction du fond . . . . .	60

<b>III</b>	<b>Preuve de concept : échantillons 2D</b>	<b>66</b>
III.1	Fonction de phase . . . . .	68
III.1.1	Cellule unique : 0D . . . . .	68
III.1.2	Cellules en lignes : 1D . . . . .	69
III.1.3	Cellules dispersées sur une surface : 2D . . . . .	69
III.2	Diffusion dynamique de la lumière . . . . .	72
III.2.1	Cellules sur des lignes : 1D . . . . .	72
III.2.2	Cellules dispersée sur une surface : 2D . . . . .	74
III.2.3	Analyses alternatives de la DLS . . . . .	80
<b>IV</b>	<b>Effet de la pression sur la motilité cellulaire au sein d'un sphéroïde</b>	<b>82</b>
IV.1	Diffusion multiple . . . . .	85
IV.1.1	Mesure du libre parcours moyen ( <i>Mean Free Path</i> ) . . . . .	85
IV.1.2	Impact de la diffusion multiple et limite d'épaisseur . . . . .	88
IV.2	Taille et pression . . . . .	91
IV.2.1	Fonction de phase . . . . .	91
IV.2.2	Taille des cellules en fonction de la pression . . . . .	93
IV.3	Vitesse et pression . . . . .	97
IV.3.1	Résultat type et analyse . . . . .	97
IV.3.2	Vitesse des cellules en fonction de la pression . . . . .	98
IV.4	Orientation du mouvement cellulaire . . . . .	103
IV.4.1	Analyse . . . . .	104
IV.4.2	Résultats . . . . .	105
IV.4.3	Modèle . . . . .	107
IV.5	Rôle de la matrice extracellulaire . . . . .	111
IV.5.1	Pression appliquée à une couche cellulaire . . . . .	111
IV.5.2	Pression appliquée à l'intérieur du sphéroïde . . . . .	112
IV.6	Au-delà des limites . . . . .	115
IV.6.1	Modèle analytique de l'impact de la diffusion multiple . . . . .	115
IV.6.2	Réduire la diffusion multiple . . . . .	122
<b>V</b>	<b>Motilité des macrophages au cours de la phagocytose de cellules apoptotiques</b>	<b>123</b>
V.1	Introduction et méthodes . . . . .	124
V.1.1	Contexte et problématique . . . . .	124
V.1.2	Méthodes . . . . .	125
V.2	Polarisation des macrophages . . . . .	127
V.2.1	Résultats . . . . .	128
V.2.2	Modèle . . . . .	130

---

V.3 Réponse aux cellules apoptotiques . . . . .	134
V.3.1 Résultats . . . . .	135
V.4 Mobilité dans et sur un gel de collagène . . . . .	137
V.4.1 Résultats . . . . .	138
<b>VI Conclusion et perspectives</b>	<b>140</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>147</b>
Bibliographie . . . . .	147
<b>Annexes</b>	<b>159</b>
A Aberrations spheriques : calcul . . . . .	161
B Analyse DLS : seconde démonstration . . . . .	164
C Fonction de corrélation pour des cellules non indépendantes . . . . .	166
D Calcul de la fonction de corrélation spatio-temporelle $C^*$ . . . . .	169
E Calcul du palier de la fonction d'autocorrélation $C$ . . . . .	171
F Calcul de la fraction de diffusion multiple . . . . .	173
G Modèle analytique de l'impact de la diffusion multiple . . . . .	175
H Modèle de marche aléatoire et fonction de corrélation $C$ associée . . . . .	179
I Formulaire de transformées de Fourier de fonctions isotropes . . . . .	182
J Protocoles . . . . .	188
K Méthode des moindre carrés manuelle sur Matlab . . . . .	190



# REMERCIEMENTS

Une thèse n'est jamais le travail d'une seule personne, c'est pourquoi je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé et soutenu durant ces trois années. Je remercie en premier lieu mon directeur de thèse, Giovanni Cappello, pour ses précieux conseils qui m'ont guidé tout au long de ma thèse et sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Sa compréhension approfondie des sphéroïdes a été primordiale pour avancer dans mon travail. Mes remerciements vont aussi à Arnaud Millet, chercheur à l'Inserm, qui m'a permis de tester mon montage sur un sujet fascinant et qui a participé à la relecture de ma thèse. Je remercie aussi Aurélien Gourrier, chercheur dans mon équipe, pour ses commentaires avisés sur mon manuscrit et plus largement pour toutes nos discussions fructueuses sur la diffusion de la lumière. Ma gratitude va également à Antoine Delon, professeur dans mon équipe, pour ses bons conseils. Je remercie également Philippe Moreau, ingénieur de laboratoire, qui a résolu nombre de mes problèmes techniques et qui a été très amical. Je remercie Vincent Lévy, étudiant en première année de master, pour m'avoir assisté dans une partie de mes expériences. Je tiens à remercier de plus tous les autres étudiants et jeunes chercheurs de mon équipe, en particulier Alexis Coullomb et Vanni Petrolli, qui ont animé les repas de midi et m'ont apporté de la bonne humeur. Et je remercie tous ceux avec qui j'ai collaboré pendant ma thèse : Jean-François Joanny, Rémi Carminati, Romain Pierrat, Carles Blanch-Mercader, Monika Dolega et Françoise Brochard-Wyart. Ce modeste travail n'aurait pas été possible sans le financement de doctorat accordé par l'ENS Paris-Saclay (anciennement ENS Cachan), ainsi que le soutien financier de l'ANR, de l'Inserm et du CNRS.

Enfin, je tiens à remercier infiniment mon épouse, Sandra, pour son amour et son soutien sans faille qui m'ont permis de me dépasser pendant ces trois années. De même, je remercie notre fille, Marion, qui m'a apporté joie et motivation. Pour finir, je rends grâce à Dieu qui m'a accordé patience et persévérance pour mener à bien ce travail.

# I

## Introduction

# I1 PROBLÉMATIQUE

Dans l'introduction, nous poserons la problématique à laquelle cette thèse est venue répondre, puis nous détaillerons les éléments du contexte : biologique, technique et le croisement des deux.

## Contexte

Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde, avec près d'un décès sur six (chiffes de l'Organisation Mondiale de la Santé). De plus, l'OMC prévoit une augmentation d'environ 70% au cours des vingt prochaines années. Le cancer est donc un enjeu majeur pour la santé au XXI<sup>e</sup> siècle. Parmi eux, le cancer colorectal est le 3<sup>eme</sup> en nombre de décès (774 000 en 2015), devant le cancer du poumon et celui du foie.

De plus en plus d'études tendent à démontrer l'importance de l'environnement tissulaire dans le développement du cancer [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Le tissu sain environnant une tumeur est capable de l'étouffer, celle-ci étant alors sans conséquences. Mais s'il est modifié, il peut au contraire avoir un effet facilitant pour la progression du cancer [4]. On peut citer par exemple le cas des macrophages qui initialement inhibent la croissance tumorale, puis en changeant d'état d'activation (polarisation) peuvent la promouvoir [7].

Outre la biochimie de l'environnement de la tumeur, les cellules sont sensibles à leur environnement mécanique. Cette capacité à transformer un signal mécanique en réponse biologique, appelée mécanotransduction [8], influence la division cellulaire [9], la migration [10] et la différenciation [11]. Les propriétés mécaniques ont donc des conséquences sur l'évolution du cancer [12, 13, 14]. Parallèlement, les questions de mécanotransduction sont aussi importantes pour le développement et la morphogenèse d'un organisme [15, 16].

## Question

La réponse mécanique à laquelle nous allons nous intéresser dans cette thèse est la réponse à une compression isotrope. Cette question a une importance toute particulière dans le cadre du cancer : plus une tumeur grossit, plus elle exerce et subit une pression vis-à-vis des tissus alentours [13]. La compression d'une tumeur était d'ailleurs un des traitements possibles du cancer [17]. Le modèle biologique que nous avons choisi pour aborder cette question est le sphéroïde, ou agrégat cellulaire. Ceux-ci ont été introduit dans les années 70 comme modèle pour étudier les tumeurs avasculaires [18, 19], et sont entre autres utilisés maintenant pour tester des drogues contre le cancer [20]. Plus de détails seront apportés sur le sphéroïde

dans la section I.2.1. Examinée par Giovanni Cappello, l'effet de la pression sur cette tumeur modèle a déjà fait l'objet de plusieurs publications dont les principaux résultats sont résumés dans la section I.2.2 [21, 22, 23, 24, 25]. Une question reste cependant : comment la pression affecte-t-elle le mouvement des cellules au sein du sphéroïde ? On sait que la pression réduit la croissance tumorale [21], ce qui serait bénéfique pour l'évolution du cancer. Mais d'autres études ont montré que comprimer une tumeur augmente aussi l'invasivité du cancer et le risque de métastases [14, 26]. J'ai donc cherché à mesurer le comportement migratoire des cellules en fonction de la pression exercée. Décrire la dynamique interne des sphéroïdes a aussi un intérêt du point de vue de la physique, les tissus biologiques représentant une nouvelle classe de matériaux dits actifs.

### Solution apportée

Répondre à cette question pose un problème technique. Une possibilité serait de suivre les déplacements de chaque cellule pour en tirer des conclusions sur leur motilité générale. Mais cela nécessiterait d'obtenir des images suffisamment nettes pour distinguer chaque cellule. Or l'imagerie à l'intérieur d'un sphéroïde de  $500\mu\text{m}$  de diamètre s'approche voire dépasse les limites de ce qui est faisable aujourd'hui en microscopie [27]. Ainsi la microscopie confocale [28] ou la microscopie à deux photons [29, 30] sont limitées à quelques centaines de micromètres. La figure I.1.1 montre un exemple d'imagerie de sphéroïde avec un microscope confocal. L'illumination par feuillet de lumière (*Selective Plane Illumination Microscopy* - SPIM) [31, 32, 33] appliquée aux sphéroïdes [34, 35] permet une acquisition plus rapide et moins photo-toxique, mais la limite reste similaire (voir figure I.1.2).

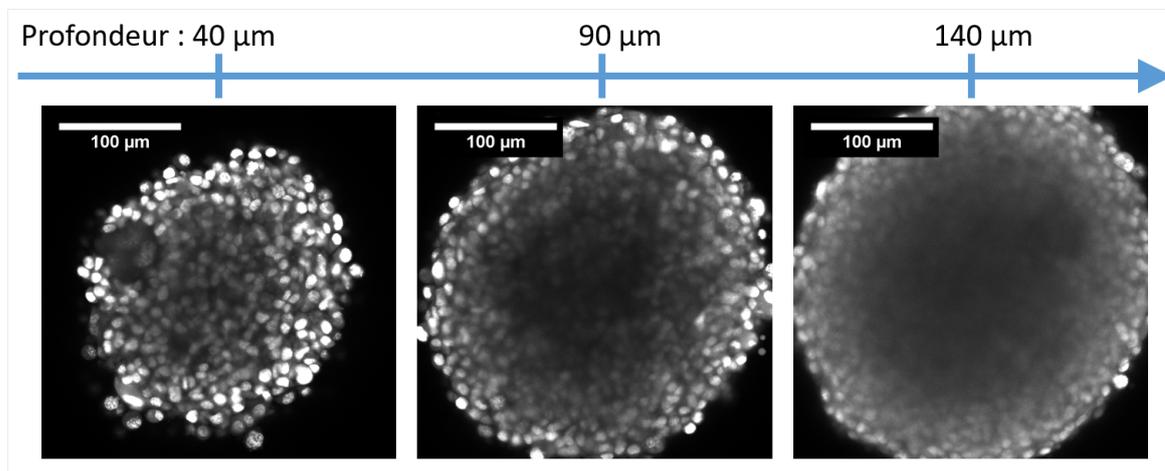


FIGURE I.1.1 – *Imagerie Confocale d'un sphéroïde à différentes profondeurs (mesurées à partir de sa surface). Le noyau des cellules a été marqué avec du NucRed® Live 647 (ThermoFisher)*

Plusieurs méthodes, telles que l'optique adaptative [36, 37], la conjugaison de phase [38, 39] ou l'utilisation de faisceaux de Bessel [35], sont en train de se développer pour améliorer l'imagerie de fluorescence dans les milieux très diffusants, mais sont encore techniquement exigeantes. Récemment, des méthodes d'imagerie photo-acoustiques ont aussi vu le jour [40], mais ne conviendraient pas pour notre étude à cause de leur résolution limitée

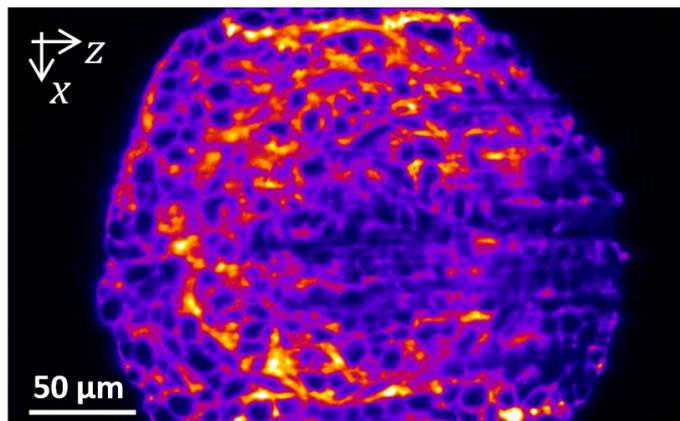


FIGURE I.1.2 – Imagerie SPIM d'un sphéroïde à une profondeur de  $120\mu\text{m}$ . L'espace intercellulaire est marqué par un fluorophore ne pénétrant pas dans les cellules : Alexa Fluor® 488 phalloïdin. L'éclairage par feuillet de lumière provient de la gauche, plus il se propage dans le sphéroïde, plus il est déformé. De l'autre côté du sphéroïde, à droite, l'éclairage n'est plus uniforme, ce qui crée des artéfacts. Tiré de [35].

par la longueur d'onde ultrason ( $\approx 40\mu\text{m}$ ). La tomographie en cohérence optique (*Optical Coherence Tomography* - OCT) est aussi une méthode remarquable pour l'imagerie en profondeur [41, 42, 43]. Elle a été développée en parallèle par une équipe partenaire pour mesurer le champ de déplacement global dans un sphéroïde [44]. Il est en revanche plus difficile d'accéder aux déplacements des cellules avec cette technique. Enfin, on peut citer l'étude de cryosections de sphéroïdes [21] ou les méthodes pour rendre l'échantillon transparent (*optical clearing*) [45, 46], mais ces techniques ne sont pas adaptées aux questions de dynamique puisqu'elles nécessitent la fixation de l'échantillon.

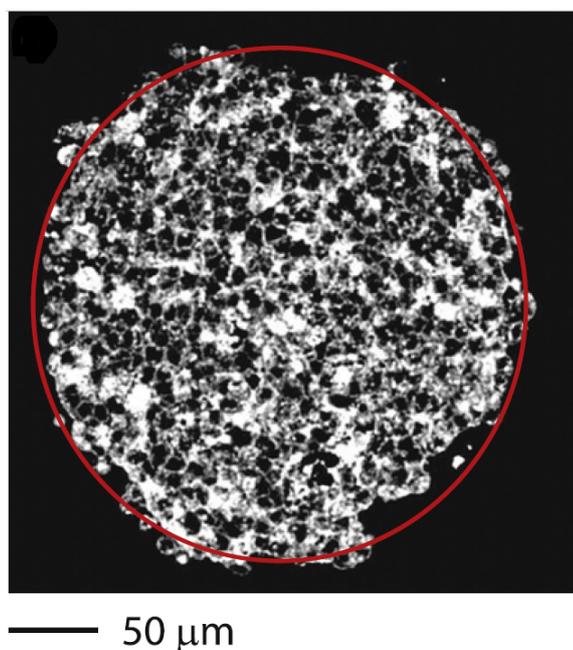


FIGURE I.1.3 – Imagerie par OCT d'un sphéroïde à une profondeur de  $100\mu\text{m}$ . Tiré de [37]

La longueur de pénétration est principalement limitée par la diffusion de la lumière (voir section I.3.2). L'idée nous est donc venue d'en tirer profit et d'observer justement cette lumière diffusée pour sonder le sphéroïde. Notre intérêt portant principalement sur la dynamique des cellules à l'intérieur du sphéroïde, nous nous sommes concentrés sur la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering-DLS*). La section I.4.3 présentera plus de détails sur la DLS. En quelques mots, il s'agit d'illuminer l'échantillon avec un laser et d'enregistrer les fluctuations de l'intensité diffusée. Cette technique constitue une alternative possédant des avantages et des inconvénients. La principale différence est qu'il ne s'agit pas d'obtenir une image, mais une mesure statistique sur la population totale du sphéroïde. Si on compare avec les techniques de fluorescence, les avantages sont :

- ⇒ La DLS est moins affectée par la profondeur, ce point sera détaillé dans la section I.3.2.
- ⇒ La fréquence d'acquisition peut être élevée puisqu'il n'est pas nécessaire de scanner l'échantillon comme pour la microscopie confocale ou deux photons. Une seule mesure suffit pour l'ensemble de la population 3D. Cet avantage peut s'avérer primordial pour observer des phénomènes à dynamique rapide.
- ⇒ Le champ de vue, et donc la taille de la population sondée, est grand car il ne dépend que de la taille du faisceau laser éclairant l'échantillon. En conséquence, on peut aisément faire une mesure sur un disque de plusieurs centimètres de diamètre.
- ⇒ Le signal est endogène, il n'est pas nécessaire d'utiliser un marqueur fluorescent pouvant dans certains cas affecter la dynamique étudiée. Sans fluorophore, on a de plus le choix de la longueur d'onde utilisée. Un laser  $850nm$  permet d'augmenter la pénétration de la lumière (environ proportionnelle à sa longueur d'onde [47, 48, 49]) en restant dans la fenêtre de faible absorption de l'eau.
- ⇒ Une faible illumination est suffisante ( $\sim 1 nJ/cellule$ ) car les cellules diffusent fortement la lumière. L'énergie déposée dans l'échantillon est donc minime, ce qui limite le risque de dégâts liés à l'exposition [50]. C'est notamment vrai si on compare au multiphoton ou au confocal ( $\sim 1 mJ/cellule$ ), le problème est moindre avec le SPIM ( $\sim 10 \mu J/cellule$ ).
- ⇒ Les grandeurs statistiques de la population sont directement obtenues, sans avoir besoin de segmenter puis faire un suivi des cellules [51]. Ces deux étapes étant généralement difficiles pour les tissus compacts et pouvant introduire des biais liés aux seuils choisis [52].

En revanche, il y a certaines limites :

- ⇒ L'épaisseur du tissu pour lequel on peut utiliser la DLS reste limitée ( $\leq 400 \mu m$  pour nos sphéroïdes).
- ⇒ L'objectif n'est pas d'obtenir une image, mais une mesure sur une population. Ainsi on ne pourra pas obtenir la trajectoire de chacune des cellules, mais on obtiendra une mesure statistique du déplacement en fonction du temps pour l'ensemble de la population. Cela rend difficile l'identification de plusieurs populations si le tissu est inhomogène.

- ⇒ L'interprétation des résultats obtenus est moins aisée que dans le cas où on peut observer les trajectoires.
- ⇒ Pour une détection en transmission, les mouvements selon l'axe optique ne sont pas détectables. On ne mesurera qu'une projection des mouvements dans un plan perpendiculaire à la direction du faisceau laser incident.

Si l'on souhaite comprendre en détail les mécanismes du mouvement cellulaire, la microscopie est plus adaptée. La DLS peut ensuite permettre des mesures rapides en grande quantité (*high throughput*) une fois le modèle de déplacement compris par microscopie. Si on souhaite tout de même obtenir une information résolue spatialement, on peut utiliser un laser plus petit, ne sondant qu'une partie de l'échantillon, et scanner l'échantillon. La DLS peut aussi être utilisée à profit pour l'étude de populations 2D, pour son grand champ et son affranchissement d'un logiciel de *tracking*.

Le chapitre suivant de l'introduction présentera les modèles biologiques étudiés. Le troisième chapitre expliquera en détail la diffusion de la lumière statique puis dynamique. Le dernier chapitre présentera la littérature sur l'utilisation de la diffusion de lumière en biologie et détaillera la question de la limite de profondeur observable en optique.

#### Plan de la thèse

L'introduction présente en détails les éléments de contexte biologique et optiques, puis la seconde partie présentera les détails des méthodes expérimentales utilisées. Les parties suivantes aborderont les résultats obtenus avec une preuve de concept de la technique en 2D (Partie III), son application à la question de l'effet de la pression dans les sphéroïdes (Partie IV) et enfin une seconde application concernant la dynamique de déplacement des macrophages en réponse à des signaux envoyés par les cellules apoptotiques (Partie V).

# I2 SPHÉROÏDES SOUS PRESSION :

## ÉTAT DE L'ART

Dans cette partie nous allons décrire succinctement le modèle biologique étudié dans notre étude : le sphéroïde. Nous verrons aussi quelques résultats importants de la littérature sur les effets de la pression sur les sphéroïdes. Ce chapitre servira de mise en contexte de nos résultats.

### I.2.1 MODÈLE DE TUMEUR : LE SPHÉROÏDE

Les sphéroïdes, ou agrégats cellulaires, ont été introduits dans les années 70 comme modèle pour étudier les tumeurs de petite taille [18, 19]. En pratique, il s'agit d'un micro-tissu formé de l'agrégation de centaines de cellules entre elles. Les cellules sont capables d'adhérer entre elles grâce à des protéines d'adhésion, en particulier la cadhérine E. Si cette adhésion est plus forte que celle avec le substrat, les cellules s'agrègent entre elles. Ensuite cette même adhésion se traduit au niveau du groupe de cellules par une tension de surface [53] qui conduit à la formation d'une sphère par des mouvements de réorganisation. La méthode de fabrication sera plus détaillée en section II.1.3. Il est intéressant de noter que tous les types de cellules ne sont pas capables de former des sphéroïdes. Si par exemple, on inhibe l'E-cadhérine dans une lignée, l'agrégation ne se produit plus et les cellules restent individuelles [54].

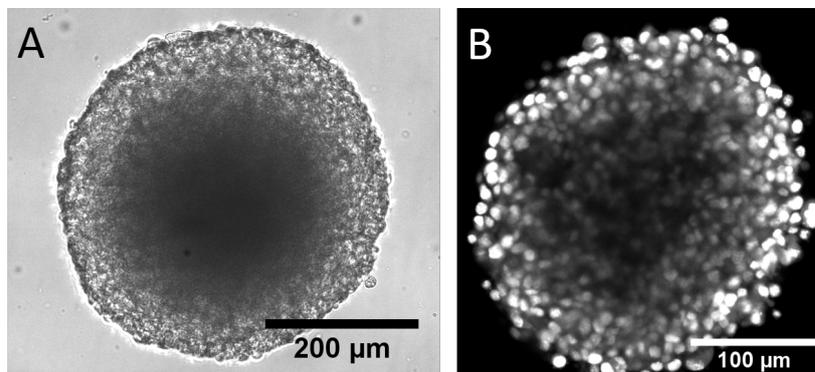


FIGURE I.2.1 – Sphéroïde observé au microscope 10x (A) et en microscopie confocale (B). Le noyau des cellules a été marqué avec du NucRed.

La culture de sphéroïdes permet de fabriquer des masses de cellules cancéreuses en

croissance, d'où le parallèle avec les tumeurs. Le modèle est cependant moins pertinent pour étudier les tumeurs de plus d'un millimètre de diamètre, dans lesquelles il se forme *in vivo* des vaisseaux sanguins pour irriguer l'intérieur de la tumeur (angiogenèse) [55]. Les sphéroïdes correspondent donc à des stades de tumeur dont la taille est assez petite pour qu'une irrigation en surface suffise. On retrouve d'ailleurs cette limitation dans la taille maximale qu'un sphéroïde peut atteindre. Enfin, on peut ajouter que ces agrégats multicellulaires possèdent une structure radiale : le gradient d'oxygène à partir de la surface donne une prolifération cellulaire plus importante en périphérie et les cellules du centre sont en majorité en état de mort cellulaire, formant un cœur nécrotique [56]. Ce gradient de division cellulaire donne naissance à un flux de cellules la périphérie vers le centre [23].

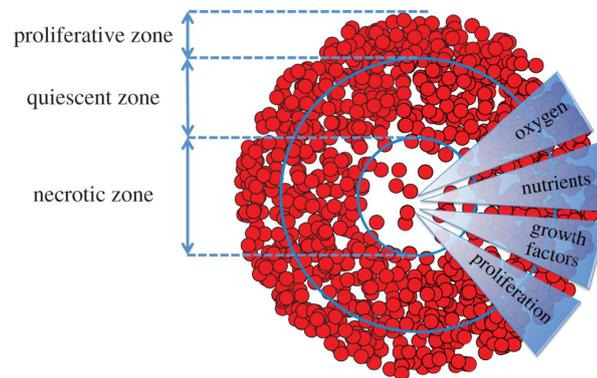


FIGURE I.2.2 – Schéma d'un sphéroïde avec les différentes zones internes, résultantes du gradient d'oxygène et de nutriments. Tiré de [57]

Les sphéroïdes permettent une étape intermédiaire entre la traditionnelle culture 2D sur boîte de pétri, pas assez représentative de l'état réel des cellules et l'étude *in vivo*, qui comporte de nombreuses contraintes. Il a été notamment montré que l'efficacité d'un traitement peut varier grandement entre les cas 2D et 3D [58, 59], ce qui fait des sphéroïdes un outil propice à l'étude de nouveaux médicaments [60, 20, 61]. Les agrégats cellulaires permettent également d'étudier le cycle cellulaire en 3D [62], l'angiogenèse [63], l'organisation et les mouvements des cellules dans les tissus [56, 23] et plus largement l'interaction des cellules avec leur microenvironnement [19].

Un autre domaine s'est beaucoup développé grâce à l'utilisation des agrégats multicellulaires : l'étude des propriétés mécaniques des tissus (viscoélasticité, rhéologie) [53]. Une sélection des techniques de caractérisation mécanique des sphéroïdes est présentée à titre informatif en figure I.2.3. Il existe des similarités avec :

- un liquide possédant une tension de surface [64, 65],
- un matériau viscoélastique, ayant une réponse élastique aux temps courts et un écoulement visqueux aux temps longs [66, 67],
- une mousse où les cellules sont les bulles pouvant se réarranger entre elles [68, 69]

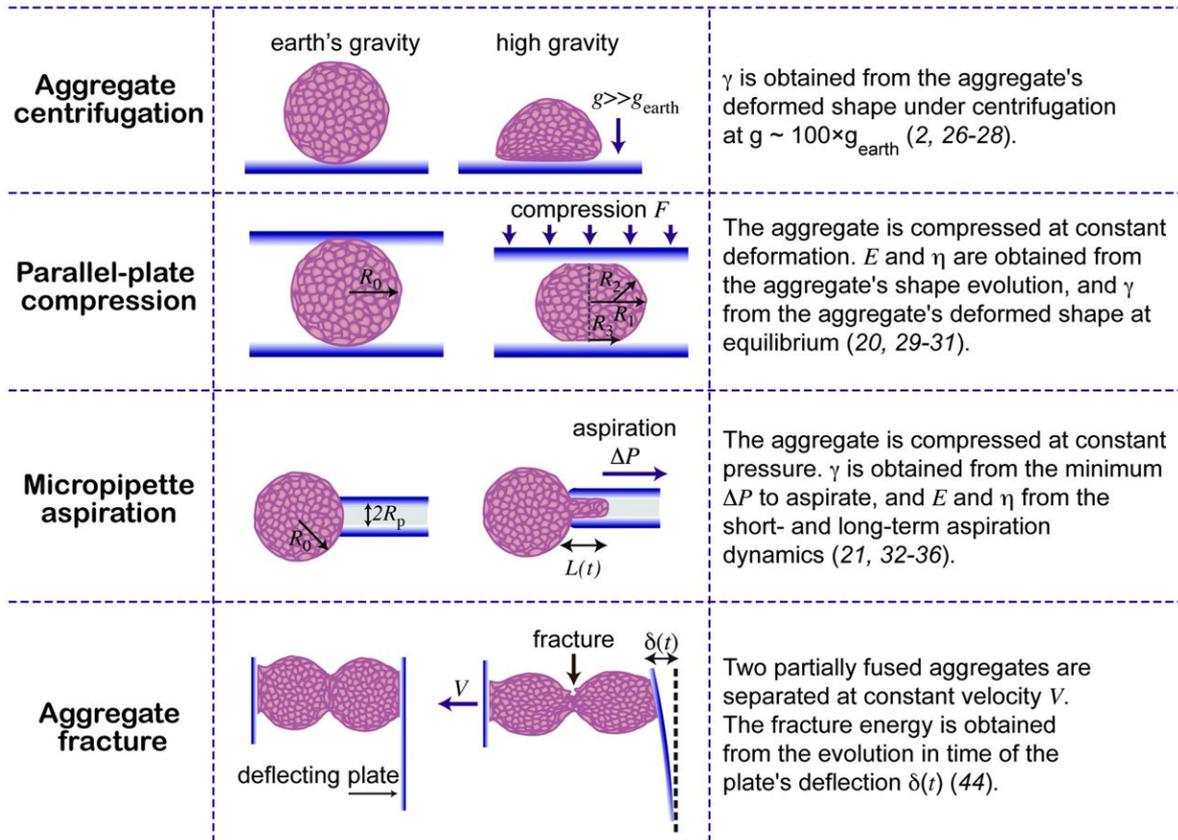


FIGURE I.2.3 – Techniques de caractérisation mécanique des sphéroïdes, tiré de [53].

## I.2.2 SPHÉROÏDES SOUS PRESSION : RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

L'étude rhéologique des sphéroïdes ne vise pas seulement à décrire quel est le comportement rhéologique de cette matière active, mais aussi à comprendre l'impact de l'environnement mécanique du sphéroïde sur les fonctions biologiques des cellules. La réponse mécanique à laquelle nous allons nous intéresser dans cette thèse est la réponse à une compression isotrope. Cette question a une importance toute particulière dans le cadre du cancer : plus une tumeur grossit, plus elle exerce et subit une pression vis-à-vis des tissus alentours. Examinée par Morgan Delarue, cette question a déjà fait l'objet de plusieurs publications dont nous allons résumer ici les principaux résultats. Les résultats présentés ont été obtenus avec la même lignée cellulaire que nous utilisons (CT26).

### Réduction de la croissance

L'effet le plus évident de la pression sur les tumeurs est de diminuer leur croissance. La figure I.2.4 présente les courbes de croissance en volume normalisé par rapport au volume initial pour des pressions allant de  $0Pa$  à  $20kPa$ . Plus la pression est forte, plus la croissance est réduite. On observe une nette réduction pour une pression aussi faible que  $500Pa$  et l'effet sature pour des pressions au-delà de  $5kPa$ . La réduction de la prolifération par une contrainte avait déjà été observée auparavant [70].

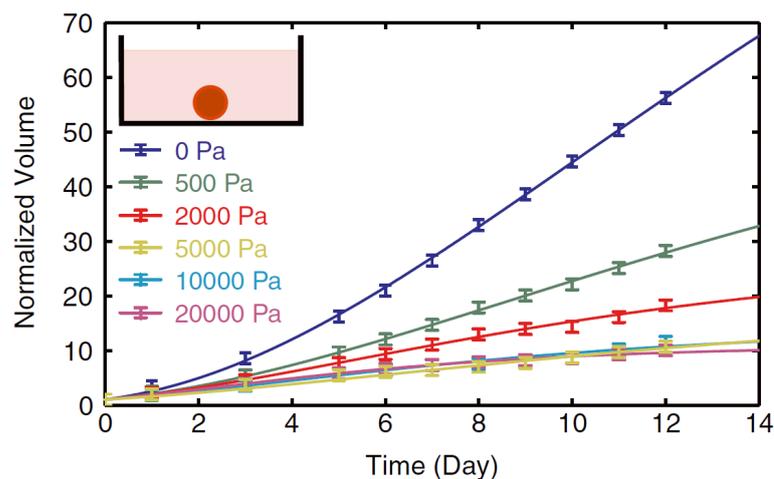


FIGURE I.2.4 – Courbes de croissance de sphéroïdes pour des pressions allant de 0 à 20kPa. Tiré de [21].

#### Diminution de la division cellulaire

La réduction du taux de croissance du sphéroïde est directement liée à l'inhibition de la division cellulaire. En l'absence de compression, on sait que la division cellulaire est plus importante en surface qu'au centre, notamment à cause du gradient d'oxygène et de nutriments. La division cellulaire n'est cependant pas nulle à l'intérieur. Lorsqu'on applique une pression de 1000 Pa sur le sphéroïde, la division cellulaire est stoppée au centre (I.2.5 cellules en bleu). Les premières couches cellulaires sont quant à elles peu affectées, de même que le taux d'apoptose (cellules en rouge). Des résultats similaires ont été obtenus par Alessandri et al. [26]. Une étude antérieure effectuée sur une lignée cellulaire différente (67NR) a montré également une réduction de la division cellulaire. En revanche une augmentation de l'apoptose a été observée contrairement à ce qui a été obtenu pour les CT26 [71].

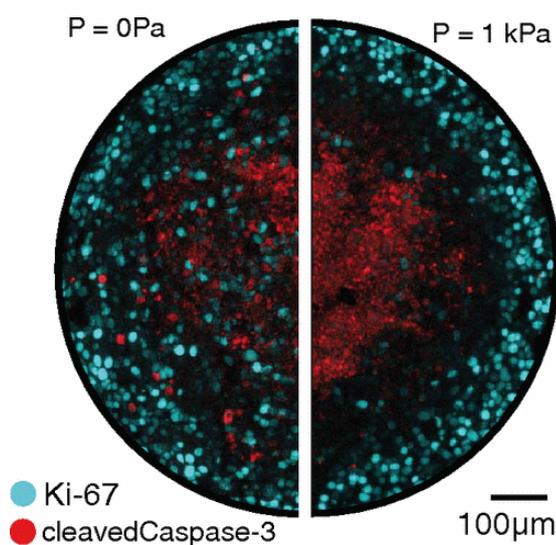


FIGURE I.2.5 – Les cellules en bleu sont en division (marquage anticorps anti-Ki-67) et les cellules en apoptose sont en rouge (marquage anticorps anti Cleaved Caspase-3). Tiré de [21]

### Réduction du volume cellulaire

Delarue et al. ont montré que la réduction du taux de division cellulaire était due à la surexpression de l'inhibiteur de prolifération  $p27^{Kip1}$  lorsque le volume disponible aux cellules est réduit [24]. La figure I.2.6 montre en effet que la distance entre noyaux des cellules diminue dès 5 min après application de la pression. On remarque de plus que cet effet s'accroît en allant vers le centre du sphéroïde, ce qui rejoint l'arrêt de la division principalement observée au centre dans la figure I.2.5. Desmaison et al. ont montré de plus qu'une contrainte mécanique perturbe la mise en place du fuseau mitotique, stoppant ainsi le cycle cellulaire dans la phase de mitose [72, 73].

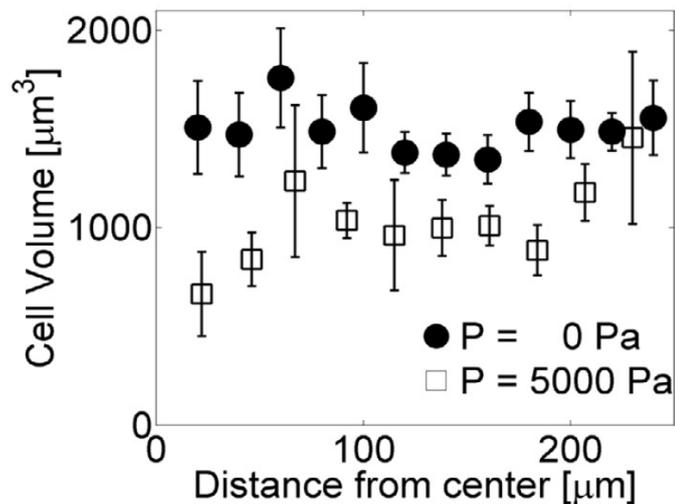


FIGURE I.2.6 – Réduction du volume occupé par une cellule dans un sphéroïde, déduit de la distance moyenne entre deux noyaux, 5 min après une compression de 5 kPa. Tiré de [25]

### Surpression au centre du sphéroïde

Cette surcompression au centre du sphéroïde n'est pas possible si on traite le tissu comme un milieu mécaniquement homogène. Monika et al. [74] ont mesuré effectivement une pression plus importante au centre (figure I.2.7) et proposé une explication liée à l'orientation des cellules sous contrainte (figure I.2.8). Comme les cellules sont anisotropes et orientées en couches concentriques, si elles sont plus rigides radialement que tangentiellement, on peut montrer que la pression croît en allant vers le centre du sphéroïde [75].

Il est intéressant de noter que les effets résumés ici ne sont pas observés pour des cellules en culture 2D. La sensibilité à la pression est donc une propriété émergente de l'organisation 3D des tissus.

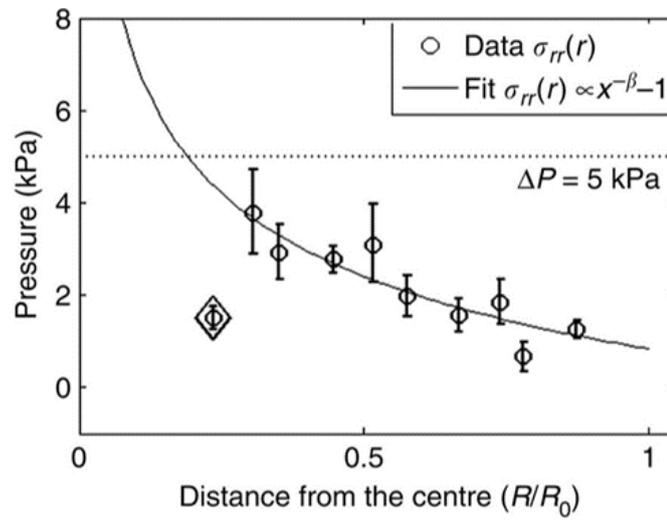


FIGURE I.2.7 – *Pression au sein du sphéroïde en fonction de la distance au centre, pour une pression appliquée à sa surface de 5kPa. Tiré de [74]*

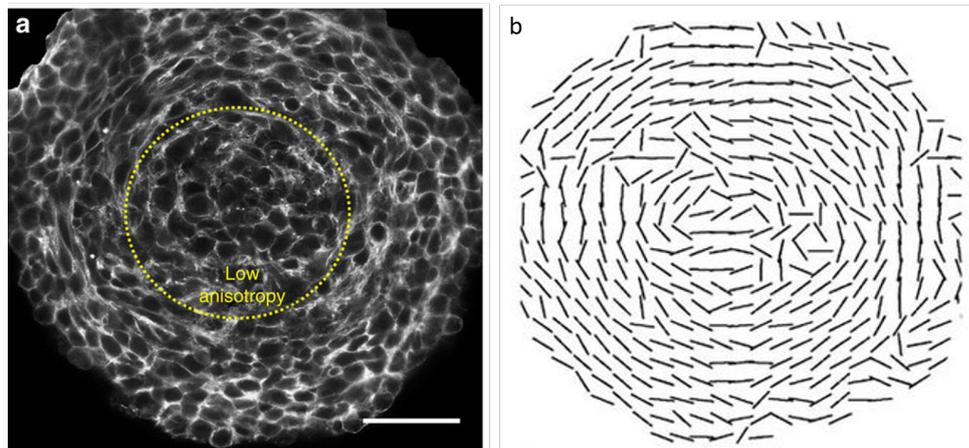


FIGURE I.2.8 – *a : image confocale d'un sphéroïde sous pression dans laquelle on voit les cellules orientées en couches concentriques. L'image est prise dans le plan équatorial, soit à  $125\mu\text{m}$  de profondeur. Le signal fluorescent provient du fluorophore Phalloidin, barre d'échelle :  $50\mu\text{m}$ . b : orientation des cellules selon leur grand axes. Tirés de [74]*

# I3 BIOLOGIE ET OPTIQUE

## I.3.1 ORIGINE DE LA DIFFUSION DE LA LUMIÈRE DANS LES CELLULES

La diffusion de lumière, de rayons-X ou de neutrons est un outil bien connu depuis la deuxième moitié du  $XX^e$  siècle et abondamment utilisé pour étudier des structures microscopiques à nanoscopiques [76, 77, 78]. Dans le domaine de la biologie, les premières études de la lumière diffusée par des cellules en suspension paraissent dans les années 70. Ce sont les variations d'indice optique qui diffusent la lumière, à commencer par la différence d'indice entre le milieu de culture, proche de l'eau (1,33), et celui du cytoplasme (1,36-1,37 [79]). Ensuite, viennent les variations à l'intérieur de la cellule : le noyau ( indice 1,38-1,47 [79, 80]), les mitochondries (indice 1,38-1,41 [81]) et les fluctuations d'indice dans le cytoplasme. La répartition de l'intensité diffusée par ces différents éléments dépend de l'angle auquel on observe la lumière. En effet, les objets larges (par rapport à la longueur d'onde) diffusent principalement vers l'avant (petits angles) alors que les petits diffuseurs diffusent la lumière de manière plus uniforme. Ainsi, aux petits angles ( $< 5^\circ$ ) la diffusion est dominée par l'interface eau/cellule, donc par la forme de la cellule [47, 82]. Ensuite vient le noyau, puis les autres organelles et le cytoplasme, comme indiqué dans la figure I.3.1. C'est d'ailleurs grâce à cette variation angulaire que la diffusion est d'abord utilisée comme un technique capable de caractériser rapidement la taille des cellules [83, 84](cytométrie en flux [85]).

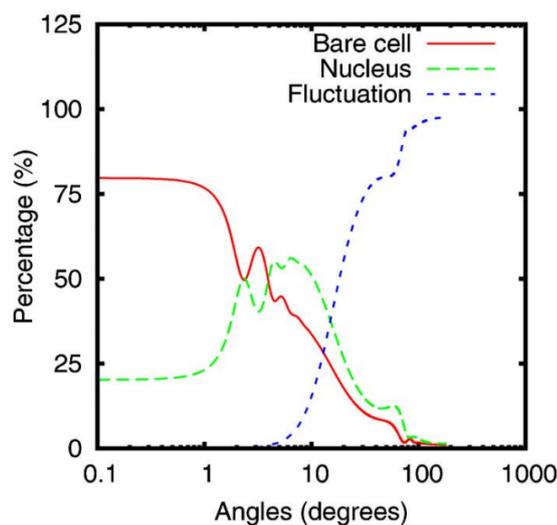


FIGURE I.3.1 – Répartition de la lumière diffusée en fonction de l'angle, pour une cellule illuminée avec un laser He-Ne (633nm). Tiré de [82]

Pour trouver un modèle du profil angulaire de la lumière diffusée par les cellules, des comparaisons ont ensuite été proposées avec la diffraction de Fraunhofer, la théorie de Mie et des calculs de propagation par méthode des éléments finis [86, 87]. Aux petits angles, la théorie de Fraunhofer est suffisante pour décrire la lumière diffusée par la cellule. Plus récemment, un article comparant la lumière diffusée par des cellules en suspension et un sphéroïde [88] ne donnait pas de différences entre les deux échantillons. Cependant cette conclusion est basée sur l'intensité aux grands angles et non aux petits angles où le signal lié à la structure du sphéroïde est attendu.

L'objectif de cette thèse étant d'obtenir des informations au niveau supra-cellulaire, on se limitera à la diffusion aux petits angles ( $< 10^\circ$ ). A ces angles, l'intensité est dominée par la forme de la cellule et son noyau. Dans les tissus où les cellules sont jointives, l'interface eau/cellule disparaît et la diffusion de la lumière provient essentiellement des noyaux [87, 47]. Mais dans le cas des sphéroïdes étudiés ici, les cellules ne sont pas jointives mais entourées de matrice extracellulaire. Les mouvements que l'on mesurera en DLS sont donc ceux des cellules et des noyaux. Aux échelles de temps considérées, le déplacement d'un noyau correspond en fait au déplacement de la cellule qui le contient. Au final, on observe donc bien les cellules. Dans la suite, on ne s'intéressera donc pas aux détails de la diffusion intracellulaire et on considèrera la cellule comme un diffuseur homogène.

### I.3.2 LIMITE DE L'OPTIQUE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES

La diffusion est la principale limitation de la pénétration de la lumière, et donc de l'imagerie, dans les tissus biologiques. [89, 90, 27]. Elle a pour effet de dévier les photons qui ne sont alors plus balistiques, c'est-à-dire que leur trajectoire n'est plus une simple droite. Dans le cas de la microscopie confocale et à deux photons, cet effet est double. À l'aller, la diffusion empêche la focalisation correcte du faisceau exciteur, ce qui augmente la taille de la zone illuminée et donc diminue la résolution (voir figure I.3.2 A). De plus l'intensité est fortement réduite au point focal, ce qui nécessite une puissance laser importante. Au retour, s'ajoute la perte de signal : la diffusion dévie le signal fluorescent émis qui n'est alors plus focalisé dans le bon plan (et éliminée par le *pinhole* pour le confocal)(figure I.3.2 B). L'illumination par feuillet de lumière (SPIM) appliquée aux sphéroïdes [34, 35] permet une acquisition plus rapide et moins photo-toxique, mais le problème de focalisation du laser est toujours présent. On notera que plusieurs méthodes, telles que l'optique adaptative [36, 37], la conjugaison de phase [38, 39] ou l'utilisation de faisceaux de Bessel [35] sont justement en train de se développer pour améliorer la focalisation d'un laser dans un milieu très diffusant, mais sont encore techniquement exigeantes.

L'importance de cette diffusion est donnée par le parcours libre moyen de transport des photons dans le tissu (*transport mean free path* - TMFP). Le TMFP correspond à la distance moyenne que parcourt un photon dans le tissu avant de perdre son orientation. Il dépend du parcours libre moyen (*mean free path* - MFP), distance moyenne entre 2 diffusions, et de l'angle moyen de diffusion. Dans les échantillons biologiques le MFP est de l'ordre de

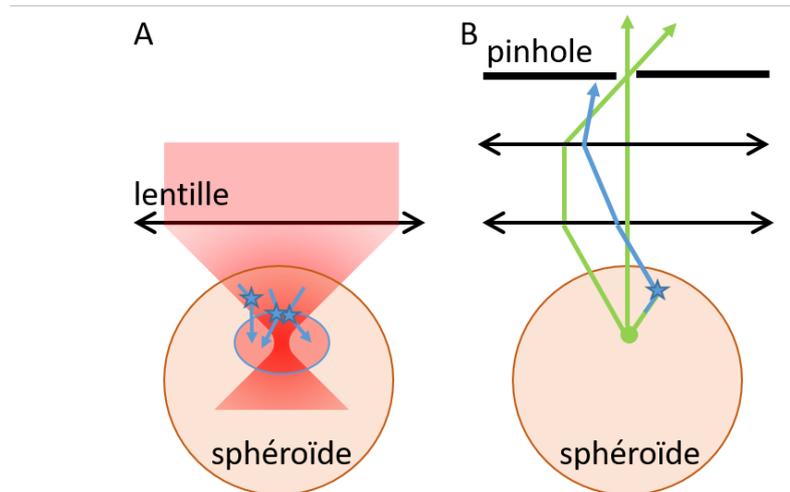


FIGURE I.3.2 – Effets de la diffusion pour la microscopie multiphoton et confocale. A : Un laser venant du haut est focalisé dans le sphéroïde grâce à une lentille. À cause de la diffusion, la lumière ne se propage pas en ligne droite et n'est pas entièrement focalisée au foyer de la lentille. B : Dans un confocal, la lumière émise par la zone excitée est filtrée par un pinhole (trou) avant d'être détectée. Le pinhole est conjugué au point focal par les lentilles afin d'éliminer les photons n'en provenant pas. Avec la diffusion, une partie des photons venant bien du foyer est aussi éliminée.

100 $\mu\text{m}$  et le TMFP est de l'ordre de 10 MFP [91, 48, 27]. Le TMFP augmente avec la longueur d'onde  $\lambda$ . Pour les tissus biologiques et  $\lambda$  dans le spectre visible ou infrarouge, le TMFP est proportionnel à  $\lambda^n$  avec  $n$  compris entre 1 et 2 [47, 48, 49, 35]. Utiliser un laser proche-infrarouge ( $\lambda = 850\text{nm}$ ) permet d'allonger la TMFP et ainsi de réduire la proportion de photons diffusés plusieurs fois. À cette longueur d'onde, dans nos sphéroïdes, la MPF mesurée est de  $76 \pm 4\mu\text{m}$  (voir section IV.1.1), ce qui donne une TMFP de l'ordre de  $760\mu\text{m}$ . Pour la microscopie confocale, il s'agit d'une estimation haute et en général la profondeur de pénétration ne dépasse pas les quelques MFP soit quelques centaines de micromètres.

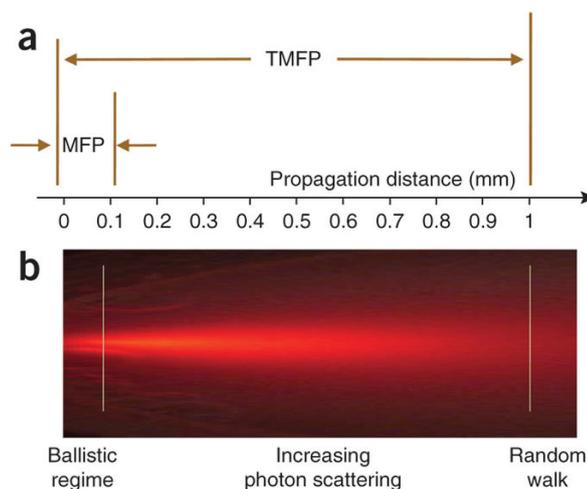


FIGURE I.3.3 – Représentation simplifiée de la propagation des photons dans un tissu ayant un TMFP de 1 mm. Tiré de [27]

La DLS est aussi limitée par la TMFP, mais possède plusieurs avantages pour l'étude des tissus épais :

- On peut utiliser une longueur d'onde plus grande, donc plus pénétrante. En effet, la longueur d'onde utilisable pour des échantillons vivants est limitée à la fenêtre d'absorption de l'eau (I.3.4). Plus on s'en éloigne et plus la puissance utilisée est forte, plus le risque de brûler l'échantillon est grand. Comme l'intensité lumineuse nécessaire en DLS est moindre, à puissance déposée dans l'échantillon égale, la longueur d'onde utilisable est plus grande.
- La longueur de pénétration est plus grande dans le cas de la DLS car il faut une unique diffusion alors que pour la microscopie de fluorescence il n'en faut aucune. Par exemple, à  $120 \mu\text{m}$  de profondeur, seulement 20% des photons ne sont pas diffusés, contre 54% de photons diffusés une fois dans la lumière diffusée (figure I.3.5).
- La diffusion multiple entraîne en microscopie une perte de contraste rendant toute mesure impossible, alors qu'en DLS la mesure est toujours possible, même si elle est en revanche biaisée.

La section IV.1.2 abordera plus en détail comment les diffusions non souhaitées affectent la mesure en DLS.

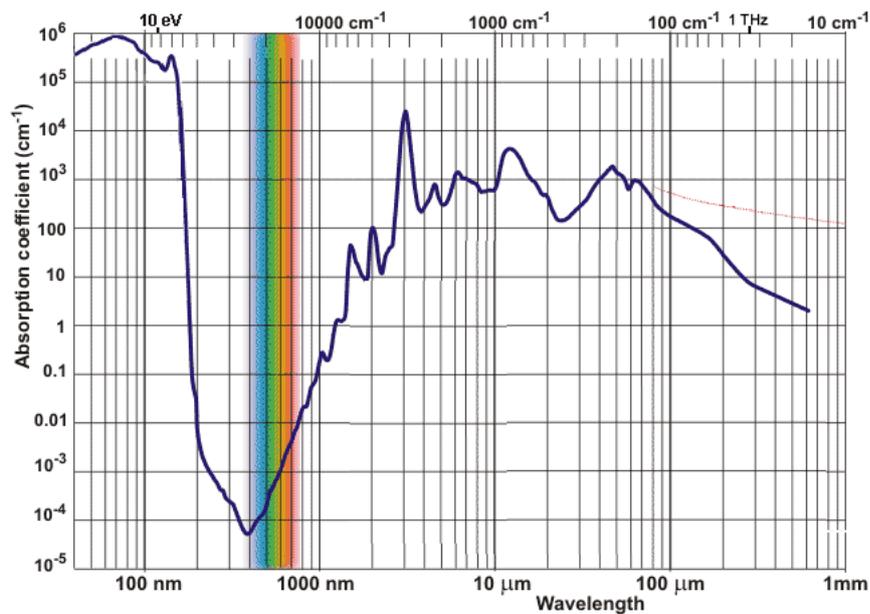


FIGURE I.3.4 – Coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la longueur d'onde. Tiré de [92].

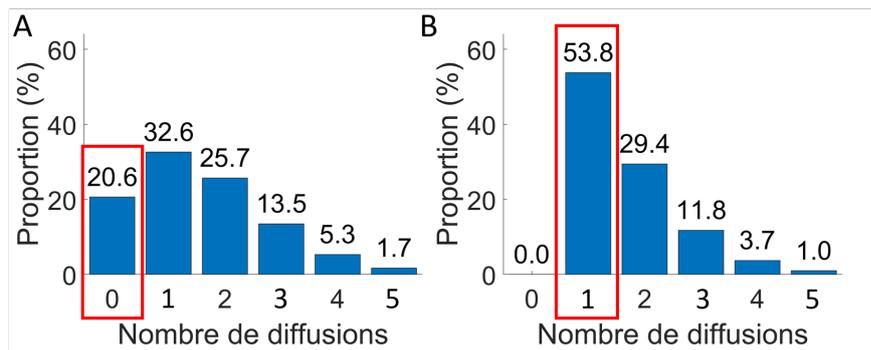


FIGURE I.3.5 – A : Proportion de photons non diffusés et diffusés jusqu'à 5 fois en traversant une épaisseur de 120  $\mu\text{m}$ . B : parmi les photons diffusés, proportion de photons diffusés une à 5 fois en traversant un sphéroïde de 120  $\mu\text{m}$  de diamètre.

L'analyse de la lumière diffusée que l'on présentera en section II.3.3 fera l'hypothèse que les photons diffusés ne le sont qu'une seule fois. La diffusion de lumière dynamique a aussi été étudiée dans le cas limite inverse : un grand nombre de diffusions (*Diffusing Wave Spectroscopy*) [93, 94, 95]. On se limitera de plus à la diffusion élastique de la lumière, c'est-à-dire sans changement de fréquence de l'onde envoyée. Pour une revue récente sur l'utilisation de la diffusion non-élastique Raman en biologie, voir [96] ; pour son application au cancer voir [97, 98]. On ne s'intéressera pas non plus à la polarisation de la lumière. Pour les lecteurs intéressés par ce sujet, voir [99, 100] et une application récente sur la maturation des pommes [101].

### I.3.3 DLS APPLIQUÉE À DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES : ÉTAT DE L'ART

La *Dynamic Light Scattering* (DLS), présentée plus loin en section I.4.3, est une technique bien établie en matière molle [99, 102, 103]. Pourtant son utilisation sur des échantillons biologiques reste marginale. On peut citer la méthode appliquée au noyau pour suivre les fluctuations au cours du cycle cellulaire [104], à l'ensemble du contenu cellulaire pour mesurer son "activité" [105] ou pour faire une cartographie 3D d'un sphéroïde en terme de dynamique interne des cellules [106, 107]. Dans le régime de diffusion multiple, elle a été utilisée comme imagerie fonctionnelle pour mesurer l'activité cérébrale [94, 108, 109]. Mais ces publications restent anecdotiques, et la DLS est utilisée pour mesurer la dynamique d'objets intracellulaires et non la dynamique des cellules elles-mêmes, comme nous allons le voir. La DLS à l'échelle de la population de cellules est donc un champ pas ou peu exploré. On peut comprendre ce manque par le fait que pour des expériences en 2D, la DLS complexifie l'interprétation par rapport à de la microscopie, même si elle peut avoir des avantages par ailleurs. Quant aux expériences 3D, la majorité des développements techniques s'est en fait concentrée sur l'imagerie en profondeur, laissant de côté les techniques ne produisant pas d'images telles que la DLS.

### I.3.4 MÉTHODE USUELLE POUR ÉTUDIER LA MIGRATION : LE *tracking*

La DLS démontre tout son intérêt pour des échantillons que l'on ne peut pas imager. Elle présente aussi un intérêt dans le cas contraire, en tant qu'alternative aux méthodes classiques de *tracking* que nous allons résumer succinctement ici.

Pour étudier la migration cellulaire, la procédure habituelle consiste à étudier leur trajectoire en suivant (*track* en anglais) la position des cellules d'image en image. Suivre des milliers de cellules à la main étant rapidement fastidieux, de nombreux groupes ont présenté des méthodes pour répondre à un besoin d'automatisation [110, 111, 112]. Ces développements sont de plus en plus partagés sous forme de logiciels gratuits utilisables par tous [51].

Le suivi des cellules nécessite en général deux étapes :

- séparer les cellules du fond et entre elles (segmentation),
- associer chaque cellule à elle-même d'une image à la suivante.

La méthode la plus simple pour réaliser la première étape est d'utiliser un filtre avec un seuil d'intensité. Si cette méthode n'est pas appropriée, d'autres méthodes plus sophistiquées existent alors [113]. Si les contours des cellules sont marqués, la segmentation par ligne de partage des eaux permet de les séparer facilement [114]. On peut également utiliser un modèle, ou *template* en anglais, de cellule à partir duquel le logiciel identifie les cellules par similarités, ou même un modèle déformable qui évolue d'image en image [115]. Quoiqu'il en soit, cette première étape de segmentation peut être difficile si le ratio signal sur bruit, ou le contraste, est faible [116]. Dans le cas où les cellules sont compactes, il est aussi difficile d'identifier individuellement leurs contours, imager les noyaux cellulaire par fluorescence permet alors de séparer chaque cellule.

Pour la seconde étape, la solution la plus simple est d'associer chaque cellule d'une image à celle la plus proche dans l'image suivante. La proximité peut être spatiale, mais aussi inclure une proximité en intensité, orientation, volume, forme ou autres. Ce procédé peut commettre des erreurs si les cellules ne sont pas suffisamment séparées dans au moins une direction. Il faut aussi une fréquence d'acquisition suffisante pour ne pas avoir des déplacements plus longs que la distance moyenne entre cellules. Enfin il est préférable de vérifier, au moins en partie, les trajectoires obtenues avant de les analyser à cause des erreurs possibles, telles que des échanges de trajectoires, des sauts non réels, des trajectoires dupliquées ou qui fusionnent [117].

Dans les cas où le *tracking* commet trop d'erreurs, la DLS peut être une alternative intéressante. La preuve de concept du chapitre Partie III montrera un exemple sur une couche cellulaire dense. En utilisant un laser large, il est de plus possible d'observer une large population.

Il existe aussi des méthodes d'analyse d'images de microscopie qui rejoignent la DLS. En effet, par diffusion de la lumière on verra dans la section I.4.1 qu'on obtient le module carré de la transformée de Fourier (TF) de l'échantillon. Cette opération peut aussi se faire numériquement. Ainsi, en travaillant avec la TF d'images obtenus par microscopie, on peut extraire plus facilement qu'avec du *tracking* des grandeurs concernant le mouvement des

cellules observées. Par exemple, on peut mesurer le mouvement collectif d'une population de bactérie (toutes les cellules ont un mouvement identique) [118]. En passant par la TF, on peut aussi avoir une meilleure précision pour détecter les faibles mouvement d'une particule piégée dans un piège optique [119]. Enfin, la *Differential Dynamic Microscopy* est une méthode d'analyse d'images basée sur la TF et qui permet d'obtenir le coefficient de diffusion d'objets pas nécessairement résolus par microscopie [120, 121].

# I4 DIFFUSION DE LA LUMIÈRE

En étudiant la lumière diffusée par les échantillons présentés dans le chapitre I.2, on peut en tirer plusieurs informations sur ceux-ci. Dans ce chapitre, nous allons voir le cas général de la diffusion de lumière. Comment la lumière se propage-t-elle après avoir interagi avec un échantillon ? Comment peut-on en tirer des renseignements sur la structure et les mouvements dans l'échantillon ?

## Onde plane monochromatique

Commençons par une rapide description de la lumière, en introduisant les notations utilisées par la suite. On considère une onde plane polarisée linéairement, monochromatique, de longueur d'onde  $\lambda$ , se propageant dans le vide dans la direction notée  $\mathbf{x}$ . L'amplitude du champ électrique est donnée par :

$$E(x, t) = E_0 \cos(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - \omega t + \phi) \quad (1)$$

où  $E_0$  est l'amplitude des oscillations,  $\mathbf{k}$  est le vecteur d'onde dont la norme est  $2\pi/\lambda$  et la direction celle de la propagation de l'onde.  $\omega t$  correspond à la propagation de l'onde, avec  $t$  le temps et  $\omega = 2\pi c/\lambda$ ,  $c$  étant la vitesse de propagation de la lumière dans le vide.  $\phi$  est la phase à l'origine. On utilisera plus souvent la notation complexe :

$$\underline{E}(x, t) = E_0 e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - \omega t + \phi)} \quad (2)$$

à partir de laquelle on pourra obtenir  $E$  en prenant la partie réelle.

## Source cohérente

La diffusion de la lumière que nous allons voir est possible uniquement si la source de lumière est cohérente. L'exemple le plus classique est le laser, c'est d'ailleurs ce type de source que nous allons utiliser. Pour rappeler ce qu'est une source cohérente, examinons comment la lumière est émise par une source lumineuse. Lorsqu'une source émet une onde lumineuse de longueur d'onde centrale  $\lambda$ , cette émission dure un certain temps  $T_c$ . Ce plus petit élément d'émission est appelé « train d'onde », car il a un début et une fin. Au sein de ce train d'onde, la phase du champ électromagnétique suit l'expression.

$$\Phi(x, t) = \mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - \omega t + \phi \quad (3)$$

où  $t$  appartient à  $[x/c, T_c+x/c]$ . C'est parce qu'on peut exprimer ainsi la phase du train d'onde qu'on peut dire qu'il est cohérent. En revanche, si la source émet un second train d'onde, la phase de ce dernier n'est plus cohérente avec le premier train d'onde car il se produit un saut de phase stochastique.  $T_c$  caractérise la cohérence temporelle de la source. Pour une source non ponctuelle (étendue), on peut aussi définir la cohérence spatiale qui caractérise la cohérence de phase entre deux points de la source.

La cohérence est nécessaire pour observer des interférences, comme dans le cas qui nous intéresse de la diffusion de lumière. Pour que deux ondes interfèrent, il faut que la différence de chemin optique  $\delta n$  soit inférieure à la longueur de cohérence  $L_c = cT_c$ . Dans le cas d'un laser à onde continue,  $L_c$  peut aller de quelques dizaines de cm, ce qui est suffisant dans notre cas, à plusieurs dizaines de km [122].

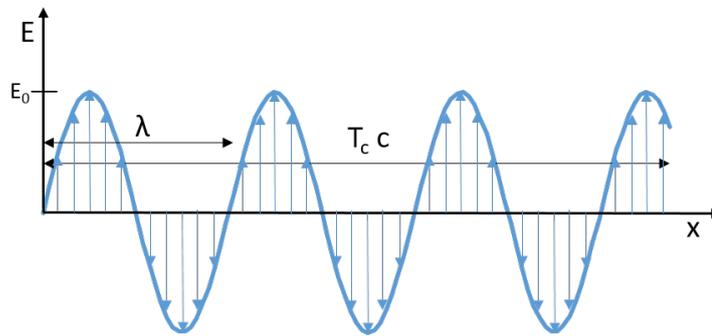


FIGURE I.4.1 – Représentation schématique d'un train d'onde plane polarisée linéairement à un instant donné.  $T_c$  est le temps de cohérence de l'onde.

## I.4.1 DIFFUSION STATIQUE

Pour commencer, imaginons une expérience simple. Avec un laser, on éclaire uniformément une cellule sphérique (en suspension) de rayon  $a$ . On place un écran (ou une caméra) éloignée de l'autre côté de la cellule, qu'observe-t-on ?

On ne prendra en compte que la lumière qui traverse la cellule. On voit sur la figure I.4.2 des lobes situés de part et d'autre du faisceau principal, ce qui témoigne des interférences lors de la propagation de la lumière.

Essayons maintenant de retrouver par le calcul cette figure d'interférence. On se place dans le cas où la distance entre l'écran et l'échantillon est très grande devant la taille de l'échantillon. En pratique, on peut placer la caméra dans le plan focal image d'une lentille. Optiquement, tout se passe alors comme si l'écran était situé à une distance infinie de l'échantillon, dans la limite des conditions de Gauss pour lesquelles les aberrations sphériques sont négligeables [123]. Déterminons le champ électrique émis dans une direction  $\mathbf{k}_{\text{out}}$  faisant un angle  $\theta$  avec la direction de l'onde incidente  $\mathbf{k}_{\text{in}}$  comme indiqué dans la figure I.4.3 ([124], chapitre 1).

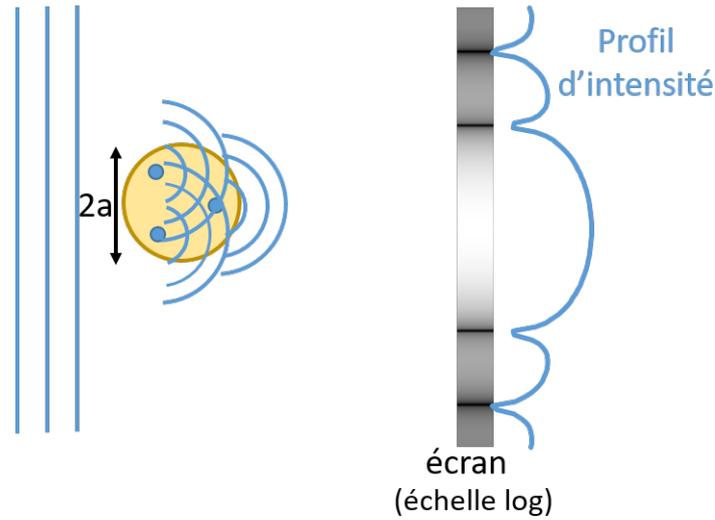


FIGURE I.4.2 – Schéma de la diffraction par une cellule sphérique : une onde plane à gauche arrive sur la cellule au centre qui diffracte la lumière vers un écran à droite. Sur l'écran est représentée l'intensité diffractée, en échelle logarithmique, ainsi que son profil.

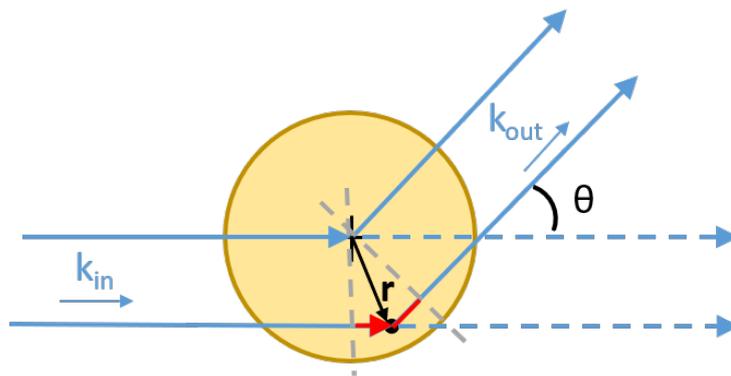


FIGURE I.4.3 – Schéma géométrique de la diffraction par une cellule sphérique. Une onde plane de vecteur d'onde  $\mathbf{k}_{in}$  arrive sur la cellule et est diffusée en son centre et au point  $\mathbf{r}$ . On observe la lumière diffusée dans une direction  $\mathbf{k}_{out}$  faisant un angle  $\theta$  avec  $\mathbf{k}_{in}$ . La différence de distance parcourue par les deux ondes diffusées est indiquée en rouge.

Pour comprendre la propagation de la lumière, on peut utiliser le principe de Huygens : chaque point de l'espace illuminé par la source se comporte à son tour comme une source ponctuelle émettant une onde sphérique. Le champ électrique diffusé dans une direction résulte de l'addition de toutes les ondes sphériques réémises au niveau de la cellule. On appelle  $\phi_0$  la phase de l'onde émise par le centre de la cellule et  $d\phi$  le déphasage par rapport à  $\phi_0$  d'une onde réémise en  $\mathbf{r}$ , on a :

$$E(\mathbf{k}_{out}, t) \propto \iiint_{cellule} E_0 e^{i(\phi_0(t) + d\phi(\mathbf{r}, \mathbf{k}_{out}))} d\mathbf{r} = E_0 e^{i\phi_0} \iiint e^{id\phi(\mathbf{r}, \mathbf{k}_{out})} d\mathbf{r} \quad (4)$$

Le détecteur n'est sensible qu'à l'intensité  $I$  :

$$I(\mathbf{k}_{out}, t) = |E(\mathbf{k}_{out}, t)|^2 \propto |E_0 e^{i\phi_0}|^2 \left| \iiint e^{id\phi(\mathbf{r}, \mathbf{k}_{out})} d\mathbf{r} \right|^2 = E_0^2 \left| \iiint e^{id\phi(\mathbf{r}, \mathbf{k}_{out})} d\mathbf{r} \right|^2 \quad (5)$$

Il nous faut ensuite déterminer l'expression de  $d\phi(\mathbf{r}, \mathbf{k}_{\text{out}})$ . On peut montrer à l'aide de la figure I.4.3 que :

$$d\phi = \mathbf{k}_{\text{in}} \cdot \mathbf{r} - \mathbf{k}_{\text{out}} \cdot \mathbf{r} \equiv -\mathbf{q} \cdot \mathbf{r} \quad (6)$$

où  $\mathbf{q}$  est le vecteur de diffusion, tel que :

$$\mathbf{q} = \mathbf{k}_{\text{out}} - \mathbf{k}_{\text{in}} \quad |q| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (7)$$

En remplaçant (6) dans (5), on obtient :

$$I(\mathbf{q}) \propto \left| \iiint e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right|^2 \quad (8)$$

En conclusion, l'intensité visible sur l'écran correspond au module carré de la transformée de Fourier de l'échantillon. La diffusion de la lumière sonde la structure dans l'espace de Fourier, ou espace réciproque. On verra plus en détails les propriétés intéressantes de la transformée de Fourier dans la section suivante. On remarquera cependant qu'on ne peut pas aisément "reconstruire" l'objet directement à partir de la lumière diffusée. Pour cela, il faudrait mesurer la diffusion dans toutes les directions, pour toutes les orientations de l'objet par rapport au laser, mais surtout pouvoir mesurer la phase du champ  $E$ . Or on ne peut mesurer que l'intensité du champ qui donne accès à son amplitude mais pas à sa phase.

Pour en revenir à notre cas particulier d'une cellule sphérique, on a :

$$I(\mathbf{q}) \propto |TF_{3D}\{Sphère_a\}|^2 \propto \left( \frac{\sin(|\mathbf{q}|a) - |\mathbf{q}|a \cos(|\mathbf{q}|a)}{(|\mathbf{q}|a)^3} \right)^2 \quad (9)$$

La position des maxima de l'intensité nous renseigne sur sa taille : soit en *fittant* l'intensité obtenue avec l'équation (9), soit en utilisant une table : le premier maximum correspond à  $q = 5.76/a$ . La figure I.4.4 montre l'exemple théorique obtenu pour une cellule de  $10\mu\text{m}$  de rayon.

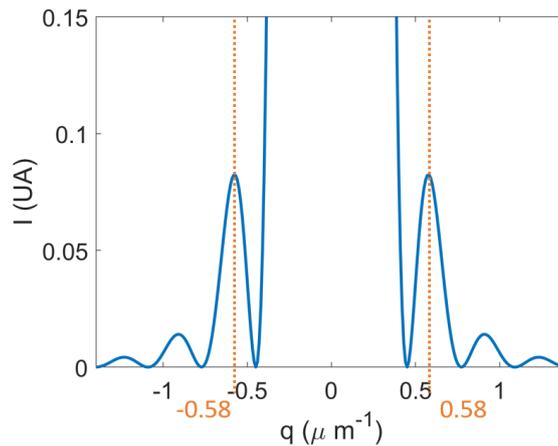


FIGURE I.4.4 – Intensité diffusée par une sphère de  $10\mu\text{m}$  de rayon, correspondant à l'équation 9. Le premier maximum est visible à  $q = 5.76/20 = 0.58\mu\text{m}^{-1}$ .

## I.4.2 TRANSFORMÉE DE FOURIER

## Définition

La transformée de Fourier d'une fonction  $f$  de  $\mathbb{R}^n$  est définie comme suivant :

$$TF\{f\}(\mathbf{q}) = \hat{f}(\mathbf{q}) = \int_{\mathbb{R}^n} f(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{r} \quad (10)$$

Inversement, on peut calculer la fonction  $f$  à partir de  $\hat{f}$  en réalisant la transformée de Fourier inverse :

$$TF^{-1}\{\hat{f}\}(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) = \frac{1}{(2\pi)^n} \int_{\mathbb{R}^n} \hat{f}(\mathbf{r}) e^{+i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{q} \quad (11)$$

La transformée de Fourier donne une image du contenu en fréquences d'un signal. Pour s'en convaincre, il suffit de prendre le cas simple d'un cosinus ou un sinus :

$$\begin{aligned} TF\{\cos(2\pi x/L)\} &= \int_{-\infty}^{+\infty} \left( \frac{e^{i2\pi x/L} + e^{-i2\pi x/L}}{2} \right) e^{-iqx} dx \\ &= \frac{1}{2} \left( \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(2\pi/L-q)x} dx + \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-i(2\pi/L+q)x} dx \right) \\ &= \frac{1}{2} (\delta(2\pi/L - q) + \delta(2\pi/L + q)) \end{aligned}$$

où  $\delta$  désigne la fonction de Dirac. On obtient deux pics symétriques pour les valeurs  $q = \pm \frac{2\pi}{L}$  (voir figure I.4.5 A). Si bien qu'on peut relier un signal fort en un  $q$  donné avec une périodicité spatiale présente dans l'échantillon.

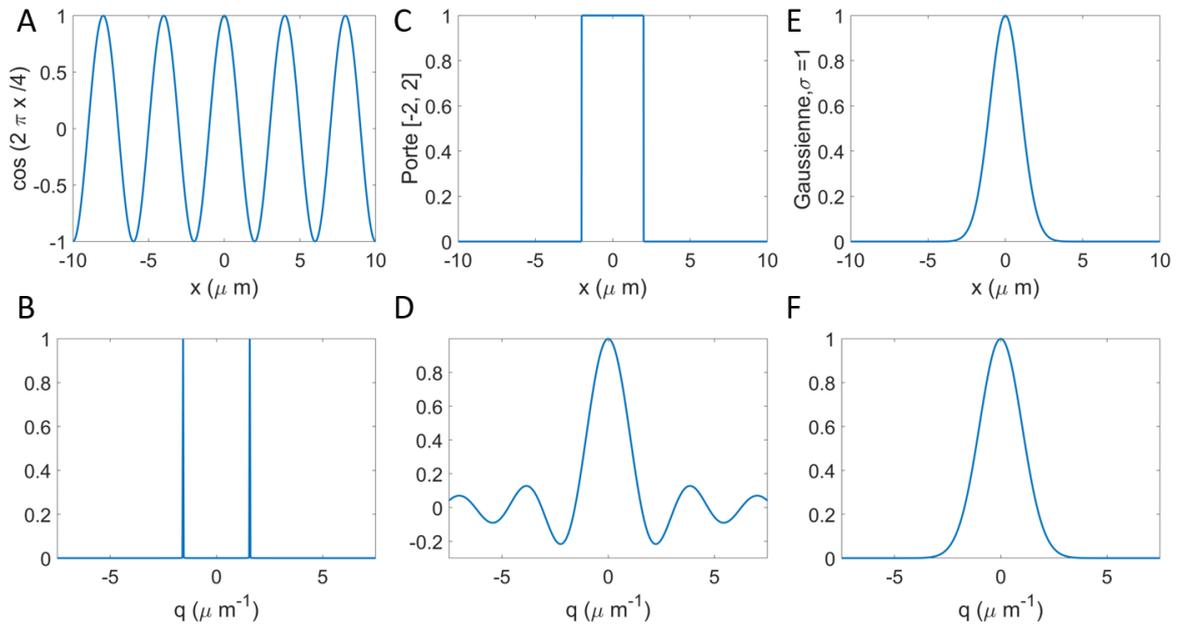


FIGURE I.4.5 – Exemples de transformées de Fourier 1D : cosinus (A) et sa TF (B), fonction porte (C) et sa TF (D), gaussienne (E) et sa TF (F).

## Propriétés

### Linéarité

La TF est une opération linéaire, c'est-à-dire pour  $f$  et  $g$  deux fonctions et  $\alpha$  et  $\beta$  deux réels :

$$TF\{\alpha f + \beta g\} = \alpha \hat{f} + \beta \hat{g} \quad (12)$$

### Parité

La transformée de Fourier d'une fonction isotrope est elle-même une fonction isotrope.

$$f \text{ isotrope} \Rightarrow \hat{f} \text{ isotrope} \quad (13)$$

Attention, dans le cas de la diffusion de lumière, l'isotropie de l'intensité sera dans le repère des  $\mathbf{q}$  et non dans le repère centré sur l'échantillon.

De plus, la transformée de Fourier d'une fonction réelle possède une symétrie hermitienne :

$$f \text{ réelle} \Rightarrow \hat{f}(-\mathbf{q}) = \overline{\hat{f}(\mathbf{q})} \quad (14)$$

Les propriétés (13) et (14) impliquent que la transformée de Fourier d'une fonction isotrope réelle est elle aussi isotrope et réelle.

$$f \text{ réelle, isotrope} \Rightarrow \hat{f} \text{ réelle, isotrope} \quad (15)$$

### Convolution et autocorrélation

On définit le produit de convolution de deux fonctions comme étant :

$$F \circledast S(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(t)S(x-t)dt = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x-t)S(t)dt \quad (16)$$

Une propriété très utilisée en diffusion de lumière est la suivante : la transformée de Fourier du produit de convolution de deux fonctions est le produit des transformées de Fourier de ces fonctions.

$$TF\{F \circledast S\} = \hat{F}\hat{S} \quad (17)$$

$$TF^{-1}\{\hat{F} \circledast \hat{S}\} = (2\pi)^2 FS \quad (18)$$

Si par exemple on observe un épithélium constitué de cellules identiques de forme  $F$  réparties selon une structure  $S$ , on peut aisément obtenir  $S$  à partir de la diffusion si on connaît  $F$  et vice versa.  $F$  et  $S$  sont communément appelé facteur de forme et facteur de structure. Cette utilisation vient principalement de la cristallographie où les atomes sont très régulièrement disposés. Pour un tissu biologique, la structure est beaucoup moins ordonnée si bien que le facteur de structure n'est visible que pour une distance limitée (voir figure I.4.6 et chapitre III.1).

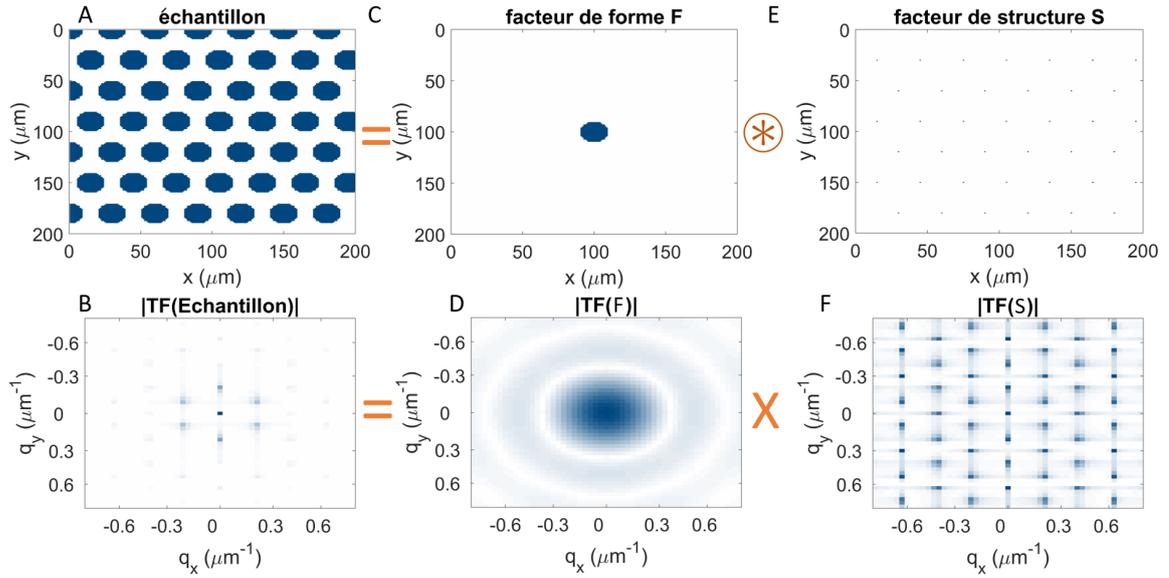


FIGURE I.4.6 – *Facteur de forme et de structure sur un exemple : échantillon (A) et sa TF (B), facteur de forme (C) et sa TF (D), facteur de structure (E) et sa TF (F).*

Pour une fonction isotrope et réelle, auto-convolution et autocorrélation sont identiques, avec comme définition de l'autocorrélation d'une fonction  $f$  :

$$R_f(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)f(t+\tau)dt \quad (19)$$

On a  $R_f = f \otimes f$ , ce qui donne dans l'espace de Fourier, en utilisant (15) :

$$\widehat{R}_f = \widehat{f}\widehat{f} = |\widehat{f}|^2 \quad (20)$$

Ainsi, en effectuant une TF inverse sur l'intensité diffractée, on obtient la fonction d'autocorrélation de l'échantillon.

### Fonctions isotropes

Un cas qui nous sera particulièrement utile sera celui d'une fonction isotrope. La transformée d'une fonction isotrope étant elle-même isotrope, on notera la norme d'un vecteur  $|\mathbf{q}| = q$ . Dans le cas 2D, on aura :

$$\widehat{f}(q) = \int_0^{\infty} \int_0^{2\pi} f(r)e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}r d\psi dr \quad (21)$$

où  $r$  désigne la distance au centre du système de coordonnées polaires, et  $\psi$  l'angle. On peut choisir l'origine de l'angle  $\psi$  suivant la direction de  $\mathbf{q}$ , de telle sorte que  $\mathbf{q}\cdot\mathbf{r} = qr \cos(\psi)$ .

$$\widehat{f}(q) = \int_0^{\infty} f(r) \int_0^{2\pi} e^{-i|q|r \cos(\psi)} r d\psi dr = 2\pi \int_0^{\infty} f(r) J_0(qr) r dr \quad (22)$$

où  $J_0$  est la fonction de Bessel d'ordre 0. Cette transformation de la fonction radiale  $f(r)$  est aussi appelée transformée de Hankel d'ordre 0. La transformation inverse sera alors :

$$f(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{\infty} \widehat{f}(q) J_0(qr) q dq \quad (23)$$

Dans le cas 3D, on aura :

$$\hat{f}(q) = \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \int_0^\pi f(r) e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} r^2 \sin(\chi) d\chi d\psi dr \quad (24)$$

où  $\psi$  et  $\chi$  sont les angles longitudinal et zénithal du système de coordonnées sphériques, que l'on peut orienter sur  $\mathbf{q}$  pour avoir  $\mathbf{q}\cdot\mathbf{r} = qr \cos(\chi)$

$$\begin{aligned} \hat{f}(q) &= \int_0^\infty f(r) r^2 \int_0^\pi e^{-iqr \cos(\chi)} \sin(\chi) d\chi dr \int_0^{2\pi} d\psi \\ &= 2\pi \int_0^\infty f(r) r^2 2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr \\ &= 4\pi \int_0^\infty f(r) \frac{r}{q} \sin(qr) dr \end{aligned} \quad (25)$$

On montre que la transformation inverse sera alors :

$$f(r) = \frac{1}{4\pi} \int_0^\infty \hat{f}(q) \frac{q}{r} \sin(qr) dq \quad (26)$$

La transformée de Fourier de fonctions isotropes utilisées dans la suite sont indiquées dans l'annexe I.

#### Observation 2D d'une TF 3D

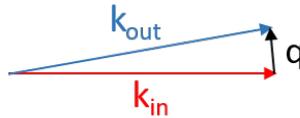


FIGURE I.4.7 – Schéma de  $\mathbf{q}$  pour un petit angle.

Le champ  $E$  diffusé à l'infini par un échantillon correspond à sa TF 3D. Mais aux petits angles, on ne mesure que des valeurs de  $\mathbf{q}$  quasiment orthogonales à  $\mathbf{k}_{in}$  (voir figure I.4.7). On ne peut mesurer cette TF que dans un plan. Si  $E(\mathbf{q})$  est isotrope, c'est-à-dire ne dépendant que de la norme de  $\mathbf{q}$ , toute l'information est bien contenue dans ce plan des  $\mathbf{q}$  perpendiculaires à  $\mathbf{k}_{in}$ . Dans le cas contraire, on peut se représenter la fonction  $E(\mathbf{q}_\perp)$  comme étant au choix :

- la TF de la projection 2D de l'échantillon dans le plan perpendiculaire à  $\mathbf{k}_{in}$ ,
- la somme des TF 2D de chacun des plans de l'échantillon.

Ces deux équivalences proviennent de la linéarité de la TF :

$$\begin{aligned} \hat{E}(\mathbf{q}_\perp) &= \int_{\mathbf{r}_\parallel} \int_{\mathbf{r}_\perp} E(\mathbf{r}_\parallel, \mathbf{r}_\perp) e^{-i\mathbf{q}_\perp \cdot \mathbf{r}_\perp} d\mathbf{r}_\perp d\mathbf{r}_\parallel \quad \text{ou} \quad = \int_{\mathbf{r}_\perp} \int_{\mathbf{r}_\parallel} E(\mathbf{r}_\parallel, \mathbf{r}_\perp) e^{-i\mathbf{q}_\perp \cdot \mathbf{r}_\perp} d\mathbf{r}_\parallel d\mathbf{r}_\perp \\ &= \int_{\mathbf{r}_\parallel} TF_{2D}\{E_{\mathbf{r}_\perp}(\mathbf{r}_\parallel)\} d\mathbf{r}_\parallel \quad = TF_{2D}\left\{\int_{\mathbf{r}_\parallel} E_{\mathbf{r}_\perp}(\mathbf{r}_\parallel) d\mathbf{r}_\parallel\right\} \end{aligned} \quad (27)$$

### Transformée de Fourier discrète

La mesure de l'intensité étant faite sur une caméra, on n'en a qu'une mesure discrète : un point par pixel de taille  $dq$  (espace réciproque). Cette fréquence d'échantillonnage  $F_e =$

$2\pi/dq$  du signal est à prendre en compte pour la transformée de Fourier. On est aussi limité par la taille de la caméra, qui fixe une limite  $q_{max}$  à l'angle de diffusion mesuré.

Si on centre la caméra sur  $q = 0$ , ces deux limites sont reliées par le nombre de pixels  $N$  :  $q_{max} = Ndq/2$ . Cette réduction de l'information implique des limites dans l'utilisation de la TF. La discrétisation du signal produit un repliement de spectre à la distance  $F_e$  (figure I.4.8) d'après le théorème d'échantillonnage, ou théorème de Nyquist-Shannon. Ainsi, on ne calculera pas la TF inverse pour des distances supérieures à :

$$x_{max} = F_e/2 = \pi/dq \quad (28)$$

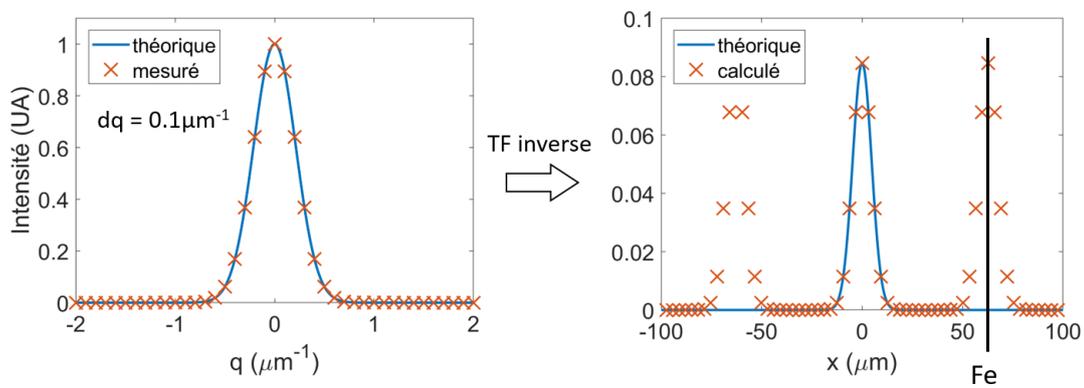


FIGURE I.4.8 – Schéma de la transformée de Fourier discrète d'une gaussienne et du repliement qui en découle.

L'étroitesse de la plage sur laquelle on mesure l'intensité limite la résolution obtenue dans l'espace direct. Plus exactement, comme on multiplie l'intensité  $I$  par une fenêtre  $[-q_{max}, +q_{max}]$ , après TF inverse, cela revient à convoluer le vrai signal  $S$  par la TF de la fenêtre d'après (17) (voir figure I.4.9). De manière générale, pour que le fenêtrage n'impacte pas trop le résultat, on se limitera à une résolution de :

$$dx = \pi/q_{max} \quad (29)$$

le nombre de points étant alors de  $x_{max}/dx = N$ . Pour la figure I.4.8, la résolution a été limitée à cette valeur. La figure I.4.9 C montre en revanche un exemple 1D dans lequel on voit l'effet du fenêtrage si on ne limite pas la résolution en  $x$ . On voit notamment les oscillations induites dans le signal car il est convolué avec la TF d'un créneau, qui est un sinus cardinal. Pour limiter cet effet, on peut choisir de multiplier l'intensité par une fenêtre qui ne soit pas une fonction créneau. La figure I.4.9 montre l'exemple d'une fenêtre de Hann  $H(q)$  : la résolution est légèrement dégradée, mais les artefacts liés aux oscillations sont supprimés.

$$H(q) = \frac{1}{2} \left( 1 - \cos\left(\pi \frac{q}{q_{max}}\right) \right) \quad (30)$$

Dans le cas 2D d'une fenêtre en disque de rayon  $q_{max}$ , le signal est convolué par  $J_1(xq_{max})/x$ , où  $J_1$  est une fonction de Bessel. Pour le cas 3D d'une fenêtre en sphère de rayon  $q_{max}$  (utilisée si on suppose  $I(\mathbf{q})$  ne dépendant que de  $|q|$ ), le signal est convolué par  $[\sin(xq_{max}) - xq_{max}\cos(xq_{max})]/x^3$ .

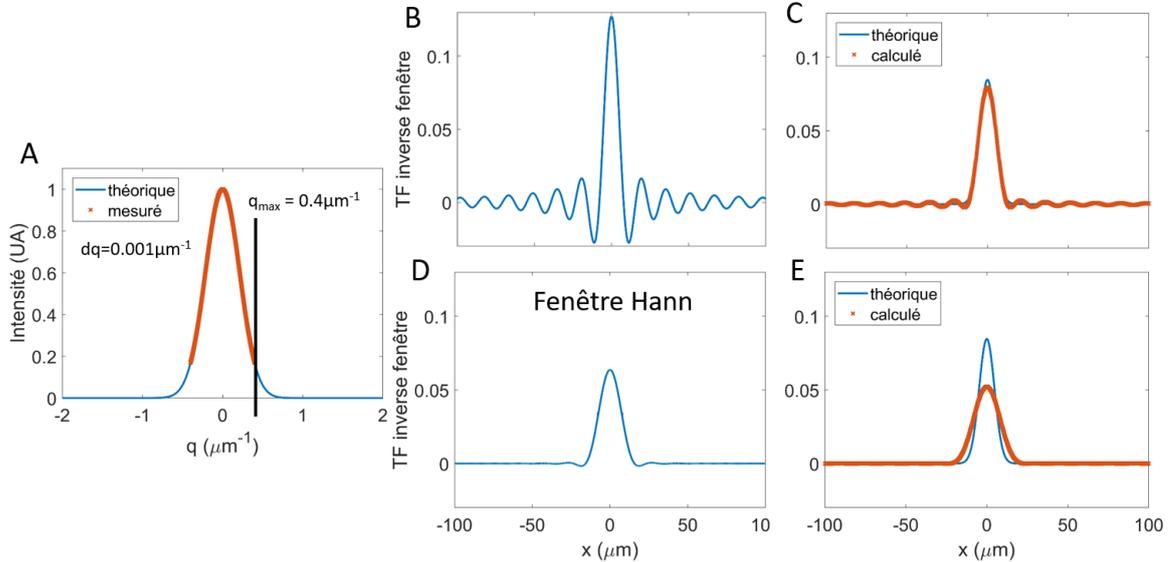


FIGURE I.4.9 – Effet du fenêtrage. A : Intensité théorique (bleu) et celle mesurée sur la caméra (orange), limitée à un angle maximum de  $q_{max}$ . B : TF inverse de la fonction porte  $[-q_{max}, +q_{max}]$ . C : TF de l'intensité théorique (bleu) et mesurée (orange), affectée par le fenêtrage  $[-q_{max}, +q_{max}]$ . D : TF inverse de fenêtrage de Hann  $H(q)$ . E : TF de l'intensité théorique (bleu) et celle de l'intensité mesurée multipliée par la fenêtrage de Hann (orange).

### I.4.3 DIFFUSION DYNAMIQUE

La diffusion dynamique de lumière, dénommée Dynamic Light Scattering (DLS) ou Photon Correlation Spectroscopy (PCS) en anglais, trouve ses origines dans les expériences de diffusion de la lumière dès la fin du XIXe siècle. On peut notamment citer l'article d'Einstein de 1910 [125] exposant une théorie qui explique les fluctuations de la lumière diffusée par l'eau. Par la suite, la DLS a principalement été appliquée dans le domaine des colloïdes car elle permet de déterminer la taille et la dispersion des particules ou molécules ( $1\text{nm}$ - $10\mu\text{m}$ ) en suspension [126, 127]. Suite à l'invention et la démocratisation des lasers à partir des années 60, la DLS est devenue une technique courante et il existe maintenant de nombreux appareils commerciaux basés dessus. Pourtant, cette technique n'a encore été que très peu utilisée pour étudier les tissus biologiques. On verra dans la section II.3.3, qu'on peut en faire une utilisation plus riche que l'analyse classique utilisée pour les colloïdes. Dans cette section, c'est cette utilisation courante que nous allons décrire succinctement. Pour plus de détails, les lecteurs pourront se référer au livre [99].

La DLS repose sur l'analyse des fluctuations de l'intensité diffusée par un échantillon en mouvement. Dans le cas de particules en suspension, celles-ci ont un mouvement brownien

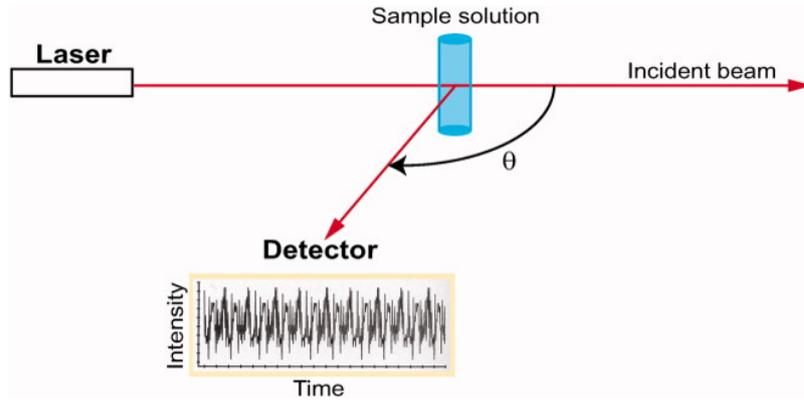


FIGURE I.4.10 – Un exemple de montage de DLS, comme présenté dans [128]

de diffusion dû à l'agitation thermique. La loi de Stokes-Einstein permet de relier le coefficient de diffusion  $D$  des particules avec leur rayon hydrodynamique  $r$ , la température  $T$ , la viscosité dynamique du fluide  $\eta$  et la constante de Boltzmann  $k_B$  :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (31)$$

Ainsi, si on mesure  $D$ , on peut en déduire  $r$  en mesurant les autres paramètres. Pour mesurer  $D$ , on mesure les fluctuations de l'intensité  $I$  de la lumière diffusée par les particules. Le montage classique consiste à utiliser un laser et à capter la lumière émise à un angle  $\theta \neq 0$  pour éviter le faisceau direct (figure I.4.10). On calcule ensuite la fonction d'autocorrélation de l'intensité normalisée  $g_2$  :

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle_t}{\langle I(q, t) \rangle_t^2} \quad (32)$$

où  $q$  est le vecteur de diffusion et  $\langle \rangle_t$  indique un moyennage sur le temps. Si toutes les particules ont la même taille, on obtient alors [129] :

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta e^{-2q^2 D \tau} \quad (33)$$

Où  $\beta$  est le facteur de cohérence, ne dépendant que des conditions géométriques d'illumination et de détection. Ainsi en ajustant  $g_2$ , on obtient aisément le coefficient de diffusion, puis la taille des diffuseurs. La figure I.4.11 montre un exemple obtenu par simulations. Si la solution comporte des particules de différentes tailles avec une distribution  $f(r)$ , on a :

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta \int_0^{+\infty} f(r) e^{-2q^2 D(r) \tau} dr \quad (34)$$

On ne peut pas directement en extraire  $f(r)$ , mais il existe plusieurs méthodes pour caractériser la distribution, comme l'analyse des cumulants par exemple [130].

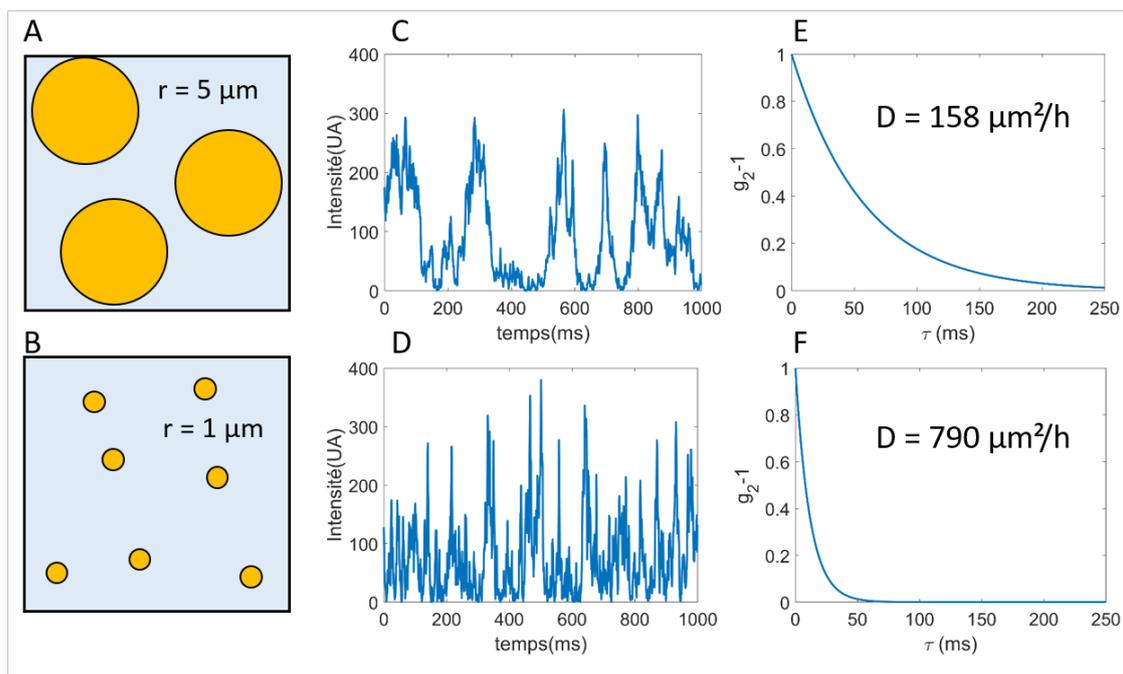


FIGURE I.4.11 – Schéma et simulation pour des billes de  $5\mu\text{m}$  (A-C-E) et  $1\mu\text{m}$  de rayon (B-D-F). L'intensité (C et D) est mesurée à  $\theta = 90^\circ$  ( $\lambda = 633\text{nm}$ ). Puis sa fonction d'autocorrélation  $g_2 - 1$  est calculée (E et F).

# II

## Méthodes

# III ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

Ce chapitre présente la lignée cellulaire étudiée et la préparation des échantillons : la culture cellulaire, la fabrication des sphéroïdes et l'utilisation du Dextran pour appliquer une pression. Les protocoles de préparation des échantillons sont résumés sous forme de liste en annexe J.

## II.1.1 MODÈLE CELLULAIRE : CT26

Afin d'étudier le problème du cancer colorectal, nous avons choisi une lignée cellulaire utilisée, entre autres, dans le test de traitements contre ce cancer : la lignée cellulaire CT26. Il s'agit d'une lignée issue d'un cancer du côlon chez la souris. Les cellules peuvent former des tumeurs avec métastases si elles sont implantées dans une souris immunodéficiente. La division cellulaire est en particulier rapide avec un cycle cellulaire d'environ 15h, ce qui permet une culture et une production d'échantillons rapide.

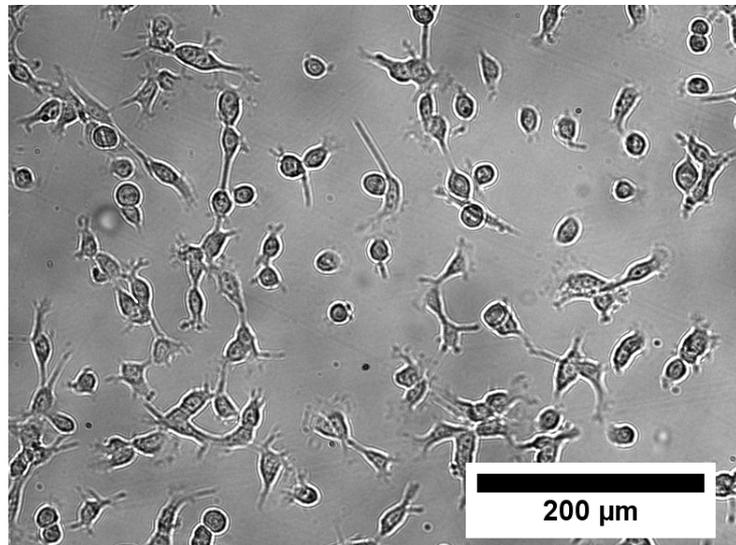


FIGURE II.1.1 – CT26 sur boîte de pétri observées au microscope 10x

Sur boîte de pétri (figure II.1.1), les cellules sont adhérentes et possèdent des formes typiques de fibroblastes. Elles se déplacent à des vitesses de l'ordre de  $30 \mu\text{m}/\text{h}$  (voir section III.1.3), sans s'agréger.

## II.1.2 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> stériles (VWR) contenant entre 6 et 10 mL de milieu de culture. Le milieu est constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco Life Technologies) avec du phénol rouge auquel est ajouté 10% en volume de sérum fœtal bovin et 1% en volume d'un mélange de pénicilline (antibiotique) et de streptomycine (antifongique). Les flasques sont placés dans un incubateur maintenu à une température de 37 °C et sous air à 5 % de CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> permet de maintenir un pH adapté.

Les cellules sont diluées et placées dans un nouveau milieu (passage des cellules) tous les 2 jours afin qu'elles ne couvrent jamais toute la surface du fond de la flasque. Si cela arrivait, la division cellulaire diminuerait fortement et le comportement cellulaire en serait modifié. Le protocole de passage des cellules est représenté en figure II.1.2. En résumé, il s'agit de détacher les cellules du fond de la flasque tout en changeant le milieu de culture, puis de remettre en culture une fraction de la population initiale dans une nouvelle flasque. Pour détacher les cellules, on utilise de la trypsine (1 mL), une enzyme efficace à 37 °C qui clive les protéines membranaires d'adhésion. Le milieu de culture comportant un inhibiteur de la trypsine, il faut le retirer et rincer la flasque avec du PBS (Phosphate Buffered Saline - Gibco Life Technologies) avant d'ajouter l'enzyme. Une fois les cellules détachées, on ajoute du milieu de culture (4 mL) qui stoppe l'action de l'enzyme et il n'est donc pas nécessaire d'extraire la trypsine de la solution. La suspension de cellules ainsi obtenue sera appelée solution intermédiaire dans la suite. C'est à partir de celle-ci qu'on produira les échantillons observés. Pour obtenir la nouvelle culture, on prélève une fraction du volume de cette solution que l'on injecte dans une nouvelle flasque contenant 6 mL de milieu. La fraction prélevée est calculée pour obtenir entre 200 000 et 250 000 cellules au final. En pratique, on remet en culture un dixième des cellules tous les 2 jours.

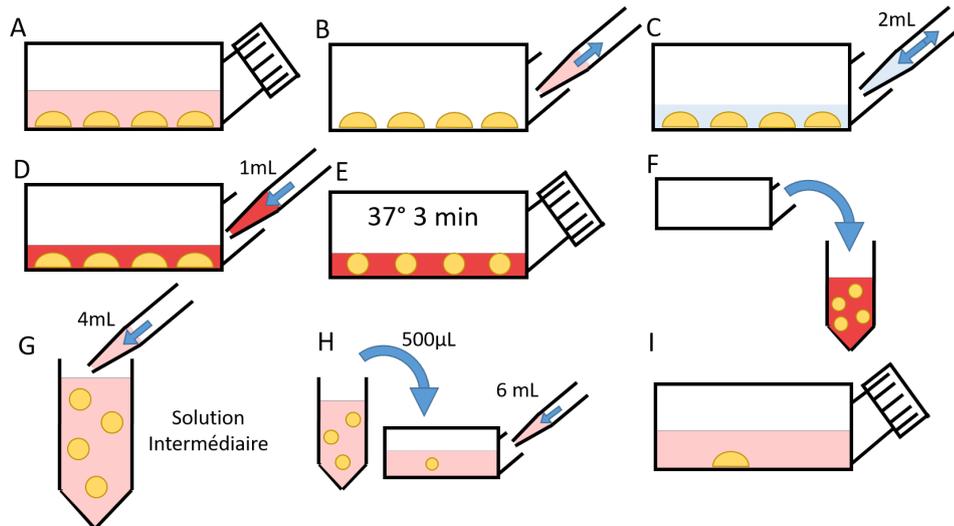


FIGURE II.1.2 – Schéma du protocole pour passer les cellules. A : flasque initiale. B : retirer le milieu. C : rincer avec 2mL de PBS. D : mettre 1mL de trypsine. E : incuber 3 min. F : transférer la suspension dans un tube. G : ajouter 4mL de milieu pour obtenir la solution intermédiaire. H : mettre 500  $\mu$ L dans une nouvelle flasque et ajouter 6 mL de milieu. I : flasque finale.

Pour les expériences réalisées avec des cellules migrant sur le fond d’une boîte de pétri, on utilise la solution intermédiaire que l’on dilue pour obtenir entre 75 000 et 500 000 cellules par mL selon les cas. 2 mL de la suspension obtenue sont ensuite versés dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre (VWR), incubée une nuit avant observation.

### II.1.3 FABRICATION DES SPHÉROÏDES

Il existe différentes méthodes pour fabriquer des agrégats multicellulaires : par agitation [131], dans des gouttes suspendues [132], par encapsulation [26] ou dans des puits sur coussin d’agarose [56]. C’est cette dernière que nous avons utilisée. La méthode consiste à faire polymériser un gel d’agarose au fond des puits d’une plaque de 96 puits puis d’y déposer des cellules. Pour obtenir le gel, une solution d’agarose (1% en masse d’agar-agar dans du PBS) est chauffée jusqu’à dissolution de la poudre d’agar-agar puis versée dans chacun des puits à raison de 100  $\mu$ L par puits. Le mélange chaud est liquide et forme un ménisque au fond du puits par capillarité, puis le gel se fige en refroidissant. Les cellules qu’on y dépose proviennent de la solution intermédiaire obtenue lors d’un passage de la culture cellulaire. La concentration volumique en cellules de la solution est mesurée grâce à une cellule de Malassez. Puis on en dilue une fraction pour obtenir une suspension de 2000 cellules par mL que l’on verse à raison de 150  $\mu$ L par puits (on a donc 300 cellules par puits).

Les cellules n’adhèrent pas au gel d’agarose, si bien qu’elles glissent et se rassemblent au fond du puits par gravité. Une fois en contact entre elles, l’adhésion cellulaire suffit à pousser les cellules à s’agréger en une sphère (figure II.1.3). L’ensemble du processus prend 3 jours et produit des sphéroïdes d’environ 250  $\mu$ m de diamètre. On peut ensuite laisser

les sphéroïdes grossir jusqu'à 8 jours après ensemencement des puits, sans avoir besoin de changer le milieu.

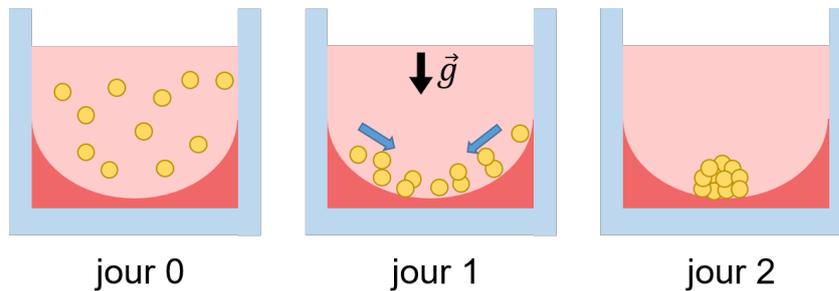


FIGURE II.1.3 – Schéma du principe de formation d'un sphéroïde dans un puits dont le fond est recouvert d'un coussin d'agarose.

Pour observer les sphéroïdes formés, on les place individuellement dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (VWR) contenant 2 mL de milieu de culture. Afin d'augmenter l'adhésion des sphéroïdes sur le fond des boîtes de pétri, ces dernières sont au préalable traitées 10 minutes avec une solution de Poly-L-lysine (PLL) (Sigma-Aldrich) puis rincées afin d'obtenir une couche de PLL adsorbée sur le fond. Sans ce traitement, les sphéroïdes sont détachés du fond au moindre mouvement de la boîte et ne restent pas à une position fixe au cours de l'observation. Avec la PLL il est tout de même préférable d'attendre 30 min après avoir placé l'échantillon, pour débiter l'observation avec un sphéroïde correctement attaché.

## II.1.4 MÉTHODE CHOISIE POUR APPLIQUER UNE PRESSION

On souhaite appliquer une pression isotrope aux agrégats, tout en étant capable de les observer. La méthode que j'ai appliquée est celle développée par Morgan Delarue : utiliser la pression mécano-osmotique exercée par un bio-polymère en solution : le Dextran [21]. Le Dextran utilisé (2 MDa - diamètre supérieur à 29.6 nm) est plus gros que les pores de la matrice extracellulaire (6 à 14 nm) et ne pénètre donc pas dans le sphéroïde. Il applique ainsi une pression à la surface du sphéroïde (figure II.1.4).

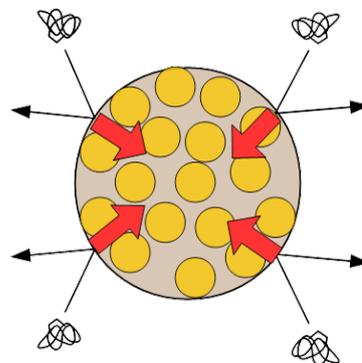


FIGURE II.1.4 – Schéma d'un sphéroïde (les disques jaunes correspondent aux cellules) entouré de molécules de Dextran lui appliquant une pression isotrope.

Morgan Delarue a démontré l'équivalence de cette pression à une pression mécanique en comparant son effet avec et sans membrane de dialyse. Dans le cas avec la membrane de dialyse, le sphéroïde est placé à l'intérieur de cette dernière et les polymères restent en dehors de la membrane car son poids de coupure est inférieur au poids moléculaire du Dextran (100kDa)(figure II.1.5). La pression osmotique dégonfle le sac de dialyse qui applique ensuite une pression mécanique au sphéroïde. L'expérience sans la membrane de dialyse a donné les mêmes résultats.

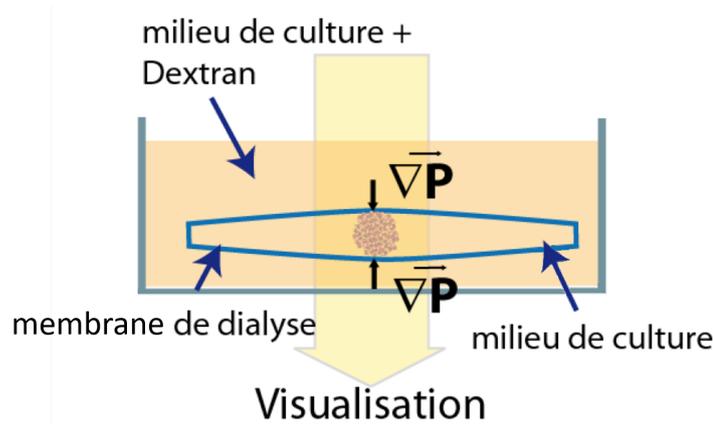


FIGURE II.1.5 – Schéma du sphéroïde dans la membrane de dialyse au fond d'un puits contenant le milieu de culture auquel a été ajouté le Dextran. Tiré de la thèse de Morgan Delarue.

La valeur quantitative de la pression exercée est calculée à partir d'une courbe de calibration empirique fournie par B. Cabane (ESPCI, Paris), figure II.1.6. La pression  $P$  exprimée en Pa suit la relation :

$$P(D) = 28,6D + 0.87D^2 + 0.005D^3 \quad (1)$$

où  $D$  est la concentration en Dextran exprimée en g/L.

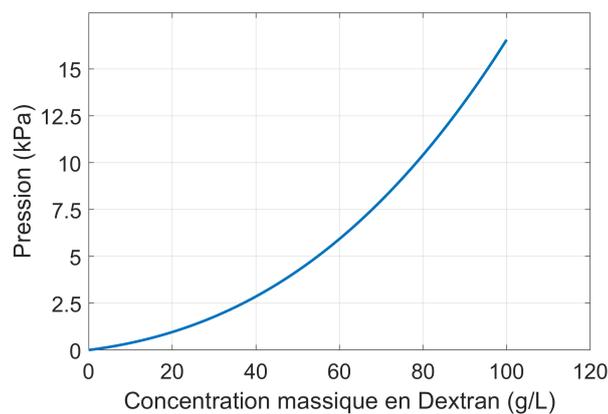


FIGURE II.1.6 – Courbe de calibration donnant la pression exercée par le Dextran en fonction de sa concentration massique.

Pour des concentrations supérieures à 40g/L, la dissolution du Dextran dans le milieu

de culture n'est pas immédiate. Le mélange doit être fait au moins un jour avant utilisation et placé sur un agitateur rotatif ou dans un incubateur.

# II2 MONTAGE

## II.2.1 PREMIER MONTAGE

Le montage que j'ai mis au point se base sur un microscope inversé classique (Zeiss Axiover 100) auquel j'ai ajouté l'équipement nécessaire pour observer la lumière diffusée par l'échantillon (voir figure II.2.1). Il est ainsi possible de voir en même temps une image de l'échantillon en microscopie et la lumière diffusée par celui-ci. Cette double acquisition permet de vérifier l'état de l'échantillon au cours du temps et de corrélérer ou comparer les mesures obtenues en microscopie et en DLS. L'idée de combiner un microscope avec un montage de DLS avait déjà été proposée par Kaplan et al. [133] et le montage possède des ressemblances avec ceux présentés dans les articles [104, 103].

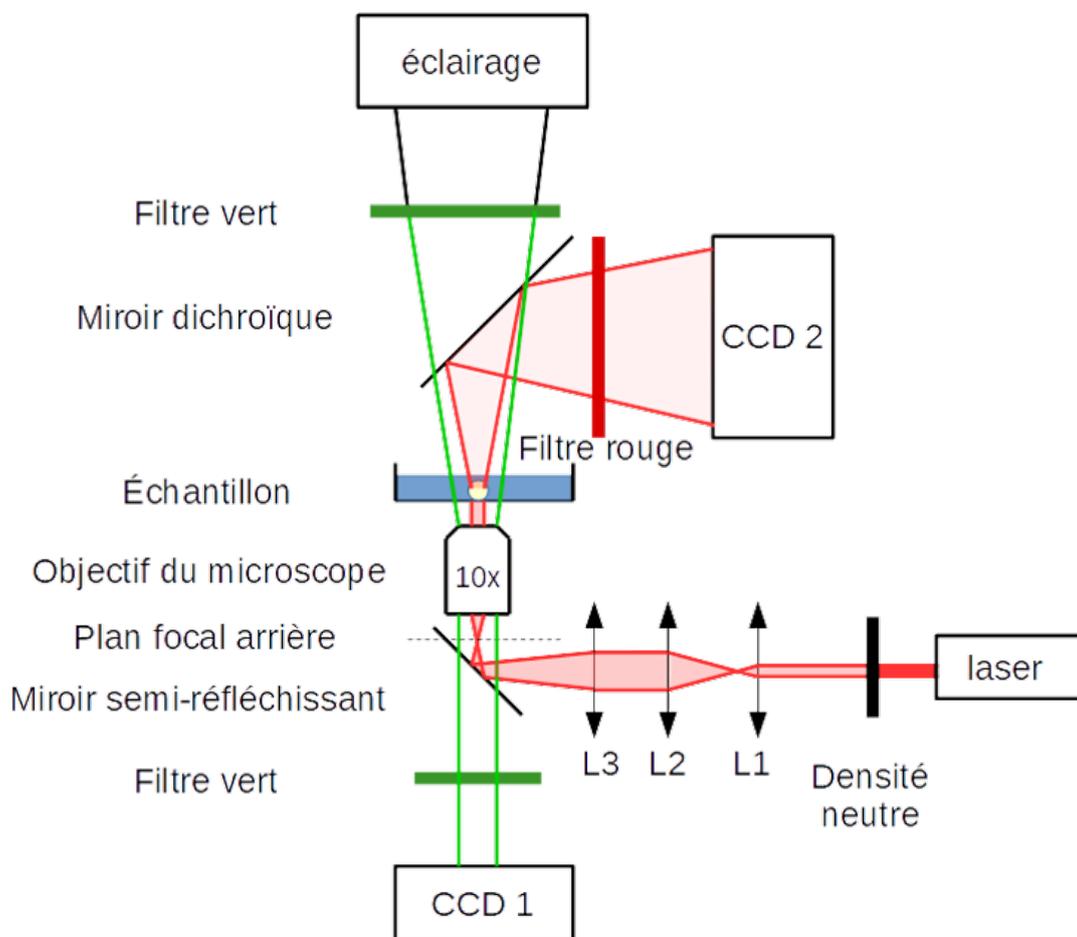


FIGURE II.2.1 – Schéma du montage expérimental.

Pour la partie microscopie, le microscope est équipé d'un objectif 10x (Zeiss EC Plan-Neofluar, O.N. 0.3) et la détection est faite sur une caméra CCD (CCD1; Allied Vision Pike).

La partie DLS comporte :

- un laser de longueur d'onde 633 nm (He-Ne, Uniphase 1101, 1.5mW) ou 850 nm (Thorlabs CPS850V, 0.85mW). Les premiers résultats ont été obtenus avec le laser He-Ne, puis le laser infrarouge uniquement a été utilisé.
- une densité neutre (Thorlabs) permettant de réduire l'intensité d'un facteur 4 à  $10^4$  selon le besoin,
- deux lentilles L1 et L2 permettant de changer le diamètre du faisceau selon l'expérience,
- un troisième lentille L3 de focale  $f_3 = +100mm$  faisant converger le laser dans le plan focal arrière de l'objectif, afin qu'en sortie de ce dernier le faisceau soit collimaté (parallèle),
- l'objectif du microscope,
- une seconde caméra CCD (CCD2; Allied Vision Guppy F 046B) avec 2048x2048 pixels de  $7.4 \mu m$  de côté. Utiliser une caméra CCD pour la diffusion de lumière permet d'acquérir simultanément plusieurs angles, comme déjà proposé par Ferri [134].

Pour que microscopie et DLS n'interfèrent pas, les deux voies optiques sont séparées en longueur d'onde : vert (550 nm) pour la microscopie et rouge (633 nm) ou infrarouge (850 nm) pour la DLS. Un filtre monochromatique vert est placé après la lampe du microscope puis un même filtre est placé avant la caméra, supprimant la lumière venant du laser. De façon similaire, un filtre monochromatique est placé avant la caméra CCD2 ne laissant passer que le signal laser. Un miroir dichroïque ("700 nm to 900 nm pellicle beam splitter"; ThorLabs) permet aussi de réfléchir la lumière laser vers la CCD2 en laissant passer la lumière verte vers l'échantillon.

Trois éléments sont modulables :

- ⇒ la puissance du laser, via la valeur de la densité neutre : elle est choisie de sorte à avoir un bon rapport signal sur bruit (lumière parasite) sans saturer la CCD2.
- ⇒ la taille du faisceau laser : approximativement celle de l'échantillon. Le but est d'avoir une proportion maximale de lumière diffusée, tout en sondant l'intégralité du sphéroïde. Il est aussi possible de réduire la taille du faisceau pour sonder une zone localisée de l'échantillon, comme illustré dans le chapitre IV.4.
- ⇒ la distance entre la CCD2 et l'échantillon : elle est choisie en faisant un compromis entre une meilleure résolution angulaire à grande distance et une plus grande plage des angles captés à faible distance. Pour donner une idée des ordres de grandeur, à distance  $D = 80$  cm, avec une caméra centrée sur le spot laser, la résolution est de  $0.005^\circ$  ( $q=0.001 \mu m^{-1}$  pour  $\lambda = 633$  nm) et l'angle maximal observé est  $7^\circ$  ( $q=1.3 \mu m^{-1}$  pour  $\lambda = 633$  nm). Il faut cependant que la distance entre l'échantillon et la caméra soit suffisamment grande pour que l'hypothèse de diffusion à l'infini

ne soit pas inapplicable. Ce problème est résolu grâce à l'utilisation d'une lentille supplémentaire, présente dans le second montage de la section suivante.

Le passage par l'objectif et le filtre rouge (ou infrarouge) dégrade légèrement le signal à cause de réflexions parasites et d'artefacts. On peut les retirer, avec la lentille L3, mais on renonce alors à l'imagerie champ plein simultanée. Pour maintenir la température et le pH, l'échantillon est placé dans un incubateur pour plateau de microscope (LCI CU-501). La platine du microscope est motorisée pour un déplacement XY.

Pour les échantillons observés dans cette thèse, la vitesse d'acquisition de la caméra n'est pas limitante. Il est cependant intéressant de connaître l'existence de la *Laser Speckle Imaging* aussi dénommée *Laser Speckle Contrast Analysis* dans le cas d'échantillons à dynamique rapide [135, 136]. Dans cette technique, les fluctuations d'intensité sont trop rapides pour être suivies par une CCD. L'intensité mesurée intègre ces fluctuations, et plus le temps d'exposition est long, plus la figure de speckle est "effacée". En mesurant le contraste de l'image en fonction du temps d'exposition, il est alors possible d'en déduire le temps caractéristique des fluctuations.

## II.2.2 SECOND MONTAGE

Par la suite, le montage précédent a été légèrement modifié afin d'être vraiment dans le cas de la diffusion à l'infini. Pour cela, on observe la lumière diffusée dans le plan focal image d'une lentille convergente L4 (Thorlabs LA1401-B, focale +60 mm). La solution la plus simple serait de mettre la caméra directement dans ce plan focal P de L4 (figure II.2.2), mais ajouter une seconde lentille L5 (identique à L4) permet de contrôler la résolution angulaire sur la caméra comme nous allons le voir.

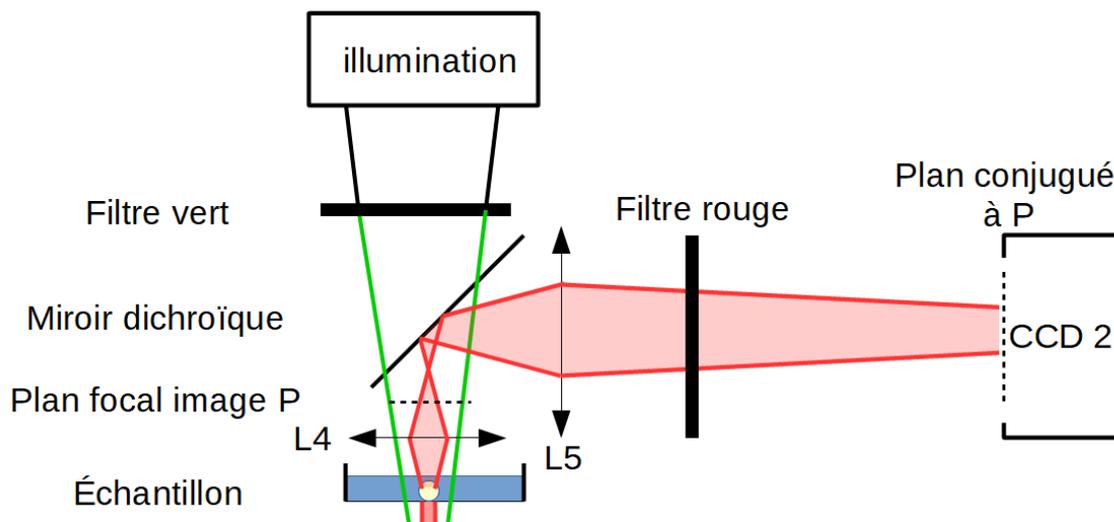


FIGURE II.2.2 – Extrait du schéma du montage expérimental n°2.

Le montage a été réglé de manière à maximiser le champ de vue, défini ici comme l'intervalle des angles de diffusion accessibles avec la caméra. Dans le montage précédent, le champ de vue était limité par la taille de la CCD2. Dans le second montage, c'est le

rayon  $r = 12.5 \text{ mm}$  de la lentille L4 qui est limitant. Pour avoir un plus grand champ de vue, on rapproche L4 le plus possible de l'échantillon. En pratique, on est limité par le boîtier de l'incubateur, qui fixe la distance entre l'échantillon et L4 à  $D = 70 \text{ mm}$ . Si on place  $q = 0 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$  au centre de la caméra, l'angle maximal accessible est alors  $q^* = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\text{atan}(r/D)/2) = 1.3 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$  (voir figure II.2.3).

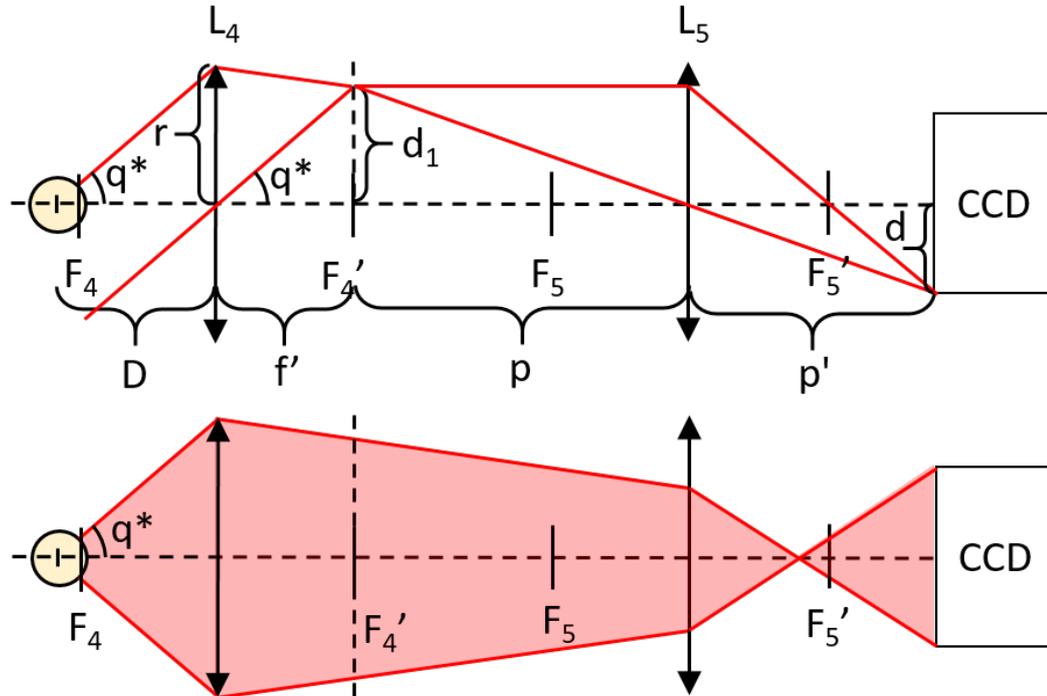


FIGURE II.2.3 – Schéma optique de la partie détection de la lumière diffusée. Le schéma du haut présente les notations du calcul et représente la conjugaison de la caméra avec le plan focal image de L4. Le montage du bas représente la propagation géométrique de la lumière diffusée qui est ajustée à la taille de la caméra grâce à L5.

La lentille L5 a la même focale  $f'$  que la première (choix arbitraire). Elle est positionnée afin que la caméra capte au moins une partie de la lumière diffusée avec l'angle  $q^*$  et que toute la surface de la caméra soit utilisée. On souhaite donc que la demi diagonale de la caméra  $d = 10,72 \text{ mm}$  correspondent à l'angle maximal  $q^*$ . Cette condition impose pour L5 un grandissement  $\gamma = \frac{-d_1}{d}$  avec  $d_1$  donné par l'angle  $q^*$  :  $\tan(q^*) = \frac{r}{D} = \frac{d_1}{f'}$ . On a donc :

$$\gamma = \frac{-f'r}{dD} \quad (1)$$

La relation de conjugaison de la lentille impose :

$$\gamma = \frac{p'}{p} = \frac{f'}{p + f'} \quad (2)$$

où  $p$  est la distance algébrique de L5 au foyer image  $F_4'$  et  $p'$  est la distance algébrique de L5 au plan conjugué de  $F_4'$  par L5. La caméra doit être placée dans ce plan. Ceci détermine la position de L5 :

$$p = f' \left( \frac{1}{\gamma} - 1 \right) = - \left( \frac{dD}{r} + f' \right) \quad (3)$$

Le calcul donne  $p = -120$  mm.

Enfin, le miroir dichroïque est positionné suffisamment proche de L5 pour qu'il ne limite pas le champ de vue (son rayon est de 9.5 mm).

### Imagerie de l'échantillon

Dans le montage de la figure II.2.2, la caméra CCD2 est placée de telle sorte à observer la lumière diffusée à l'infini. On peut ajouter momentanément une lentille supplémentaire entre L5 et la caméra pour obtenir à la place l'image du plan de l'échantillon. Il n'est pas nécessaire de modifier autre chose et cette configuration permet d'observer l'échantillon avec un plus grand champ de vue que la CCD1, mais surtout d'observer le faisceau laser dans le plan de l'échantillon. On peut ainsi aisément en mesurer la taille et la position par rapport à l'échantillon. En pratique, on utilise une lentille divergente  $f' = -50$  mm placée 15.3 mm après L5 (figure II.2.4). La figure II.2.5 montre un exemple d'utilisation pour positionner le sphéroïde par rapport au laser et mesurer la taille du laser.

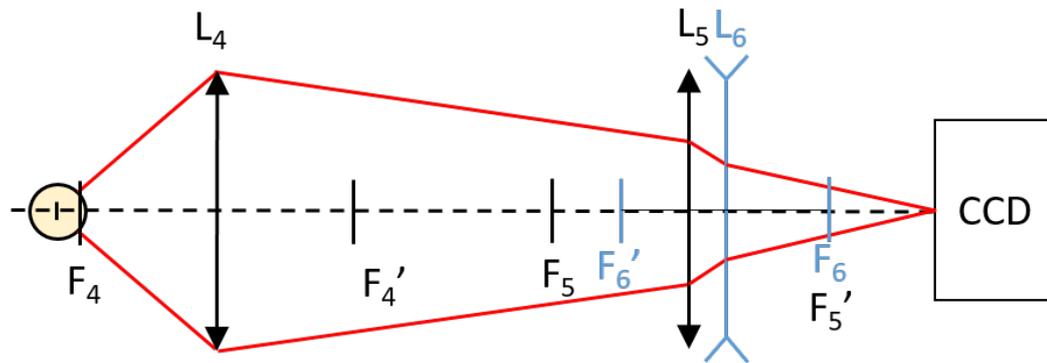


FIGURE II.2.4 – Schéma optique de la partie détection de la lumière diffusée, dans la configuration permettant d'imager le plan de l'échantillon.

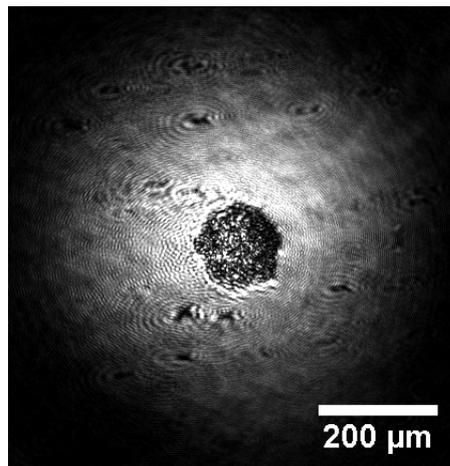


FIGURE II.2.5 – Photographie via la CCD2 avec L6 d'un sphéroïde (au centre) et du profil laser l'illuminant.

## Aberrations sphériques

Le rayon  $r$  de la lentille L4 donnée plus haut est en fait une taille effective. Le rayon réel de la lentille est de 1 pouce (2.54 cm) mais on n'utilise que le centre de celle-ci à cause des aberrations sphériques qui affectent les rayons arrivant sur les bords de la lentille. Comme le montre la figure II.2.6, plus les rayons arrivent sur les bords de la lentille, plus l'effet des aberrations est important. Cet effet se traduit dans le plan focal image de L4, donc aussi sur la caméra, par un décalage de la position réelle des rayons par rapport à leur position théorique. Ainsi sur les bords du champ de vue, l'échelle n'est plus linéaire (rayons bleus sur la figure). Pire encore, on peut avoir un mélange d'angles (rayons rouges) : deux rayons issus de diffusions à des angles différents arrivent au même endroit sur la caméra. Cette aberration est à éviter absolument : il ne faut pas que les bords de la lentille reçoivent de lumière (ou il faut utiliser des lentilles de plus petit diamètre).

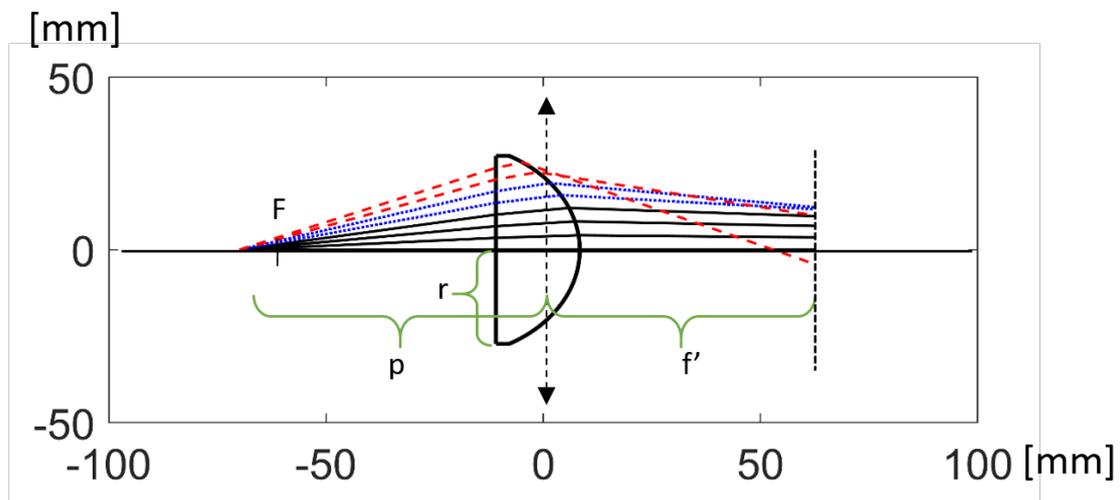


FIGURE II.2.6 – Illustration des aberrations sphériques pour les rayons arrivant sur les bords d'une lentille. L'objet diffusant est placé en  $p = -70$  mm, la focale  $f'$  est de 60 mm. Les rayons noirs correspondent aux rayons correctement positionnés dans le plan focal, les bleus en pointillés sont positionnés selon une échelle qui ne peut plus être considérée comme linéaire et les rouges en tirets se superposent avec d'autres rayons.

Concrètement, on choisit de se limiter à une zone où les aberrations engendrent un décalage inférieur à 10% pour la position de l'intersection d'un rayon avec le plan focal image. Cette taille effective  $r$  dépend des paramètres de la lentille et de la distance à l'échantillon  $p$ . Le calcul est présenté en annexe A pour  $p = -70$  cm qui est le réglage utilisé dans le deuxième montage. On obtient  $r = 12.5$  mm, ce qui représente un peu moins de la moitié du rayon réel de la lentille.

## Choix de la taille du faisceau

La taille du laser est choisie de manière à maximiser le rapport signal (lumière diffusée) sur bruit (faisceau direct et signal parasite), tout en sondant l'ensemble du sphéroïde. Com-

mençons par décrire comment se propage un faisceau laser gaussien : dans l'approximation scalaire du champ, l'intensité  $I$  en fonction de la distance de propagation  $z$  et de la distance  $r$  à l'axe de propagation est :

$$I(r, z) = \frac{2I_0}{\pi w^2(z)} e^{-\frac{2r^2}{w^2(z)}} \quad (4)$$

où  $w(z)$  est la largeur du laser, qui s'exprime en fonction de la largeur minimale  $w_0$ , ou *waist* :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{\lambda}{\pi w_0^2} z \right)^2} \quad (5)$$

La figure II.2.7 montre un exemple de cette largeur en fonction de  $z$ .

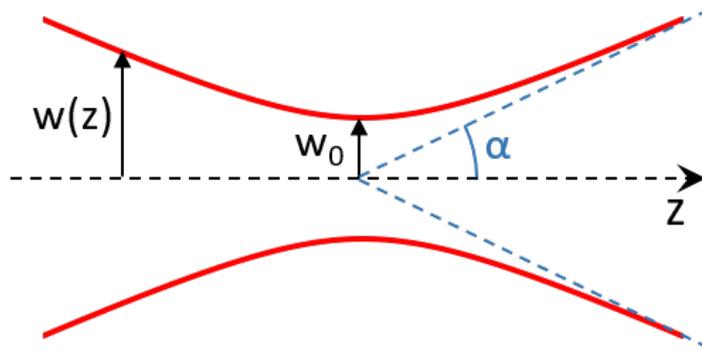


FIGURE II.2.7 – Schéma de la largeur  $w$  du faisceau gaussien au cours de sa propagation. Elle atteint son minimum  $w_0$ , appelé *waist*, en  $z = 0$ .  $\alpha$  est l'angle de divergence à l'infini du faisceau.

Dans le montage, le *waist* du laser est positionné au niveau de l'échantillon pour que le champ y soit collimaté, c'est-à-dire avec une direction unique. On voit dans l'équation 5 que la taille du laser  $w_0$  est reliée à sa divergence à l'infini  $\alpha$  :

$$\tan(\alpha) = \frac{\lambda}{\pi w_0} \quad (6)$$

Ainsi plus le faisceau est petit au niveau de l'échantillon, plus il sera large au niveau de la caméra. Le faisceau direct produit sur la caméra une intensité :

$$I(q) = \frac{w_0^2 I_0}{2\pi} e^{-\frac{1}{2}(w_0 q)^2} \quad (7)$$

Un *waist* étroit signifie donc un faisceau direct large sur la caméra qui se superpose au signal, empêchant une mesure correcte aux plus petits angles. Mais dans le cas d'un  $w_0$  large, il faut prendre en compte un autre aspect : si le faisceau est très large, la majeure partie de l'intensité passe à côté du sphéroïde et le rapport signal sur faisceau direct est réduit. Le calcul théorique prenant en compte ces deux effets antagonistes prédit un rapport signal sur bruit qui augmente avec la taille du *waist*, du moins pour les angles plus grands que la taille d'une tache de speckle. En pratique, les réflexions parasites et les défauts du faisceau gaussien produisent un fond plus intense que le signal si seule une faible portion du faisceau

est diffusée. En conclusion, on prend un faisceau d'une taille proche de celle de l'échantillon pour avoir un maximum de lumière diffusée tout en observant l'intégralité de l'échantillon.

### Calibration angulaire

Pour confirmer la résolution angulaire calculée plus haut, une calibration à l'aide d'un réseau de transmission (Edmund Optics) a été faite. Le réseau possède 110 traits/mm, ce qui donne une diffraction au premier ordre à  $\theta = 5.3^\circ$  pour le laser infrarouge.

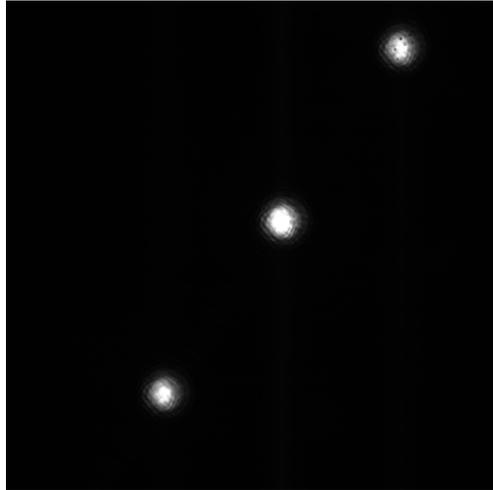


FIGURE II.2.8 – Exemple d'un cliché de diffraction obtenu avec le réseau éclairé par le laser infrarouge. Le point central est l'ordre 0, les deux autres points sont les ordre 1 et -1, correspondant à  $5.3^\circ$  et  $-5.3^\circ$ .

# II3 ACQUISITION ET ANALYSE

## II.3.1 ACQUISITION

Les programmes d'acquisition d'images pour les deux CCD ont été réalisés sous Matlab. Le seul point intéressant à mentionner concerne le programme d'acquisition de la lumière diffusée. La caméra enregistre l'intensité sur 14 bits, mais ce n'est pas suffisant compte tenu de la large distribution en intensité. Le programme d'acquisition prend donc plusieurs images à différents temps d'exposition. Comme l'intensité croît en allant vers le centre, l'algorithme cherche la distance au centre ( $q = 0$ ) en dessous de laquelle des pixels sont à saturation, puis prend une nouvelle mesure pour tous les pixels dans ce disque. Cette seconde mesure est faite avec un temps d'exposition plus court, divisé par un facteur  $k$  donné. S'il subsiste des pixels à saturation lors de la seconde mesure, le disque contenant tous ces pixels est à nouveau cherché et une troisième mesure est faite à un temps d'exposition encore  $k$  fois plus court. En général, on commence avec un temps d'exposition d'environ 0.5 seconde, puis le divise par un facteur 4 d'une mesure à la suivante, et ce à quatre reprises. On obtient un temps d'exposition pour le centre d'environ 2 ms. La profondeur d'enregistrement effective est ainsi multipliée par  $4^4 = 256$ , ce qui donne au total 22 bits. Les anneaux visibles dans la figure II.3.1 correspondent à ces différents temps d'exposition.

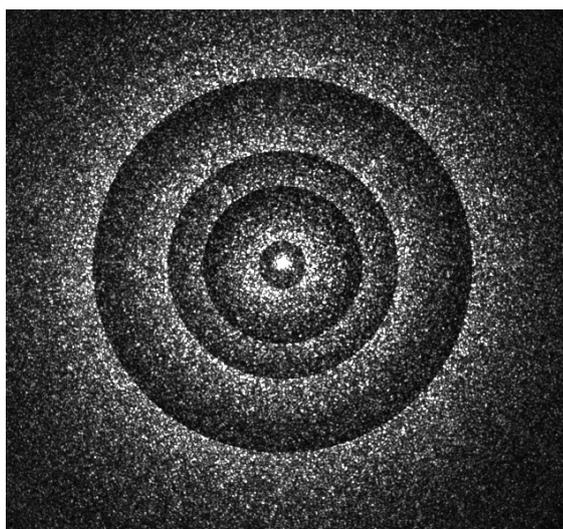


FIGURE II.3.1 – Exemple d'intensité mesurée avec différents temps d'exposition. Le temps d'exposition est divisé par 4 d'un disque au suivant : 500 ms, 125 ms, 31 ms, 7.8 ms et 2.0 ms. L'échantillon correspondant est constitué de cellules sur une boîte de pétri.

La fréquence d'acquisition varie entre 1 image toutes les 10 secondes pour les échantillons les plus dynamiques et 1 image toutes les 40 secondes pour les échantillons dont les mouvements sont plus lents. Plus la durée totale de l'acquisition est grande, meilleure est la statistique pour le calcul de la fonction d'autocorrélation de l'intensité. La limite basse donnant un signal clair est de 20 minutes pour les dynamiques observées. En pratique, les acquisitions durent entre 30 minutes et 10 heures.

## II.3.2 FONCTION DE PHASE

Cette section présente comment sont analysés les clichés de diffraction obtenus avec des cellules et des sphéroïdes. Il s'agit d'une analyse statique de la lumière diffusée et non pas dynamique. Pour cela, on considère la fonction de phase  $P$  qui est l'intensité diffusée en fonction de l'angle, normalisée par l'intensité totale.

$$P(\theta) = \frac{I(\theta)}{\int I d\Omega} \quad (1)$$

La répartition angulaire de la lumière diffusée, caractérisée par la fonction de phase, nous renseigne sur la structure de l'échantillon.

On verra que dans le cas des sphéroïdes ou de cellules dispersées sur une boîte de pétri, il n'y a pas de structure à longue portée, à l'échelle de l'échantillon. En conséquence, on cherche à extraire de la fonction de phase deux informations à petite échelle : la taille moyenne des cellules et la distance moyenne entre cellules voisines. Au niveau de la fonction de phase, les petites échelles se retrouvent dans l'enveloppe des variations de l'intensité. C'est donc cette enveloppe que l'on souhaite mesurer. La granulosité, les taches de speckle, provient quant à elle du positionnement relatif des cellules sur l'ensemble de l'échantillon, et ne contient donc pas l'information recherchée ici. Ces propriétés viennent du fait que l'intensité correspond au module carré de la transformée de Fourier de la densité de diffuseurs dans l'échantillon (section I.4.1).

Afin d'extraire l'enveloppe du signal, les fluctuations provenant des taches de speckle sont lissées en réalisant une moyenne azimutale, c'est-à-dire à norme de  $\mathbf{q}$  fixe, de l'intensité mesurée. La figure II.3.2 présente un exemple illustrant le parallèle entre structure locale/globale de l'échantillon et fluctuations globale/locale de l'intensité. Il s'agit d'une simulation pour des "cellules" avec un profil de densité gaussien d'écart type noté  $d$ . Les figures de la partie III montreront un exemple réel.

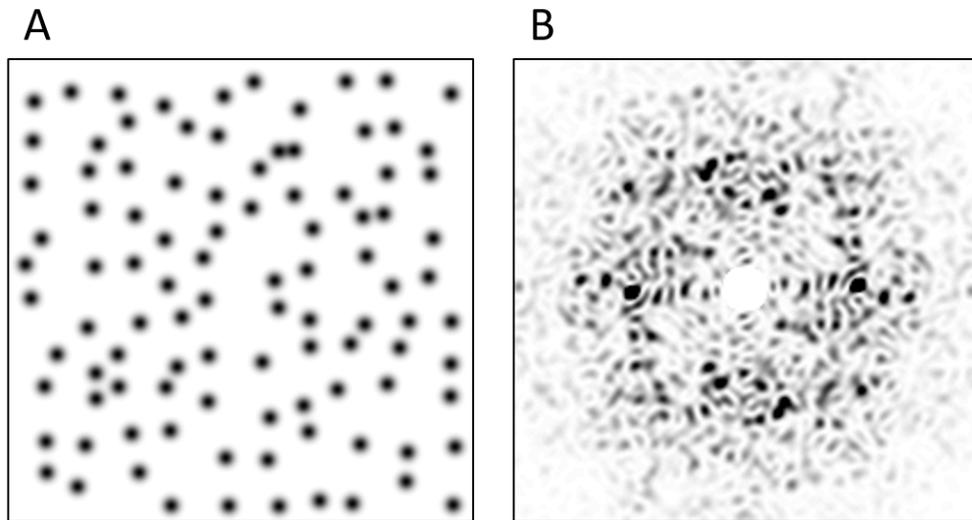


FIGURE II.3.2 – Simulation de diffusion de lumière pour des particules à profil gaussien. (A) montre l'échantillon et (B) la lumière diffusée correspondante (obtenue par  $|TF|^2$ , le pic central a été retiré). Le profil général vient de la densité  $\rho$  à courte distance tandis que le speckle résulte de l'agencement de l'ensemble des particules. Les particules sont des gaussiennes d'écart type de  $d = 1 \mu\text{m}$ , positionnées selon un quadrillage possédant un pas de  $8 \mu\text{m}$ , auquel un bruit blanc en position est ajouté.

Dans la relation  $P = |TF\{\rho\}|^2$ , où  $\rho$  est la densité de diffuseurs, le module carré empêche de retrouver exactement  $\rho$  avec une simple TF inverse. On peut cependant avoir une information statistique sur la population.

Pour caractériser la taille moyenne  $d$  des cellules, on fait une hypothèse sur le profil moyen d'une cellule en le modélisant par une fonction  $f$  dépendant de  $d$ . Dans l'exemple de la figure II.3.2, on prend pour  $f$  une gaussienne  $f = e^{-\frac{r^2}{2d^2}}$ . L'enveloppe de la fonction de phase est ensuite ajustée avec  $|TF\{f\}|^2$  pour en tirer le paramètre  $d$ . Pour l'exemple de la figure II.3.2, on ajuste avec  $|TF\{f\}|^2 \propto e^{-(qd)^2}$  et on obtient  $d = 1 \mu\text{m}$ . On retrouve bien l'écart type utilisé dans la simulation, caractéristique de la taille des "cellules". Il faut cependant exclure de l'ajustement les plus petits angles qui contiennent également des informations sur l'organisation des premiers voisins, s'il y en a une. Dans la figure II.3.3 A, les particules sont positionnées selon un quadrillage bruité, si bien que pour  $q > 0.8 \mu\text{m}^{-1}$  on retrouve la TF du profil d'une cellule, mais en dessous il s'y superpose l'information sur l'organisation spatiale des cellules.

Pour obtenir la distance au premier voisin, on effectue une TF inverse de  $P$ . Comme indiqué dans la I.4.2, pour une fonction isotrope,  $P = |TF\{\rho\}|^2$  est la TF de la fonction d'autocorrélation de  $\rho$  notée  $R_\rho$ . La TF inverse de  $P$  nous donne donc  $R_\rho$ . On peut ensuite y lire la distance au premier voisin comme étant le premier pic visible, comme indiqué dans l'exemple de la figure II.3.3 B. On observe un premier pic à  $8 \mu\text{m}$  qui correspond bien à la maille du quadrillage.

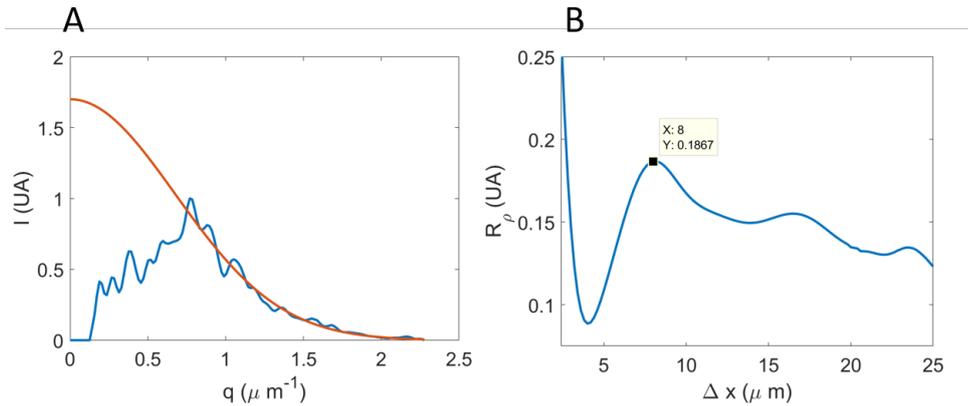


FIGURE II.3.3 – A : Fonction de phase non renormalisée correspondant à la figure II.3.2 B et fit gaussien pour  $q > 0.8 \mu\text{m}^{-1}$ . B : fonction d'autocorrélation de  $\rho$  obtenue en faisant une TF inverse de la fonction de phase.

Quelques précisions sur le programme de calcul de la fonction de phase :

- Le fond (lumière parasite) est soustrait à la lumière diffusée. Les zones de la caméra où le signal parasite est trop important ne sont pas prises en compte dans le calcul.
- Comme indiqué dans la description de l'acquisition, l'intensité est mesurée sur différents temps d'exposition. Un temps d'exposition multiplié par  $k$  est compensé dans le calcul par une division par  $k$  de l'intensité.
- La caméra produit un léger vignettage (lumière plus sombre sur les bords) car sa surface n'est pas exactement perpendiculaire à la direction de diffusion pour tous les angles. Cette aberration est corrigée en divisant l'intensité par  $\cos(\theta)^3$  [137].
- Comme les taches de speckle sont modifiées avec les mouvements internes de l'échantillon, on peut réduire leur effet sur la mesure de la fonction de phase en moyennant plusieurs clichés pris à intervalle régulier sur toute la durée d'acquisition.
- Pour moyennner azimuthalement l'intensité dans le cas d'un échantillon anisotrope, l'image cartésienne est transformée en image polaire puis moyennée. L'image polaire est obtenue via un découpage en quadrillage polaire sur-échantillonné de l'image cartésienne.

### II.3.3 THÉORIE DE LA DLS

La figure de diffraction dépend de la position de chacune des cellules dans l'échantillon. Lorsque celles-ci se déplacent, la figure est donc modifiée. Comme on ne mesure que l'intensité du champ diffusé et non sa phase, on ne peut remonter aux trajectoires individuelles des cellules. Cependant nous allons voir dans cette section que les fluctuations d'intensité sont reliées statistiquement aux propriétés cinétiques de l'ensemble des cellules.

Pour caractériser les fluctuations de l'intensité  $I$ , on utilise la fonction de corrélation  $C$  :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle_t^2} - 1 \quad (2)$$

où  $\langle \rangle_t$  représente la moyenne sur la durée de l'expérience. La fonction de corrélation  $C$  donne une mesure de la corrélation de l'intensité en fonction du délai  $\tau$ . Si  $\tau = 0$  le signal est corrélé et  $C=1$  car pour une figure de speckle,  $\langle I^2 \rangle = 2 \langle I \rangle^2$ . En revanche, si pour tout  $t$ , l'intensité au temps  $t$  est décorrelée de celle au temps  $t + \tau$ , on a :

$$\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle = \langle I(\mathbf{q}, t) \rangle \langle I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle = \langle I(\mathbf{q}, t) \rangle^2 \quad (3)$$

et  $C=0$  (figure II.3.4).

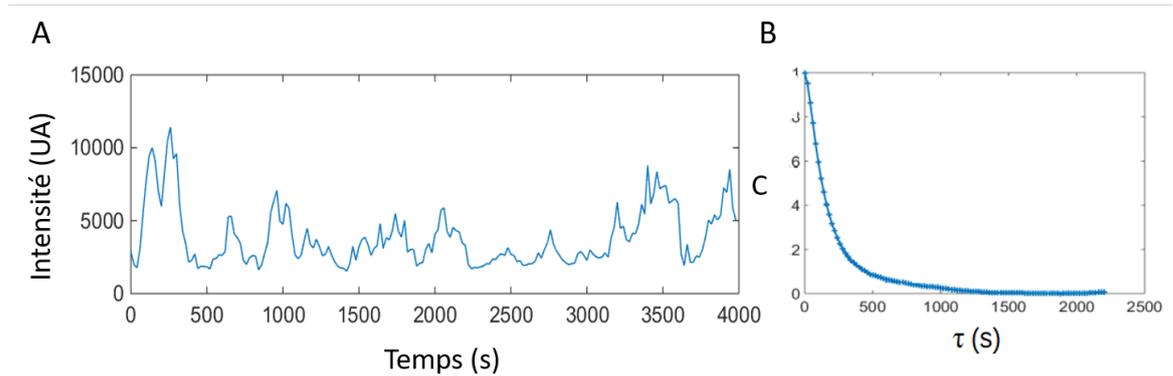


FIGURE II.3.4 – Exemple de fluctuations d'intensité mesurées en un pixel (A) et de la fonction de corrélation  $C$  associée (B).

Dans la majorité des cas,  $C$  est isotrope et on la calcule pour une norme de  $q = |\mathbf{q}|$  donnée. On moyenne alors  $C$  sur tous les pixels correspondant à  $|\mathbf{q}| = q \pm dq$  qui forment un anneau sur la caméra.

$$C(q, \tau) = \left\langle \frac{\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle_t^2} - 1 \right\rangle_\phi \quad (4)$$

où  $\langle \rangle_\phi$  représente la moyenne sur les pixels de l'anneau,  $\phi$  étant l'angle azimutal. Dans ce cas isotrope, on peut obtenir une meilleure mesure de l'intensité moyenne  $\langle I(q, t) \rangle_t$  au dénominateur, en prenant à la place  $\langle I(q, t) \rangle_\phi$ . En effet, l'intensité moyennée sur le temps en un pixel situé à un vecteur de diffusion  $\mathbf{q}$  correspond à la fonction de phase en  $\mathbf{q}$ . Pour un échantillon isotrope, la fonction de phase ne dépend pas de la direction. Ainsi tous les pixels situés à des vecteurs de diffusion de norme  $q = |\mathbf{q}|$  ont la même moyenne temporelle. Effectuer la moyenne de l'intensité sur ces pixels en un temps donné  $\langle I(q, t) \rangle_\phi$  donne aussi la valeur de la fonction de phase en  $q$ . La différence est qu'il faut une expérience très longue pour que  $\langle I(q, t) \rangle_t$  converge et pour  $\langle I(q, t) \rangle_\phi$ , il faut un grand nombre de taches de speckle. La première condition n'est généralement pas remplie alors que la seconde l'est toujours. On peut choisir de moyenner à la fois sur le temps et sur  $\phi$  pour avoir un meilleur résultat. Moyenner uniquement sur  $\phi$  permet cependant de corriger l'éventuelle variation temporelle de l'intensité moyenne, venant par exemple d'une dérive du laser. L'expression exacte calculée pour  $C$  est alors :

$$C_{\text{expérimental}}(q, \tau) = \left\langle \frac{I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau)}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle_\phi \langle I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle_\phi} \right\rangle_{\phi, t} - 1 \quad (5)$$

Nous allons voir maintenant comment la fonction  $C$  est reliée aux mouvements des cellules. Le calcul analytique est fait dans l'hypothèse de la diffusion simple, et on approximera le champ incident du laser à une onde plane. Pour commencer, on relie la corrélation d'intensité à celle du champ scalaire  $E$  grâce à la relation de Siegert :

$$\frac{\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle_t^2} - 1 = \beta \left| \frac{\langle E(\mathbf{q}, t)\overline{E(\mathbf{q}, t + \tau)} \rangle_t}{\langle E(\mathbf{q}, t)^2 \rangle_t} \right|^2 \equiv \beta |g_1(\mathbf{q}, t + \tau)|^2 \quad (6)$$

où  $\beta$  est le facteur de cohérence du montage expérimental.  $\beta$  dépend du rapport entre la taille des pixels et celle des taches de speckle. Dans notre cas où les pixels sont plus petits que les taches, on a  $\beta \approx 1$ . La fonction  $g_1$  est communément appelée la fonction de corrélation normalisée du premier ordre. L'application de la relation de Siegert requiert plusieurs hypothèses mais il est en réalité possible de contourner son utilisation comme indiqué en annexe B. La démonstration alternative est légèrement plus longue mais n'implique qu'une seule hypothèse supplémentaire : que les mouvements des cellules ne soient pas corrélés entre eux.

En diffusion simple, le champ électrique diffusé est la superposition des ondes sphériques diffusées par les  $N$  cellules situées à des positions  $\mathbf{r}_j(t)$  :

$$E(\mathbf{q}, t) = E_0(\mathbf{q}) \sum_{j=1}^N e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_j(t)} \quad (7)$$

où  $E_0(\mathbf{q})$  rend compte de la dépendance angulaire du champ diffusé par une cellule. Pour une direction  $\mathbf{q}$  donnée, il s'agit d'une constante. En utilisant cette expression dans l'équation 6, on obtient :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \left| \frac{S(\mathbf{q}, \tau)}{S(\mathbf{q}, 0)} \right|^2 \quad (8)$$

avec

$$S(\mathbf{q}, \tau) = \langle \sum_{j,k} e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t+\tau) - \mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t \quad (9)$$

Le déplacement d'une cellule pendant la période de temps  $\tau$  est :

$$\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t) = \mathbf{r}_j(t + \tau) - \mathbf{r}_j(t) \quad (10)$$

On peut réécrire  $S$  :

$$S(\mathbf{q}, \tau) = \sum_{j,k} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t+\tau) - \mathbf{r}_j(t) + \mathbf{r}_j(t) - \mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t = \sum_{j,k} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t)} e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t) - \mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t \quad (11)$$

On fait l'hypothèse que les déplacements des cellules ne sont pas corrélés à leur position :

$$S(\mathbf{q}, \tau) = \sum_{j,k} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t)} \rangle_t \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t) - \mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t \quad (12)$$

Quand on calcule la moyenne  $\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t)} \rangle_t$ , on fait en fait :

$$\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t)} \rangle_t = \int_0^{t_{max}} e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau, t)} \frac{dt}{t_{max}} \quad (13)$$

où  $t_{max}$  est la durée de l'acquisition. On prend donc en compte tous les déplacements effectués par la cellule  $j$  durant l'expérience. L'ensemble de ces déplacements peut être décrit par une distribution, c'est-à-dire :

$$\int_0^{t_{max}} e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau,t)} \frac{dt}{t_{max}} = \int \int \int P b_\tau(\Delta\mathbf{r}_j) e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau,t)} d\Delta\mathbf{r} \quad (14)$$

où  $P b_\tau(\Delta\mathbf{r}_j)$  est la distribution de probabilité des déplacements d'intervalle de temps  $\tau$  de la cellule  $j$ . On fait l'hypothèse que toutes les cellules ont un comportement moyen identique, décrit par la même distribution  $P b_\tau(\Delta\mathbf{r})$ . En conséquence,  $\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_j(\tau,t)} \rangle_t$  ne dépend pas de  $j$  :

$$\begin{aligned} S(\mathbf{q}, \tau) &= \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(\tau,t)} \rangle_t \sum_{j,k} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t)-\mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t \\ &= \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(\tau,t)} \rangle_t \langle \sum_{j,k} e^{-i\mathbf{q}\cdot[\mathbf{r}_j(t)-\mathbf{r}_k(t)]} \rangle_t \\ &= \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(\tau,t)} \rangle_t S(\mathbf{q}, 0) \end{aligned} \quad (15)$$

Pour finir, on obtient :

$$\begin{aligned} C(\mathbf{q}, \tau) &= \left| \frac{S(\mathbf{q}, \tau)}{S(\mathbf{q}, 0)} \right|^2 \\ &= \left| \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(\tau,t)} \rangle_t \right|^2 \\ &= \left| \int \int \int P b_\tau(\Delta\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} d\Delta\mathbf{r} \right|^2 \\ &= |TF\{P b_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \end{aligned} \quad (16)$$

où  $P b_\tau(\Delta\mathbf{r})$  est la distribution des déplacements des cellules pendant une période  $\tau$ . On utilisera parfois aussi la relation :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = TF\{P b_\tau(\Delta\mathbf{r})\} \quad (17)$$

Ainsi en mesurant la fonction d'autocorrélation de l'intensité, on accède à la  $|TF|^2$  de la distribution des déplacements des cellules. Il y a un parallèle direct avec le fait que  $I$  est la  $|TF|^2$  de la position des cellules. La chapitre III.2 montrera sur un exemple de comment cette relation est utilisée pour quantifier la motilité des cellules.

Dans le calcul, on a fait l'hypothèse d'une population homogène de cellules. Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, par exemple si on a deux populations A et B ayant des comportements migratoires différents, le résultat est le suivant :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \left| TF\{\alpha_A P b_\tau^A(\Delta\mathbf{r}) + \alpha_B P b_\tau^B(\Delta\mathbf{r})\} \right|^2 \quad (18)$$

où  $\alpha_X$  est la fraction de cellules appartenant à la population X et  $P b^X$  est la distribution de déplacements propre à cette population. Ce résultat est obtenu à partir de l'équation 12, grâce à la linéarité de la somme puis de la transformée de Fourier.

L'annexe C présente le calcul de la fonction de corrélation si on ne fait pas l'hypothèse de cellules indépendantes. En considérant que chaque cellule possède  $p$  voisines dont le mouvement est corrélé au sien, l'équation 16 est modifiée en :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = |TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \left(1 - \frac{p}{N}\right) + \frac{p}{N} TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{\mathbf{v}/\mathbf{k}})\} \quad (19)$$

où  $N$  est le nombre total de cellules et  $\Delta\mathbf{r}_{\mathbf{v}/\mathbf{k}}$  désigne les déplacements des cellules voisines dans le référentiel de la cellule centrale. Les corrélations entre déplacements ajoutent donc un terme en  $\frac{p}{N}$ . Dans nos échantillons on observe en général plus d'un millier de cellule ( $N$ ) et il est donc raisonnable de faire l'hypothèse  $p \ll N$ . Dans ces conditions, on retrouve bien le résultat de l'équation 16.

Le calcul de corrélation de l'intensité est fait grâce à un script Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States) sur lequel on peut faire quelques remarques :

- Les zones de la caméra où les réflexions parasites sont clairement visibles sont exclues de l'analyse.
- Dans les cas où les taches de speckle sont bien plus grandes que la résolution de la caméra, on peut réduire la résolution des images par un facteur  $\gamma$  pour ne pas occuper trop de mémoire vive. Pour réduire la taille d'une image par un facteur  $\gamma$ , on moyenne les pixels par groupes carrés de  $\gamma$  pixels de côtés (la RAM nécessaire est réduite par  $\gamma^2$ ). Cette opération ne modifie pas le résultat de façon sensible.
- Pour les échantillons isotropes, l'analyse de l'intensité est faite par anneaux. C'est-à-dire que pour une valeur  $q$  donnée, on effectue une moyenne sur tous les pixels situés à une distance comprise entre  $q - dq$  et  $q + dq$  du centre  $q = 0$ . Ces pixels forment l'ensemble utilisé pour faire la moyenne notée  $\langle \rangle_\phi$  précédemment.
- Le programme effectue aussi le calcul de la corrélation de l'intensité non moyennée sur le temps :  $\langle I(t)I(t + \tau) \rangle_\phi$  avec  $\tau$  fixé. Ce calcul permet de voir si l'échantillon est en régime stationnaire où si le temps de décorrélation change au cours du temps.

## II.3.4 CORRECTION DU FOND

La mesure expérimentale de  $C$  diffère de l'expression théorique à cause du fond constitué du bruit quantique de la caméra, des réflexions parasites du laser et du faisceau direct pour les plus petits angles. Ainsi, la mesure de corrélation pour un  $\mathbf{q}$  donné ne donne pas directement  $C(\tau)$ , mais  $C_m = \alpha C(\tau) + \delta$  (figure II.3.5) où  $\alpha$  et  $\delta$  sont deux constantes dues au fond. Si la durée de l'expérience est suffisamment longue, on a accès à des délais  $\tau$  tels que l'intensité est complètement décorrélée, c'est-à-dire  $C(\tau) = 0$ . On peut alors mesurer  $\delta$  comme étant le palier atteint par  $C_m$  aux  $\tau$  longs. Comme on sait par ailleurs que  $C(0)=1$ , pour obtenir  $C$  il suffit de faire l'opération :

$$C = \frac{C_m - \delta}{C_m(0) - \delta} \quad (20)$$

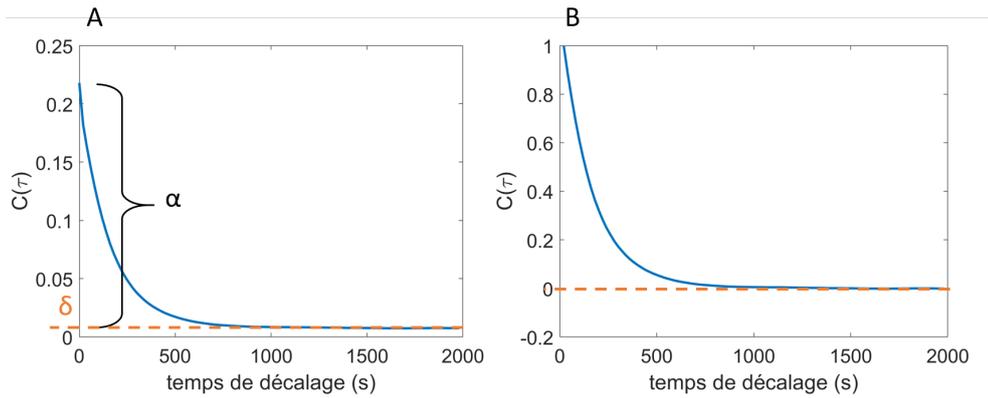


FIGURE II.3.5 – Exemple d’une fonction expérimentale de corrélation  $C(\tau)$  pour  $q = 0.6 \mu\text{m}^{-1}$ , obtenue pour des cellules se déplaçant sur une boîte de pétri. A : fonction non corrigée des facteurs  $\alpha$  et  $\delta$ . B : fonction corrigée.

Le fond pose un réel problème pour les cas où  $\delta$  n’est pas mesurable. C’est le cas lorsque la dynamique est très lente et que l’acquisition n’est pas assez longue, mais aussi pour les plus petits angles. En effet, de manière générale, le temps de décorrélation augmente quand  $q$  diminue et tend même vers l’infini pour  $q = 0$ . Cette observation se comprend si on reprend le résultat de l’équation 16 :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = | \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta r} \rangle |^2 \quad (21)$$

Grossièrement, l’intensité est décorrélée quand  $\mathbf{q}\cdot\Delta r = 2\pi$ , soit des  $\Delta r$  de l’ordre de  $\frac{2\pi}{q}$ . Ainsi plus l’angle d’observation  $q$  est petit, plus il faut un déplacement important des cellules pour décorréler l’intensité. En conséquence, la décorrélation se fait pour des délais  $\tau$  plus grand. La figure II.3.6 montre un exemple de cet effet.

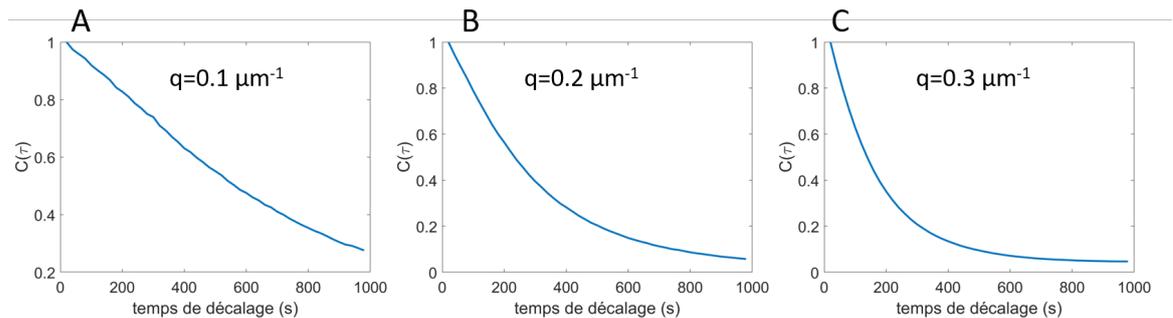


FIGURE II.3.6 – Exemple d’une fonction expérimentale de corrélation  $C(\tau)$  pour  $q = 0.1 \mu\text{m}^{-1}$  (A),  $q = 0.2 \mu\text{m}^{-1}$  (B) et  $q = 0.3 \mu\text{m}^{-1}$  (C). Dans les cas A et B le délai maximal est trop court pour déterminer  $\delta$ .

Avec quelques hypothèses sur la nature du signal parasite, il est possible de calculer la valeur du palier. Le bruit est considéré comme étant composé du bruit quantique D (*Dark noise*) de la caméra et des réflexions parasites du laser donnant un champ  $E_p$  (intensité  $I_p$ ) fonction de  $\mathbf{q}$  mais constant dans le temps. Ce bruit est superposé au champ E (intensité I)

diffusé par l'échantillon. Le signal S en intensité sur la caméra est alors :

$$S(t) = D(t) + [E(t) + E_p][\overline{E(t)} + \overline{E_p}] \quad (22)$$

Deux méthodes pour corriger le palier sont présentées ici. La première, par moyenne, tirée de [137], est difficile à appliquer dans mon cas, à cause de la nature de mon échantillon et de mon montage. La seconde méthode, par corrélation, est nouvelle et donne de meilleurs résultats pour mes mesures.

### Méthode par moyenne

Pour la première méthode, on calcule de la fonction d'autocorrélation mesurée  $C_m$  en tenant compte du signal parasite. Le calcul est fait en annexe E, il est largement inspiré de celui fait par Cipelleti et al. dans [137]. Les hypothèses suivantes sont utilisées :

- E et  $E_p$  sont indépendants,
- $\langle E_p \rangle_\phi = \langle E \rangle_{\phi,t} = 0$ ,
- $\langle I \rangle_\phi$  est constante dans le temps,
- D est indépendant du reste et  $\langle D \rangle_\phi$  est constante.

On obtient  $C_m$  :

$$C_m = |g_1|^2 \frac{\langle I \rangle_{\phi,t}^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} + 2 \frac{\langle I_p \rangle_\phi \langle I \rangle_{\phi,t}}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \Re(g_1) + \frac{\langle I_p^2 \rangle - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \quad (23)$$

où  $\Re$  désigne la partie réelle,  $g_1$  est la fonction de corrélation du champ E et  $|g_1|^2$  est la mesure théorique de C, sans signal parasite :  $C = |g_1|^2$ . Outre le palier, ce résultat prédit une erreur sur la mesure de C à cause du 2<sup>ème</sup> terme qui correspond aux interférences entre E et  $E_p$ . Comme indiqué dans [137], on peut corriger cette erreur en calculant  $g_1$ , solution du polynôme du second degré que constitue l'équation 23. La comparaison de C avec et sans cette correction n'a pas montré de différence significative dans mes expériences. Au contraire, la correction produit dans certains cas des artefacts car ses paramètres sont difficiles à mesurer avec précision, comme nous allons le voir. Cette correction ne sera donc pas faite et on ne s'intéresse qu'à la valeur du palier aux temps long égal à  $\delta = \frac{\langle I_p^2 \rangle - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2}$ .

Pour obtenir ce palier, il faut mesurer :

- la moyenne de l'intensité totale mesurée en un q donné  $\langle S \rangle_{\phi,t}$ ,
- la variance de l'intensité parasite  $\langle I_p^2 \rangle_\phi - \langle I_p \rangle_\phi^2$ .

Pour mesurer la lumière parasite, on fait une mesure sans échantillon  $S_p = \frac{I_p}{T} + D$ , où T est le coefficient de transmission du laser à travers le sphéroïde. Pour en déduire la variance, il faut prendre en compte le bruit quantique D toujours présent [137] :

$$\langle I_p^2 \rangle_\phi - \langle I_p \rangle_\phi^2 = T^2 \left( \langle S_p^2 \rangle_\phi - \langle S_p \rangle_\phi^2 + \langle D \rangle_\phi^2 - \langle D^2 \rangle_\phi \right) \quad (24)$$

Deux difficultés se présentent lors de cette mesure. La première est que pour obtenir un cliché sans échantillon, il faut déplacer la boîte de pétri afin que le laser passe à côté du sphéroïde. Or ce déplacement ne se fait pas sans modification de la lumière parasite, au

moins à cause de l'interface milieu de culture/air qui n'est pas plane. La seconde est que le sphéroïde atténue la lumière parasite qui le traverse. C'est pourquoi son coefficient de transmission  $T$  est présent dans l'équation 24. Mais en réalité, seule une partie de la lumière parasite est atténuée par le sphéroïde et il est difficile de séparer les signaux parasites atténués ou non.

Si la grandeur mesurée était uniquement la moyenne de l'intensité parasite, une mesure approximative, du fait de ces difficultés, pourrait être suffisante. Mais pour mesurer une variance, il faut une bonne précision de la mesure de  $I_p$ . La figure II.3.7 montre un exemple de comparaison entre le palier prédit et celui mesuré. Les résultats ne sont pas satisfaisants, notamment pour les vecteurs de diffusion de norme comprise entre 0.16 et 0.22  $\mu\text{m}^{-1}$ , qui dépassent du cadre.

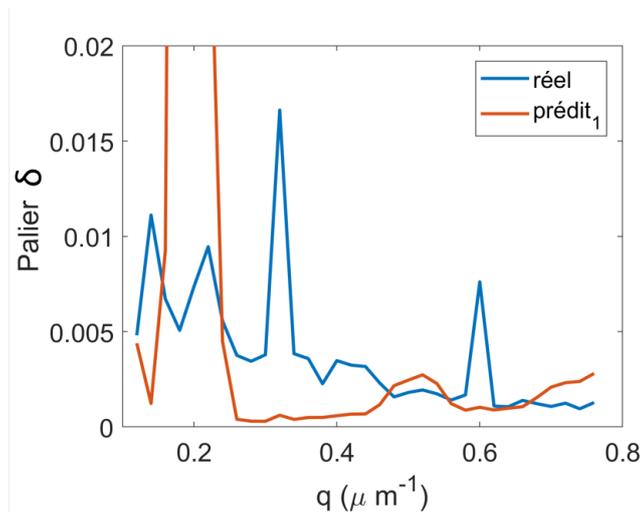


FIGURE II.3.7 – Palier  $\delta$  en fonction de l'angle, mesuré au  $\tau$  long ("réel") ou calculé avec 24 ("prédit<sub>1</sub>").

### Méthode par corrélation

Je propose ici une nouvelle méthode de correction basée sur la corrélation spatio-temporelle de l'intensité. L'idée est de calculer la fonction de corrélation  $C$ , mais en corrélant non pas un pixel avec lui-même mais deux pixels séparés d'une distance  $dq$ . Comme on va le voir avec le calcul, en choisissant bien  $dq$ , on peut supprimer le signal pour ne mesurer que le fond. Comme cette méthode effectue une mesure locale de la corrélation résiduelle, qu'elle utilise les mêmes données que  $C$  et procède d'un calcul proche, elle fournit une mesure du fond bien plus fiable.

On considère la fonction de corrélation spatio-temporelle, notée  $C^*$  :

$$C^*(\mathbf{q}, \mathbf{dq}, \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q} + \mathbf{dq}, t + \tau) \rangle}{\langle I(\mathbf{q}) \rangle^2} - 1 \quad (25)$$

où on a ajouté le paramètre  $\mathbf{dq}$  de décalage angulaire. Similairement à précédemment, on définit la fonction de corrélation spatio-temporelle d'une fonction  $f$  réelle ou complexe :

$$G_f^*(q, \tau) = \langle f(q, t)\overline{f(q + dq, t + \tau)} \rangle_{\phi, t} \quad (26)$$

La notation  $E(t + \tau, \mathbf{q} + \mathbf{dq})$  est noté  $E^{\tau, dq}$ . En conservant le même bruit et les mêmes hypothèses, on montre de manière similaire à la section précédente que :

$$\begin{aligned} G_S^* &= \langle (D + [E + E_p][\overline{E + E_p}])((D^\tau + [E^{\tau, dq} + E_p^{\tau, dq}][\overline{E^{\tau, dq} + E_p^{\tau, dq}}])) \rangle_{\phi, t} \\ &= G_I^* + 2\Re(G_E^* G_{E_p}^*) + 2 \langle I \rangle_{\phi, t} \langle I_p \rangle_{\phi} + \langle I_p I_p^{dq} \rangle_{\phi} \\ &\quad + \langle D \rangle_{\phi, t}^2 + 2 \langle D \rangle_{\phi, t} [\langle I_p \rangle_{\phi} + \langle I \rangle_{\phi, t}] \end{aligned} \quad (27)$$

où on a utilisé l'égalité  $\langle I_p \rangle_{\phi} = \langle I_p^{dq} \rangle_{\phi}$  et  $\langle D \rangle_{\phi} = \langle D^{dq} \rangle_{\phi}$ .

Ce qui donne pour  $C_m^*$  :

$$C_m^* = C^* \frac{\langle I \rangle_{\phi, t}^2}{\langle S \rangle_{\phi, t}^2} + 2 \frac{\langle I_p \rangle_{\phi}}{\langle S \rangle_{\phi, t}^2} \Re(G_E^* G_{E_p}^*) + \frac{\langle I_p I_p^{dq} \rangle_{\phi} - \langle I_p \rangle_{\phi}^2}{\langle S \rangle_{\phi, t}^2} \quad (28)$$

A nouveau, l'idée est d'obtenir le palier  $\delta$  sans avoir besoin d'une expérience longue, grâce à  $C_m^*$ . Si on fait l'hypothèse que le fond parasite  $I_p$  varie spatialement moins rapidement que  $I$ , c'est à dire que pour les  $\mathbf{dq}$  qu'on considèrera  $I_p = I_p^{dq}$ , alors on retrouve le palier  $\delta = \frac{\langle I_p^2 \rangle - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi, t}^2}$  dans l'équation 28. Comme  $dq$  sera de l'ordre de la taille d'une tache de speckle, cette approximation est d'autant meilleure que les taches de speckle sont petites.

Nous allons maintenant montrer qu'en choisissant bien  $\mathbf{dq}$  on peut avoir  $C_m^* = \delta$  quel que soit  $\tau$ , et donc notamment pour des  $\tau$  courts. Pour cela, on calcul  $C^*$  comme indiqué en annexe D et on obtient :

$$C(\tau)^* = C(\mathbf{q} + \mathbf{dq}) \left( \frac{\langle I(\mathbf{q}) I(\mathbf{q} + \mathbf{dq}) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right) \quad (29)$$

où on a supposé une distribution d'intensité isotrope en moyenne et pris  $\mathbf{dq}$  tel que  $|\mathbf{q} + \mathbf{dq}| = |\mathbf{q}|$ . On retrouve bien  $C(\mathbf{q})$  pour  $\mathbf{dq} = 0$  car pour une figure de speckle,  $\langle I^2 \rangle = 2 \langle I \rangle^2$ . Pour  $\mathbf{dq} \neq 0$ ,  $C$  est multipliée par un facteur qui dépend de la corrélation spatiale de l'intensité. Au delà de la taille d'une tache de speckle les intensités sont décorrélatées si bien que  $\langle I(\mathbf{q}) I(\mathbf{q} + \mathbf{dq}) \rangle = \langle I(\mathbf{q}) \rangle \langle I(\mathbf{q} + \mathbf{dq}) \rangle = \langle I \rangle^2$ , soit  $C^* = 0$ . La figure II.3.8 montre un exemple de  $C^*$  pour différents  $dq$ .

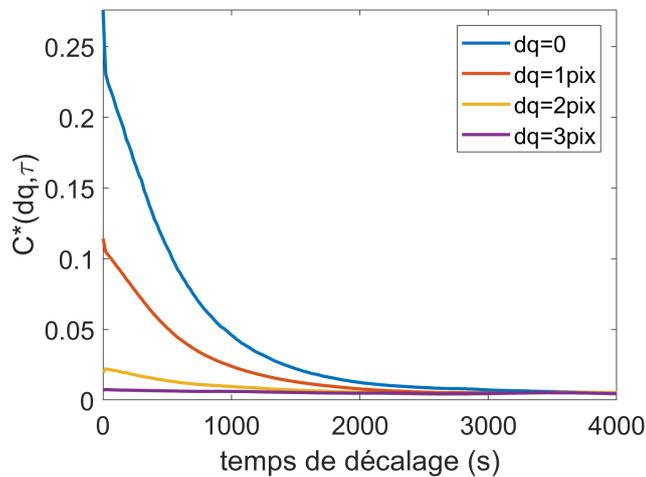


FIGURE II.3.8 –  $C^*(\tau)$  pour  $q = 0.24 \mu\text{m}^{-1}$  et  $dq$  entre 0 et 3 pixels, soit entre 0 et  $4.2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^{-1}$ . Dans cet exemple, les taches de speckle ont une taille approximative de 2 pixels.

De retour à l'équation 28, on a donc  $C_m^* = \delta$  si on choisit  $\mathbf{d}\mathbf{q}$  plus grand que la taille d'un speckle. On choisira une valeur proche de cette valeur critique pour que l'approximation d'un champ parasite constant sur cette distance reste correcte.

La figure II.3.9 reprend la figure II.3.7 en y ajoutant le palier prédit par cette seconde méthode. Les résultats obtenus sont bien plus proches de la réalité. Les écarts relatifs sont inférieurs à 2% de  $C(0)$ . De plus, le calcul a été fait ici dans des conditions où il est justement difficile d'accéder à  $\delta$  : pour des  $\tau$  calculés inférieurs à 820 secondes uniquement (voir figure II.3.8).

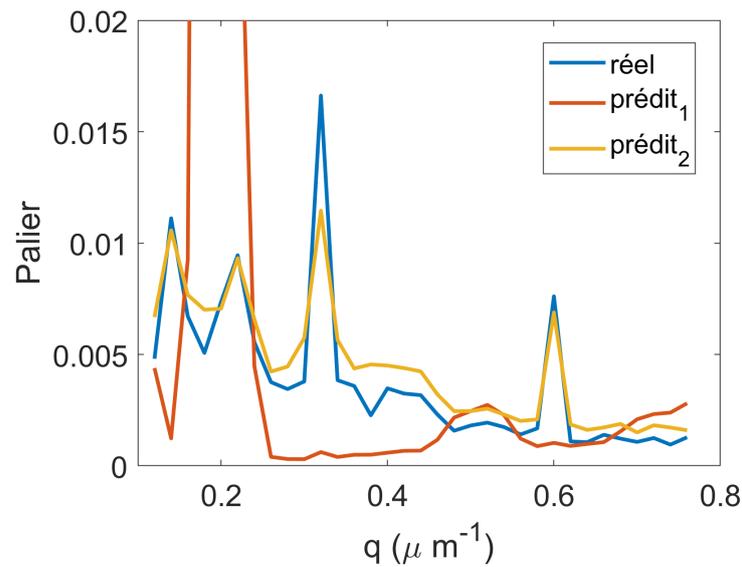


FIGURE II.3.9 – Palier  $\delta$  en fonction de l'angle, mesuré au  $\tau$  long ("réel"), calculé avec 24("prédit1") ou avec 28("prédit2")

# III

Preuve de concept : échantillons 2D

L'objectif de cette partie est de démontrer la faisabilité de l'étude d'ensemble de cellules par diffusion de lumière. En observant des échantillons plats, ou 2D, les résultats obtenus peuvent être vérifiés par microscopie. Les cas d'une cellule unique (0D), de cellules organisées en lignes (1D) et enfin de cellules migrant sur une surface (2D) sont présentés ici. Les résultats de cette partie ont été publiés dans [138].

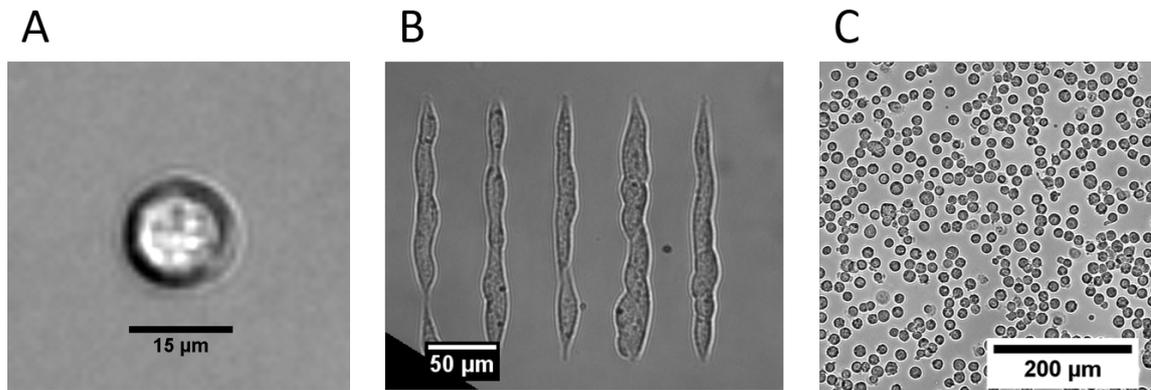


FIGURE 10 – Images champ plein d'une cellule (A), de cellules organisées en lignes (B) et d'une couche de cellules au fond d'une boîte de pétri (C). Pour les images A et C, les cellules ne sont pas encore adhérentes.

### Méthodes spécifiques

Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus avec le premier montage réalisé, présenté en section II.2.1. L'échantillon est illuminé par un laser de longueur d'onde  $\lambda = 633$  nm passant la lentille L3 puis l'objectif du microscope. Le profil gaussien du laser a pour écart type  $33 \pm 1 \mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon. La caméra est placée à 77.7 mm de l'échantillon, ce qui permet de mesurer l'intensité pour des vecteurs de diffusion  $q < 1.3 \mu\text{m}^{-1}$  ( $8^\circ$ ). L'analyse est limitée à  $q > 0.1 \mu\text{m}^{-1}$  ( $0.3^\circ$ ) pour exclure le faisceau direct saturant la caméra. Une image est enregistrée toute les 20 secondes sur une période d'au moins 1h30. L'incertitude indiquée sur un résultat correspond à deux fois l'erreur type s'il s'agit d'une moyenne de mesures. S'il s'agit d'un coefficient obtenu par ajustement, l'incertitude représente l'intervalle de confiance à 95%.

# III.1

## FONCTION DE PHASE

### III.1.1 CELLULE UNIQUE : 0D

Pour étudier la lumière diffusée par les tissus, on peut commencer par observer le cas d'une cellule isolée. Ici, on observe une cellule au fond d'une boîte de pétri. La cellule n'a pas encore eu le temps d'adhérer au fond et est donc encore sphérique (III.1.1 a). La figure III.1.1 b présente la lumière diffusée, le fond ayant été soustrait et les plus petits angles coupés à cause du faisceau direct du laser (disque noir). En traçant le profil radial de l'intensité, figure III.1.1 c, on peut voir une bosse autours de  $q = 0.75 \mu\text{m}^{-1}$ , signature de la taille de la cellule. En effet, si on ajuste le profil pour  $q < 0.85 \mu\text{m}^{-1}$  par ce que donne une sphère de diamètre  $d$  :

$$I(\mathbf{q}) \propto |TF_{3D}\{Sphère_{d/2}\}|^2 \propto \left( \frac{\sin(|\mathbf{q}| d/2) - |\mathbf{q}| d \cos(|\mathbf{q}| d/2)/2}{(|\mathbf{q}| d/2)^3} \right)^2 \quad (1)$$

on obtient  $d = 14.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$ . Cette valeur correspond bien au diamètre mesuré en champ plein :  $15 \pm 1 \mu\text{m}$ .

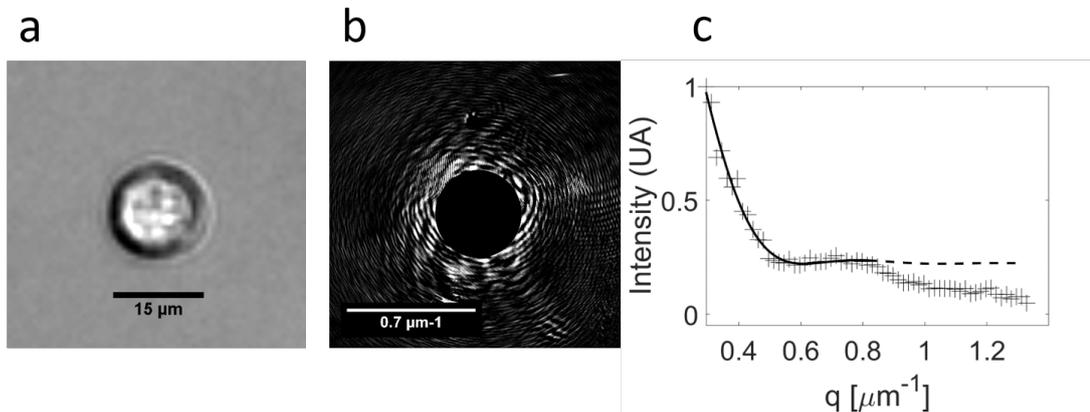


FIGURE III.1.1 – *Expérience sur cellule unique : (a) image champ plein et (b) lumière diffusée associée. (c) Profil angulaire de l'intensité (croix), obtenu en moyennant azimuthalement b, et ajustement avec l'équation 1 (ligne pleine).*

Pour des vecteurs de diffusion supérieurs à  $0.85 \mu\text{m}^{-1}$ , correspondant à des distances inférieures à  $7.4 \mu\text{m}$  dans l'espace direct, la description sphérique simplifiée n'est plus suffisante et l'ajustement ne correspond pas. C'est en effet à partir de ces angles que les composants internes, et notamment le noyau, diffusent une part non négligeable de la lumière. Ce résultat

tat justifie la plage de  $q$  mesurés par la suite ( $q < 1.3 \mu\text{m}^{-1}$ ), puisqu'on ne s'intéresse qu'à des structures supra-cellulaires.

### III.1.2 CELLULES EN LIGNES : 1D

Pour obtenir des cellules en lignes, un substrat particulier est préparé. Il s'agit d'une lamelle de verre sur laquelle est fabriqué un micro motif de surfaces sur lesquelles les cellules peuvent adhérer ou non. La surface non adhérente est couverte de pLL-PEG, tandis que la surface adhérente est couverte de fibronectine. La préparation, faite par Vanni Petrolli, suit la méthode décrite en détail dans [138], elle-même inspirée de [139].

L'exemple de cellules en lignes illustre clairement la transposition de la diffraction classique au cas des cellules (figure III.1.2). Les lignes de  $200 \mu\text{m}$  de long et  $10 \mu\text{m}$  de large sont séparées de  $50 \mu\text{m}$  et chacune rassemble une trentaine de cellule (figure III.1.2 a). Le motif crée ainsi une structure multicellulaire bien contrôlée. En observant la lumière diffusée par cette structure (figure III.1.2 b), on retrouve le résultat de l'expérience classique en diffraction des fentes d'Young. Les pics d'interférence visibles selon l'axe  $q_x$  sont séparés de  $\Delta q = 0.130 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$ , signature de la périodicité des lignes dans l'espace direct :  $\frac{2\pi}{\Delta q} = 48 \pm 2 \mu\text{m}$ .

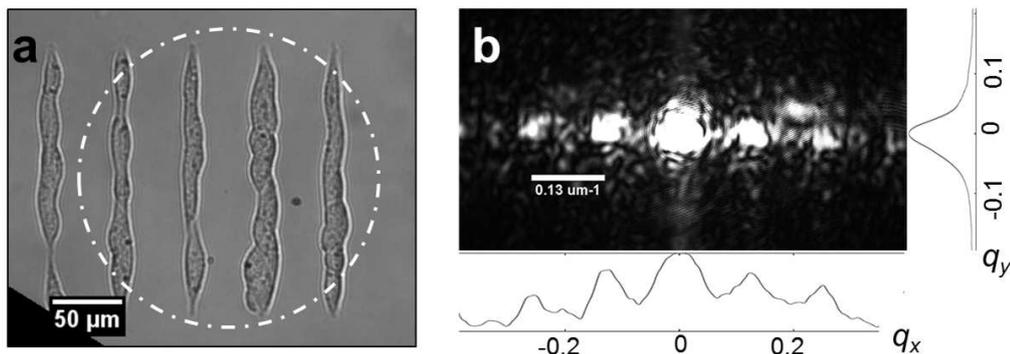


FIGURE III.1.2 – *Expérience sur cellules en lignes : (a) image champ plein et (b) lumière diffusée associée. Le cercle en pointillé indique la taille approximative du laser.*

### III.1.3 CELLULES DISPERSÉES SUR UNE SURFACE : 2D

Lorsque les cellules ne sont plus organisées selon un motif, mais dispersées sur la surface (III.1.3 A), la figure de diffraction est significativement différente (III.1.3 B). Comme il n'y a plus de structure dans l'échantillon, on ne retrouve pas non plus de structure dans la lumière diffusée, mais plutôt une distribution en grain qui semble aléatoire : une figure de speckle. En chaque point le champ résulte de la somme des champs diffusés par l'ensemble des cellules. Comme les phases ne sont pas coordonnées, les interférences sont destructives par endroit (sombre) et constructives en d'autres (lumineux). La taille des tâches de speckle est inversement proportionnelle à la taille de l'échantillon diffusant [140], ici fixée par la

taille du faisceau laser. Dans ce cas, la lentille L3 ainsi que l'objectif ont été retirés pour illuminer l'échantillon avec un faisceau plus large (écart type  $110 \mu\text{m}$ ).

L'intensité moyenne n'est pas uniforme dans la figure de speckle : elle décroît avec l'angle. On peut le voir plus clairement dans la figure III.1.3 C qui représente l'intensité moyennée azimutalement. Comme déjà observé en section II.3.2, le profil moyen dépend de l'organisation à petite échelle des cellules. Ici, il s'agit de leur forme et de la distance au premier voisin. Dans cette expérience, les cellules ont été observées avant d'être adhérentes, ce qui explique leur forme. Cette situation permet d'avoir des cellules peu dispersées en forme et donnant une signature plus nette en diffusion. On ne retrouve pas la bosse de la figure III.1.1 C à cause la dispersion en taille des cellules, mais on peut tout de même utiliser le même ajustement que le cas 1D (eq. 1). On obtient un diamètre  $d = 14.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , comparable à la moyenne des diamètres mesurée à partir de III.1.3 A :  $14.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ . Avec une mesure moins bruitée, on pourrait aussi retrouver la distribution de tailles [141], mais ce n'est pas l'objectif ici.

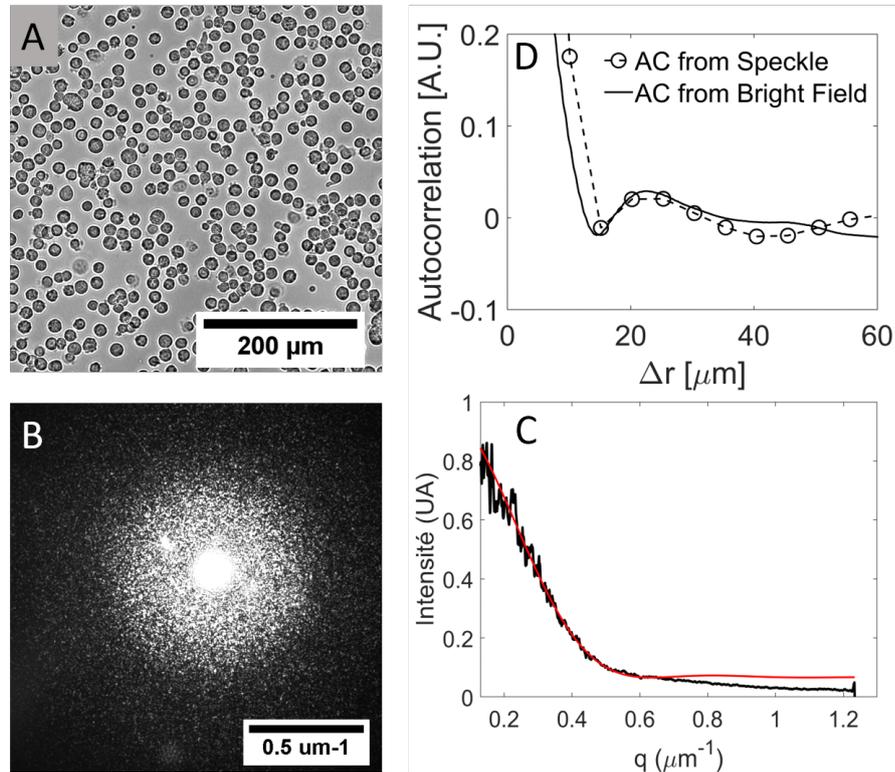


FIGURE III.1.3 – *Expérience sur cellules en monocouche : (A) image champ plein et (B) lumière diffusée associée. (C) Profil angulaire de l'intensité, obtenu en moyennant azimutalement B, et ajustement selon l'équation 1 (ligne rouge). (D) Autocorrélation de A, obtenue à partir de A (ligne pleine) et à partir de C par TF inverse (cercle vide et ligne pointillé).*

Lorsque les cellules sont éparées, leur position ne sont pas corrélées spatialement. Mais dans le cas d'une forte concentration surfacique, comme c'est le cas ici, une organisation entre cellules voisines apparaît. En calculant la TF inverse de l'intensité, on obtient la fonction d'autocorrélation de l'échantillon (figure III.1.3 D, ligne pointillé). On peut y voir

---

un maximum autours de  $\Delta r = 25 \pm 5 \mu m$  correspondant à la distance moyenne entre deux cellules voisines. Le calcul de l'autocorrélation de l'image plein champ donne un résultat similaire (ligne pleine), avec un maximum situé à  $\Delta r = 22.6 \mu m$ .

# III.2 DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE

Nous allons voir maintenant comment le motif que forme la lumière diffusée change au cours du temps. Comme indiqué dans la section II.3.3, la fonction de corrélation  $C$  caractérisant les fluctuations temporelles de l'intensité, est reliée aux déplacements  $\Delta\mathbf{r}$  des cellules selon la relation :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \left| \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(t+\tau)} \rangle \right|^2 = |TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \quad (1)$$

$C(\mathbf{q})$  est, pour un délai  $\tau$  fixé, le module carré de la transformée de Fourier de la distribution  $Pb(\Delta\mathbf{r})$  des distances parcourues pendant  $\tau$ . A travers les expériences 1D et 2D, cette section présente plusieurs méthodes pour caractériser et quantifier la dynamique des cellules à partir de la mesure de  $C$ .

Comme on mesure l'intensité diffusée sans avoir accès à la phase du champ électrique, on ne peut mesurer que les déplacements relatifs des cellules. Pour une cellule seule, l'intensité diffusée est la même quel que soit sa position. La DLS ne nous donne donc aucune information sur sa trajectoire. En revanche la dynamique des échantillons multicellulaires est mesurable par DLS, comme le montrent les exemples de ce chapitre.

## III.2.1 CELLULES SUR DES LIGNES : 1D

Pour que les cellule puissent se déplacer sur les lignes, elle y sont déposées en moindre quantité que dans la figure III.1.2 (figure III.2.1 A). En conséquence les pics de diffraction sont moins marqués et on voit bien apparaître les tâches de speckle (figure III.2.1 B) .

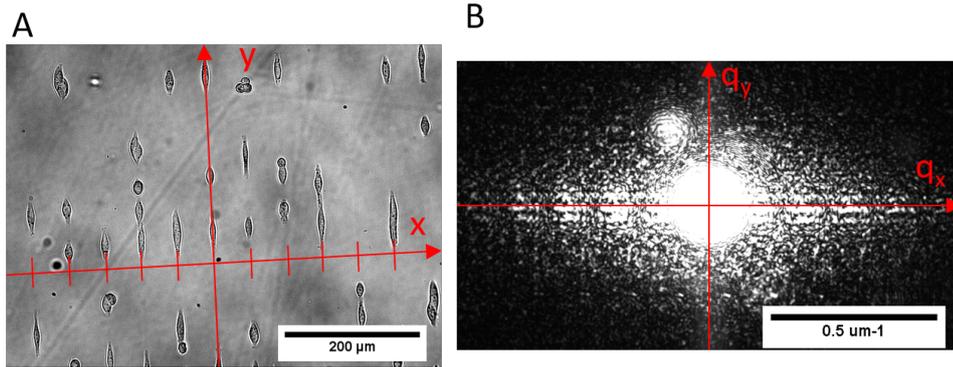


FIGURE III.2.1 – *Expérience sur cellules en lignes : (a) image champ plein et (b) lumière diffusée associée. Les deux axes principaux  $x$  et  $y$ , respectivement perpendiculaire et parallèle aux lignes, se retrouvent dans l'espace réciproque en  $q_x$  et  $q_y$ .*

### Temps caractéristique de décorrélation

Une première approche pour visualiser l'information contenue dans la fonction d'auto-corrélation  $C$  consiste à calculer le temps caractéristique de décorrélation de l'intensité  $\tau_{1/2}$  en fonction du vecteur de diffusion  $\mathbf{q}$ . On choisit  $\tau_{1/2}$  tel que  $C(\tau_{1/2}) = 1/2$ . Cette représentation permet de se faire une première idée de la dynamique de l'échantillon, rapidement et sans avoir à passer par un modèle ni par la TF. Considérons 3 exemples pour s'en rendre compte :

- Pour des cellule immobiles, le déplacement  $\Delta\mathbf{r}(\tau)$  est nul, ce qui donne  $\tau_{1/2}$  infini et indépendant de  $\mathbf{q}$ . En pratique il y a toujours de légères fluctuations et le temps de décorrélation n'est jamais infini.
- Pour des cellules se déplaçant en ligne droite avec une vitesse moyenne  $\bar{v}$ , leurs déplacements sont  $\Delta\mathbf{r}(\tau) = \mathbf{v}\tau$ . En introduisant cela dans la première partie de l'équation 1, on obtient un temps caractéristique  $\tau_{1/2} \propto 1/\bar{v}q$ .
- Enfin pour des cellules suivant une marche aléatoire brownienne avec un coefficient de diffusion  $D$ , le déplacement quadratique moyen est  $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 2D\tau$ . En conséquence, on a  $\tau_{1/2} \propto 1/Dq^2$ .

Dans les 3 cas, le temps caractéristique suit une loi de puissance :  $\tau_{1/2} \propto q^{-n}$  avec  $n$  égal à 0, 1 et 2 dans cet ordre. Tracer  $\tau_{1/2}$  en fonction de  $q$  permet donc de lire simplement le type de mouvement qu'ont les cellules, ainsi que l'ordre de grandeur du coefficient associé.

### Retour aux résultats

Revenons au cas des cellules se déplaçant sur des lignes pour appliquer cette méthode. L'anisotropie présente dans la figure d'interférence se retrouve dans la fonction d'autocorrélation  $C$ , comme le montre la carte des  $\tau_{1/2}$  en figure III.2.2 A. Dans cette figure,  $C$  est calculée et moyennée par groupes de 20x20 pixels. Ce nombre de pixels est choisi comme un compromis entre résolution et statistique. Ici, 20x20 pixels correspondent à environ 3 tâches de speckle.

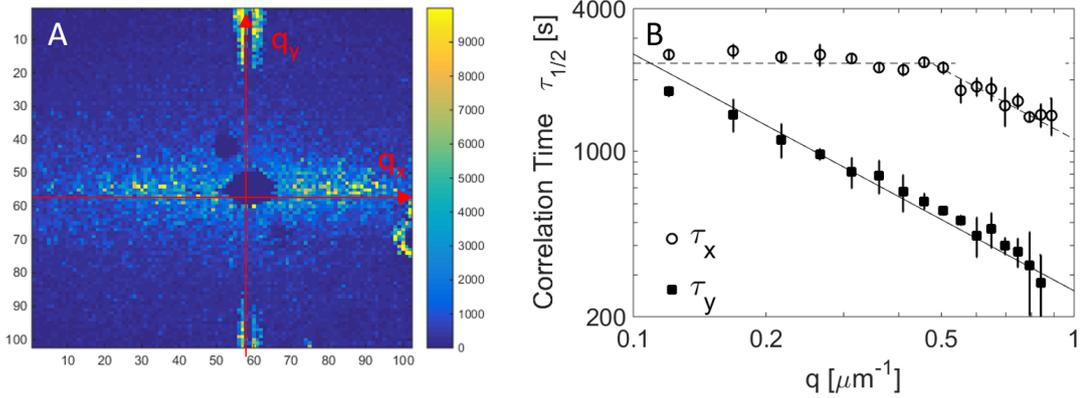


FIGURE III.2.2 – Temps caractéristique de décorrélation  $\tau_{1/2}$  calculé et moyenné par groupes de  $20 \times 20$  pixels (A) ou en fonction des directions  $q_x$  et  $q_y$  (B). Dans la figure A, les pixels saturant n'ont pas été analysés et apparaissent avec  $\tau_{1/2} = 0$ .

Si on trace  $\tau_{1/2}(q)$  selon les deux axes principaux  $q_x$ , perpendiculaire aux bandes, et  $q_y$ , parallèle aux bandes, on observe deux comportements différents (figure III.2.2 B). Pour obtenir ces courbes, seuls les pixels proches des axes sont pris en comptes : les résultats sont moyennés sur des rectangles de  $60 \times 40$  pixels (environ 18 tâches de speckle) centrés et orientés selon l'axe. Dans la direction  $q_y$ ,  $\tau_{1/2}$  décroît en  $q^{-1}$  (figure III.2.2 B, carrés pleins) indiquant un mouvement persistant le long des lignes (du moins pour des périodes inférieures à 2000 s). Si on ajuste  $\tau_{1/2}(q) = [q\bar{v}]^{-1}$ , on obtient une mesure moyenne de la vitesse  $\bar{v} = 10 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{h}$ . Cette mesure n'est cependant pas exacte puisqu'en réalité on a  $\tau_{1/2}(q) = \alpha [q\bar{v}]^{-1}$ , avec  $\alpha$  de l'ordre de 1.

Dans la direction  $q_x$ , on observe deux lois de comportement différentes, avec une transition à  $q = 0.55 \mu\text{m}^{-1}$ . Pour des vecteurs de diffusion inférieurs à cette valeur,  $\tau_{1/2}$  est indépendant de  $q$  (figure III.2.2 B, cercles vides). Ce résultat indique que les cellules ne bougent pas selon cet axe, à cause du confinement imposé par les bandes adhérentes. Néanmoins, pour  $q > 0.55 \mu\text{m}^{-1}$ , on remarque une baisse du temps de décorrélation.  $0.55 \mu\text{m}^{-1}$  correspond dans l'espace réel à  $11.5 \mu\text{m}$ , ce qui est très proche de la largeur des bandes ( $10 \mu\text{m}$ ). Cette observation est donc compatible avec un mouvement résiduel des cellules dans la direction perpendiculaire aux lignes, dans les limites du motif adhérent.

## III.2.2 CELLULES DISPERSÉE SUR UNE SURFACE : 2D

Comme en III.1.3, on observe des cellules au fond d'une boîte de pétri. Mais dans le cas étudié ici, les échantillons sont incubés une nuit avant observation pour que les cellules soient adhérentes. On prépare 4 échantillons à différentes concentrations pour observer des dynamiques différentes. Les boîtes de pétri de 35 mm de diamètre contiennent 150k, 300k, 600k et 1000k cellules (figure III.2.3). Lors de l'observation, les cellules occupent 15% (A), 36% (B), 53% (C) et 74% (D) de la surface respectivement.

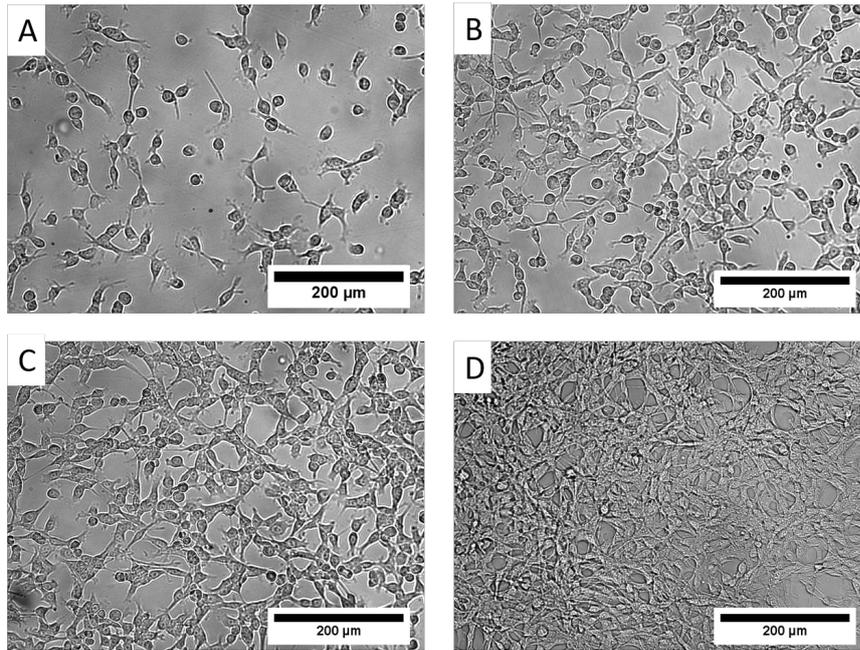


FIGURE III.2.3 – Image champ plein des cellules migrant au fond d’une boîte de pétri couvrant 15% (A), 36% (B), 53% (C) et 74% (D) de la surface.

Comme l’échantillon est isotrope, on peut effectuer une moyenne azimutale (norme de  $\mathbf{q}$  constante) pour n’étudier que le profil radial de la fonction de corrélation de l’intensité. En pratique, on moyenne sur des anneaux de largeur  $dq = 0.077\mu\text{m}^{-1}$ . Cette résolution angulaire  $dq$  est choisie par un compromis entre résolution et statistique. Ici, la surface d’un speckle est d’environ 650 pixels, si bien que les anneaux de pixels contiennent entre 230 speckles (au centre) et 890 speckles (à l’extérieur). En reprenant l’analyse expliquée dans la section précédente, on obtient les résultats présentés en figure III.2.4.

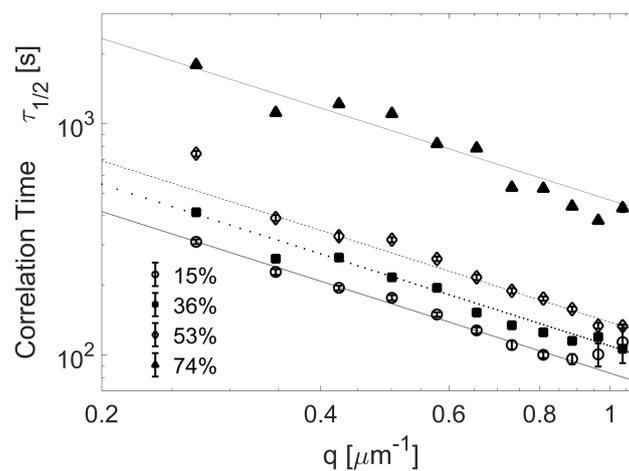


FIGURE III.2.4 – Temps caractéristique de décorrélation  $\tau_{1/2}$  en fonction du vecteur de diffusion  $q$ , pour des cellules en 2D avec une concentration allant de 15% à 74% de la surface. Les barres d’erreur correspondent à l’intervalle de confiance à 95% de l’ajustement. On remarque que le temps de décorrélation augmente avec la densité.

La première remarque est qu'on y lit une loi de puissance avec un exposant proche de -1 (lignes), pour n'importe quelle confluence. Cela signifie que les cellules ont un mouvement balistique pour les temps observés ( $\leq 1000$ s). En ajustant les points par  $\tau_{1/2}(q) = \alpha/q$ , on obtient une estimation de la vitesse moyenne des cellules avec  $1/\alpha$  (tableau III.2.1).

TABLE III.2.1 – *Estimation des vitesses moyennes des cellules :  $1/\alpha$ .*

Confluence	15 %	36%	55%	74%
$1/\alpha$ ( $\mu m/h$ )	$30 \pm 2$	$22.8 \pm 0.9$	$18.0 \pm 0.9$	$5.4 \pm 0.7$

Plus la couche de cellule est dense, plus la vitesse des cellules est petite. Il s'agit d'un effet bien connu d'inhibition de contact entre cellules (*Contact inhibition of locomotion* [142]) C'est parce que ce résultat était prévu qu'on a choisi d'observer différentes concentrations et mesurer ainsi différentes valeurs de vitesse, même s'il est vrai que cet effet peut être réduit dans le cas de cellules cancéreuses [143].

Le mouvement balistique observé peut être surprenant. Cela ne signifie pas que les cellules se déplacent uniquement en ligne droite, mais que pour des distances courtes le mouvement est persistant. En multipliant la vitesse par le temps caractéristique mesuré maximal, on obtient des distances maximales de l'ordre de  $3 \mu m$ . Or, si on observe les cellules en champ plein, on voit une marche aléatoire avec une persistance d'environ  $10 \mu m$ . Ainsi, le régime observé en figure III.2.4 correspond aux petites distances, ou aux temps courts, dominé par le mouvement persistant. Pour observer le régime brownien, il faudrait mesurer la fonction de corrélation d'intensité à des angles plus petits, correspondant à des distances plus grandes.

### Analyse par transformée de Fourier

Pour aller au-delà de l'approche semi-quantitative, on utilise les propriétés de la transformée de Fourier dans l'équation 1. On ne considère plus  $C(\tau)$  pour un  $q$  fixé, mais  $C(q)$  pour un  $\tau$  fixé, afin d'avoir le module carré de la transformée de Fourier de la distribution des distances parcourues pendant  $\tau$ .

$$C_\tau(\mathbf{q}) = |TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \quad (2)$$

Un exemple est donné en figure III.2.5 A, pour une mesure en 2D. A cause du module carré, une partie de l'information, la phase, est perdue. Sans cela, il suffirait de faire une TF inverse pour retrouver  $Pb(\Delta r)$ . Retrouver  $Pb(\Delta r)$  à partir de  $C$ , malgré la phase perdue est désigné comme un problème inverse mal posé. Ce problème est inhérent à la diffusion de lumière. Plusieurs méthodes de récupération de phase existent [144, 145], dans cette étude nous nous focalisons sur deux hypothèses permettant de résoudre ce problème.

1. On suppose que la distribution de déplacements est isotrope, qu'il n'y a pas de direction privilégiée. Dans le cas étudié ici, cette hypothèse ne pose pas de problème puisqu'il n'y a aucun gradient dirigeant le mouvement cellulaire. Cette hypothèse permet de dire que  $TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}$  est aussi isotrope. Comme par ailleurs  $Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})$  est une fonction

réelle,  $TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}$  est alors aussi réelle (voir section I.4.2). Le module carré devient simplement un carré et la seule information perdue est le signe :

$$\sqrt{C(\mathbf{q}, \tau)} = \pm TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\} \quad (3)$$

2. On suppose que les changements de signe sont visibles. Pour  $q = 0$  on a  $TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\} = 1$  puis s'il y a un changement de signe pour un  $q_0$  donné, cela se traduit par  $C(q_0) = 0$ . Si le cas se présente, ou il y a bien un changement de signe ou il s'agit d'un point de rebroussement. Il faut alors voir quelles sont les implications des deux possibilités et si possible les départager. Dans l'exemple donné en figure III.2.5 A et dans tous les résultats présentés dans cette thèse, le cas ne se présente pas.

Avec ces deux hypothèses, on obtient  $TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}$ , puis on effectue une TF inverse pour calculer  $Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})$ . La figure III.2.5 B montre l'exemple en partant de la mesure en A. La résolution  $d\Delta r$  est limitée par la plus grande valeur  $q_{max}$  accessible, selon la relation :  $d\Delta r = \pi/q_{max} = 3.14 \mu m$  (section I.4.2).

Quand cela est possible, on préférera *fitter*  $C(q)$  puis réaliser une TF inverse analytique, en gardant à l'esprit cette limite de résolution. L'annexe I présente quelques TF analytiques dans le cas de fonctions isotropes. Pour la figure III.2.5, l'ajustement a été fait avec une décroissance exponentielle dont la TF inverse est donnée dans la figure B. Pour avoir une meilleure représentation de la distance moyenne parcourue par les cellules pendant  $\tau$ , la figure C donne la distribution de l'amplitude des déplacements. Elle est obtenue à partir de  $Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})$  en multipliant par  $4\pi\Delta r^2$  car il s'agit d'une distribution 3D sphérique.

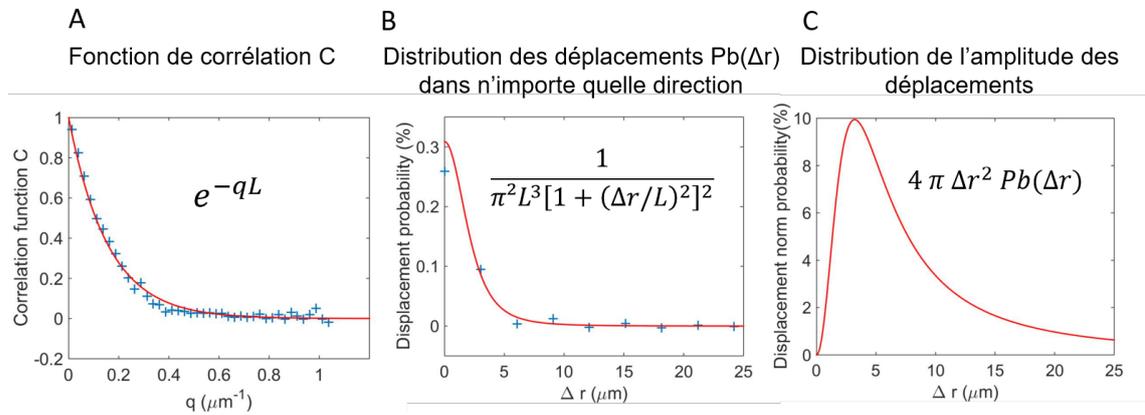


FIGURE III.2.5 – Fonction de corrélation  $C(q)$  obtenue pour un délai  $\tau = 40$  minutes (A). La TF inverse de la racine de cette fonction nous donne  $Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})$  (B). Pour représenter la distribution d'amplitude des déplacements, B est multipliée par  $4\pi\Delta r^2$  (C). A est ajustée par une exponentielle décroissante, avec  $L = 6.4 \pm 0.3 \mu m$ , ce qui donne ensuite pour B et C les expressions analytiques indiquées dans les cadres.

## Retour aux résultats

Voyons maintenant les résultats obtenus pour les échantillons présentés en figure III.2.3.

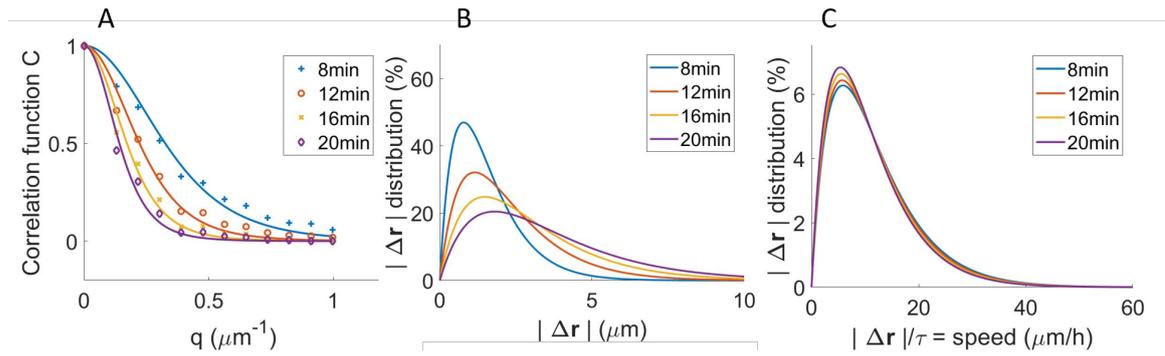


FIGURE III.2.6 – A : fonctions de corrélation  $C(q)$  obtenues pour des délais de 8, 12, 16 et 20 minutes. B : distributions d'amplitude des déplacements pour les mêmes délais. C : déplacements rapporté au délai  $\tau$ , i.e. déplacements par unité de temps ou vitesse.

La figure III.2.6 A présente la fonction de corrélation pour des délais allant de 8 à 20 minutes, dans le cas de l'échantillon à 36% de surface couverte par les cellules. Les fonctions C sont ajustées avec l'expression :

$$C(q) = \left[ 1 + \left( \frac{q\overline{\Delta r}}{2} \right)^2 \right]^{-3} \quad (4)$$

Cette équation a été choisie de manière empirique car elle ajuste correctement nos mesures. Comme indiqué plus haut, on en déduit la distribution d'amplitude des déplacements des cellules pour les délais correspondants en figure III.2.6 B. Le calcul analytique donne l'expression :

$$Pb(|\Delta r|) = \frac{4}{\overline{\Delta r}} |\Delta r| e^{-2\Delta r / \overline{\Delta r}} \quad (5)$$

et  $\overline{\Delta r}$  est la moyenne de  $|\Delta r|$ . La distribution s'étale avec le temps indiquant que les cellules parcourent une distance moyenne qui augmente avec  $\tau$  : 3.2  $\mu m$ , 4.6  $\mu m$ , 6.0  $\mu m$ , puis 7.2  $\mu m$ . Si on rapporte la distance au délai  $\tau$ , c'est-à-dire si on regarde la distance par unité de temps, donc la vitesse, on voit en figure III.2.6 C que les distributions se superposent. On retrouve donc le résultat trouvé en figure III.2.4 : le déplacement est proportionnelle au temps. On peut aussi réduire toutes les courbes à un seul paramètre : la vitesse moyenne  $\bar{v} = \overline{|\Delta r|}(\tau) / \tau$ .

Les résultats des autres échantillons donnent des courbes similaires, mais avec des vitesses différentes. La mesure de la vitesse n'est pas calculée qu'à partir de 4 courbes, mais est obtenue en ajustant simultanément toutes les courbes  $C(\tau, q)$  par :

$$C(\tau, q) = \left[ 1 + \left( \frac{q\tau\bar{v}}{2} \right)^2 \right]^{-3} \quad (6)$$

Pour les différentes concentrations, on obtient les vitesses indiquées dans la table III.2.2.

Pour vérifier ces mesures de vitesse, les trajectoires de 15 cellules pour chaque échantillon sont suivies sur les films en microscopie. Le *tracking* est fait à la main, en cliquant sur le centre de la cellule pour des images prises à 1 minute d'intervalle. La vitesse moyenne d'une

TABLE III.2.2 – Vitesses moyennes  $\bar{v}$  des cellules obtenues en ajustant  $C$ . L'erreur correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

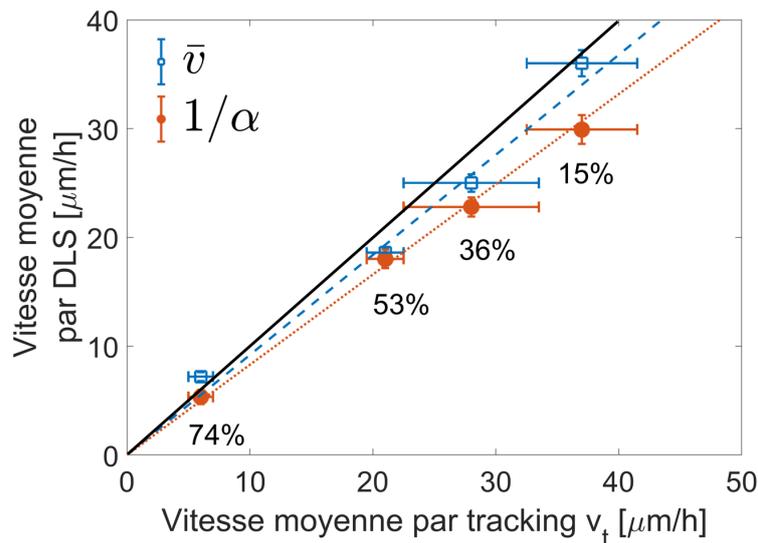
Confluence	15 %	36%	55%	74%
$\bar{v}$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$36.0 \pm 0.3$	$25.0 \pm 0.2$	$18.6 \pm 0.1$	$7.2 \pm 0.1$

cellule est obtenue en divisant la distance totale parcourue par le temps d'observation. La vitesse moyenne  $v_t$  pour un échantillon est ensuite calculée en moyennant les vitesses moyennes des 15 cellules suivies. Les résultats sont présentés dans le tableau III.2.3.

TABLE III.2.3 – Vitesses moyennes  $v_t$  des cellules obtenues par tracking.

Confluence	15 %	36%	55%	74%
$v_t$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$37 \pm 5$	$28 \pm 6$	$21 \pm 2$	$6 \pm 1$

La figure III.2.7 permet de comparer visuellement les 3 mesures de vitesses. La première estimation de vitesse  $1/\alpha$  et la vitesse obtenue par ajustement  $\bar{v}$  y sont représentées en fonction de la vitesse mesurée par *tracking*. Dans le cas de  $1/\alpha$ , les mesures relatives sont correctes : une régression linéaire (ligne pointillée) indique que la vitesse mesurée est bien proportionnelle à la vitesse réelle. En revanche les valeurs absolues sont systématiquement sous estimées de 17%. La ligne pleine signale le ratio 1 : 1 avec  $v_t$ .  $1/\alpha$  est une bonne estimation de la vitesse, même si elle ne permet pas d'avoir une mesure exacte à cause du pré-facteur inconnu. La mesure obtenue par ajustement suivant l'équation 6 permet de corriger l'erreur systématique. La régression linéaire donne une sous estimation de 8% (ligne pointillée) qui rentre dans les barres d'erreur.

FIGURE III.2.7 – Vitesses déduites de la DLS en fonction de la vitesse mesurée par tracking :  $\bar{v}$  obtenue par ajustement (carrés bleus vides) et  $1/\alpha$  (cercles oranges pleins). Les lignes pointillées correspondent aux régressions linéaires associées. La ligne pleine correspond la droite d'égalité avec  $v_t$ .

La mesure de vitesse par DLS est donc confirmée ici. Comparé au cas 3D, la DLS a un intérêt moindre en 2D puisqu'il est possible dans ce cas d'imager et de suivre les trajectoires des cellules. La DLS peut tout de même s'avérer avantageuse, notamment dans le cas d'une couche dense de cellule. En effet, dans cette situation le *tracking* n'est pas évident à la main et quasi impossible de manière automatisée. Le second avantage est de pouvoir observer une large population en prenant un laser large.

### III.2.3 ANALYSES ALTERNATIVES DE LA DLS

Cette courte section présente deux analyses alternatives de la fonction de corrélation  $C$ .

#### Déconvolution

La méthode de la section III.2.2 utilise 2 hypothèses pour passer de  $|TF\{Pb(\Delta r)\}|^2$  à  $Pb(\Delta r)$  (figure III.2.8 A) :

- $Pb(\Delta r)$  isotrope
- Possibilité de voir et prendre en compte les changements de signe dans  $TF\{Pb(\Delta r)\}$ .

Il existe une seconde méthode utilisant des hypothèses légèrement différentes (figure III.2.8 B) :

- $Pb(\Delta r)$  isotrope
- $Pb(\Delta r) = 0$  au dessus d'une distance maximale  $\Delta r_{max}$ .

Avec la première hypothèse, en effectuant une TF inverse, on obtient la fonction autocorrélation de  $Pb(\Delta r)$ , notée  $R_{Pb(\Delta r)}$ . Avec la seconde hypothèse,  $R_{Pb(\Delta r)}$  admet aussi une limite et on peut appliquer un algorithme de déconvolution [146]. Cette méthode est cependant plus compliquée à mettre en œuvre et est moins robuste à cause de l'algorithme. Remarque : passer par la transformée de Fourier pour effectuer la déconvolution reviendrait au cas de la méthode A.

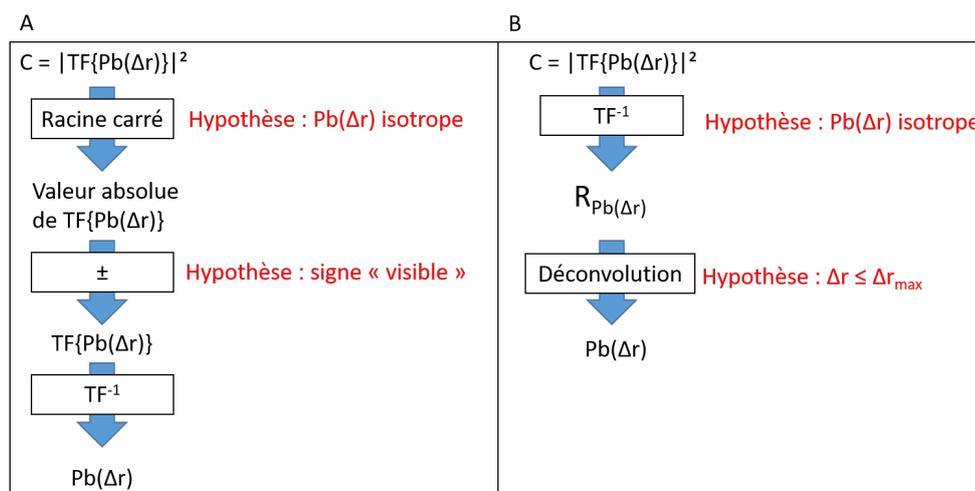


FIGURE III.2.8 – Diagramme résumé de l'analyse en section III.2.2 (A) et de la méthode alternative présentée ici (B).

### Calcul de moments

Cette sous section présente une méthode pour extraire le déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement* - MSD) des cellules à partir de  $C$  sans utiliser de TF inverse. On peut en effet obtenir la MSD des cellules pour un délai  $\tau$  donné à partir de  $TF\{Pb(\Delta r)\} \equiv g_1(\tau)$ . Plus généralement, on peut obtenir les moments des déplacements  $Pb(\Delta r)$ , en définissant le moment d'ordre  $n$   $M_n$  comme suivant :

$$M_n = \langle |\Delta r|^n \rangle_{\phi,t} \quad (7)$$

Pour cela, on reprend la relation :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}(\tau)} \rangle_{\phi,t} \quad (8)$$

En effectuant un développement de Taylor en 0 de l'exponentielle, on obtient :

$$\begin{aligned} g_1(\mathbf{q}, \tau) &= 1 + \sum_{k=1}^{\infty} \langle \frac{[-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}(\tau)]^k}{k!} \rangle_{\phi,t} \\ &= 1 + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\langle [\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}(\tau)]^k \rangle_{\phi,t}}{i^k k!} \end{aligned} \quad (9)$$

Pour une fonction isotrope en 2D, on peut montrer qu'on obtient :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = 1 + \sum_{k=1}^{\infty} M_k \frac{\int_0^{2\pi} \cos(x)^n dx}{i^k k!} q^k \quad (10)$$

Pour une fonction isotrope en 3D :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = 1 + \sum_{k=1}^{\infty} M_k \frac{(-1)^k + 1}{2i^k (k+1)!} q^k \quad (11)$$

$g_1$  s'exprime ainsi en polynôme de  $q$  dont les coefficients dépendent des moments. Pour obtenir la MSD, i.e.  $M_2$ , on ajuste  $g_1$  avec un polynôme de degré 2 au voisinage de  $q = 0$ . Pour que l'ajustement soit fiable, il faut avoir suffisamment de points qui satisfassent  $q \ll \frac{1}{\langle |\Delta r| \rangle_{\phi,t}}$ . Pour le cas 2D, le polynôme est :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = 1 - \frac{MSD}{4} q^2 \quad (12)$$

Pour le cas 3D :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) = 1 - \frac{MSD}{6} q^2 \quad (13)$$

Cette méthode permet d'obtenir la MSD sans avoir à faire une TF inverse numérique qui peut produire des artefacts, ou une TF inverse théorique qui suppose un modèle pour  $g_1$ . Elle est aussi avantageuse dans le cas où le champ de vue en angle n'est pas assez large pour obtenir une mesure complète de  $g_1(\mathbf{q})$ . On remarquera qu'on ne peut cependant pas calculer  $\langle |\Delta r| \rangle_{\phi,t}$  pour les fonctions isotropes.

# IV

Effet de la pression sur la motilité  
cellulaire au sein d'un sphéroïde

Cette partie est consacrée à l'application de la diffusion de lumière sur les sphéroïdes. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les techniques d'imagerie ne permettent pas de pénétrer en profondeur ( $>100 \mu m$ ) dans nos sphéroïdes. La DLS prend donc tout son intérêt dans l'étude de ces échantillons 3D. Certaines différences avec le cas 2D sont à prendre en compte, elles seront abordées dans le premier chapitre. L'objectif est de répondre à la problématique posée en introduction : comment la pression affecte-t-elle les mouvements des cellules au sein du sphéroïde ? L'intérêt porté à cette question provient d'un paradoxe apparent dans la littérature. D'une part, lorsqu'une population cellulaire est dense, l'inhibition de contact réduit le déplacement des cellules (*contact inhibition of locomotion*). La partie précédente l'a montré en 2D, et on sait que la pression augmente la densité cellulaire dans les sphéroïdes [26, 25]. On peut donc s'attendre à une diminution des déplacements des cellules dans les sphéroïdes sous pression. D'autre part, il a été observé qu'une pression ( $\sim 2kPa$ ) induisait une plus grande mobilité des cellules en surface ( $<20 \mu m$ ) du sphéroïde [26], leur conférant un phénotype plus invasif [14]. Pour mieux comprendre cette opposition, il faut aller au-delà des cellules de la surface et mesurer ce qu'il se passe à l'intérieur du sphéroïde. Y retrouve-t-on cette augmentation des déplacements cellulaires ?

### Méthodes spécifiques

Les sphéroïdes sont préparés comme indiqué en section II.1.3. En résumé, on dépose des cellules dans des plaques de 96 puits comportant un coussin d'agarose. Par gravité, les cellules tombent au fond du puits, glissent sur le gel d'agarose et se rassemblent pour former une sphère. Des sphéroïdes de deux tailles sont préparés :  $\sim 250 \mu m$  de diamètre après 3 jours d'incubation et  $\sim 500 \mu m$  de diamètre après 7 jours d'incubation (figure IV.2.9). Les cellules utilisées sont les mêmes que celles des expériences en 2D, avec cette fois une structure 3D.

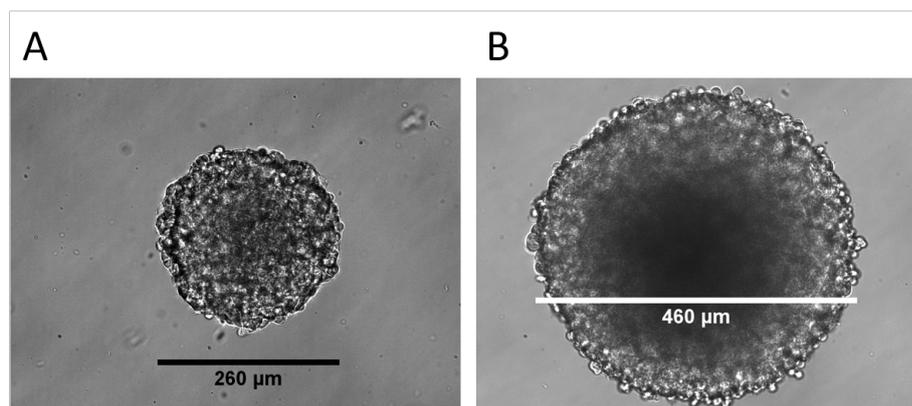


FIGURE IV.2.9 – Microscopie d'un sphéroïde de  $260 \mu m$  de diamètre (A) et  $460 \mu m$  de diamètre (B).

L'expérience consiste ensuite à enregistrer la lumière que les sphéroïdes diffusent en fonction de la pression à laquelle ils sont soumis. Pour les observer, ils sont déposés individuellement dans des boîtes de pétri prétraitées avec de la poly-L-lysine et remplies avec 2mL de milieu avec Dextran. Les molécules de Dextran ne pénètrent pas dans le sphéroïde

et exercent une pression à sa surface. La gamme de pression étudiée correspond en ordre de grandeur à la pression que peut exercer et subir en retour une tumeur en croissance vis-à-vis des tissus environnants [70]. La table IV.2.4 donne l'équivalence entre les concentrations de Dextran utilisées selon les pressions appliquées.

TABLE IV.2.4 – *Concentration en Dextran utilisée pour obtenir la pression souhaitée.*

Pression (kPa)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	25
Concentration (g/L)	0	37.0	54.8	68.8	78.4	87.5	95.5	102.6	109.2	120.9

Avant observation, les échantillons ainsi préparés sont incubés 1h pour deux raisons. La première est de permettre au sphéroïde d'attacher correctement au fond de la boîte de pétri. La seconde est de passer la période transitoire de l'effet du Dextran sur le sphéroïde. La mesure est ainsi faite en régime stationnaire, ce qui permet d'effectuer une moyenne sur la durée de l'expérience (1h30 pour les petits sphéroïdes, 2h30 pour les gros). Pour vérifier que ce régime est atteint, on calcule la corrélation de l'intensité non moyennée sur le temps, comme indiqué en fin de section II.3.3. En fonction du résultat obtenu, on supprime de l'analyse le début de l'acquisition, jusqu'à 1h pour les gros sphéroïdes.

Le montage utilisé pour observer la lumière diffusée est celui présenté en section II.2.1, appelé "premier montage". L'échantillon est illuminé par un laser de longueur d'onde  $\lambda = 850$  nm passant la lentille L1 (+150 mm) puis la lentille L2 (+30 mm). A l'exception du chapitre IV.1, le profil gaussien du laser a pour écart type  $96 \pm 6 \mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon. Afin de réduire la lumière parasite, le filtre infrarouge et l'objectif du microscope sont retirés lors de l'acquisition de la lumière diffusée. En conséquence, il n'est plus possible d'avoir l'image en microscopie simultanément. La caméra est placée à 87.5 mm de l'échantillon, ce qui permet de mesurer l'intensité pour des vecteurs de diffusion  $q < 0.9 \mu\text{m}^{-1}$  ( $7^\circ$ ). L'analyse est limitée à  $q > 0.1 \mu\text{m}^{-1}$  ( $0.3^\circ$ ) pour exclure le faisceau direct saturant la caméra. Une image est enregistrée toute les 20 secondes sur une période d'au moins 1h30. L'incertitude indiquée sur un résultat correspond à deux fois l'erreur type s'il s'agit d'une moyenne de mesures. S'il s'agit d'un coefficient obtenu par ajustement, l'incertitude représente l'intervalle de confiance à 95%.

Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées avec Vincent Lévy, élève stagiaire en deuxième année de master.

## Plan

Le premier chapitre traite de la différence principale entre 2D et 3D : la diffusion multiple. Les chapitres 2 et 3 présentent les résultats obtenus pour la taille et la vitesse des cellules en fonction de la pression. La question de l'inhomogénéité spatiale des vitesses dans le sphéroïde est abordée en chapitre 4. Le chapitre 5 interroge le rôle de la matrice extracellulaire dans la sensibilité à la pression. Le dernier chapitre propose des pistes pour utiliser la DLS dans des échantillons plus épais que ceux étudiés dans cette partie.

# IV1

## DIFFUSION MULTIPLE

Le passage d'un échantillon 2D à un échantillon 3D pose la question de la diffusion multiple. En effet, l'hypothèse de diffusion simple est nécessaire dans les calculs présentés en chapitre II.3. Dans ce chapitre, nous allons quantifier la diffusion multiple dans les sphéroïdes et décrire qualitativement son effet sur les mesures statiques et dynamiques. On en déduira une épaisseur de sphéroïde limite pour notre analyse et on verra une piste analytique pour aller au-delà.

### IV.1.1 MESURE DU LIBRE PARCOURS MOYEN (*Mean Free Path*)

La proportion de photons subissant une diffusion multiple dépend de la distance moyenne que parcourt un photon avant d'être diffusé : le libre parcours moyen ou *mean free path* (MFP). Pour mesurer le MFP, on utilise la loi de Beer-Lambert qui caractérise la perte d'intensité  $I$  dans la direction du faisceau laser en fonction de la longueur  $L$  du milieu traversé :

$$I(L) = I(0)e^{-\mu L} \quad (1)$$

où  $\mu$  est le coefficient d'extinction.  $\mu$  est la somme du coefficient d'absorption  $\mu_a$  et du coefficient de diffusion  $\mu_s$ . Dans les tissus biologiques, l'absorption est faible dans le visible, contrairement à la diffusion [48]. On a donc  $\mu_a \ll \mu_s$ , et  $\mu \approx \mu_s$ . Le *Mean Free Path* est l'inverse de  $\mu_s$  :

$$MFP = \frac{1}{\mu_s} \quad (2)$$

La mesure du MFP consiste donc à mesurer le rapport entre l'intensité entrant dans un sphéroïde de diamètre  $D$  et l'intensité non diffusée qui en ressort, puis de calculer :

$$MFP = \frac{-D}{\ln(I(D)/I(0))} \quad (3)$$

Pour mesurer le rapport  $T = I(D)/I(0)$ , on mesure l'intensité parvenant à la caméra avec et sans le sphéroïde. L'intensité totale mesurée sans échantillon nous donne la référence  $I(0)$ . Pour le cliché avec échantillon, il faut mesurer la lumière qui n'a pas été diffusée en la distinguant de celle qui l'a été.

Il faut faire la distinction entre la diffusion interne et celle de surface. La forme sphérique de l'échantillon va induire une diffraction à la surface du sphéroïde qui ne caractérise pas la diffusion interne du tissu, celle que l'on cherche. Ainsi, l'intensité correspondant à ce que donnerait un sphéroïde homogène est comptées comme intensité non diffusée. On prend

donc l'intégrale de l'intensité correspondant à ce profil. En pratique, on prend la somme de l'intensité contenue dans un disque centré sur  $q = 0$  et comportant la majorité de l'intensité non diffusée. De plus, on soustrait l'intensité du fond en la mesurant à grand angle. On obtient ainsi le rapport  $T = I(D)/I(0)$ . La figure IV.1.1 montre un exemple où les anneaux obtenus par la diffraction d'une sphère sont bien visibles.

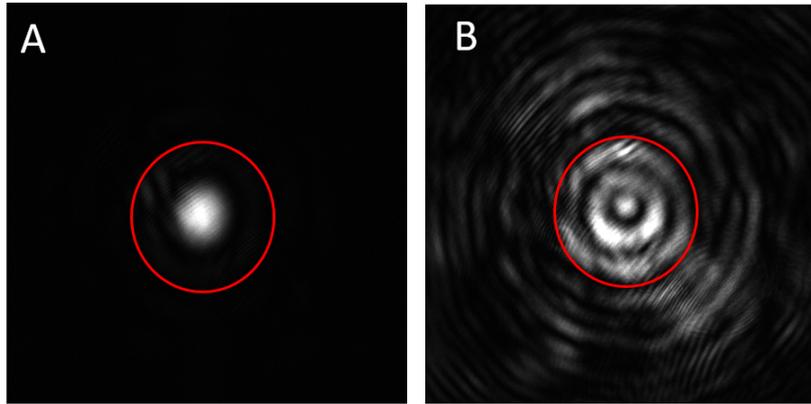


FIGURE IV.1.1 – Intensité mesurée du faisceau laser sans (A) et avec (B) le sphéroïde. Le disque rouge indique la surface sur laquelle l'intensité est sommée pour obtenir l'intensité non diffusée.

Pour déduire le MFP de  $T$ , on ne peut pas utiliser directement l'équation 3. Le laser étant large, l'épaisseur traversée n'est pas celle du diamètre en tout point et il y a même une certaine proportion de la lumière qui passe à côté du sphéroïde. Il est donc nécessaire d'effectuer une intégrale dans le plan de l'échantillon en prenant en compte la taille du sphéroïde et celle du faisceau laser. Le calcul est présenté en annexe F et fournit la proportion de photons non diffusés (et diffusés  $k$ -fois) en fonction du MFP. Comme il n'y a pas de solution analytique, pour obtenir le MFP, on cherche la valeur donnant la proportion  $T$  mesurée. Les résultats présentés dans le tableau IV.1.1 ont été obtenus pour des faisceaux Gaussien d'écart-type  $\sigma = 21.3 \pm 0.2 \mu m$  pour  $\lambda = 633 nm$  et  $\sigma = 26.0 \pm 0.2 \mu m$  pour  $\lambda = 850 nm$ .

TABLE IV.1.1 – Calcul de la MFP pour les longueurs d'onde 633 nm et 850 nm, fait selon l'annexe F.

Longueur d'onde (nm)	Diamètre du sphéroïde ( $\mu m$ )	ratio T	MFP ( $\mu m$ )
633	146.2	0.097	55.2
	221.8	0,0254	57.8
	273.2	0.0089	56.3
850	146.2	0,210	75.0
	221.8	0,0813	82.6
	273.2	0.0247	70.8

En moyenne, on obtient pour le laser 633nm  $56.4 \pm 0.8 \mu m$ , où l'erreur est l'erreur type. Pour le laser infrarouge 850nm, on a  $76 \pm 4 \mu m$ . On remarque que notre cas, la MFP est proportionnelle à  $\lambda$ .

Le calcul de l'annexe F permet aussi d'obtenir la proportion de photons diffusés  $k$ -fois. On

peut ainsi vérifier l'hypothèse de la diffusion simple. La figure IV.1.2 présente la proportion de photons diffusés  $k$  fois pour deux tailles de sphéroïdes et deux longueurs d'onde.

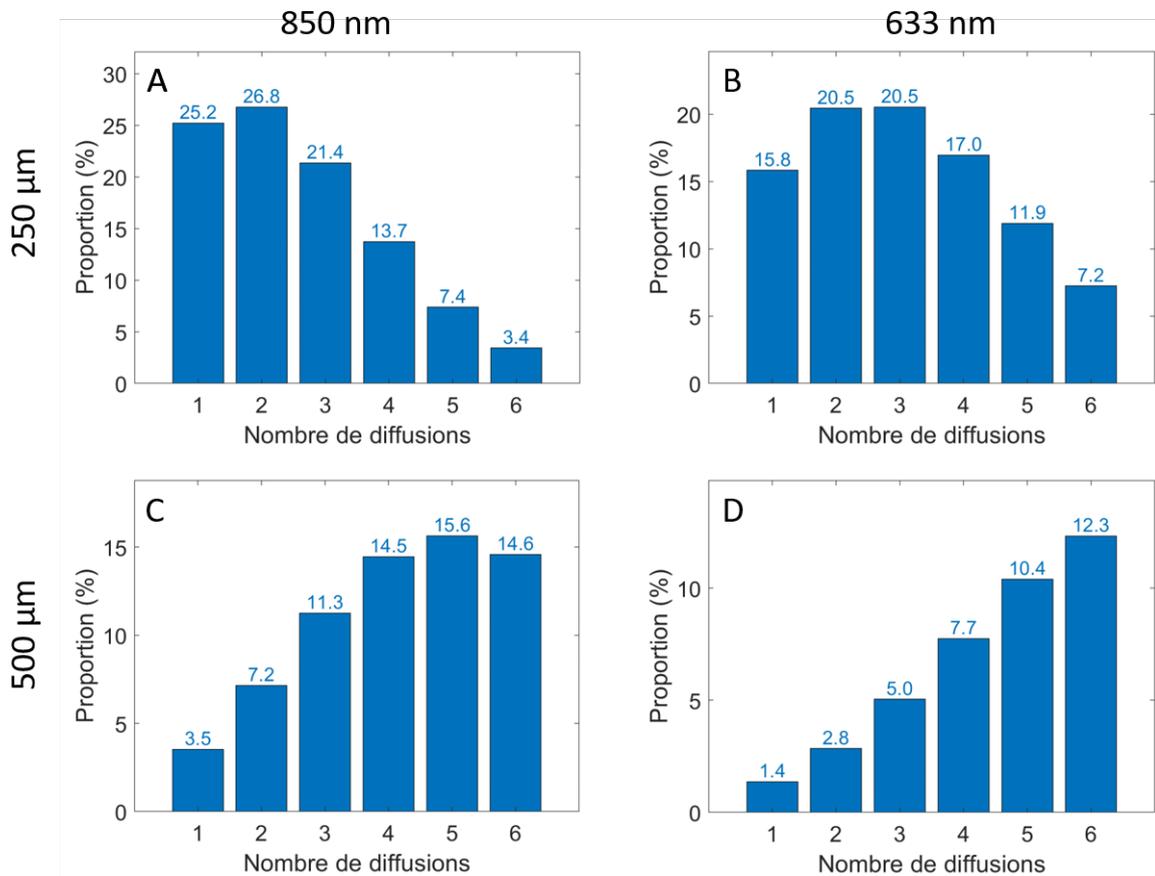


FIGURE IV.1.2 – Proportion de photons diffusés  $n$  fois pour  $n$  allant de 0 à 6. Il s'agit de la proportion de la lumière diffusée, la lumière non diffusée n'est pas comptée. Résultats calculés pour une longueur d'onde de 850 nm (A et C) et 633 nm (B et D) avec pour MFP  $76\mu\text{m}$  et  $56.4\mu\text{m}$  respectivement. Le faisceau laser gaussien est caractérisé par un écart type  $\sigma = 100\mu\text{m}$ , le sphéroïde a un diamètre de  $250\mu\text{m}$  (A et B) ou  $500\mu\text{m}$  (C et D).

D'après les résultats du calcul, l'hypothèse de diffusion simple n'est pas vérifiée pour les sphéroïdes étudiés dans la suite ( $250$  et  $500\mu\text{m}$  de diamètre). Même pour le cas le plus favorable ( $250\mu\text{m}$  de diamètre et  $\lambda = 850\text{nm}$ ), la diffusion simple ne représente que 25% de la lumière diffusée. Comme prévu, utiliser un laser infrarouge permet d'améliorer la situation, mais pas de manière radicale. Agrandir la taille du sphéroïde décroît considérablement la proportion de photons diffusés une seule fois.

Il faut en réalité prendre aussi en compte l'angle moyen de chaque diffusion. En effet, la grandeur qui importe pour la DLS est le parcours libre moyen de transport des photons dans le tissu (*transport mean free path* - TMFP), comme nous allons le voir à travers la section suivante.

## IV.1.2 IMPACT DE LA DIFFUSION MULTIPLE ET LIMITE D'ÉPAISSEUR

La diffusion multiple n'a pas le même effet sur la DLS que sur la microscopie d'imagerie, telle que la microscopie confocale. Pour cette dernière, la diffusion simple et multiple empêchent la focalisation correcte de la lumière, à l'excitation comme à la détection (voir section I.3.2). Pour le cas de la DLS, on ne cherche pas à rejeter les photons hors focus puisqu'on sonde l'intégralité du sphéroïde en même temps. Ainsi le problème de la focalisation et de la conjugaison de plan ne se pose pas. En revanche, s'il y a des photons diffusés plusieurs fois, deux effets vont perturber la mesure (voir figure IV.1.3).

- Le premier est qu'un photon diffusé deux fois, par exemple, sera affecté par le mouvement des deux diffuseurs. Pour donner une représentation simplifiée, si deux cellules bougent en sens inverse, la vitesse mesurée équivalente est double si interprétée comme la vitesse d'une seule cellule.
- Le second effet est une perte de résolution angulaire dans le signal capté. En effet, comme on peut le voir dans la figure IV.1.3, des photons issus d'angles de diffusion différents (ici  $\theta$  et  $-\alpha$  suivi de  $(\alpha + \theta)$ ) seront au sortir orientés dans la même direction. On aura ainsi une convolution du signal en diffusion simple par une fenêtre d'une certaine taille angulaire.

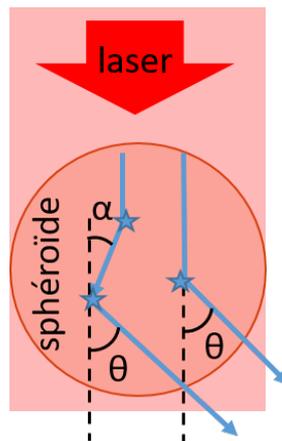


FIGURE IV.1.3 – Schéma de la diffusion simple (à droite) et double (à gauche) dans un sphéroïde illuminé par un laser.

Les deux effets néfastes de la diffusion multiple sont en réalité limités par la faible dispersion angulaire de la diffusion. En effet, pour des cellules la lumière est principalement diffusée vers l'avant ce qui signifie que statistiquement la majeure partie des diffusions doubles sera en fait constituée d'au moins une diffusion vers l'avant. Dans ce cas, les deux erreurs induites par la diffusion double sont annulées. En effet, pour la première, la diffusion n'engendre pas de modification du chemin optique et est donc transparente. Pour la deuxième erreur, on comprend sur le schéma IV.1.3 que  $\alpha$  est nul dans ce cas. Ainsi ce qui compte effectivement pour la DLS, c'est bien la TMFP et pas simplement la MFP.

Le TMFP correspond à la distance moyenne que parcourt un photon dans le tissu avant

de perdre son orientation. Il dépend du MFP et de l'angle moyen de diffusion par la relation :

$$TMFP = \frac{MFP}{1 - g} \quad (4)$$

où  $g$  est le facteur d'anisotropie (la figure IV.1.4 montre un exemple) :

$$g = 2\pi \int_0^\pi P(\theta) \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (5)$$

Où  $P$  est la fonction de phase.

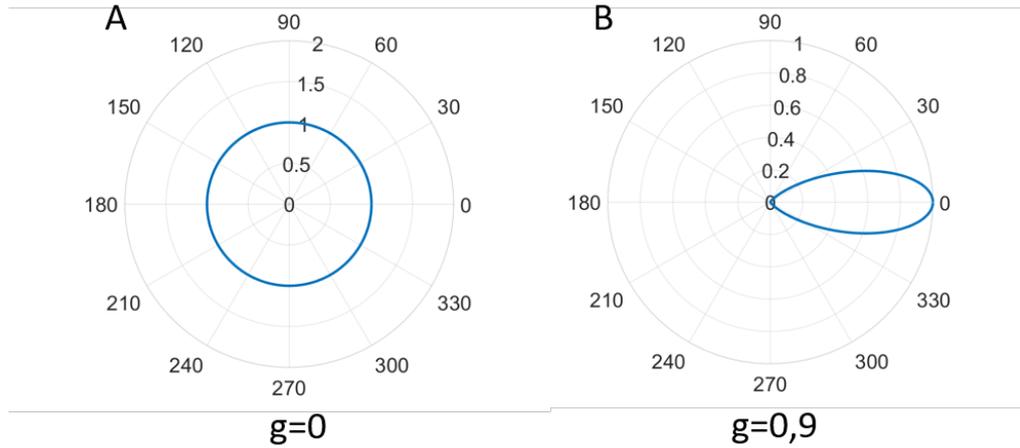


FIGURE IV.1.4 – Schémas montrant l'exemple d'une fonction de phase isotrope (A) et d'une fonction de phase principalement dirigée vers l'avant (B) avec leur facteur d'anisotropie associé.  $0^\circ$  indique la direction avant,  $180^\circ$  indique la direction arrière.

Ainsi, si la diffusion est principalement vers l'avant,  $g \approx 1$  et  $TMFP \gg MFP$ .  $g$  n'a pas été mesuré avec nos sphéroïdes car il faut capter la lumière diffusée à tous les angles, ce que ne permet pas notre montage. Mais on sait tout de même que dans les tissus,  $g$  est généralement compris entre 0.85 et 0.95 [47, 86]. Il y a donc un facteur 10 entre le MFP et le TMFP, donnant un TMFP de l'ordre de  $560 \mu m$  pour  $\lambda = 633 \text{ nm}$  et  $760 \mu m$  pour  $\lambda = 850 \text{ nm}$ . Comme il s'agit de la distance pour laquelle l'orientation est perdue, on prendra plutôt comme limite un maximum de 5 diffusions. Le calcul en annexe F permet d'obtenir une estimation de l'épaisseur limite dans la géométrie des sphéroïdes. Si on souhaite avoir plus de 80% de photons diffusés 5 fois ou moins, cela correspond à un diamètre  $D$  de  $260 \mu m$  avec  $633 \text{ nm}$  et  $360 \mu m$  avec  $850 \text{ nm}$  (le calcul est fait pour un faisceau gaussien d'écart type  $\sigma$  tel que le  $4\sigma = D$ ). A titre de comparaison, les microscopies confocale et deux photons, qui utilisent les photons non diffusés atteignent une profondeur de  $90 \mu m$  avec  $633 \text{ nm}$  et  $120 \mu m$  avec  $850 \text{ nm}$ , si on accepte 80% de photons diffusés 2 fois ou moins. Cette limite correspond à ce qui est observé en figure I.1.1 de l'introduction (9). De plus, en microscopie confocale, la lumière doit traverser l'échantillon deux fois, contrairement à la DLS.

Il faut noter que dans le cas où l'échantillon est plus épais que cette limite, la DLS donne toujours un signal fort, mais à cause de la diffusion multiple, la mesure n'est plus fiable en valeur absolue. Elle reste cependant utilisable en mesure relative, à proportion de diffusion multiple égale, comme par exemple à taille de sphéroïde égale.

**conclusion**

En conclusion, la limite d'épaisseur pour conserver l'analyse faite en chapitre II.3 est de  $360 \mu m$  pour une longueur d'onde de  $850 \text{ nm}$ . Dans la suite, on observera la lumière diffusée par des sphéroïdes de deux diamètres différents :  $250 \mu m$  et  $500 \mu m$ . Dans le premier cas, on fera l'hypothèse de diffusion simple pour  $\lambda = 850 \text{ nm}$ . Dans le second, la limite définie ici étant dépassée, on considèrera les mesures comme relatives et non absolues.

# IV2 TAILLE ET PRESSION

## IV.2.1 FONCTION DE PHASE

De même que dans le cas des échantillons sur boîte de pétri, le profil angulaire de diffusion, ou fonction de phase, nous renseigne sur la structure du sphéroïde. Comme il n'y a pas de structure à longue portée, on cherchera uniquement à mesurer la taille des cellules à l'intérieur des agrégats. Dans la lumière diffusée, la taille et la forme des cellules se retrouvent dans le facteur de forme, c'est-à-dire les basses fréquences de la fonction de phase. Au contraire, les hautes fréquences, les tâches de speckle, proviennent du positionnement relatif des cellules. On cherchera donc à lisser les fluctuations provenant des tâches de speckle en réalisant une moyenne azimutale de l'intensité mesurée.

La principale difficulté dans cette mesure est la présence du faisceau direct aux petits angles. Comme indiqué en section II.2.1, la présence de lumière parasite nécessite d'ajuster la taille du faisceau laser à celle de l'échantillon. Or, pour un échantillon éclairé par un laser de diamètre  $4\sigma$ , le faisceau direct sur la caméra sera de diamètre  $4/\sigma$ . Pour réduire l'impact du faisceau direct sur la mesure, on peut tenter de le soustraire. Pour cela, on mesure le profil laser  $I_L$  sans échantillon et le coefficient de transmission  $T$  pour prendre en compte que ce profil est atténué en passant à travers le sphéroïde. On soustrait ensuite  $TI_L$  à la fonction de phase pour supprimer la composante du faisceau direct. En pratique, à cause de la diffraction du faisceau à la surface du sphéroïde (voir section précédente), on ne soustrait pas exactement le bon profil angulaire. En conséquence, on limitera la mesure de l'intensité diffusée par le sphéroïde à  $q > 0.15\mu m^{-1}$ . L'effet du vignettage a été corrigé en divisant par  $\cos(\theta)^3$ .

Pour présenter l'analyse réalisée sur les fonctions de phases de tous les sphéroïdes, voyons un exemple. La figure IV.2.2 présente le profil angulaire, moyenné selon l'azimut, mesuré pour un sphéroïde de diamètre  $D = 146 \mu m$  avec  $\lambda = 850 \text{ nm}$ , et un faisceau de taille  $\sigma = 26.0 \pm 0.2 \mu m$ . Cette mesure a été choisie pour caractériser le profil angulaire car la diffusion multiple y est minimale (petit sphéroïde et  $\lambda = 850 \text{ nm}$ ). De plus, la mesure a été faite avec le montage avec lentille (section II.2.2), ce qui réduit la taille du faisceau direct. L'objectif n'est pas de décrire exactement le profil angulaire, comme ça a été fait dans [86, 87], mais d'y trouver une signature de la taille des cellules à l'intérieur du sphéroïde. Dans les tissus ou les cellules jointives, la diffusion de la lumière provient principalement des noyaux mais le cas des sphéroïdes étudiés ici est différent. En effet, les cellules ne sont pas jointives mais entourées de matrice extracellulaire et de fluide interstitiel, dont l'indice optique diffère

de celui des cellules. Il y a donc un contraste d'indice à la surface des cellules et ce contraste se retrouve dans la lumière diffusée. Pour extraire de l'intensité cette information sur la taille des cellules, j'ai choisi un ajustement relativement simple. Les petits angles ( $q < 0.4\mu\text{m}^{-1}$ ) correspondent à la lumière diffusée par l'interface cellule/milieu extracellulaire et le signal est bien ajusté par une gaussienne. Aux angles plus grands ( $q > 0.5\mu\text{m}^{-1}$ ), les autres contributions à la diffusion ne sont plus négligeables et la gaussienne ne suffit pas. J'ai choisis de manière empirique d'ajuster le signal à ces angles par une fonction de Henyey-Greenstein. Cette fonction est souvent utilisée pour décrire la diffusion des tissus [47, 86], son expression est :

$$HG(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2g\cos(\theta)]^{3/2}} \quad (1)$$

La figure IV.2.1 présente en exemple la fonction de Henyey-Greenstein pour  $g = 0.9$  et  $\lambda = 0.850$  nm.

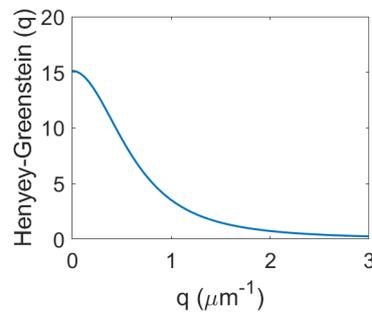


FIGURE IV.2.1 – Fonction de Henyey-Greenstein pour  $g = 0.9$  et  $\lambda = 850$  nm.

Pour ajuster tous les angles simultanément, j'ai choisi d'utiliser l'expression :

$$I(q) = \frac{A}{2\pi} e^{-\frac{q^2}{2\sigma^2}} + \frac{B}{4\pi} \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2g\cos(2a\sin(\frac{\lambda q}{4\pi}))]^{3/2}} \quad (2)$$

en faisant l'hypothèse au premier ordre que la lumière diffusée par l'interface cellule/milieu et celle décrit par la fonction de Henyey-Greenstein se somment en intensité.

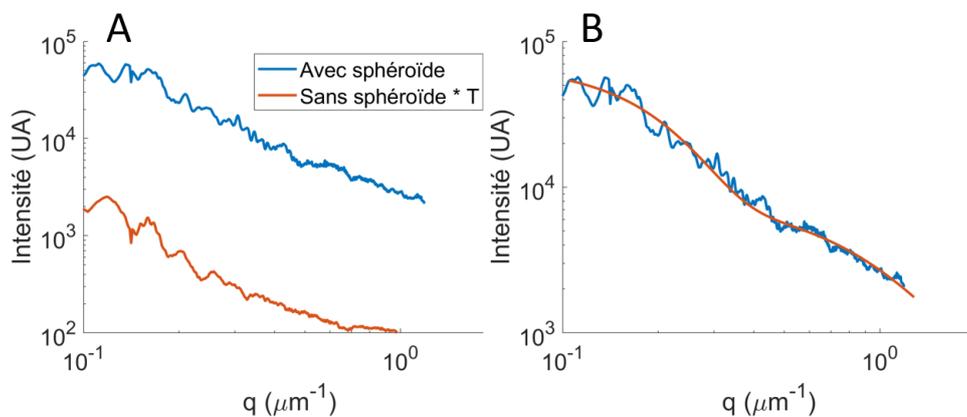


FIGURE IV.2.2 – A : Intensité en fonction du vecteur de diffusion  $q$ , mesurée avec et sans sphéroïde. Le profil sans sphéroïde a été multiplié par le coefficient de transmission du sphéroïde :  $T = 0.064$ . B : Intensité diffusée par le sphéroïde avec soustraction du fond. Le profil est ajusté par l'équation 2.

En pratique, on ajuste d'abord la partie  $q > 0.5 \mu m^{-1}$ , puis la partie  $0.15 \mu m^{-1} < q < 0.4 \mu m^{-1}$  avec la somme d'une gaussienne et de l'ajustement trouvé pour  $q > 0.5 \mu m^{-1}$ . On peut voir dans la figure IV.2.2 que l'ajustement reprend la forme lissée du profil angulaire. Les coefficients obtenus sont :  $A = 3.9 \pm 0.2 \cdot 10^5$  u.a.,  $\sigma = 0.137 \pm 0.005 \mu m^{-1}$ ,  $B = 8.1 \pm 0.2 \cdot 10^2$  u.a. et  $g = 0.877 \pm 0.002$ . De  $\sigma$ , on déduit un profil moyen  $\rho$  de densité des cellules en gaussienne d'écart type  $\sigma_c = \frac{1}{\sqrt{2}\sigma} = 5.2 \pm 0.2 \mu m$ .

$$\rho(r) \propto e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{r}{\sigma_c}\right)^2} \quad (3)$$

En dérivant ce profil, on obtient la distribution en rayon  $Pb(r)$  des cellules :

$$Pb(r) = \frac{r}{\sigma_c^2} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{r}{\sigma_c}\right)^2} \quad (4)$$

On retiendra de cette mesure le diamètre moyen  $\bar{d}$  :

$$\bar{d} = 2 \int_0^\infty Pb(r) r dr = 2 \sqrt{\frac{\pi}{2}} \sigma_c = \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma} \quad (5)$$

Ici, on mesure  $\bar{d} = 12.9 \pm 0.5 \mu m$ .

Remarque : on peut déduire une valeur du facteur d'anisotropie à partir de l'ajustement :  $g = 0.89$ . Cette valeur n'est cependant pas fiable puisqu'elle est basée uniquement sur les angles  $1.2^\circ < \theta < 9.3^\circ$ .

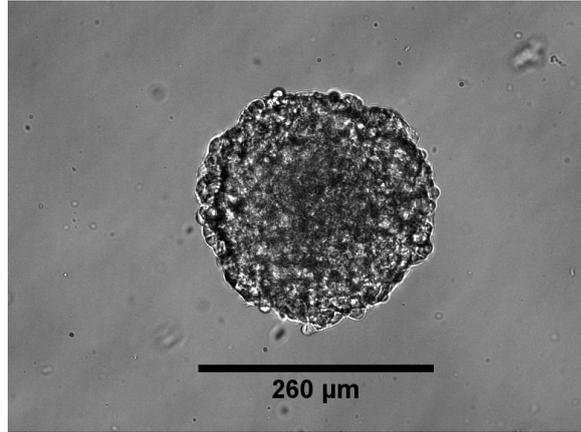
## IV.2.2 TAILLE DES CELLULES EN FONCTION DE LA PRESSION

Pour étudier l'effet de la pression sur la taille des cellules, on utilise un ajustement identique à celui présenté dans la section précédente : la somme d'une gaussienne d'écart-type  $\sigma$  et d'une fonction de Henyey-Greenstein. A partir du paramètre d'ajustement  $\sigma$ , on calcule un diamètre moyen des cellules :  $\bar{d} = \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma}$ . Pour lisser d'avantages les tâches de speckle, on effectue une moyenne sur 20 mesures de l'intensité diffusée. Les mesures sont réparties à intervalle régulier sur toute la durée d'acquisition, à l'exception des 20 premières minutes (30 pour les gros sphéroïdes). En effet, cette période correspond au temps nécessaire pour atteindre les bonnes conditions de température et de pH, ainsi qu'une fixation stable sur le fond de la boîte de pétri. Pour que l'ajustement ne soit pas dominé par les plus fortes intensités, mais prenne en compte l'intégralité du profil, on ajuste le logarithme de l'intensité.

La mesure a été faite sur des sphéroïdes de deux tailles différentes,  $260 \mu m$  et  $460 \mu m$  de diamètre, pour des surpressions allant 0 à 25 kPa, avec un minimum de 3 sphéroïdes différents. Pour les gros sphéroïdes, on se contentera d'une mesure relative de  $\bar{d}$  compte-tenu de la diffusion multiple.

### sphéroïdes de $260 \mu m$ de diamètre

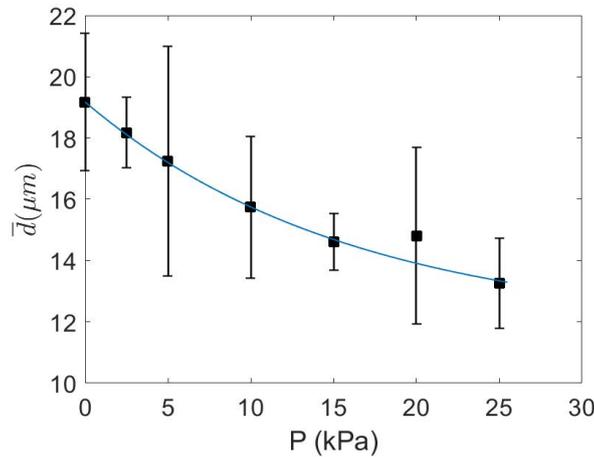
Les petits sphéroïdes sont obtenus après 3 jours d'incubation, comme décrit en section II.1.3. Ils ont un diamètre moyen de  $260 \mu m$  avec un écart type de  $30 \mu m$ .

FIGURE IV.2.3 – Microscopie d'un sphéroïde de 260  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Le tableau IV.2.1 donne la valeur du paramètre d'ajustement  $\bar{d}$  en fonction de la pression, ainsi que le nombre de sphéroïdes utilisés pour la mesure. La figure IV.2.4 présente ces résultats graphiquement.

TABLE IV.2.1 – Diamètre moyen  $\bar{d}$  des cellules dans les petits sphéroïdes en fonction de la pression.

Pression (kPa)	0	2.5	5	10	15	20	25
$\bar{d}(\mu\text{m})$	19	18	17	16	15	15	13
2x erreur type ( $\mu\text{m}$ )	2	1	4	2	1	3	1
n	3	6	3	3	5	5	3

FIGURE IV.2.4 – Diamètre moyen  $\bar{d}$  des cellules dans les petits sphéroïdes en fonction de la pression. Ajustement avec l'équation 6 :  $P^* = 16 \pm 8 \text{ kPa}$ ,  $\bar{d}^* = 12 \pm 2 \mu\text{m}$ .

On observe une diminution du diamètre des cellules quand la pression augmente. Pour avoir une meilleure visualisation des résultats, les points expérimentaux sont ajustés par l'expression :

$$\bar{d} = (\bar{d}(0) - \bar{d}^*)e^{-P/P^*} + \bar{d}^* \quad (6)$$

où  $\bar{d}^*$  est le plateau et  $P^*$  est la pression caractéristique ayant un effet sur la taille des

cellules. Cette expression est empirique et n'est pas fondée par un modèle. Elle permet tout de même de déduire une pression  $P^* = 16 \pm 8$  kPa caractéristique de l'effet observé. Elle est liée au module d'élasticité isostatique (*bulk modulus*) du sphéroïde qui est du même ordre de grandeur :  $\sim 30$  kPa [25].

La diminution de la taille des cellules concorde avec la diminution du volume des cellules observé par ailleurs dans [25] (voir introduction section I.2.2). Pour comparaison, la diminution du volume était de 30% pour une pression de 5 kPa. Ici, on mesure une diminution du diamètre de 10.1% pour la même pression, soit une diminution de 27.3% en volume (puissance 3).

### sphéroïdes de 460 $\mu m$ de diamètre

Les gros sphéroïdes sont obtenus après 7 jours d'incubation. Ils ont un diamètre moyen de 460  $\mu m$  avec un écart type de 60  $\mu m$ .

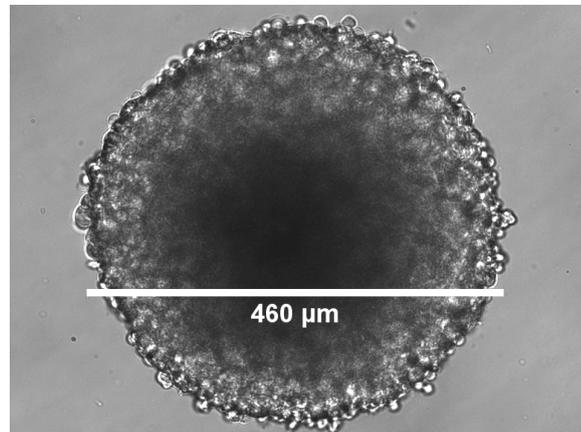


FIGURE IV.2.5 – Microscopie d'un sphéroïde de 460  $\mu m$  de diamètre.

Le tableau IV.2.2 donne la valeur du paramètre d'ajustement  $\bar{d}$  en fonction de la pression, ainsi que le nombre de sphéroïdes utilisés pour la mesure. La figure IV.2.6 présente ces résultats graphiquement.

TABLE IV.2.2 – Diamètre moyen  $\bar{d}$  des cellules dans les gros sphéroïdes en fonction de la pression.

Pression (kPa)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
$\bar{d}(\mu m)$	18	19.8	21	22	20	20	18	18	15
2x erreur type ( $\mu m$ )	1	0.7	2	3	2	6	2	4	2
n	7	7	7	2	7	4	7	3	9

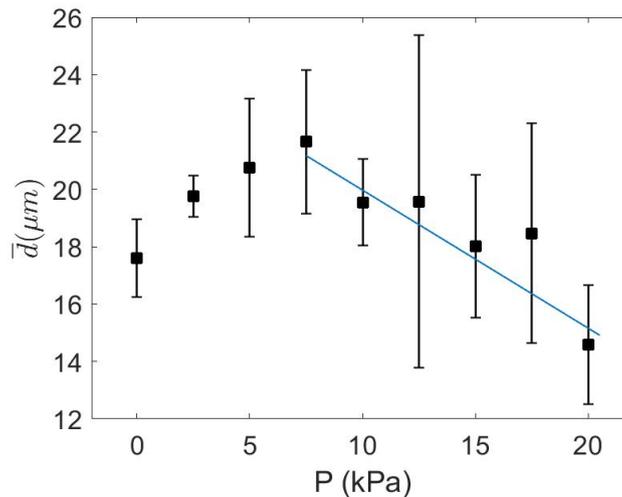


FIGURE IV.2.6 – Diamètre moyen  $\bar{d}$  des cellules dans les gros sphéroïdes en fonction de la pression.

L'interprétation est moins simple avec les gros sphéroïdes. Pour les plus faibles pressions ( $<7.5$  kPa),  $\bar{d}$  augmente puis on retrouve une diminution similaire au cas des petits sphéroïdes. Conclure que la taille des cellules augmente pour les pressions  $<7.5$  kPa me semble déraisonnable. Une hypothèse faite sur l'interprétation de  $\bar{d}$  est peut-être en cause. En ajustant la fonction de phase par une gaussienne quel que soit la pression, on a supposé que la distribution de forme des cellules était indépendante de la pression et que seule leur taille était modifiée. Cette hypothèse n'est peut-être pas vérifiée et l'augmentation de  $\bar{d}$  traduirait un changement de forme. Prenons par exemple un changement de forme passant de sphérique à gaussienne en conservant le diamètre  $d$ . En ajustant l'intensité diffusée par la sphère avec une gaussienne, on mesure  $\bar{d} = 0.64d$ , tandis que pour la gaussienne on retrouve bien  $\bar{d} = d$ . Ainsi le changement de forme est perçu comme une augmentation de  $\bar{d}$ . C'est peut-être ce qu'on mesure ici pour  $P < 7.5$  kPa : les cellules deviennent moins sphériques sous la pression.

La différence observée avec le cas des petits sphéroïde peut aussi provenir d'une différence de proportion entre le cœur nécrotique et la surface en division. Dans le cas des gros sphéroïde, le cœur représente une partie plus importante de la population des cellules sur laquelle la moyenne de taille est mesurée. Je ne trouve cependant d'explication à l'augmentation de  $\bar{d}$  à partir de cette remarque.

Remarque : comme la pression diminue la taille des sphéroïdes, elle diminue aussi la diffusion multiple. Pour être sûr que cet effet n'entre pas en compte dans le résultat obtenu, j'ai regardé la corrélation entre  $\bar{d}$  et la taille du sphéroïde après compression, sans trouver de corrélation.

# IV3 VITESSE ET PRESSION

## IV.3.1 RÉSULTAT TYPE ET ANALYSE

Pour la mesure de vitesse, on reprend l'analyse présentée en section III.2.2. On enregistre les fluctuations d'intensité, on calcul la fonction de corrélation  $C(q, \tau)$ , on en déduit la distribution de déplacements  $Pb_\tau(\Delta r)$  des cellules pendant un délai  $\tau$ . Pour cela, on utilise l'hypothèse d'isotropie de l'échantillon : il n'y a pas de direction privilégiée dans le sphéroïde. Dans le passage à 3 dimensions, il est important de noter que les transformées de Fourier sont faite en 3D et non plus en 2D.

La figure IV.3.1 présente les résultats obtenus pour un sphéroïde de  $410 \mu\text{m}$  de diamètre, sans surpression. Cet exemple est utilisé pour montrer des caractéristiques retrouvées dans tous les cas, avant de passer à l'étude de l'effet de la pression.

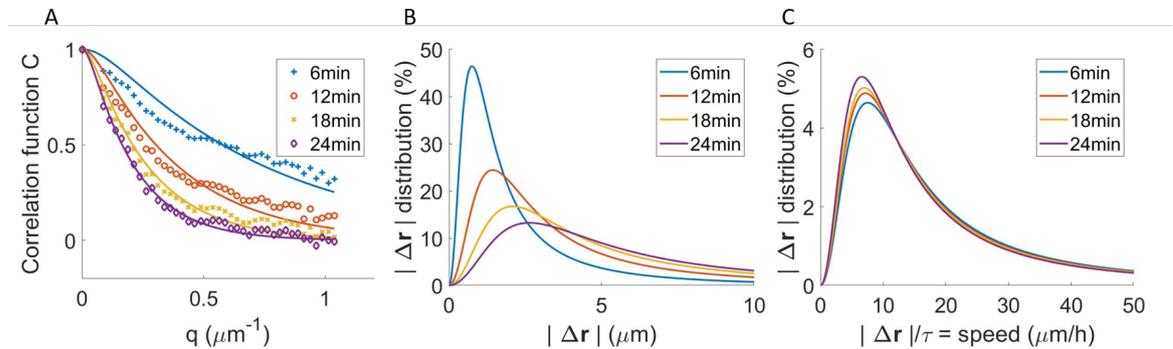


FIGURE IV.3.1 – A : fonctions de corrélation  $C(q)$  obtenues pour des délais de 6, 12, 18 et 24 minutes. B : distributions d'amplitude des déplacements pour les mêmes délais. C : déplacements rapporté au délai  $\tau$ , i.e. déplacements par unité de temps ou vitesse.

La figure IV.3.1 A présente la fonction de corrélation pour des délais allant de 6 à 24 minutes. Les points expérimentaux de  $C(q)$  semblent décrire une exponentielle décroissante. Mais pour des raisons de symétrie (section III.2.3) C a nécessairement une dérivée nulle en  $q = 0$  et je propose de manière empirique l'ajustement :

$$C(q) = \exp\left(2A \left[1 - \sqrt{1 + (q/q_0)^2}\right]\right) \quad (1)$$

Avec  $A = 0.1$ . Pour  $q \gg q_0$ , on retrouve une exponentielle ( $e^{-2Aq/q_0}$ ) et pour  $q \ll q_0$  on a une gaussienne ( $e^{-A(q/q_0)^2}$ ).

On déduit de la figure A la distribution d'amplitude des déplacements des cellules pour les délais correspondants en figure IV.3.1 B. Le calcul analytique donne l'expression (I) :

$$Pb(|\Delta r|) = \frac{q_0^3 \sqrt{2A/\pi}}{K_{1/2}(A)} |\Delta r|^2 \frac{K_2 \left( \sqrt{A^2 + (|\Delta r|q_0)^2} \right)}{A^2 + (|\Delta r|q_0)^2} \quad (2)$$

où  $K_\alpha$  désigne une fonction de Bessel modifiée. La moyenne de  $|\Delta r|$  est alors (I) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{4A}{\pi q_0} e^A K_0(A) \approx \frac{0.34}{q_0} \quad (3)$$

Si on rapporte la distance au délai  $\tau$ , c'est-à-dire si on regarde la distance par unité de temps, donc la vitesse, on voit en figure IV.3.1 C que les distributions se superposent. Le déplacement est donc proportionnel au temps, similairement au cas des cellules migrant au fond d'une boîte de pétri. De même que pour le cas des cellules en 2D cela ne signifie pas que les cellules se déplacent en permanence de manière balistique, mais que pour les temps considérés, la trajectoire est persistante. On peut réduire toutes les courbes à un seul paramètre : la vitesse moyenne  $\bar{v} = \langle |\Delta r|(\tau) \rangle / \tau$ .

Pour toutes les pressions et pour les deux tailles de sphéroïde, on retrouve des courbes similaires, ainsi que la loi en  $q^{-1}$ . Le paramètre qu'on retiendra pour étudier l'effet de la pression sera uniquement  $\bar{v}$ , obtenu en ajustant simultanément toutes les courbes  $C(\tau, q)$  par :

$$C(\tau, q) = \exp \left( 2A \left[ 1 - \sqrt{1 + (q\tau\bar{v}/0.34)^2} \right] \right) \quad (4)$$

Les résultats présentés dans la suite correspondent donc au régime balistique observé aux temps courts (inférieurs à une heure). En perspective, il serait intéressant de mesurer également les déplacements aux temps longs. Cette mesure nécessiterait une acquisition plus longue et à des angles plus petits.

## IV.3.2 VITESSE DES CELLULES EN FONCTION DE LA PRESSION

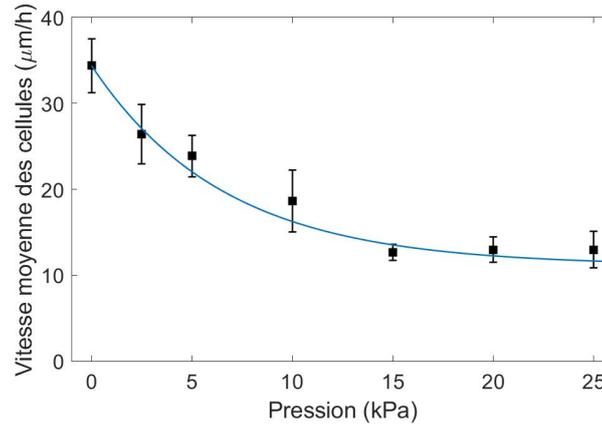
Une partie des sphéroïdes utilisés pour les mesures de vitesses sont les mêmes que ceux utilisés pour les mesures de diamètre en chapitre IV.2. A ceux-ci s'ajoutent d'autres sphéroïdes pour lesquels la mesure de taille n'était pas possible à cause d'un rapport signal sur bruit trop faible. En effet, la mesure dynamique donne un meilleur signal en conditions dégradées que la mesure statique. Les diamètres moyennes des sphéroïdes sont en conséquence légèrement modifiée : 250  $\mu m$  avec un écart type de 30  $\mu m$  pour les petits sphéroïdes et 470  $\mu m$  avec un écart type de 50  $\mu m$  pour les gros sphéroïdes.

### Sphéroïdes de 250 $\mu m$ de diamètre

Le tableau IV.3.1 donne la valeur du paramètre d'ajustement  $\bar{v}$  en fonction de la pression, ainsi que le nombre de sphéroïdes utilisés pour la mesure. La figure IV.3.2 présente ces résultats graphiquement.

TABLE IV.3.1 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules dans les petits sphéroïdes en fonction de la pression.

Pression (kPa)	0	2.5	5	10	15	20	25
$\bar{v}(\mu\text{m}/h)$	34	26	24	19	13	13	13
2x erreur type ( $\mu\text{m}/h$ )	3	3	2	4	1	1	2
n	7	6	6	7	7	6	6

FIGURE IV.3.2 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules dans les petits sphéroïdes en fonction de la pression. Ajustement avec l'équation 5

On observe une diminution de la vitesse des cellules quand la pression augmente. Les points expérimentaux sont ajustés par une expression empirique identique à celle utilisée pour la taille des cellules :

$$\bar{v} = (\bar{v}(0) - \bar{v}^*)e^{-P/P^*} + \bar{v}^* \quad (5)$$

où  $\bar{v}^*$  est le plateau et  $P^*$  est la pression caractéristique ayant un effet sur la vitesse des cellules. On trouve  $\bar{v}^* = 11 \pm 3 \mu\text{m}/h$  et  $P^* = 7 \pm 4 \text{ kPa}$ . La pression caractéristique est plus petite que celle obtenue avec les mesures de diamètres, indiquant une sensibilité plus grande (le pallier de saturation est atteint plus rapidement).

### Sphéroïdes de 470 $\mu\text{m}$ de diamètre

Le tableau IV.3.2 donne la valeur du paramètre d'ajustement  $\bar{v}$  en fonction de la pression, ainsi que le nombre de sphéroïdes utilisés pour la mesure. La figure IV.3.3 A présente ces résultats graphiquement.

TABLE IV.3.2 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules dans les gros sphéroïdes en fonction de la pression.

Pression (kPa)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20
$\bar{v}(\mu\text{m}/h)$	21	15	11	10	10	10	9	10
2x erreur type ( $\mu\text{m}$ )	2	4	2	2	1	2	2	1
n	6	6	6	2	6	3	7	7

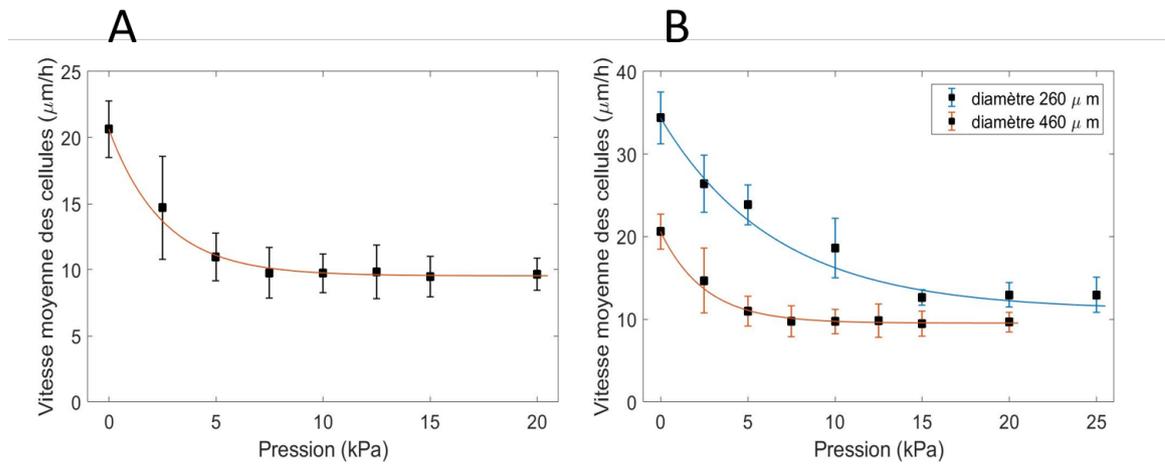


FIGURE IV.3.3 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules dans les gros sphéroïdes en fonction de la pression (A) et comparaison des vitesses entre gros et petits sphéroïdes en fonction de la pression (B).

### Comparaison entre gros et petits sphéroïdes

Il existe des différences intéressantes entre petits et gros sphéroïdes. D'une part, les vitesses moyennes sont plus faibles pour les gros sphéroïdes alors même que la diffusion multiple devrait la surévaluer. D'autre part, la baisse de vitesse avec la pression est plus rapide pour les gros sphéroïdes avec  $P^* = 2.5$  en comparaison à  $P^* = 7$  pour les petits sphéroïdes. Ces deux différences peuvent s'expliquer par la précontrainte de croissance qui existe dans les sphéroïdes [13, 147]. En effet, lorsqu'une tumeur grossit, il existe deux sources de pression pour les cellules qui la composent : une pression d'origine externe qui est celle que l'on étudie ici par le biais du Dextran et une pression d'origine interne, présente même en l'absence de tissus environnants. Cette dernière est due à l'opposition entre la division cellulaire qui crée une pression de croissance et les forces tangentielles exercées par les couches cellulaires de surface, qui empêchent la pression de croissance de se libérer. Cette pression est dénommée ici "précontrainte" car elle est présente avant l'application de la pression par le Dextran. La précontrainte augmente lors de la croissance du sphéroïde [148]. Ainsi, une précontrainte supérieure de 8 kPa dans le cas des gros sphéroïdes impliquerait un décalage des mesures effectuées : 5 kPa exercée par le Dextran correspondrait en réalité à un total de 13 kPa dans les conditions des petits sphéroïdes. C'est ce décalage qu'expose la figure IV.3.4. En supposant que la pression effective est augmentée de 8 kPa dans les sphéroïdes plus gros, les mesures s'alignent sur une même courbe (ajustement :  $P^* = 8 \pm 3$  kPa et  $\bar{v}^* = 9 \pm 3$   $\mu\text{m/h}$ ).

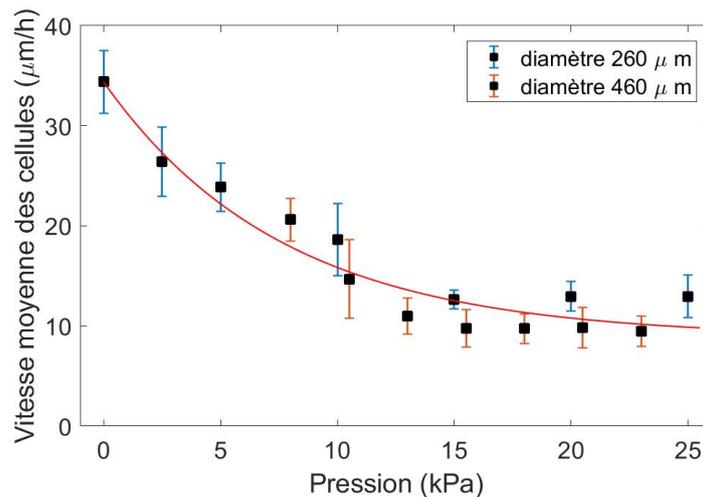


FIGURE IV.3.4 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules en fonction de la pression dans les petits sphéroïdes (bleu) et les gros sphéroïdes (orange). Pour ces derniers, la pression effective est augmentée de  $8\text{kPa}$  par rapport à la pression appliquée par Dextran. L'ajustement (rouge) est fait avec l'expression 5.

Les plateaux de vitesse aux fortes pressions sont proches ( $\bar{v}^* = 9.6 \mu\text{m}/h$  pour les gros et  $\bar{v}^* = 11 \mu\text{m}/h$  pour les petits), ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la précontrainte et suggère l'existence d'une vitesse résiduelle minimale.

Dans la comparaison entre sphéroïde de  $250 \mu\text{m}$  et  $450 \mu\text{m}$  de diamètre, un autre élément a peut-être aussi son importance : l'âge du sphéroïde. Entre un sphéroïde de 3 jours et un de 7 jours, il est possible que l'organisation ait changée, ou que la proportion de matrice extracellulaire sécrétée par les cellules ait augmentée. Pour découpler l'effet de l'âge et de la taille, il serait intéressant de faire des mesures des vitesses sur des gros sphéroïdes de 2 jours, ou des petits sphéroïdes de 7 jours, en variant le nombre initial de cellules dans les puits de culture.

## Conclusion

Pour les deux tailles de sphéroïde, on observe une diminution de la vitesse des cellules au sein de sphéroïdes soumis à une pression extérieure. La diminution est significative puisqu'elle est de 63% pour les petits sphéroïdes et 53% pour les gros. De même que pour la diminution de la division cellulaire, la diminution des déplacements des cellules indique une baisse de l'activité cellulaire sous pression. Dans le cadre des tumeurs en croissance, la pression qu'exercent les tissus environnant apparaît donc comme un mécanisme capable de freiner le développement du cancer.

L'effet arrive à saturation (plateau) pour des pressions de l'ordre de 15 kPa (petits) et 7.5 kPa (gros). Ces valeurs sont comparables au seuil de 5 kPa au-delà duquel la diminution de croissance due à la pression sature [21] (voir section I.2.2). Dans les deux cas, la saturation se produit pour des pressions similaires à la pression maximale qu'un sphéroïde en croissance peut exercer sur les tissus l'entourant (définie comme pression homéostatique dans [149]) :

entre 6 et 16 kPa [70]. Tout se passe comme si le sphéroïde n'était sensible que sur la gamme de pression qu'il est capable d'exercer, la réponse saturant au delà la pression maximale.

L'augmentation sous pression de la mobilité des cellules observée dans [26] n'est pas retrouvée ici. Il y a donc une réelle différence entre la réponse des cellules à l'intérieur du sphéroïde et celle des cellules des premières couches de la surface. On remarquera que cette distinction était aussi visible dans la réponse des cellules en terme de division cellulaire (voir figure I.2.5 en section I.2.2). Cette différence est importante puisque ce sont les cellules de surface qui sont susceptibles de quitter la tumeur pour aller vers les tissus sains et former des métastases. Il serait alors intéressant d'étudier séparément la dynamique des deux populations et de comprendre comment elles sont reliées. Ce projet est débuté dans le chapitre suivant.

# IV4 ORIENTATION DU MOUVEMENT CELLULAIRE

Les résultats du chapitre précédent suggèrent une différence de dynamique entre les cellules la surface et celles du cœur, du moins sous pression. Pour comprendre l'effet de la pression sur l'inhomogénéité des vitesses au sein des sphéroïdes, il faudrait pour commencer savoir ce qu'il en est dans le cas des sphéroïdes non soumis à une pression. Ce chapitre répond à cette question et il serait intéressant de poursuivre avec le cas des sphéroïdes sous pression.

Pour sonder localement le sphéroïde, le faisceau laser est réduit en taille. On le positionne à différentes distances  $d$  du centre (figure IV.4.1) pour mesurer les vitesses à l'intérieur du sphéroïde en fonction de la distance au centre. En utilisant les lentilles L1 (+150 mm), L2 (+30 mm), L3 (+100 mm) et l'objectif du microscope, on obtient un faisceau laser d'écart type de  $58 \pm 20 \mu m$ . Le laser a une taille non négligeable devant celle des sphéroïdes, mais cela permet de sonder suffisamment de cellules pour avoir une bonne statistique. Un faisceau plus petit demanderait un temps d'acquisition plus long, à qualité de mesure égale. La caméra est positionnée à 42.4 mm de l'échantillon et l'acquisition dure 3h.

Les sphéroïdes utilisés sont issus de 3 à 7 jours d'incubation, pour un diamètre allant de  $236 \mu m$  à  $481 \mu m$  avec une moyenne de  $364 \mu m$ . Pour un même sphéroïde, deux ou trois acquisitions sont faites : une où le laser est positionné au centre du sphéroïde et une ou deux autres où le laser est positionné à une distance  $d$  du centre.

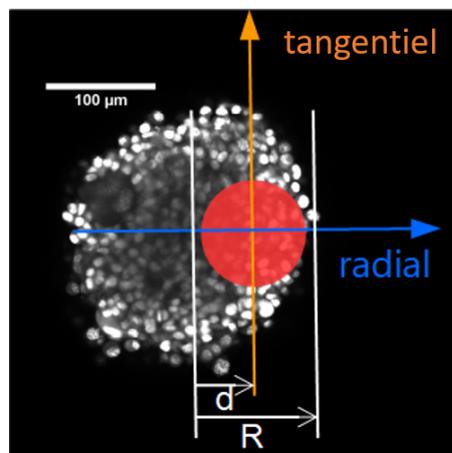


FIGURE IV.4.1 – Image confocale d'un sphéroïde et illustration des axes radial et tangential centrés sur la position  $d$  du laser.

## IV.4.1 ANALYSE

Le premier résultat a été de constater que l'isotropie est perdue si le laser n'est pas au centre du sphéroïde, à la fois dans la figure de diffraction (figure IV.4.2 A) et dans la fonction de corrélation (figure IV.4.2 B). Deux directions avec des dynamiques différents apparaissent : la direction radiale, c'est-à-dire du centre vers la surface, et la direction tangentielle, perpendiculaire à la direction radiale ou parallèle à la surface (figure IV.4.1).

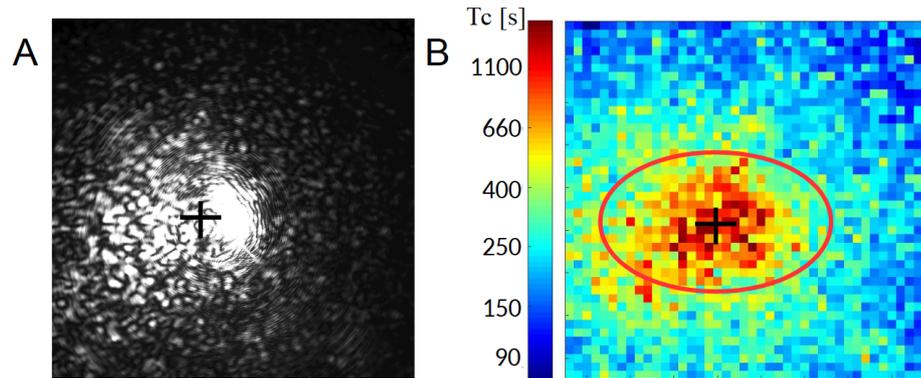


FIGURE IV.4.2 – A : Lumière diffusée par un sphéroïde lorsque le laser est positionné sur le côté. L'orientation des axes est la même que celle pour la figure IV.4.1. B : Temps caractéristiques  $T_c$  de décroissance de  $C$ , moyennée par zones de  $48 \times 48$  pixels (issu de la même expérience que A). L'ellipse rouge indique une courbe isochrone.

De même que pour le cas des cellules migrant sur de lignes (section III.2.1), le signal est anisotrope et on ne peut donc plus moyenner azimuthalement les résultats. L'analyse est légèrement modifiée en conséquence. Pour une direction donnée, on prend en compte les pixels situés dans deux  $16^{\text{ème}}$  de disque centrés sur la direction, comme indiqué en figure IV.4.3. Ensuite pour une valeur de  $q$  donnée, on prend les sections de l'anneau correspondant. La figure donne l'exemple de la deuxième valeur de  $q$ , dans la direction tangentielle.

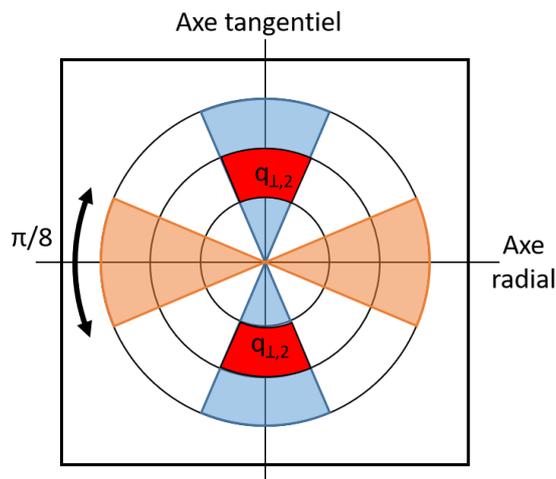


FIGURE IV.4.3 – Schéma indiquant comment les pixels sont groupés pour moyenner la fonction de corrélation de l'intensité  $C$ . En rouge : pixels utilisés pour calculer  $C$  dans la direction tangentielle, pour la deuxième valeur de  $q$ .

L'isotropie est brisée, mais pour pouvoir utiliser la même analyse que précédemment, on fait l'hypothèse de symétrie centrale sur la distribution de déplacements. Ainsi pour une direction donnée, la distribution est symétrique dans les deux sens. En conséquence la moyenne des déplacements est nulle et le déplacement net global est nul. Pour la direction tangentielle cette hypothèse ne pose pas de problème, mais pour la direction radiale, on sait qu'il y a un flux de cellules vers le centre du sphéroïde. Mais ce flux a une vitesse moyenne ( $\approx 1 \mu\text{m}/\text{h}$ ) bien plus faible que les vitesses moyennes mesurées. En fait, même s'il y a un flux, il n'a pas d'influence sur la fonction de corrélation  $C$ , à cause du module carré dans la formule :

$$C = |TF\{Pb(v)\}|^2 \quad (1)$$

qui empêche de voir des déplacements en bloc. On utilise donc la même analyse que précédemment, pour tirer de  $C$  deux vitesses : la vitesse  $\bar{v}_\perp$  dans la direction tangentielle et la vitesse  $\bar{v}_\parallel$  dans la direction radiale.

## IV.4.2 RÉSULTATS

La première chose à noter est que la vitesse des cellules diminue avec la taille (l'âge?) des sphéroïdes. La figure IV.4.4 A montre que la vitesse  $V_0$  mesurée au centre du sphéroïde ( $d=0$ ) passe de  $20 \mu\text{m}/\text{h}$  à  $7 \mu\text{m}/\text{h}$  pour un diamètre évoluant de  $150 \mu\text{m}$  à  $500 \mu\text{m}$ . Cette diminution semble concerner toutes les cellules du sphéroïde puisque qu'il en est de même pour les cellules en surface ( $0.85 < \frac{d}{R} < 1.28$ ), qui ont une vitesse proportionnelle à la vitesse  $V_0$  au centre (figure IV.4.4 B).

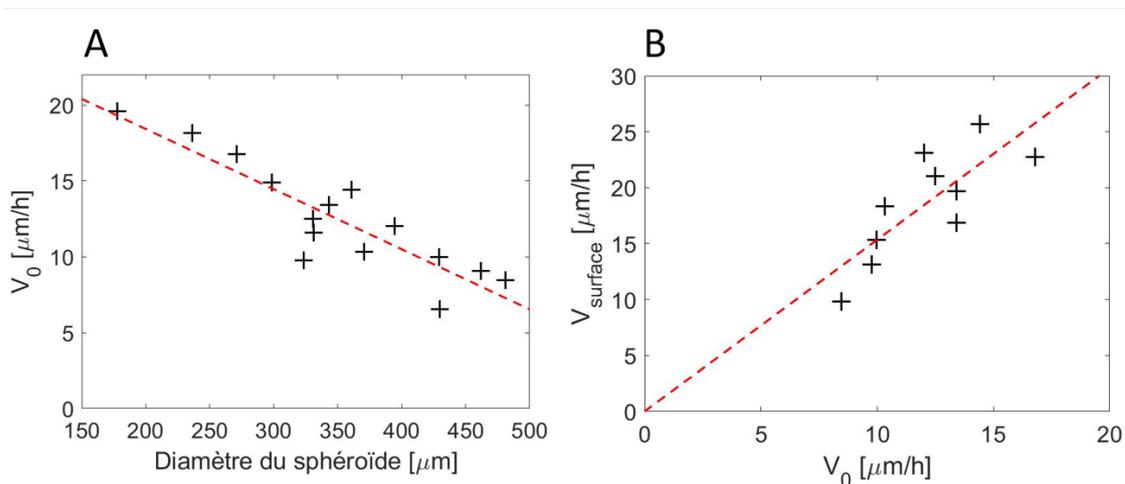


FIGURE IV.4.4 – A : vitesse  $V_0$  au centre du sphéroïde en fonction du diamètre du sphéroïde. La ligne pointillée indique un ajustement linéaire ( $V_0 = 26.4 - 0.04\text{diamètre } \mu\text{m}/\text{h}$ ). B : vitesse moyenne (toutes directions confondues) des cellules au bord du sphéroïde ( $0.85 < \frac{d}{R} < 1.28$ ) en fonction de la vitesse  $V_0$  au centre. La ligne pointillée indique un ajustement linéaire ( $V_{\text{surface}} = 1.5V_0$ ).

Regardons maintenant la variation de la vitesse en fonction de la distance d'au centre

du sphéroïde. Pour regrouper les mesures faites sur des sphéroïdes de tailles différentes, on normalise les vitesses par la vitesse au centre  $V_0$ . Plutôt que la distance  $d$  au centre, les résultats ont montré une similitude d'un sphéroïde à l'autre en normalisant cette distance par le rayon  $R$  du sphéroïde. Le tableau IV.4.1 donne les vitesses obtenues en fonction de  $d/R$  et la figure IV.4.5 présente ces résultats graphiquement.

TABLE IV.4.1 – Vitesse moyenne radiale  $\bar{v}_\perp$  et tangentielle  $\bar{v}_\parallel$  des cellules dans les sphéroïdes en fonction de la position du laser  $d/R$ .

$d/R$	0	0.2	0.6	1	1.4
$\frac{\bar{v}_\parallel}{\bar{v}_0}$	1	1.0	1.2	1.3	1.2
2x erreur type	0	0.1	0.2	0.2	0.2
$\frac{\bar{v}_\perp}{\bar{v}_0}$	1	1.0	1.4	1.6	1.7
2x erreur type	0	0.2	0.2	0.2	0.4
n		4	5	7	4

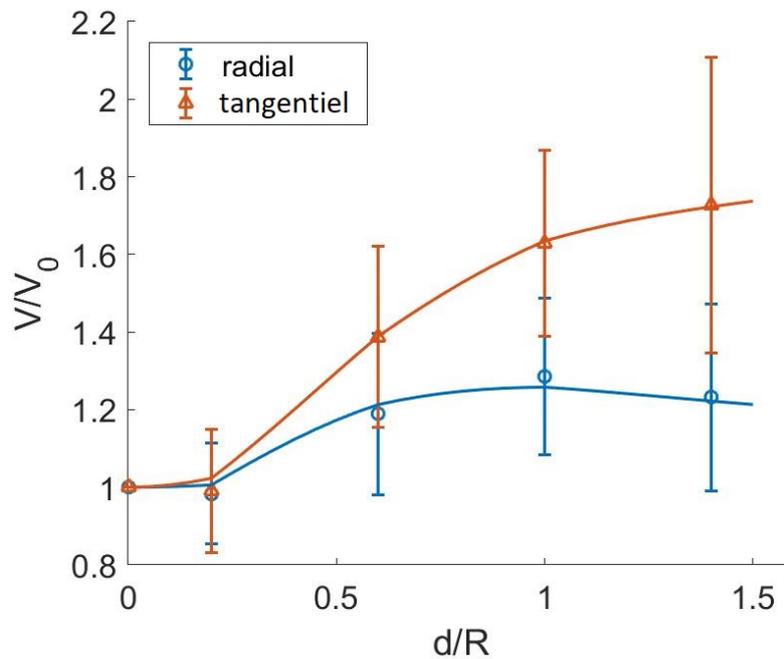


FIGURE IV.4.5 – Vitesse moyenne radiale  $\bar{v}_\perp$  et tangentielle  $\bar{v}_\parallel$  des cellules dans les sphéroïdes en fonction de la position du laser  $d/R$ . Ligne continue : ajustement de la section IV.4.3.

Au centre du sphéroïde ( $d/R = 0$ ), la vitesse est la même dans les deux directions (le ratio donne  $0.98 \pm 0.04$ ), ce qui est logique puisque toutes les directions sont équivalentes. Comme on normalise par  $\bar{v}_0$ , on a un rapport de 1 au centre. En décalant le laser, 2 caractéristiques apparaissent :

- La vitesse radiale est moindre que la vitesse tangentielle. Les cellules se déplacent donc préférentiellement dans leur couche cellulaire. Ce résultat est cohérent avec l'image

présentée en figure I.2.8 au chapitre I.2, montrant que les cellules sont anisotropes et orientées en couches concentriques.

- Les deux vitesses sont plus grandes au bord qu’au centre. Ce résultat est cohérent avec ce qu’on sait de la structure des sphéroïdes : une surface active et un cœur nécrotique. La distinction entre ces deux populations de cellules va aussi dans le sens d’une réponse à la pression différente entre l’intérieur, mesurée dans le chapitre précédent, et la surface, mesurée dans [26].

L’axe des abscisses va au-delà de 1 car le laser n’a pas une taille négligeable par rapport au sphéroïde (écart type  $58 \pm 20 \mu m$ ). Même si le centre du laser est positionné à  $d = 1.4R$ , le sphéroïde intercepte une partie du faisceau et diffuse de la lumière.

Si l’interprétation qualitative de la figure IV.4.5 est aisée, l’interprétation quantitative demande quelques précautions. En effet, le profil mesuré ne correspond pas directement au profil des vitesses dans le sphéroïde pour deux raisons :

- le faisceau n’a pas une taille ponctuelle si bien que les cellules observées ne sont pas toutes à la distance  $d$ .
- le faisceau illumine une colonne du sphéroïde si bien que l’orientation radiale n’est pas la même pour toutes les positions illuminées (figure IV.4.6). Ce qu’on a appelé direction radiale ici ne correspond donc pas à la direction radiale pour toutes les cellules diffusantes.

Pour être quantitatif, il faut prendre en compte la moyenne qui est faite sur l’ensemble de la population diffusant le laser. La section suivante présente ce calcul.

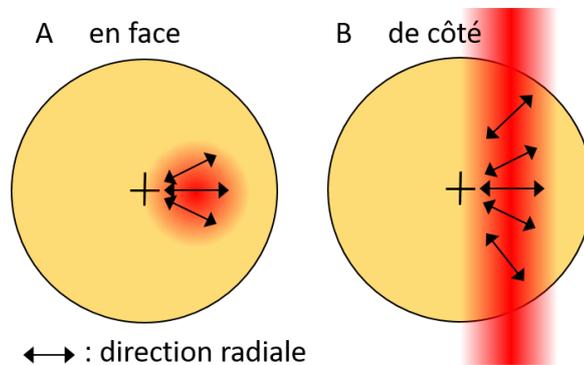


FIGURE IV.4.6 – Schéma du laser illuminant un sphéroïde, avec une vue de face (A) et de côté (B). La direction radiale locale, représentée par la double flèche n’est pas la même pour l’ensemble des points sondés par le laser.

### IV.4.3 MODÈLE

A cause du moyennage effectué par le laser, il n’est pas possible de déduire exactement  $\bar{v}_{\parallel}(d/R)/\bar{v}_0$  et  $\bar{v}_{\perp}(d/R)/\bar{v}_0$  des mesures. On peut cependant proposer un modèle pour l’inhomogénéité et l’anisotropie des vitesses puis voir avec un calcul s’il explique les résultats mesurés.

Pour décrire l'anisotropie entre la direction radiale et la direction tangentielle, on suppose qu'en chaque point  $\mathbf{r} = [x, y, z]$  du sphéroïdes, la distribution de vitesse  $Pb(\mathbf{v})$  est anisotrope, avec une vitesse caractéristique  $V_{\parallel}$  dans la direction radiale et  $V_{\perp}$  dans la direction tangentielle (figure IV.4.6). On note  $\alpha$  le ratio des deux vitesses :  $\alpha = V_{\perp}/V_{\parallel}$ . On choisit une distribution en exponentielle décroissante ayant pour vitesses caractéristiques  $V_{\parallel}$  et  $V_{\perp}$ . La distribution  $Pb(\mathbf{v})$  dépend de la position dans le sphéroïdes car l'axe radial en dépend. Si on prend par exemple une cellule située en  $[0,0,1]$  :

$$\begin{aligned} Pb(\mathbf{v})_{[0,0,1]} &= \exp \left[ -\sqrt{\left(\frac{v_x}{V_{\perp}}\right)^2 + \left(\frac{v_y}{V_{\perp}}\right)^2 + \left(\frac{v_z}{V_{\parallel}}\right)^2} \right] \\ &= \exp \left[ -\sqrt{\frac{v_y^2 + v_x^2}{v_{\perp}^2} + \left(\frac{v_z}{V_{\parallel}}\right)^2} \right] \end{aligned} \quad (2)$$

avec  $\mathbf{v} = [v_x, v_y, v_z]$ . La distribution choisie n'est pas exactement la même que celle utilisée pour calculer  $\bar{v}$ , mais une fois le moyennage effectué, on obtient une courbe proche. A partir de cette expression, on peut trouver  $Pb(\mathbf{v})$  pour n'importe quelle position dans le sphéroïde. On note  $\mathbf{n} = \frac{\mathbf{r}}{|\mathbf{r}|}$  le vecteur radial normalisé. En remarquant que  $v_y^2 + v_x^2 + v_z^2 = |\mathbf{v}|^2 - v_z^2$  et  $v_z = \mathbf{v} \cdot \mathbf{n}$ . L'équation dans le cas général est :

$$\begin{aligned} Pb(\mathbf{v})_{[x,y,z]} &= \exp \left[ -\sqrt{\frac{|\mathbf{v}|^2 - (\mathbf{v} \cdot \mathbf{n})^2}{V_{\perp}^2} + \left(\frac{\mathbf{v} \cdot \mathbf{n}}{V_{\parallel}}\right)^2} \right] \\ &= \exp \left[ -\sqrt{\frac{|\mathbf{v}|^2}{V_{\perp}^2} + (\mathbf{v} \cdot \mathbf{n})^2 \left(\frac{1}{V_{\parallel}^2} - \frac{1}{V_{\perp}^2}\right)} \right] \\ &= \exp \left[ -\frac{1}{V_{\perp}} \sqrt{|\mathbf{v}|^2 + (\mathbf{v} \cdot \mathbf{n})^2 \left(\frac{V_{\perp}^2}{V_{\parallel}^2} - 1\right)} \right] \\ &= \exp \left[ -\frac{1}{V_{\perp}} \sqrt{(v_x^2 + v_y^2 + v_z^2) + \frac{(v_x x + v_y y + v_z z)^2}{x^2 + y^2 + z^2} \left(\frac{V_{\perp}^2}{V_{\parallel}^2} - 1\right)} \right] \end{aligned} \quad (3)$$

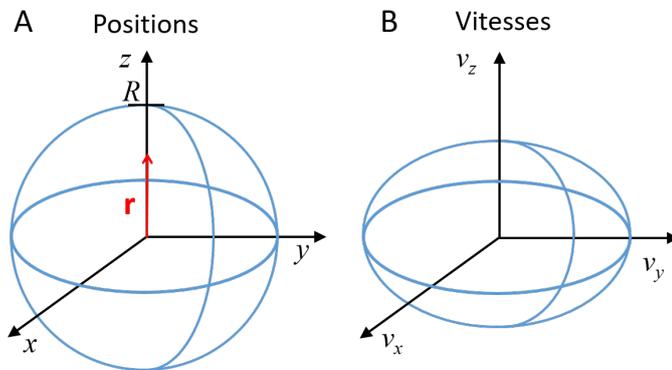


FIGURE IV.4.7 – Schéma du vecteur position  $\mathbf{r}$  (A) et de la distribution de vitesses en ce point (B). La distribution de vitesses est anisotrope : la vitesse est plus lente selon l'axe radial.

Pour décrire l'inhomogénéité dans le sphéroïde, on sépare le sphéroïde en 2 régions, comme on l'avait supposé dans la figure ?? du chapitre précédent. Le centre du sphéroïde, plus lent, correspond aux positions  $|\mathbf{r}| < \gamma R$ , où  $R$  est le rayon du sphéroïde et  $\gamma$  un paramètre d'ajustement inférieur à 1. La périphérie, plus rapide, correspond aux positions  $|\mathbf{r}| \geq \gamma R$ . Pour traduire la différence de vitesse, on introduit un troisième paramètre d'ajustement  $\beta$ , tel que les vitesses  $V_{\parallel}$  et  $V_{\perp}$  sont  $\beta$  fois plus grandes en surface qu'au centre.

Puis le calcul consiste à effectuer une moyenne sur la population participant au signal : les cellules illuminées par le laser. Pour cela, on reprend le profil gaussien du laser utilisé qui est situé à une distance  $d$  du centre du sphéroïde selon l'axe  $x$  :

$$I(x, y) = I_0 e^{-\frac{(x-d)^2 + y^2}{2\sigma^2}} \quad (4)$$

avec  $\sigma = 58 \mu m$  et on a :

$$Pb(\mathbf{v}) = \int_{-R}^R \int_{-\sqrt{R^2-x^2}}^{\sqrt{R^2-x^2}} \int_{-\sqrt{R^2-x^2-y^2}}^{\sqrt{R^2-x^2-y^2}} I(x, y) Pb(\mathbf{v})_{[x,y,z]} dz dy dx \quad (5)$$

avec  $R = 180 \mu m$ , le rayon du sphéroïde.

On ajuste  $\alpha, \beta$  et  $\gamma$  afin de retrouver les résultats de la figure IV.4.5. Malgré la simplicité du modèle, l'ajustement correspond bien aux mesures, comme le montre la ligne continue sur la figure. Les coefficients obtenus sont :

- ratio entre la vitesse tangentielle et la vitesse radiale :  $\alpha = 1.87$ ,
- ratio entre les vitesses en surface et les vitesses au centre :  $\beta = 2.85$ ,
- transition entre le centre et la surface pour  $r = \gamma R = 0.5R$ .

On retrouve les résultats quantitatifs : une vitesse tangentielle plus grande que la vitesse radiale (x1.87), une vitesse plus grande à la surface qu'au centre (x2.85), avec une transition à mi-rayon. La figure IV.4.8 présente ces résultats.

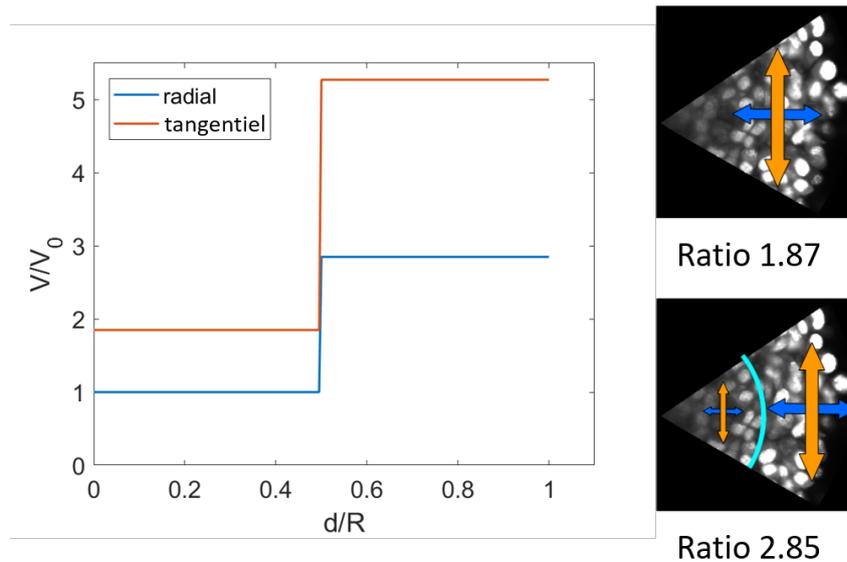


FIGURE IV.4.8 – A gauche, vitesse radiale et tangentielle en fonction de la position  $d/R$  dans le sphéroïde, pour le modèle. A droite, résumé schématique.

Grâce à ces résultats, on connaît plus de détails sur la distribution des vitesses au sein des sphéroïdes. On constate que même sans pression, la vitesse est plus grande en surface. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné qu'il y a une meilleure oxygénation et plus de nutriments en surface. Une transition cœur/surface à mi-rayon, ou  $90 \mu m$  en moyenne, est cependant un peu surprenant car la couche de cellules en division est plutôt de l'ordre de  $50 \mu m$  [23] voire  $20 \mu m$  [26]. Le résultat le plus inattendu est le fait d'avoir une vitesse plus grande dans la direction tangentielle. Ce résultat est cohérent avec une description en couches stratifiées du sphéroïde. Il serait intéressant de voir comment ces résultats sont modifiés avec la pression. La diminution de vitesse est-elle plus importante au centre, là où la pression est plus forte [74] ?

# IV5 RÔLE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Les résultats du chapitre IV.3 ouvrent une autre question importante : par quel mécanisme la pression réduit-elle la vitesse de déplacement des cellules ? Ce chapitre amorce une piste pour y répondre.

Dans les sphéroïdes, les cellules sont entourées d'une matrice formant un gel déformable. Le module d'élasticité isostatique de la matrice extracellulaire (*Extra-Cellular Matrix* - ECM) est de l'ordre de 1 kPa alors que celui d'une cellule est de l'ordre de 800 kPa. Ainsi lors d'une compression, la matrice extracellulaire est bien plus déformée que les cellules (figure IV.5.1). Pour cette raison, la matrice extracellulaire est un acteur important de la réponse d'un sphéroïde à une compression. De plus une étude récente suggère que les composants de l'ECM (collagène, fibronectine, vimentine, laminine) sont dénaturés sous pression [26]. Ce chapitre présente deux expériences permettant d'interroger le rôle de la matrice extracellulaire dans la sensibilité des cellules à la pression.

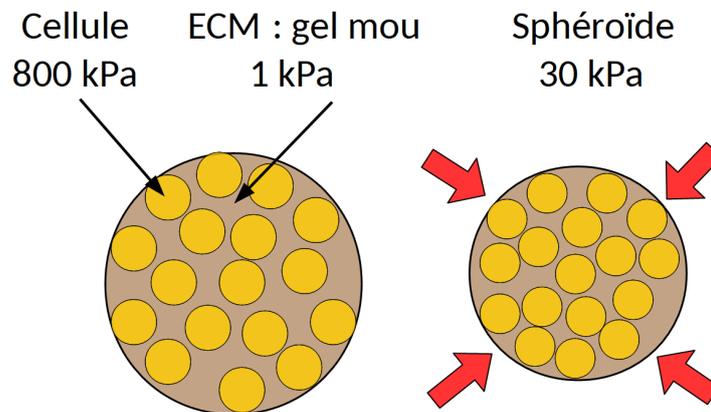


FIGURE IV.5.1 – Schéma d'un sphéroïde sans compression à gauche et soumis à une pression isostatique à droite. Le module d'élasticité isostatique des cellules est de l'ordre de 800 kPa, tandis que celui de l'ECM est de 1 kPa si bien que le sphéroïde composé des deux a un module intermédiaire de 30 kPa.

## IV.5.1 PRESSION APPLIQUÉE À UNE COUCHE CELLULAIRE

La première expérience consiste à appliquer une pression à des cellules migrant au fond d'une boîte de pétri. Dans ce cas, les cellules ne sont plus incluses dans une matrice extracel-

lulaire (figure IV.5.2 A). Les échantillons sont préparés comme en section III.2.2, avec 300k cellules par boîte de pétri, donnant le lendemain une surface couverte à 33% par les cellules (écart type 13%). Avant observation, les 2 mL de milieu de culture sont remplacés, soit par du milieu simple, soit par du milieu contenant 95.5g/L de Dextran (pression de 15kPa). Puis l'échantillon est incubé 1h avant observation. Le protocole est donc le même que celui utilisé pour les sphéroïdes. Comme l'échantillon a la taille de la boîte de pétri, on peut augmenter la taille du faisceau laser afin d'avoir une population sondée plus grande et en conséquence une meilleure statistique. Les cellules sont illuminées avec le laser infrarouge (850 nm) sans aucune lentille, soit avec un profil gaussien d'écart type  $525 \pm 6 \mu\text{m}$ . L'acquisition de la lumière diffusée est faite pendant 1h30.

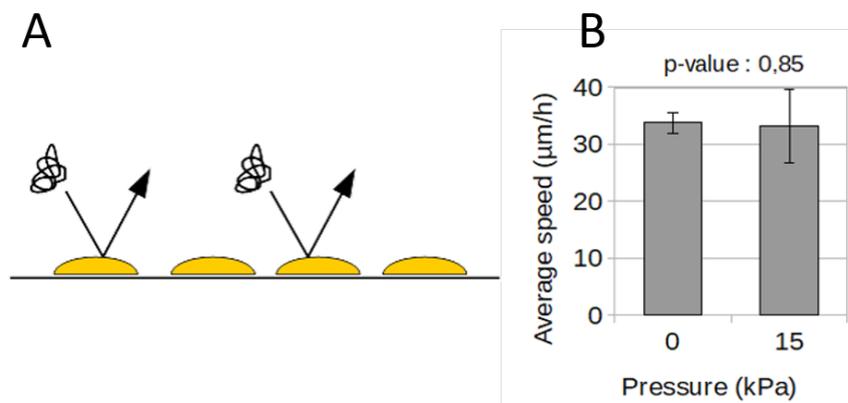


FIGURE IV.5.2 – A : Schéma de cellules (en jaune) au fond d'une boîte de pétri, soumises à la pression exercée par les molécules de Dextran (en noir). B : Vitesse moyenne des cellules avec et sans pression (15kPa). Barres d'erreur : 2x erreur type.

TABLE IV.5.1 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules en 2D avec et sans pression.

Pression (kPa)	0	15
$\bar{v}(\mu\text{m}/h)$	34	33
2x erreur type ( $\mu\text{m}$ )	2	6
n	9	7

La figure IV.5.2 B et la table IV.5.1 donnent la vitesse mesurée avec pression (15kPa) et sans (0kPa). La différence mesurée est comprise dans les barres d'erreur et un test de Student donne une valeur  $p = 0.85$  ne permettant pas de rejeter l'hypothèse nulle. En 2D, on ne retrouve donc pas l'influence de la pression sur les déplacements cellulaires, ou du moins pas à des pressions équivalentes. La sensibilité à la pression observée dans les sphéroïdes est donc une propriété émergente de la structure 3D du tissu.

## IV.5.2 PRESSION APPLIQUÉE À L'INTÉRIEUR DU SPHÉROÏDE

Pour tester si l'impact de la pression est lié seulement à l'organisation 3D des cellules, une seconde série d'expérience a été conduite. Pour appliquer la pression, on utilise des

molécules de Dextran plus petites que précédemment : 10 kDa (11.6 nm de diamètre) au lieu de 2 MDa (29.6 nm de diamètre). Le Dextran pénètre alors dans le sphéroïde mais non dans les cellules. La pression est exercée sur la surface des cellules individuellement, mais non sur le sphéroïde dans son ensemble. Par rapport au cas précédents, les cellules sont toujours soumises à la pression, mais la matrice extracellulaire n'est plus écrasée (figure IV.5.3 A).

Les sphéroïdes utilisés ont un diamètre de  $330 \mu\text{m}$  avec un écart type de  $40 \mu\text{m}$ . Jusque-là, les cas avec et sans pression étaient comparés sur des sphéroïdes différents. Afin de ne pas isoler l'effet de la pression des variations qu'il existe d'un sphéroïde à l'autre, la mesure avec et sans pression est faite ici sur un même sphéroïde. On commence par enregistrer la lumière diffusée dans le cas 0 kPa, puis on remplace le milieu de culture par du milieu comportant 78.4 g/L (pression 10kPa) de "petits" Dextran. Dans les deux cas, l'acquisition dure 2h30 et seul le régime stationnaire est analysé. Il n'y a pas de dérive lente observée, uniquement une courte période (20 minutes) de stabilisation de température et de pH.

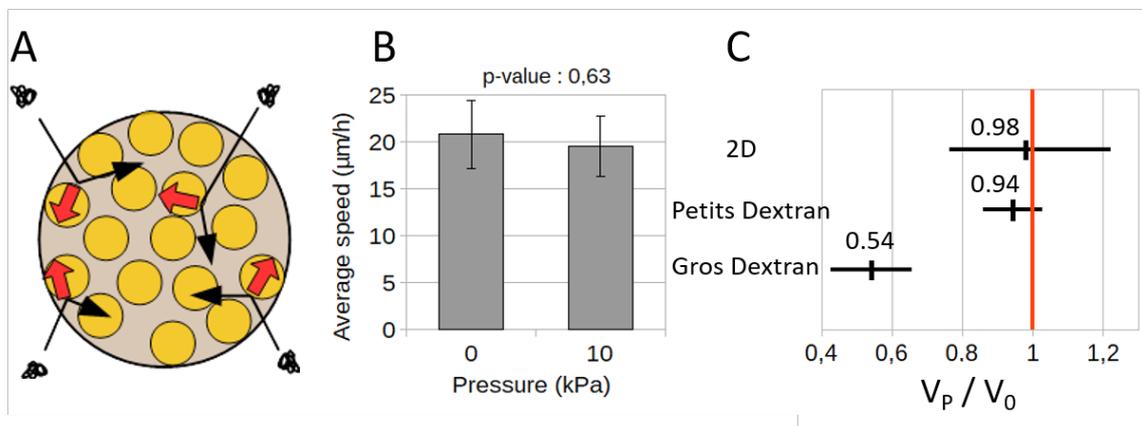


FIGURE IV.5.3 – A : Schéma d'un sphéroïde composé de cellules (en jaune) et de matrice extracellulaire (gris). Les molécules de Dextran (noir) pénètrent dans le sphéroïde et exercent une pression à la surface des cellules. B : Vitesse moyenne des cellules avec et sans pression (10kPa). Barres d'erreur :  $2x$  erreur type. C : rapport entre la vitesse  $V_P$  mesurée avec pression et la vitesse  $V_0$  mesurée sans pression, pour le cas 2D (en haut) et pour le cas des Dextran de 10kDa (en bas).

TABLE IV.5.2 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules avec et sans pression des "petits" Dextran.

Pression (kPa)	0	10
$\bar{v}(\mu\text{m}/h)$	21	20
2x erreur type ( $\mu\text{m}$ )	4	3
n	5	5

La figure IV.5.3 B et la table IV.5.2 donnent la vitesse  $V_P$  mesurée avec pression (10kPa) et la vitesse  $V_0$  mesurée sans (0kPa). Comme les mesures sont appariées, il est plus intéressant de regarder le rapport  $V_P/V_0$  qui est de  $0.94 \pm 0.09$ . La figure IV.5.3 C présente le rapport des vitesses pour le cas des "petits" Dextran ainsi que celui des cellules en 2D. De même que dans la section précédente, la différence entre  $V_P$  et  $V_0$  est comprise dans les barres d'erreur. On en conclut que si les cellules sont soumises à la pression, mais pas leur environnement, elles

perdent la sensibilité observée auparavant. Ce résultat indique que la matrice extracellulaire joue un rôle primordial dans la capacité des cellules à sonder leur environnement en terme de pression. Pour faire le lien avec la diminution de vitesse, on peut imaginer par exemple que lorsque la matrice est compressée, la taille de ses pores est réduite, ce qui limite la mobilité des cellules. Pour tester l'importance de la matrice, on pourrait étudier l'impact de drogues la dégradant, telle que la collagénase. Ces premiers indices indiquent une piste concernant le mécanisme permettant au cellules de sentir la pression, elle mériterait d'être approfondie.

# IV6 AU-DELÀ DES LIMITES

Le premier chapitre de cette partie a donné une limite de  $360 \mu m$  pour  $\lambda = 850 \text{ nm}$ . Est-il possible d'aller au-delà ? On peut avoir une mesure relative si on va un peu plus loin, mais peut-on obtenir une mesure absolue ? Ce chapitre propose un modèle analytique de la diffusion multiple et de son impact sur les mesures si on souhaite aller au-delà, puis quelques pistes expérimentales pour réduire la diffusion multiple.

## IV.6.1 MODÈLE ANALYTIQUE DE L'IMPACT DE LA DIFFUSION MULTIPLE

Dans cette section nous allons voir un modèle de l'impact de la diffusion multiple sur la mesure la fonction de phase  $P$  et celle de  $C(q)$ . L'objectif est de pouvoir en tirer une méthode de correction de la diffusion multiple dans le cas où le nombre maximal de diffusions est de l'ordre de 10. On passerait ainsi d'une mesure relative à une mesure absolue. Le modèle est basé sur une description de la diffusion de la lumière qui est intermédiaire entre une description purement ondulatoire et une description purement corpusculaire. La description purement ondulatoire est trop complexe pour pouvoir exprimer la diffusion multiple de façon simple. La description corpusculaire fait l'hypothèse de photons qui ne sont plus corrélés en phase au sortir de l'échantillon. Cette hypothèse n'est valide que pour un très grand nombre de diffusions, c'est sur elle que repose la technique *Diffusive Wave Spectroscopy*. Ici, la propagation de la lumière est supposée corpusculaire pour les premières diffusions et ondulatoire après la dernière (figure IV.6.1).

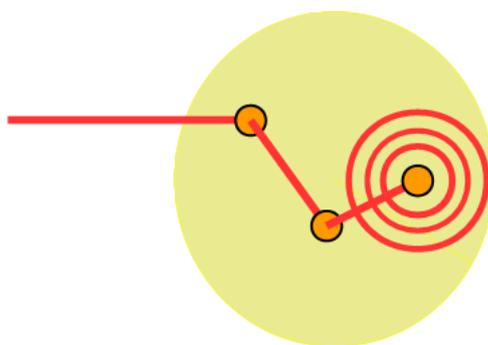


FIGURE IV.6.1 – Schéma de principe du modèle de diffusion multiple : un photon venant de la gauche est diffusé 2 fois (propagation corpusculaire géométrique) avant de produire une onde sphérique lors de la troisième et dernière diffusion (propagation ondulatoire).

## Fonction de phase

Pour décrire la diffusion multiple, on considère qu'à chaque diffusion, le photon a une probabilité de changer de direction qui suit la fonction de phase propre à l'échantillon, comme mesurée en section IV.2.1. Cette description corpusculaire exclut toute interférence avec d'autres photons lors de la propagation suite à la diffusion. Pour un photon diffusé 2 fois, la fonction de phase obtenue, notée  $P_2$ , la probabilité de direction finale est le produit d'auto-convolution de  $P$ . Ce résultat est détaillé en annexe G et étendu à la fonction de phase d'un photon diffusé  $k$  fois :

$$P_k = P \circledast^{k-1} P \quad (1)$$

où  $P \circledast^k P$  représente  $P$  convoluée avec elle-même  $k$  fois, avec la convention  $P \circledast^0 P = P$ . Le calcul présenté en section IV.1.1 nous donne, pour un sphéroïde de taille donnée, la proportion des photons en fonction du nombre de fois où il ont été diffusés. On note  $\alpha_k$  la fraction de photons diffusés  $k$  fois. Ainsi la lumière diffusée par le sphéroïde est répartie selon la fonction de phase mesurée  $P_m$  :

$$P_m = \sum_{k=1}^n \alpha_k [P \circledast^{k-1} P] \quad (2)$$

Ce résultat montre que la diffusion multiple mélange les angles, à cause du produit de convolution. Il ne s'agit pas d'un simple lissage entraînant une perte de résolution. En effet, la proportion de photons diffusés 2 fois dépend de la direction observée  $\mathbf{q}$  et pour certaines directions, il est plus probable qu'un photon ait subi 2 diffusions à  $\mathbf{q}/2$  qu'une seule à  $\mathbf{q}$ . Ainsi le signal est dominé par une lumière diffusée à un angle autre que celui attendu. La figure IV.6.2 montre l'exemple de la proportion de photons diffusés 1 fois ou deux fois en fonction de l'angle, pour  $\alpha_1 = 0.7$ ,  $\alpha_2 = 0.3$  et  $P = \frac{e^{-(q/0.2)^2}}{\pi 0.2^2}$ . On voit que pour  $q > 0.35 \mu\text{m}^{-1}$ , les photons doublement diffusés sont majoritaires.

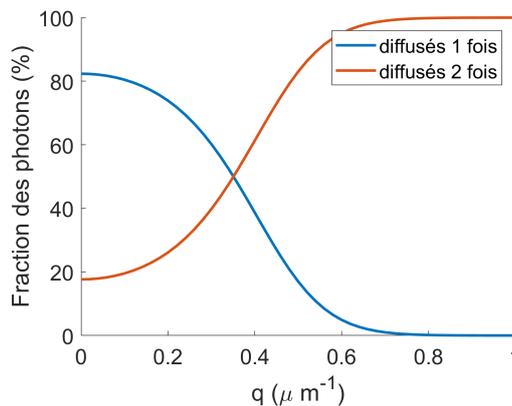


FIGURE IV.6.2 – Fraction de photons diffusés 1 fois et 2 fois en fonction de  $q$ . Le calcul a été fait pour  $\alpha_1 = 0.7$ ,  $\alpha_2 = 0.3$  et  $P = \frac{e^{-(q/0.2)^2}}{\pi 0.2^2}$ .

De plus, le produit de convolution élargit la fonction de phase mesurée (figure IV.6.3). Dans l'espace direct, cela se traduit par une taille de cellules plus petites que la réalité. Dans

le cas présenté dans la figure, si on fit la fonction  $P_m$  avec une gaussienne, on trouve des cellules 8.2% plus petites.

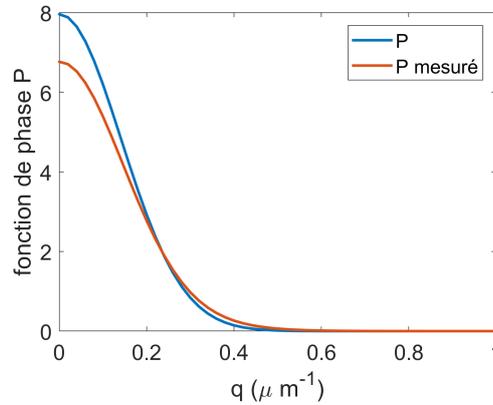


FIGURE IV.6.3 – Fonction de phase en diffusion simple pure ( $P$ ) et avec 30% de diffusion double ( $P$  mesuré).

### Fonction de corrélation

Voyons maintenant l'impact des photons diffusés sur la fonction d'autocorrélation de l'intensité  $C(\mathbf{q}_2)$ . Le calcul à diffusion multiple est abordé d'une manière similaire à la celui fait en section I.4.1.

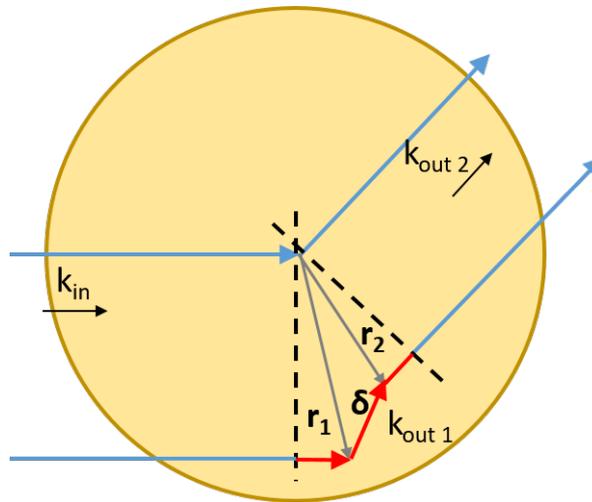


FIGURE IV.6.4 – Diffraction double dans un sphéroïde, géométrie

La figure IV.6.4 montre le cas d'une diffusion double : un photon est diffusé au point  $\mathbf{r}_1$ , puis au point  $\mathbf{r}_2$ . De même que dans la section I.4.1, on calcule le déphasage  $d\phi$  du champ émis  $\mathbf{r}_2$  par rapport au champ émis par le centre du sphéroïde. On appelle  $\delta$  le vecteur allant entre la diffusion en  $\mathbf{r}_1$  et celle en  $\mathbf{r}_2$  :  $\delta = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$ . On note  $\mathbf{k}_{out1}$  le vecteur d'onde associé à la diffusion selon  $\mathbf{ff}_i$  et  $\mathbf{q}_1 = \mathbf{k}_{out1} - \mathbf{k}_{in}$  et  $\mathbf{q}_2 = \mathbf{k}_{out2} - \mathbf{k}_{in}$ .

La figure IV.6.4 permet de voir qu'on a :

$$\begin{aligned}
d\phi &= \mathbf{k}_{\text{in}} \cdot \mathbf{r}_1 + \mathbf{k}_{\text{out1}} \cdot \delta - \mathbf{k}_{\text{out2}} \cdot \mathbf{r}_2 \\
&= \mathbf{k}_{\text{in}} \cdot \mathbf{r}_1 + \mathbf{k}_{\text{out1}} \cdot (\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1) - \mathbf{k}_{\text{out2}} \cdot \mathbf{r}_2 \\
&= -\mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_1 + (\mathbf{k}_{\text{out1}} - \mathbf{k}_{\text{out2}}) \cdot \mathbf{r}_2 \\
&= -\mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_1 + (\mathbf{q}_1 - \mathbf{q}_2) \cdot \mathbf{r}_2
\end{aligned} \tag{3}$$

Ce qui donne un champ :

$$E(\mathbf{q}_2) = E_0 e^{-i(\mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_1 + (\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \mathbf{r}_2)} \tag{4}$$

On voit ici que l'onde obtenue :

- est celle d'une diffusion simple en  $\mathbf{r}_2$  si la première diffusion est droite, c'est-à-dire  $\mathbf{q}_1 = 0$ .
- est celle d'une diffusion simple en  $\mathbf{r}_1$  si la deuxième diffusion est droite, c'est-à-dire  $\mathbf{q}_1 = \mathbf{q}_2$ .
- est sensible aux mouvements de  $\mathbf{r}_1$  et  $\mathbf{r}_2$  dans les autres cas. Ses fluctuations seront donc plus rapides en moyenne.

Pour continuer avec le calcul de  $C(\mathbf{q}_2)$ , trois hypothèses sont nécessaires :

- les mouvements des cellules en  $\mathbf{r}_1$  et  $\mathbf{r}_2$  sont décorrelés et sont statistiquement décrits par la même distribution.
- toute la lumière diffusée en  $\mathbf{r}_1$  va en  $\mathbf{r}_2$ , pour que les changements du champ diffusé en  $\mathbf{r}_2$  ne soient corrélés à ceux d'aucun autre champ émis.
- $\mathbf{q}_1$  est constant dans le temps. Cette approximation est valable si la distance entre les diffuseurs (de l'ordre du *mean free path*) est grande par rapport aux déplacements  $\Delta \mathbf{r}_1(\tau)$  et  $\Delta \mathbf{r}_2(\tau)$ . Pour la dynamique de nos sphéroïdes cette approximation est bonne.

Dans ces conditions, la relation de Siegert tient toujours, et on retrouve :

$$C(\mathbf{q}_2) = \left| \frac{\langle E(\mathbf{q}_2, t) \overline{E(\mathbf{q}_2, t + \tau)} \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}_2, t) \rangle_t} \right|^2 \tag{5}$$

Le calcul complet est fait en annexe G et donne au final, dans le cas d'un maximum de  $n$  diffusions :

$$C = \left| \frac{1}{P_m} \sum_{k=1}^n \alpha_k [(P \times g_1) \otimes^{k-1} (P \times g_1)] \right|^2 \tag{6}$$

où  $g_1$  est la notation prise dans pour :

$$g_1(\mathbf{q}, \tau) \equiv TF\{Pb_\tau(\Delta \mathbf{r})\} \tag{7}$$

On peut aussi exprimer cette équation dans l'espace direct, en gardant les mêmes hypothèses que celles utilisées pour l'analyse de la section II.3.3 :

$$TF^{-1}\{\sqrt{C}P_m\} = \sum_{k=1}^n \alpha_k (2\pi)^{2(k-1)} [Pb(\Delta r) \otimes \hat{P}]^k \tag{8}$$

où  $\tilde{P} = TF^{-1}\{P\}$ .

On retrouve un produit de convolution dans le cas de C, mais la conséquence de la diffusion multiple sur la mesure de déplacement des cellules n'est pas simple. En effet, selon l'analyse utilisée, on peut obtenir soit une vitesse plus grande soit une vitesse plus petite que la vitesse réelle. On reprend le même exemple que pour la fonction de phase, avec une fonction  $g_1 = e^{-(q/q_0(\tau))^2}$ , avec  $q_0 = \frac{1}{v\tau}$ , ce qui revient à un déplacement balistique. On prendra  $v = 25\mu\text{m}/h$ . La figure IV.6.5 compare la fonction  $g_1$  réelle et celle que l'on mesure à cause de la diffusion double. On retrouve une fonction plus "large" que la réalité, comme pour P, à cause de la convolution.

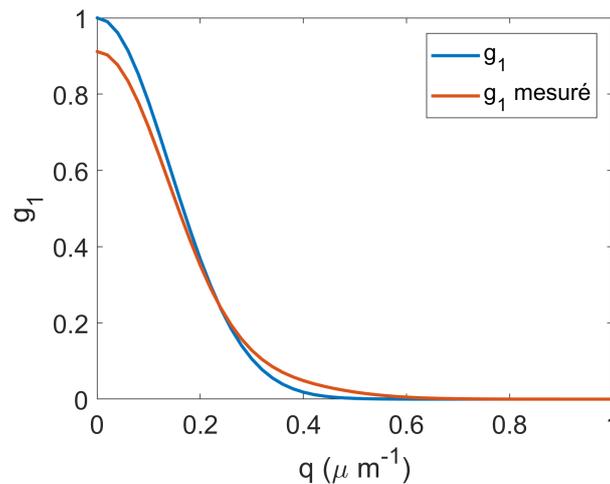


FIGURE IV.6.5 – Fonction de corrélation en diffusion simple et avec 30% de diffusion double, pour  $\tau = 720$  s.

Si on regarde  $C(\tau)$  et qu'on caractérise la vitesse par le temps caractéristique de décorrélation  $T_{1/2}$ , en utilisant  $v \approx \frac{1}{T_c q}$  (voir section III.2.1). On obtient des vitesses plus grandes pour  $q < 0.25\mu\text{m}^{-1}$  (figure IV.6.6 A) et des vitesses plus lentes pour  $q > 0.25\mu\text{m}^{-1}$  (figure IV.6.6 B).

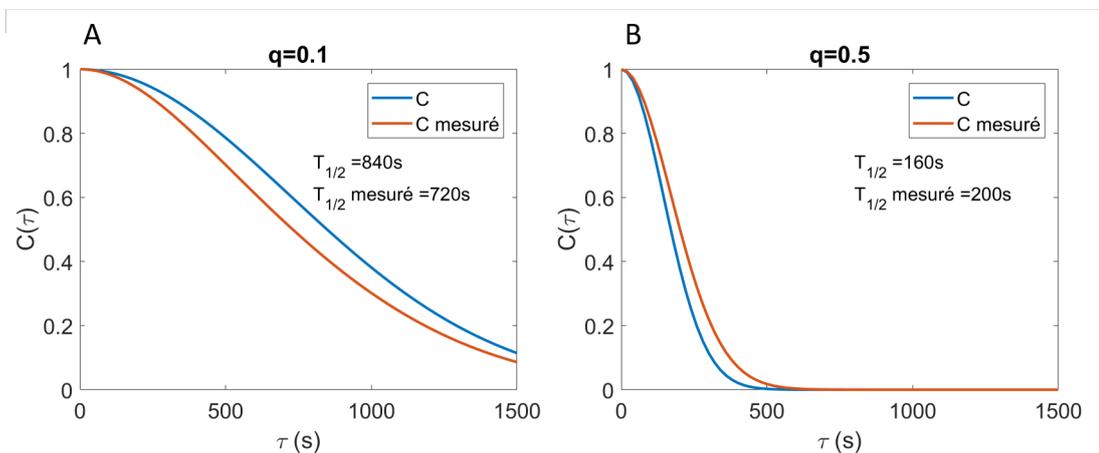


FIGURE IV.6.6 – Fonction de corrélation temporelle de l'intensité  $C(\tau)$  pour  $q = 0.1\mu\text{m}^{-1}$  (A) et  $q = 0.5\mu\text{m}^{-1}$  (B).

Si en revanche, on utilise la transformée de Fourier comme indiqué en section III.2.2, l'effet ne dépend pas de l'angle puisqu'on prend en compte  $C(q)$ . L'analyse ne prend pas en compte l'amplitude de  $C(q)$ , mais uniquement sa forme car on renormalise pour avoir  $g_1(0) = 1$ . Ainsi, comme  $g_1$  mesurée est plus large, la distribution des déplacements  $Pb(\Delta r) = TF^{-1}\{g_1\}$  est plus étroite : on obtient une vitesse plus faible. La figure IV.6.7 montre les distributions de déplacements associées aux  $g_1$  de la figure IV.6.5.

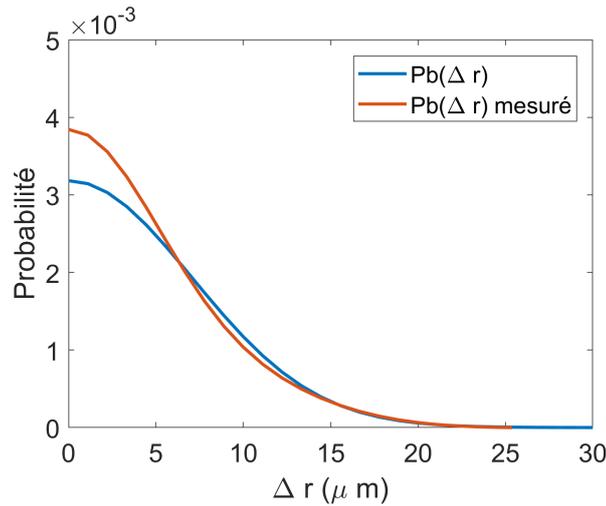


FIGURE IV.6.7 – Distribution de déplacements en diffusion simple et avec 30% de diffusion double.  
 $\tau = 720s$ .

Pour évaluer le biais introduit par la diffusion multiple en fonction du diamètre du sphéroïde, on peut effectuer un calcul numérique à partir de ce modèle. J'ai choisi de simuler un sphéroïde homogène, dont les cellules ont un mouvement ballistique se traduisant par une fonction de corrélation  $g_1$  en diffusion simple  $g_1(q, \tau) = e^{-qv\tau/2}$ , avec  $v = 20 \mu m/h$ . La fonction de phase choisie correspond à la gaussienne mesurée expérimentalement pour un sphéroïde en section IV.2.1 :  $P = \frac{e^{-(q/0.14)^2}}{\pi 0.14^2}$ . Pour des diamètres croissants, l'algorithme calcule la proportion de photons diffusés  $n$  fois à 850 nm, comme indiqué en section IV.1.1, puis utilise l'équation 16 pour en déduire la fonction de corrélation  $C$  mesurée.  $C(q)$  est ajustée par  $e^{-qv^*\tau/2}$  pour différentes valeurs de  $\tau$ , ainsi le ratio  $v^*/v$  indique si la vitesse mesurée est sur-évaluée ou sous-évaluée. L'ajustement est fait pour  $0.6 < q < 1.1 \mu m^{-1}$  pour correspondre à ce qui est fait expérimentalement. Pour revenir à la différence d'analyse abordée plus haut, la méthode qui utilise la transformée de Fourier, revient à renormaliser  $C(q)$  tel que  $C(0) = 1$  avant d'effectuer l'ajustement exponentiel. Pour la méthode temporelle qui utilise les temps caractéristiques de décorrélation, cette étape n'existe pas. On va ainsi pouvoir comparer l'effet de la diffusion multiple selon la méthode utilisée.

Le premier résultat a été de constater que le comportement ballistique est conservé :  $v^*$  ne dépend pas de  $\tau$ . En revanche, le ratio  $v^*/v$  est bien affecté par la diffusion multiple et l'erreur comise en fonction du diamètre du sphéroïde est indiqué en figure IV.6.8.

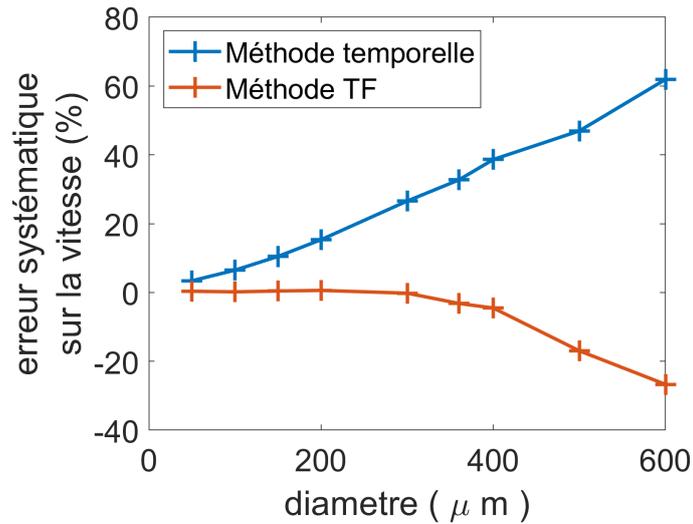


FIGURE IV.6.8 – Erreur systématique sur la mesure de la vitesse des cellules, à cause de la diffusion multiple, en fonction du diamètre du sphéroïde.

La méthode temporelle sur-estime la vitesse (les fluctuations d'intensité sont plus rapides qu'en diffusion simple) alors que la méthode TF sous-estime la vitesse (la fonction  $g_1$  est plus large qu'en diffusion simple). La méthode TF donne des résultats nettement moins affectés par la diffusion multiple, avec une erreur de moins de 5% à  $400\mu m$ , contre presque 40%. En terme d'épaisseur optique, cela représente 5.3 MFP. Il faut cependant rappeler que la méthode TF nécessite la mesure de  $C$  à de faibles angles pour la renormalisation, or ce sont les angles pour lesquels la mesure est la moins aisée.

S'il est vérifié, ce modèle permet en fait d'aller plus loin qu'une estimation de l'erreur comise puisqu'il est possible de corriger les mesures de  $C$  et  $P_m$  obtenues en diffusions multiples. En effet, le système des 2 équations 8 et 2 a l'avantage d'être solvable. Pour obtenir  $P$ , on passe dans l'espace direct :

$$TF\{P_m\} = \sum_{k=1}^N \alpha_k TF\{P\}^k \quad (9)$$

On obtient un polynôme de degré  $N$  en  $TF\{P\}$ . On cherche alors les racines réelles positives pour avoir  $TF\{P\}$ , puis on applique la TF inverse pour calculer  $P$ . Une fois  $P$  calculé, on peut résoudre l'équation 8 de la même manière : il s'agit d'un polynôme de degré  $N$  en  $Pb(\Delta r) \otimes \hat{P}$ . A partir de  $Pb(\Delta r) \otimes \hat{P}$ , on peut obtenir  $g_1$  en appliquant une TF puis en divisant par  $P$ .

En conclusion, le calcul présenté ici ouvre une piste pour trouver un modèle de correction de la diffusion multiple. Il serait intéressant de tester expérimentalement ou par des simulations ce modèle. Si vérifié, il permettrait d'obtenir une mesure absolue et non plus relative dans les cas de diffusions multiple importante.

## IV.6.2 RÉDUIRE LA DIFFUSION MULTIPLE

Cette courte section présente 3 méthodes trouvées dans la littérature pour réduire la diffusion multiple.

### Polarisation

Pour diminuer la proportion de diffusion multiple, il serait intéressant de tester l'ajout de deux filtres polarisant : un polariseur linéaire au sortir du laser et un analyseur linéaire, orienté identiquement au polariseur, avant la caméra. Effet, la diffusion multiple affecte la polarisation qui est progressivement perdue [150]. Ainsi cette configuration pourrait filtrer les photons diffusés plus d'une fois.

### Corrélation croisée

Si on s'intéresse à un échantillon n'étant pas un objet de phase, on peut utiliser une corrélation croisée pour éliminer la diffusion multiple. Un tel échantillon atténue l'intensité mais ne modifie pas la phase de la lumière et l'objet est alors "réel" au sens de la transformée de Fourier. On a donc  $E(-\mathbf{q}) = \overline{E(\mathbf{q})}$ , soit  $I(-\mathbf{q}) = I(\mathbf{q})$  en diffusion simple. Grâce à cette propriété, on peut montrer que mesurer  $\langle I(\mathbf{q}, t)I(-\mathbf{q}, t + \tau) \rangle$ , et non plus  $\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle$ , permet de supprimer les photons diffusés plus d'une fois [151]. Les cellules et les sphéroïdes ne peuvent cependant pas être considérés comme des objets "réels".

### Diffusion bidirectionnelle

De manière similaire, l'article [152] propose de mesurer la lumière diffusée par 2 sources illuminant l'échantillon dans deux directions différentes. En effectuant une corrélation croisée des deux mesures, il est possible d'éliminer le signal issu de la diffusion multiple.

### Sélection temporelle des photons

Les photons peu diffusés peuvent aussi être sélectionnés comme étant ceux arrivant en premier sur le détecteur. En effet, les photons subissant un grand nombre de diffusion parcourent au final une distance plus grande et arrivent sur la caméra avec un délai de l'ordre de la nanoseconde. Mesurer la lumière diffusée de manière résolue en temps peut être fait avec un laser impulsif ou un laser modulé en fréquence associé à un interféromètre [153]. Cette méthode a été utilisée en *Diffusing Wave Spectroscopy*, où le nombre de diffusion est très grand, pour améliorer la résolution spatiale [154]. Peut-être est-il possible de transposer la technique au cas de la DLS pour sélectionner les photons diffusés une seule fois. À ma connaissance, cela n'a pas encore été entrepris.

# V

Motilité des macrophages au cours de la  
phagocytose de cellules apoptotiques

# V1

# INTRODUCTION ET MÉTHODES

Le but de cette dernière partie est double :

1. tester le potentiel de la DLS sur un problème nouveau, pour lequel notre technique n'a pas été optimisée.
2. comprendre comment la migration des macrophages est affectée par la présence de leurs proies, les cellules apoptotiques.

Comme il s'agit d'un début de projet, les résultats ne sont pas complets mais ouvrent tout de même des perspectives.

## V.1.1 CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

Les macrophages sont bien connus pour leur rôle dans la défense immunitaire contre les infections, en particulier pour leur capacité à phagocyter puis détruire les agents pathogènes [155]. Il existe une autre fonction tout aussi importante remplie par ces cellules : l'élimination des cellules apoptotiques [156, 157]. L'apoptose correspond à la mort programmée de la cellule : en réponse à un signal, la cellule déclenche une procédure d'autodestruction. Ce mécanisme est utilisé dans de nombreux processus dont le maintien du nombre de cellules dans les tissus où celles-ci sont renouvelées (homéostasie), l'élimination des cellules endommagées par des agents mutagènes ou des cellules infectées par des bactéries ou des virus [158, 159]. Une fois entrée en apoptose, la cellule doit être rapidement phagocytée, sinon la cellule apoptotique entre en nécrose et relargue son contenu, ce qui est toxique pour les cellules environnantes et provoque une inflammation [160]. Pour être trouvée rapidement par les macrophages, la cellule envoie des signaux "find me" ("trouvez-moi") dès le début de l'apoptose [161] (figure V.1.1). En parallèle, elle expose des signaux "eat me" ("mangez-moi") à sa surface, le plus connu étant le lipide PtdSer qui passe du feuillet interne de la membrane cellulaire au feuillet externe lors de l'apoptose [162].

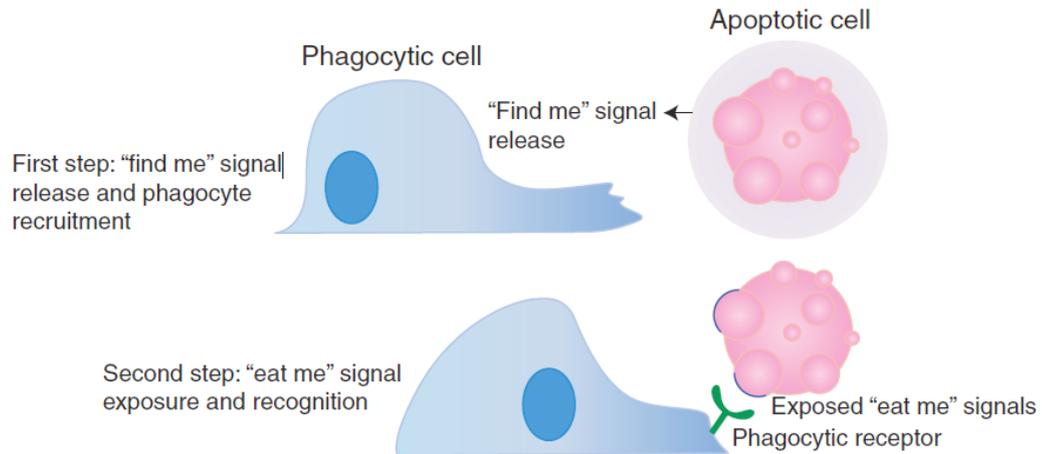


FIGURE V.1.1 – Schéma des deux premières étapes de l'élimination des cellules apoptotiques, tiré de [157].

La question que nous adressons ici est : est-ce que le contact avec des cellules apoptotiques peut modifier le phénotype migratoire des macrophages de manière quantitative? Ce travail a été mené en collaboration avec Arnaud Millet de l'institut Albert Bonniot (IAB - Grenoble). Si la DLS a été choisie pour étudier les déplacements des macrophages, c'est pour sa facilité d'utilisation pour des échantillons en 3D. En effet, l'objectif initial était d'étudier la migration 3D des cellules dans un gel de collagène. La première phase d'expériences en 2D représente la majeure partie des résultats obtenus et la situation 3D n'a été qu'effleurée. La DLS en 2D présente tout de même l'intérêt du grand champ de vue et permet d'éviter les difficultés inhérentes au *tracking* de cellules.

## V.1.2 MÉTHODES

### Culture cellulaire

La lignée étudiée est appelée THP1, il s'agit de monocytes humains issus d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë [163]. Les cellules sont non-adhérentes et restent en suspension (figure V.1.2 A). Les monocytes sont des précurseurs des macrophages. Pour induire une différenciation en macrophages, on les expose pendant 48h à du PMA (phorbol myristate acetate) à raison d'une concentration comprise entre 20 et 50 nM. Après ce délai, la PMA est retirée avec du PBS. Une fois différenciés en macrophages, la division cellulaire est stoppée et les cellules adhèrent au fond de la boîte de culture (figure V.1.2 B). Elles présentent un aspect granuleux dû aux vésicules qui se forment à leur surface.

La culture cellulaire est réalisée sur les monocytes selon un protocole légèrement différent de celui présenté en section II.1.2 car les cellules n'adhèrent pas à la flasque de culture. Il n'est donc pas nécessaire de les détacher. Après avoir compté les cellules, un million d'entre elles sont placées dans un tube et centrifugées 5 minutes à 300 g. Le surnageant est retiré et les cellules sont re-suspendues dans 5mL de milieu avant d'être transférées dans une nouvelle flasque. Le milieu de culture est constitué de RPMI (Roswell Park Memorial Institute

Medium) suppléé avec du GlutaMAX (ThermoFisher) auquel est ajouté 10% en volume de sérum foetal bovin. Les cellules doivent être maintenue à une concentration comprise entre 200k et 800k cellules par mL. En pratique, on les repique tous les 2 ou 3 jours.

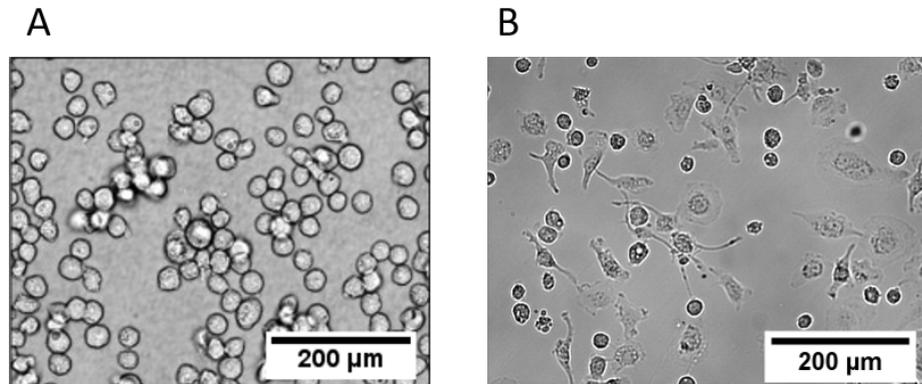


FIGURE V.1.2 – Microscopie de monocytes THP1 (A) (tiré de [164]) et de monocytes THP1 différenciés en macrophages après 48h à 20nM de PMA (B).

## Montage

Les résultats du chapitre 2 ont été obtenus avec le premier montage réalisé (section II.2.1) avec la caméra située à 92.8 mm de l'échantillon. Pour les chapitres suivants, le montage utilisé est le second montage réalisé, présenté en section II.2.2. L'échantillon est illuminé par un laser de longueur d'onde  $\lambda = 850$  nm sans aucune lentille, soit avec un profil gaussien d'écart type  $525 \pm 6 \mu m$  dans le plan de l'échantillon. Cette taille de laser permet de sonder une population d'environ 1500 cellules. L'imagerie en microscopie n'est pas faite en simultané de l'acquisition de la lumière diffusée. Une image est enregistrée toutes les 20 secondes sur une période d'au moins 1h30.

# V2 POLARISATION DES MACROPHAGES

Avant de tester l'influence des cellules apoptotiques sur les macrophages, nous avons voulu regarder si l'état d'activation, ou polarisation, des macrophages modifie quantitativement leurs paramètres de migration. Les macrophages sont des cellules du système immunitaire qui sont présente une plasticité phénotypique, c'est-à-dire que malgré leur stade de différenciation finale elles sont capables de modifier leur programme transcriptionnel en fonction de leur environnement. Ce changement de comportement est appelé "polarisation" et a été décrit en premier en 1992 [165]. Une première classification de ces polarisations a été proposées en 2000 [166], puis complétée en 2004 [167]. Deux polarisations vont nous intéresser ici (figure V.2.1) :

- la polarisation "M1" induite par des signaux pro-inflammatoires, produisant un comportement pro-inflammatoire : le macrophage produit de cytokines inflammatoires et est spécialisé dans l'élimination des bactéries.
- la polarisation "M2" induite par des signaux anti-inflammatoires : l'action du macrophage permettra d'aller vers la résolution d'une inflammation, avec en particulier une phagocytose plus importante et un remodelage tissulaire.

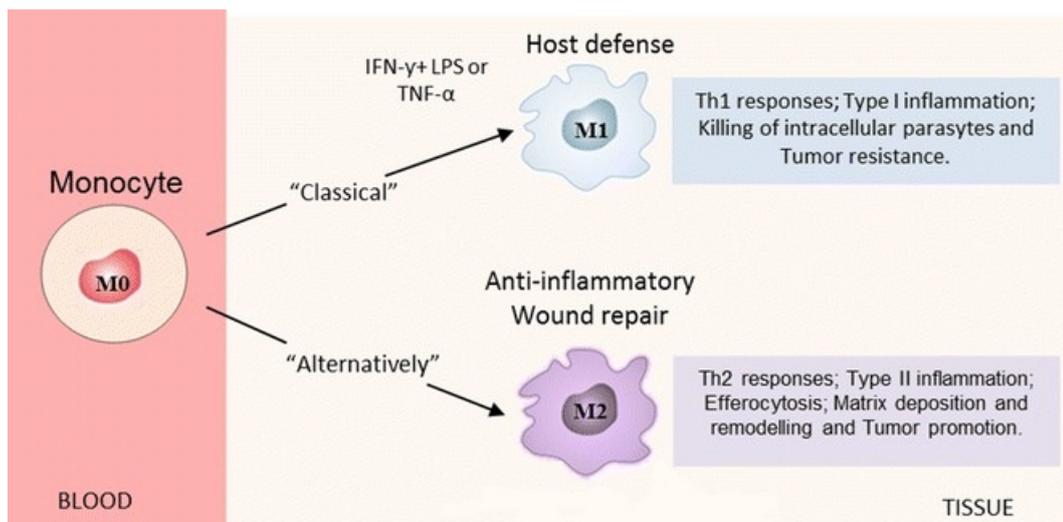


FIGURE V.2.1 – Schéma de la différenciation puis polarisation des monocytes, d'après [168]

Les résultats obtenus pour les deux polarisations pourront nous servir de référence

pour comparer l'effet des cellules apoptotiques à un signal pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire.

### Préparation des échantillons

Au sortir d'un repiquage, on prépare une solution de monocytes avec une concentration de 270k cellules/mL et 20nM de PMA. 2 mL sont placés dans une boîte de pétri de 35mm de diamètre et incubés pendant 48h. Après ce délai, les monocytes sont différenciés en macrophages et adhèrent au fond de la boîte de pétri. On rince alors l'échantillon deux fois avec du PBS afin d'éliminer la PMA avant d'ajouter un nouveau milieu selon la polarisation souhaitée :

- M1 : 2mL de milieu contenant 1ng/mL de LPS (Lipopolysaccharide) et 20 ng/mL d'IFN- $\gamma$  (Interféron gamma)
- M2 : 2mL de milieu contenant 20 ng/mL d'IL-4 (Interleukine-4) et 20 ng/mL d'IL-13 (Interleukine-13).

Les macrophages sont ainsi stimulés pendant 24h avant d'être observés.

## V.2.1 RÉSULTATS

En utilisant la même analyse que les parties précédentes, on calcule la fonction de corrélation  $C(q, \tau)$  et on en déduit la distribution de déplacements  $Pb_\tau(\Delta r)$  des cellules pendant un délai  $\tau$ . La figure V.2.2 présente les résultats obtenus pour la polarisation M1. La courbe présentée résulte d'une moyenne sur 12 expériences identiques.

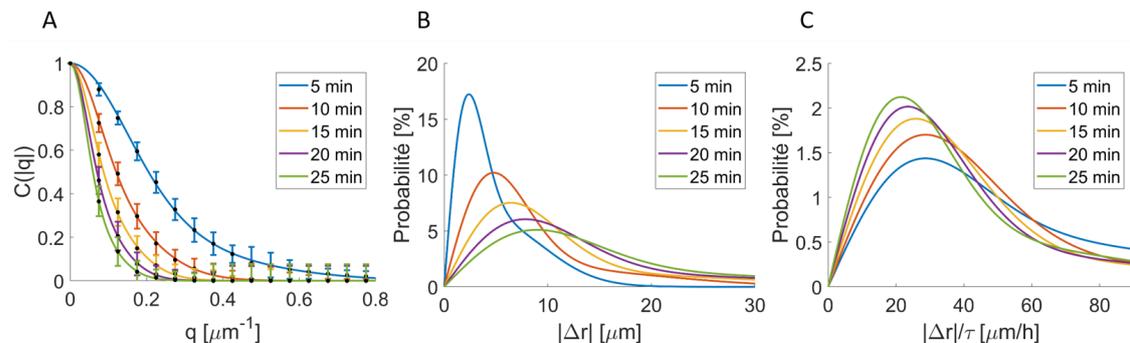


FIGURE V.2.2 – A : fonctions de corrélation  $C(q)$  obtenues pour des délais entre 5 et 25 minutes. barres d'erreur : erreur type. B : distributions d'amplitude des déplacements pour les mêmes délais. C : déplacements rapportés au délai  $\tau$  (vitesse).

La figure V.2.2 A présente la fonction de corrélation pour des délais allant de 5 à 25 minutes, ajustées avec l'expression :

$$C(q) = \left[ A e^{-(q^2 \sigma_1^2)/2} + (1 - A) e^{-(q^2 \sigma_2^2)/2} \right]^2 \quad (1)$$

Cet ajustement est choisi car il correspond bien aux courbes mesurées et permet d'avoir une forme analytique. Un ajustement par deux gaussiennes peut suggérer l'existence de deux

populations de cellules dans l'échantillon. Mais il est difficile de faire cette conclusion car  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  sont proches et ne donnent pas deux populations bien distinctes. Quoi qu'il en soit, on ne cherche pas ici à distinguer différentes populations mais à caractériser l'ensemble.

On déduit de la figure A la distribution d'amplitude des déplacements des cellules pour les délais correspondants en figure V.2.2 B. Le calcul analytique donne l'expression (I) :

$$Pb(|\Delta r|) = |\Delta r| \left[ \frac{A}{\sigma_1^2} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{|\Delta r|}{\sigma_1} \right)^2} + \frac{1-A}{\sigma_2^2} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{|\Delta r|}{\sigma_2} \right)^2} \right] \quad (2)$$

Pour la polarisation M2, on obtient aussi une fonction de corrélation bien ajustée par une somme de deux gaussiennes et le même traitement est effectué. La figure V.2.3 montre la comparaison entre les deux polarisations.

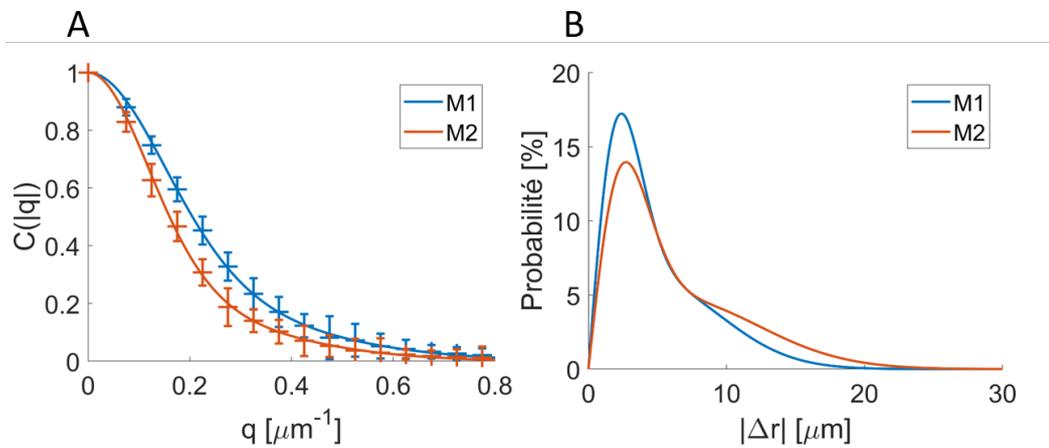


FIGURE V.2.3 – A : fonctions de corrélation  $C(q)$  obtenues pour un délai de 5 minutes pour M1 et M2. Barres d'erreur : erreur type. B : distributions d'amplitude des déplacements correspondantes.

Pour la polarisation M2, on constate une plus grande occurrence des déplacements plus grands. Contrairement aux cas des parties précédentes, si on rapporte la distance au délai  $\tau$  en figure figure V.2.2 C, les distributions ne se superposent pas. Pour les échelles de temps observées, le déplacement n'est pas simplement balistique. On ne peut donc plus caractériser le déplacement des cellules uniquement par une vitesse. On choisit de regarder la moyenne quadratique des déplacements (*Mean Squared Displacement* - MSD) car c'est la grandeur couramment utilisée pour caractériser la migration cellulaire. Dans notre cas, la MSD peut être calculée à partir de l'ajustement précédent :

$$MSD(\tau) = 2 \left( A\sigma_1(\tau)^2 + (1-A)\sigma_2(\tau)^2 \right) \quad (3)$$

Pour comparer M1 et M2, la MSD dans chacun des cas est présentée en figure V.2.4 A. Il s'agit de la MSD issue de l'ajustement de la courbe moyenne de  $C$ , et non de la moyenne des ajustements des courbes de chaque échantillon.

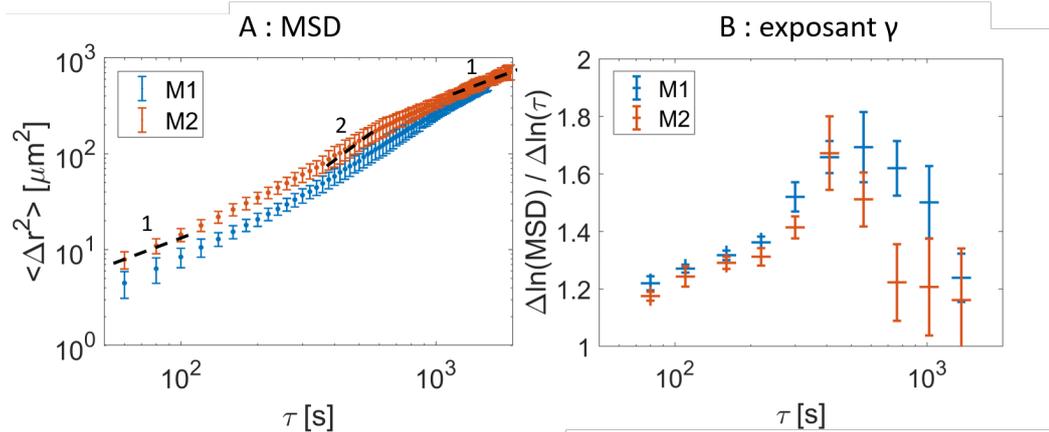


FIGURE V.2.4 – A : Déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du délai  $\tau$  pour les deux polarisations M1 et M2. Barres d'erreur : intervalle de confiance à 95 % de l'ajustement. B : exposant  $\gamma$  de la loi de puissance. L'exposant est obtenu avec l'équation 4, puis moyenné sur des intervalles de durée exponentielle à  $\tau$ . Barres d'erreur : erreur type.

Qualitativement, on retrouve dans la MSD le même constat que celui de la figure V.2.3 : un déplacement plus rapide pour la polarisation M2. La MSD est représentée en échelle logarithmique afin de faire ressortir les lois de puissance. Si on a  $MSD \propto \tau$  il s'agit d'une marche aléatoire, si  $MSD \propto \tau^2$  il s'agit d'un mouvement balistique. Dans les deux cas, on a une loi de puissance, l'exposant, noté  $\gamma$ , étant 1 dans le premier cas et 2 dans le deuxième. Les lignes en pointillé sur la figure A donnent pour comparaison la pente pour un exposant  $\gamma = 1$  puis  $\gamma = 2$  puis  $\gamma = 1$ . Pour mieux visualiser l'exposant, la figure B représente  $\gamma$  en fonction du délai  $\tau$ . Il est calculé comme étant la dérivée numérique du logarithme de la MSD en fonction du logarithme de  $\tau$  :

$$\gamma(\tau + d\tau/2) = \frac{\ln(MSD(\tau + d\tau)) - \ln(MSD(\tau))}{\ln(\tau + d\tau) - \ln(\tau)} \quad (4)$$

L'exposant varie entre 1 et 2, on a donc un comportement intermédiaire entre un mouvement balistique et mouvement brownien. Afin de comprendre ces résultats, la section suivante présente un modèle. L'objectif est de comprendre quel est le type de mouvement des cellules et d'obtenir les paramètres quantitatifs associés pour comparer les deux polarisations.

## V.2.2 MODÈLE

### Temps longs

Si on se limite aux temps supérieurs à 480 secondes (8 minutes), la MSD passe d'un régime quasi-balistique ( $\gamma = 2$ ) à un régime brownien ( $\gamma = 1$ ). Cette transition correspond à une marche aléatoire dont le temps de persistance  $T_P$  est de l'ordre des temps observés. Aux temps plus courts que  $T_P$ , le mouvement est en ligne droite, aux temps plus longs que  $T_P$  la cellule change de direction et effectue une marche aléatoire. Cette description correspond par ailleurs à ce qui est observé en microscopie champ plein.

Il existe un modèle général pour les marches aléatoires avec persistance appelé *Persistent Random Walk* (PRW) [169, 170]. Le modèle repose sur une équation stochastique différentielle décrivant le mouvement des cellules :

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = -\frac{1}{T_P}\mathbf{v} + \frac{S}{\sqrt{T_P}} \frac{d\mathbf{W}}{dt} \quad (5)$$

où  $\mathbf{v}$  est le vecteur vitesse de la cellule,  $T_P$  est le temps de persistance,  $S = \sqrt{\langle \mathbf{v}^2 \rangle}$ ,  $\mathbf{W}$  est un processus de Wiener. Le processus de Wiener est la description mathématique d'une marche aléatoire, en 2D dans notre cas. Dans cette équation, la marche aléatoire n'est pas sur la position de la cellule, mais sa vitesse. Cela signifie que s'il n'y avait pas le premier terme dans l'équation, la norme de la vitesse évoluerait comme la racine carrée du temps. Le premier terme empêche d'avoir une vitesse infinie en ajoutant une résistance au déplacement décrite par une décorrélation exponentielle du vecteur vitesse.

Les hypothèses associées à ce modèle sont :

- isotropie de la distribution des déplacements des cellules : vérifié dans notre cas.
- population homogène de cellules : a priori pas vérifié dans notre cas.
- distribution gaussienne des déplacements pendant un délai  $\tau$  : pas vérifié dans notre cas.
- corrélation des vitesse  $\langle \mathbf{v}(t)\mathbf{v}(t+\tau) \rangle$  en exponentielle décroissante : pas vérifiable avec les données de la DLS.

Toutes les hypothèses ne sont pas vérifiées dans notre cas et on ne prétendra pas que ce modèle décrit exactement le mouvement de nos cellules. On peut en revanche l'utiliser pour caractériser la vitesse et la persistance du mouvement des macrophages selon leur polarisation. Pour cela, on ajuste les mesures de MSD avec l'expression de la MSD qui découle du modèle [171] :

$$MSD(\tau) = nS^2T_P^2 \left( e^{-\tau/T_P} + \frac{\tau}{T_P} - 1 \right) \quad (6)$$

avec  $n$ , la dimension de l'espace : 2 dans notre cas.

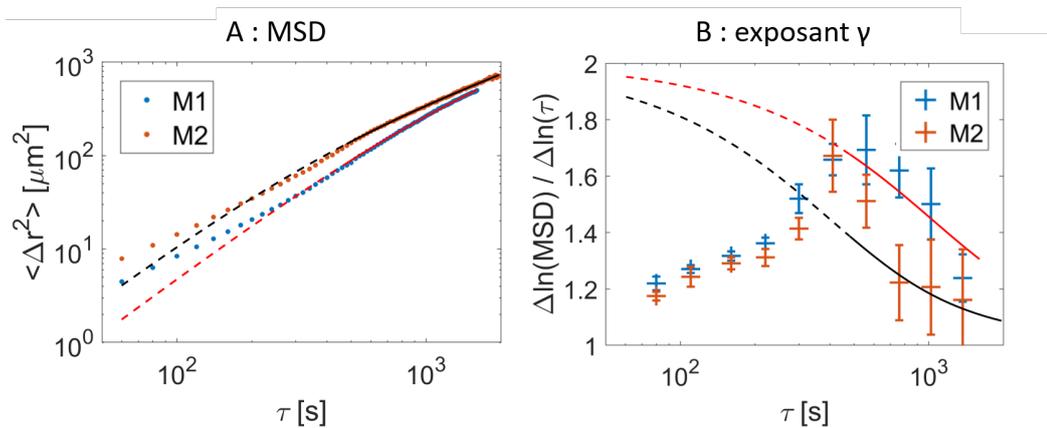


FIGURE V.2.5 – A : Déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du délai  $\tau$  pour les deux polarisations M1 et M2. Lignes pleines : ajustement avec l'équation 6. Lignes pointillés : prolongements de l'ajustement hors des points ajustés. B : exposant  $\gamma$  de la loi de puissance. Même remarque pour les lignes pleines et pointillés.

La figure V.2.5 indique les ajustements que donne ce modèle et la table H.2 donne les paramètres associés. L'ajustement est réalisé sur la MSD, non sur l'exposant  $\gamma$ . On peut aussi déduire le coefficient de diffusion  $D$  à partir de  $S$  et  $T_P$  :  $D = S^2 T_P / 2$ .

TABLE V.2.1 – Vitesse  $S$  et persistance  $T_P$  en fonction de la polarisation. Erreur : intervalle de confiance à 95% de l'ajustement.

Polarisation	$S$ ( $\mu m/h$ )	$T_P$ (s)	$D$ ( $\mu m^2/h$ )
M1	$82 \pm 1$	$407 \pm 16$	$377 \pm 17$
M2	$129 \pm 6$	$158 \pm 15$	$364 \pm 45$

Les vitesses trouvées peuvent sembler élevées, surtout en comparant avec les résultats obtenus avec la lignée CT26, mais correspondent à ce qu'on trouve dans la littérature [172, 173]. Les deux polarisations entraînent des comportements migratoires bien distincts. Aux temps courts ( $< 500s$ ), ou distances courtes ( $< 10 \mu m$ ), les macrophages M1 sont plus lents, avec une vitesse instantanée  $S$  36% plus petite que celle des macrophages M2. En revanche le temps de persistance  $T_P$  des M1 est nettement plus grand (facteur 2.6) que celui des M2, si bien qu'aux temps longs les coefficients de diffusion sont similaires.

Ces différences sont probablement liées aux fonctions spécifiques qu'on a rempli les macrophages selon leur polarisation. Pour la polarisation M1, peut-être qu'un mouvement plus persistant est pertinent pour capter des proies.

Ces résultats permettront de comparer l'influence des cellules apoptotiques à des signaux pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2).

Remarque : plutôt que de passer par le calcul de la MSD, on aurait pu ajuster directement la fonction de corrélation  $C$ . Trouver l'expression analytique de  $C$  issue du modèle *Persistent Random Walk* n'est pas évident mais c'est possible avec un modèle un peu plus simple, comme montré en annexe H.

## Temps courts

Le modèle pour les temps longs ne rend pas bien compte de la MSD mesurée pour les temps  $\tau < 500$  s. Pour ces délais, la MSD correspond à des distances parcourues inférieurs à  $10 \mu m$ , donc à des mouvements plus petits que le diamètre des cellules ( $20 \mu m$ ). En observant les cellules en microscopie, on voit qu'il s'agit de fluctuations de la position du centre de la cellule sans réelle translocation, comme par exemple lors d'un changement de forme de la cellule. Ces fluctuations rapides n'ont pas d'impact sur la migration à grande échelle, mais peuvent être une signature intéressante de l'activité des macrophages.

J'ai choisi de modéliser ce mouvement aux temps courts par un oscillateur harmonique, c'est à dire comme étant des fluctuations autour d'une position d'équilibre, sans translocation aux temps longs. L'expression de la MSD est connue dans ce cas [174] :

$$MSD(\tau) = L^2(1 - e^{-\tau/T_F}) \quad (7)$$

où  $L$  correspond à la distance maximale des fluctuations de la position du centre de la cellule et  $T_F$  est le temps caractéristique des fluctuations. Pour ajuster les courbes de la figure V.2.5

A, on garde constant le coefficient de diffusion  $D = S^2 T_P / 2$  et on ajuste avec les paramètres  $T_P$ ,  $L$  et  $T_F$  :

$$MSD(\tau) = L^2(1 - e^{-\tau/T_F}) + 2T_P \left( e^{-\tau/T_P} + \frac{\tau}{T_P} - 1 \right) \quad (8)$$

Les résultats obtenus sont présentés en table V.2.2 et les ajustement associés sont représentés en figure V.2.6.

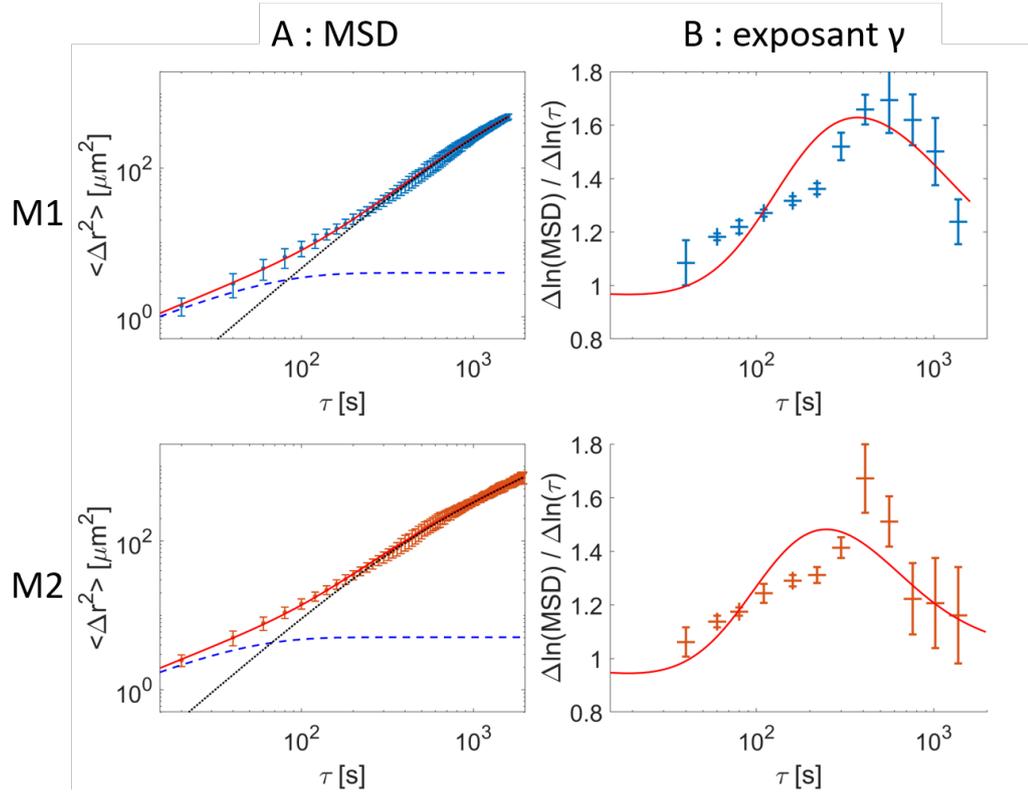


FIGURE V.2.6 – A : Déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du délai  $\tau$  pour les deux polarisations M1 et M2. Lignes pleines : ajustement avec l'équation 8. Lignes pointillées : premier (bleu) et deuxième (noir) terme de 8. B : exposant  $\gamma$  de la loi de puissance. Ligne pleine : exposant issu de l'ajustement.

TABLE V.2.2 – Vitesse  $S$  et persistance  $T_P$  en fonction de la polarisation.

Polarisation	$S$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$T_P$ (s)	$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ )	$L$ ( $\mu\text{m}$ )	$T_F$ (s)
M1	$79 \pm 1$	$432 \pm 8$	$377 \pm 17$	$2.0 \pm 0.2$	$50 \pm 12$
M2	$118 \pm 3$	$190 \pm 7$	$364 \pm 45$	$2.3 \pm 0.2$	$36 \pm 10$

Les coefficients  $S$  et  $T_P$  de la marche aléatoire aux temps longs sont peu changés. Le temps caractéristique  $T_F$  des fluctuations de position est environ 10 fois plus petit que  $T_P$  traduisant des mouvements plus rapides. Ces mouvements sont cependant limités à des distances  $L$  de l'ordre de  $2 \mu\text{m}$ . Les deux polarisations ont des paramètres  $L$  proches. Le temps  $T_F$  est plus grand dans le cas de M1, mais l'erreur de mesure ne permet pas de conclure avec certitude.

# V3 RÉPONSE AUX CELLULES APOPTOTIQUES

Dans ce chapitre, les macrophages sont incubés avec des cellules apoptotiques afin d'étudier leur effet sur le comportement migratoire des macrophages. Comme l'apoptose est un processus dynamique [175], on compare l'effet de cellules apoptotiques à deux périodes différentes : au début de l'apoptose (cellules apoptotiques précoces) et à la fin de l'apoptose (cellules apoptotiques tardives).

## Préparation des échantillons

Au sortir d'un repiquage, on prépare une solution de monocytes avec une concentration de 500k cellules/mL et 20nM de PMA. 2 mL sont placés dans une boîte de pétri de 35mm de diamètre et incubés pendant 48h. Après ce délai, la PMA est rincée et on ajoute à la culture des cellules apoptotiques. Il s'agit de cellules Jurkat irradiées 2 minutes aux UV puis incubées 4h pour l'apoptose précoce et 20h pour l'apoptose tardive. Macrophages et cellules apoptotiques sont incubés 1h. Enfin les cellules Jurkat, non adhérentes, sont rincées afin de ne laisser que les macrophages. Des échantillons de contrôle sont incubés sans cellules apoptotiques. Chaque type d'échantillon est préparé et observé 3 fois.

Visuellement, on n'observe pas de différence significative entre les différents échantillons. La figure V.3.1 montre une microscopie d'un échantillon de contrôle.

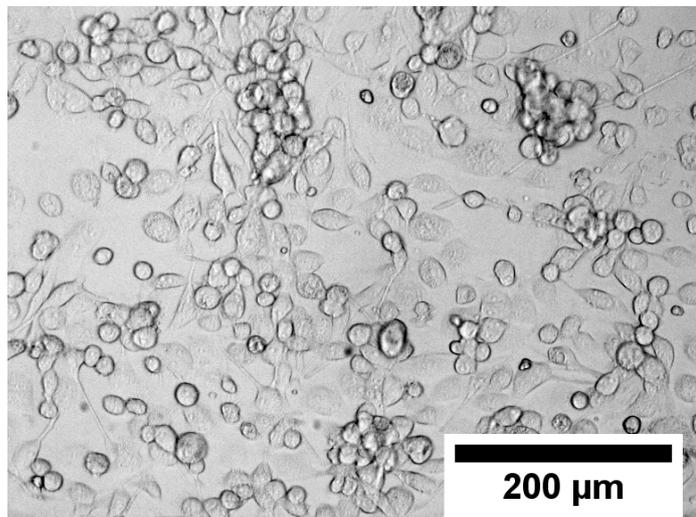


FIGURE V.3.1 – Microscopie des macrophages non exposés aux cellules apoptotiques.

### V.3.1 RÉSULTATS

Pour analyser les fonctions de corrélations d'intensité obtenues par DLS, on reprend le modèle précédent de marche aléatoire avec persistance. On ne s'intéresse qu'à la migration et non aux fluctuations aux temps courts. En résumé, on ajuste la fonction C, on en déduit la distribution des déplacements, puis la MSD qu'on ajuste avec l'équation 6 pour en tirer la vitesse S des cellules et le temps de persistance  $T_P$ . On déduit de ces deux paramètres d'ajustement le coefficient de diffusion D et la longueur de persistance :  $L_P = ST_P$ . Contrairement au chapitre précédent, l'analyse n'est pas faite sur la courbe C moyennée, mais sur chacune des courbes des échantillons.

TABLE V.3.1 – Vitesse S, persistance  $T_P$ , coefficient de diffusion D et longueur de persistance  $L_P$  en fonction d'échantillon. Erreur : 2x erreur type.

Echantillon	S ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$T_P$ (s)	D ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ )	$L_P$ ( $\mu\text{m}$ )
Apoptose précoce	$66 \pm 8$	$350 \pm 50$	$210 \pm 40$	$6.4 \pm 0.9$
Apoptose tardive	$25 \pm 5$	$1240 \pm 860$	$100 \pm 40$	$8 \pm 4$
Contrôle	$41 \pm 5$	$740 \pm 240$	$170 \pm 30$	$8 \pm 2$
M1	$82 \pm 1$	$407 \pm 16$	$377 \pm 17$	$9.3 \pm 0.4$
M2	$129 \pm 6$	$158 \pm 15$	$364 \pm 45$	$5.7 \pm 0.6$

On constate que plus la vitesse S est élevée, plus le temps de persistance  $T_P$  est court. Cette relation a pour conséquence de conserver la longueur de persistance  $L_P$ , sauf pour M2. Le coefficient de diffusion D n'est en revanche pas conservé, contrairement au chapitre précédent. Cette longueur constante implique  $S \propto \frac{1}{T_P}$  comme on peut le voir en figure V.3.2 où l'axe des ordonnées est la vitesse S et l'axe des abscisses est le taux de changement de direction  $\Gamma = \frac{1}{T_P}$ . La droite en pointillé est un ajustement linéaire (M2 n'est pas pris en compte).

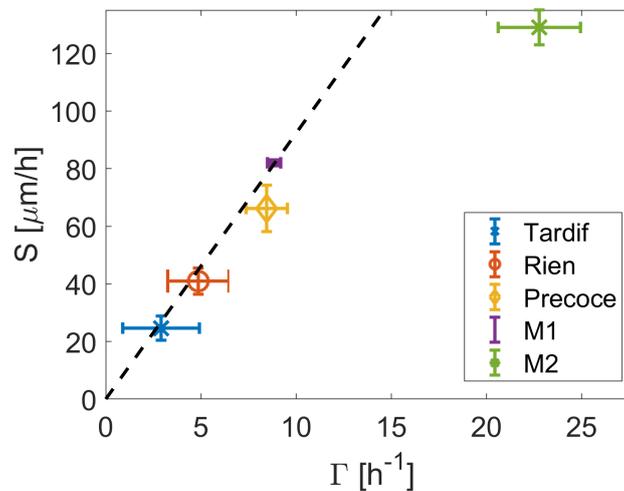


FIGURE V.3.2 – Vitesse S en fonction du taux de changement de direction des cellules  $\Gamma$  selon l'échantillon. Ajustement linéaire  $S = 9.2\Gamma$ .

L'effet des cellules en apoptose précoce est opposé à celui des cellules en apoptose tardive : dans le premier cas la vitesse augmente par rapport au contrôle (et  $T_P$  diminue) et dans le second la vitesse diminue (et  $T_P$  augmente). Les macrophages exposés aux cellules en apoptose précoce sont plus rapides à la fois aux courtes distances (S) et aux longues distances (D). Si on compare aux résultats obtenus avec les polarisations M1 et M2, on observe une proximité entre les macrophages pro-inflammatoires M1 et ceux exposés aux cellules récemment entrées en apoptoses. Ce résultat est surprenant car on sait par ailleurs que la phagocytose de cellules apoptotiques entraîne au contraire une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires chez les macrophages [157].

Ces résultats mériteraient d'être confirmés par un plus grand nombre de mesure. C'est notamment vrai pour le cas des cellules en apoptose tardive pour lesquelles le temps d'acquisition doit être augmenté en raison du temps de persistance long (1240 s). Enfin, il serait intéressant d'observer la dynamique des macrophages en présence des cellules apoptotiques. Dans un tel échantillon, il serait néanmoins nécessaire de différencier la lumière diffusée par les macrophages de celle diffusée par cellules apoptotiques. Pour cela, on peut envisager d'augmenter la diffusion des macrophages en les marquant avec des nanoparticules d'or. L'étude des mécanismes de l'élimination des cellules apoptotiques est un domaine relativement jeune et prometteur en termes de débouchés thérapeutiques.

# V4 MOBILITÉ DANS ET SUR UN GEL DE COLLAGÈNE

Les expériences présentées dans cette partie ont jusque-là été réalisées en 2D, sur le fond d'une boîte de pétri. Dans ce chapitre, la transition entre la 2D et la 3D est étudiée en comparant la migration de macrophages dans les situations suivantes :

- 2D-C : sur une surface couverte de collagène.
- 2D-G : sur un gel de collagène.
- 3D : inclus dans un gel de collagène.

Les échantillons intermédiaires entre la situation précédente et le cas 3D servent de contrôles. La comparaison entre 2D-C et 2D-G permet de voir l'influence de la rigidité du substrat (environ 600 Pa pour le gel) et la seule différence entre 2D-G et 3D est bien la dimensionalité.

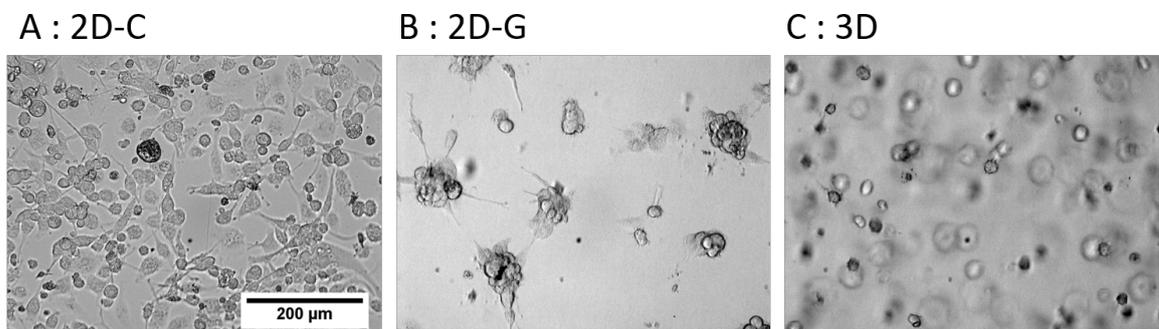


FIGURE V.4.1 – Microscopie des macrophages sur surface couverte de collagène (A), sur gel épais de collagène (B), inclus dans un gel de collagène (C). L'échelle est identique aux trois clichés.

## Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés avec un nombre de cellules identique aux chapitres précédentes : 500k cellules par boîte de pétri. En revanche, la différenciation des monocytes en macrophages est réalisée avec une concentration plus élevée en PMA : 50 nM contre 20 nM auparavant. Concernant les substrats, dans le cas 2D-C la boîte de pétri est couverte de collagène de type 1 à raison de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Dans le cas 2D-G, le gel est polymérisé à  $37^\circ\text{C}$  à partir d'une solution à  $2 \text{ mg}/\text{mL}$  de collagène de type 1. Enfin, pour l'échantillon 3D, les cellules sont mélangées à la solution de collagène avant polymérisation. Chaque type d'échantillon est préparé et observé 4 fois.

La figure V.4.1 montre une microscopie des trois types d'échantillon. Visuellement, le cas 2D-C est identique aux macrophages sur boîte de pétri. En revanche, lorsque les macrophages sont sur un gel épais (2D-G), elles forment des agrégats de plusieurs cellules. Les macrophages inclus dans le gel ont quant à eux une forme sphérique.

## V.4.1 RÉSULTATS

L'analyse pour les deux cas 2D est similaire à celle effectuée dans le chapitre précédent, le tableau V.4.1 en donne les résultats.

TABLE V.4.1 – Vitesse  $S$ , persistance  $T_P$ , coefficient de diffusion  $D$  et longueur de persistance  $L_P$  en fonction d'échantillon. Erreur : 2x erreur type.

Substrat	S ( $\mu\text{m}/h$ )	$T_P$ (s)	D ( $\mu\text{m}^2/h$ )	$L_P$ ( $\mu\text{m}$ )
2D-C	$41 \pm 22$	$740 \pm 790$	$110 \pm 50$	$6 \pm 4$
2D-G	$16 \pm 5$	$640 \pm 380$	$21 \pm 17$	$3 \pm 1$

La première remarque est de constater qu'il y a une grande dispersion des résultats pour des conditions expérimentales identiques. Il serait nécessaire d'augmenter la statistique pour confirmer ces résultats. Si on compare l'échantillon 2D-C et l'échantillon contrôle du chapitre précédent, les résultats sont identiques. Outre la différence de concentration en PMA utilisée pour différencier les cellules, la seule modification est le *coating* de la surface avec du collagène. La similitude des résultats indique donc que la présence de collagène-1 n'a pas d'effet particulier sur la migration des macrophages.

Entre 2D-C et 2D-G, l'unique changement significatif est la vitesse des cellules. Les macrophages sont ici plus lents sur un substrat moins rigide que le plastique. On retrouve cette tendance dans la littérature [176, 177, 178], même si le contraire est parfois observé [179]. Il est étonnant de trouver un temps de persistance similaire dans les deux cas, malgré le changement radical d'organisation des cellules (figure V.4.1).

Enfin, l'échantillon 3D a donné des résultats très différents. Pour commencer, un ajustement avec deux gaussiennes n'est plus adapté. La fonction de corrélation  $C$  a une décroissance plus lente en fonction de  $q$  et l'ajustement suivant donne un bon résultat (figure V.4.2 A) :

$$C(q) = \left[ \frac{A}{1 + (q/q_1)^{n_1}} + \frac{1 - A}{1 + (q/q_2)^{n_2}} \right]^2 \quad (1)$$

La distribution de déplacements associée est (figure V.4.2 B) :

$$Pb(|\Delta r|) = \frac{A 2^{1/2-n_1} q_1^{3/2+n_1}}{\Gamma(n_1) 2\pi^{3/2}} \frac{K(3/2 - n_1, q_1 |\Delta r|)}{|\Delta r|^{3/2-n_1}} + \frac{(1 - A) 2^{1/2-n_2} q_2^{3/2+n_2}}{\Gamma(n_2) 2\pi^{3/2}} \frac{K(3/2 - n_2, q_2 |\Delta r|)}{|\Delta r|^{3/2-n_2}} \quad (2)$$

TABLE V.4.2 – Vitesse  $S$ , persistance  $T_P$ , coefficient de diffusion  $D$  et longueur de persistance  $L_P$  pour des macrophages migrant dans un gel 3D. Erreur : intervalle de confiance à 95% de l'ajustement.

Substrat	S ( $\mu\text{m}/h$ )	$T_P$ (s)	D ( $\mu\text{m}^2/h$ )	$L_P$ ( $\mu\text{m}$ )
3D	$4.8 \pm 2$	$24000 \pm 10000$	$160 \pm 70$	$33 \pm 14$

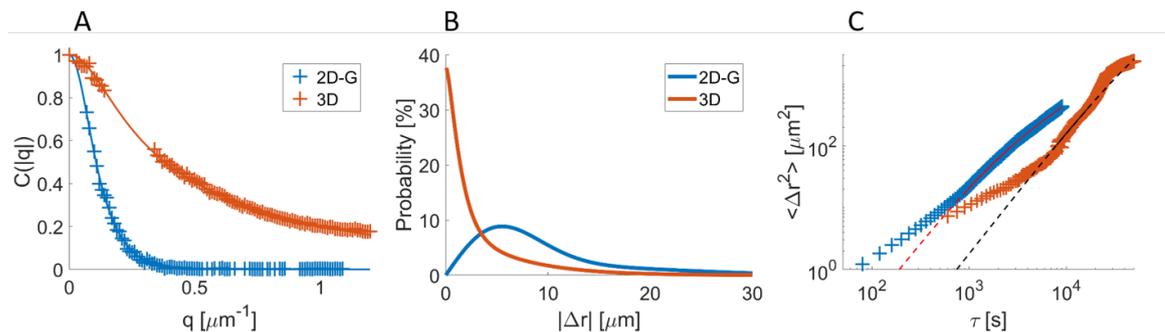


FIGURE V.4.2 – A : fonctions de corrélation  $C(q)$  obtenues pour un délai de 1h pour 2D-G et 3D. Les points manquants pour 3D correspondent aux angles où la lumière parasite dénature trop le signal. B : distributions d’amplitude des déplacements correspondantes. C : déplacement quadratique moyen pour les deux échantillons, avec un ajustement utilisant l’équation 6.

Pour comparaison, une mesure effectuée sur des macrophages migrant sur un gel (2D-G) est aussi représentée en figure V.4.2. On observe dans le cas 3D une distribution de déplacements dont le maximum est en 0, contrairement à précédemment, et dont la moyenne est plus petite que celle du cas 2D-G. Ce résultat se retrouve pour le déplacement quadratique moyen en figure V.4.2 C : les cellules en 3D sont plus lentes que celles sur gel (qui étaient elles-mêmes plus lentes que celles sur pétri).

Le modèle utilisé précédemment pour interpréter la MSD n’est pas adapté au cas 3D. Pour obtenir au moins une comparaison de vitesse, l’ajustement a tout de même été fait (tableau V.4.2) et donne une vitesse plus de 3 fois inférieure au cas 2D-G. Cette faible vitesse nécessite des temps d’acquisition beaucoup plus longs et parmi les 4 expériences réalisées, une seule a été assez longue (15 h) pour fournir des résultats fiables. On remarque que pour les temps courts (inférieurs à 2 h) on retrouve un comportement similaire à ce qui a été observé plus haut. On peut supposer qu’il s’agit aussi de fluctuations de position ou de forme des cellules dans le gel.

Les différences observées entre 2D et 3D ne sont pas surprenantes dans la mesure où il est maintenant bien connu que les modes de migration 3D et 2D sont différents [180, 181, 182, 183, 171].

Pour comprendre la migration des macrophages dans le gel, il serait nécessaire de développer un nouveau modèle, basé si possible sur une observation par microscopie. La DSL permet d’obtenir aisément des résultats statistiques sur une grande population, mais elle est moins pratique pour comprendre la dynamique individuelle des cellules.

# VI

## Conclusion et perspectives

## SUR LES RÉSULTATS

### Sphéroïdes

L'introduction posait la question : comment la pression affecte-t-elle mouvement des cellules au sein du sphéroïde ? Grâce à la DLS, nous avons pu répondre à cette question en mesurant la vitesse des cellules dans des sphéroïdes. Cette conclusion rassemble les résultats obtenus pour donner une description globale de l'effet de la pression sur les sphéroïdes.

Comme vu en introduction, le sphéroïde a une structure radiale notamment à cause d'un gradient d'oxygène et de nutriments. Cette organisation est aussi vraie pour la dynamique cellulaire puisqu'on constate une séparation cœur/surface à mi rayon, avec des cellules en surface environ 3 fois plus rapides que celles du cœur. Les cellules se déplacent préférentiellement dans une même couche, avec une vitesse radiale environ deux fois plus faible que la vitesse tangentielle (figure VI.4.3 A et C).

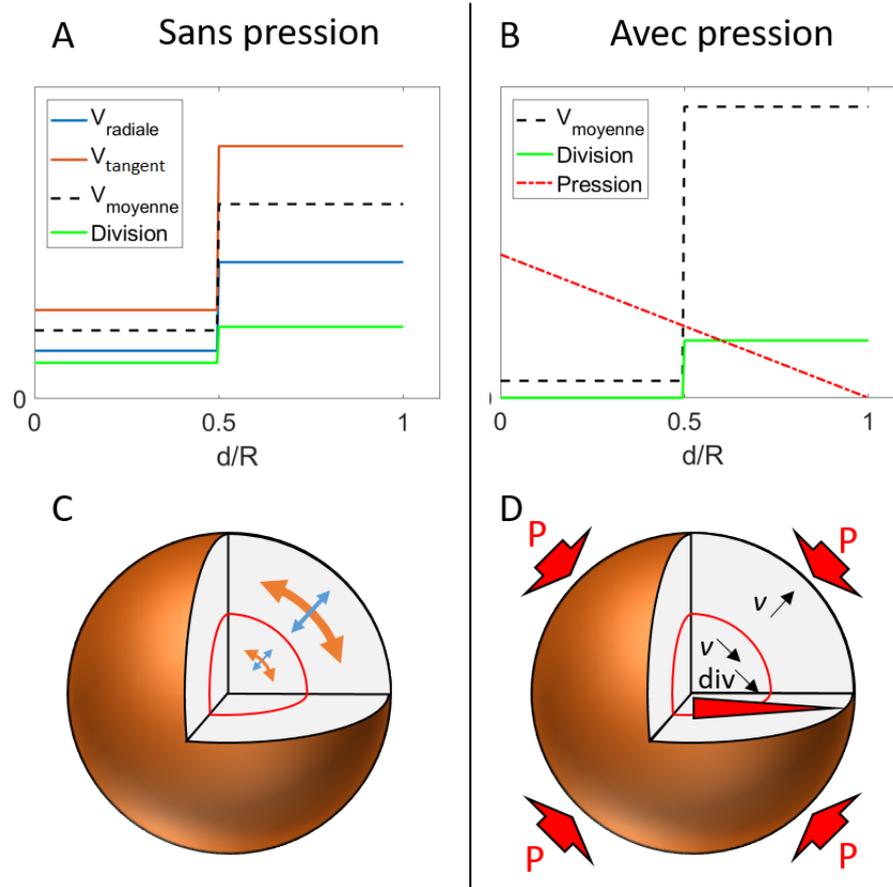


FIGURE VI.4.3 – Résumé schématique des résultats. A et C : sans pression, B et D : avec pression.

A et B : Vitesse radiale (bleu), tangentielle (orange) et moyenne (tirets noirs) des cellules en fonction de leur distance au centre  $d$  rapportée au rayon  $R$  du sphéroïde. Y sont ajoutés le taux de division (vert) et la pression (rouge). C et D : Schémas d'un sphéroïde. C : Les flèches indiquent les vitesses tangentielles (orange) et radiales (bleu), la ligne de séparation entre surface et cœur est matérialisée en rouge. D : sphéroïde sous pression : flèches rouges et triangle signifiant l'augmentation de la pression vers le centre. En surface la vitesse  $v$  augmente et au centre elle diminue, ainsi que la division cellulaire ( $div$ ).

Soumis à une pression, le sphéroïde conserve cette structure puisque les cellules à l'intérieur sont ralenties tandis que les cellules de surface sont accélérées [26]. Il en est de même pour la division cellulaire qui est stoppée au centre, mais perdue en surface [25]. Ces résultats sont cohérents avec une pression mesurée plus forte au centre qu'en surface [74].

En augmentant la pression, la vitesse diminue jusqu'à atteindre un plateau pour des pressions de l'ordre de 5-10 kPa. L'effet de la pression sur la vitesse et sur la division est alors à saturation, avec une vitesse moyenne deux fois plus faible que celle sans pression. La taille moyenne des cellules est aussi réduite.

En croissant, le sphéroïde voit l'ensemble de ses cellules diminuer de vitesse, à raison de  $4 \mu\text{m}/h$  par  $100 \mu\text{m}$  de diamètre et le plateau de vitesse est atteint pour des pressions moindres (figure VI.4.4). L'existence d'une précontrainte augmentant avec l'âge du sphéroïde pourrait expliquer cette évolution.

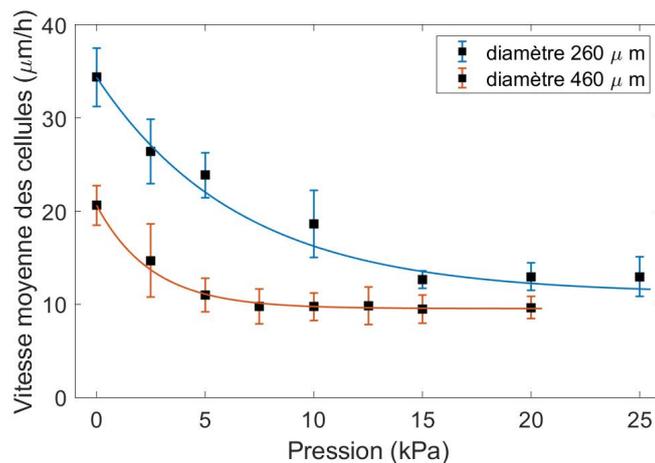


FIGURE VI.4.4 – Vitesse moyenne  $\bar{v}$  des cellules en fonction de la pression pour des sphéroïde de 260 et 460  $\mu\text{m}$ .

Appliquer une contrainte mécanique à un sphéroïde a des effets opposés entre d’une part, le centre où la mobilité et la croissance sont réduites et d’autre part, la surface où la mobilité et l’invasivité est augmentée. Pour comprendre le lien entre ces deux dynamiques, on pourrait étudier la vitesse en fonction de la position dans le sphéroïde sous pression, de la même manière que dans le chapitre IV.4. Il serait aussi intéressant de déterminer le mécanisme par lequel la pression influe la dynamique cellulaire. Nos résultats montrent que la matrice extra cellulaire joue un rôle important dans cette question. On pourrait enfin développer un modèle numérique du sphéroïde sous pression, de manière similaire aux travaux en deux dimensions de Marchetti et al. [184].

## Macrophages

Sur une question tout à fait différente, notre méthode a donné des résultats préliminaires intéressants. La DLS a permis de caractériser la migration de macrophages soumis à divers stimuli : des signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, des cellules apoptotiques précoces et tardives. Leur mouvement sur une surface 2D s’apparente à une marche aléatoire avec persistance, caractérisée par une vitesse  $S$  et un temps de persistance  $T_P$ . Les stimuli modifient ces paramètres, mais il apparaît que la longueur de persistance  $L_P = ST_P$  est conservée d’une condition à l’autre (figure VI.4.5). En conséquence, la cellule effectue un compromis entre une migration rapide (grande vitesse  $S$  et faible persistance  $T_P$ ) et une migration persistante (faible vitesse  $S$  et grande persistance  $T_P$ ).

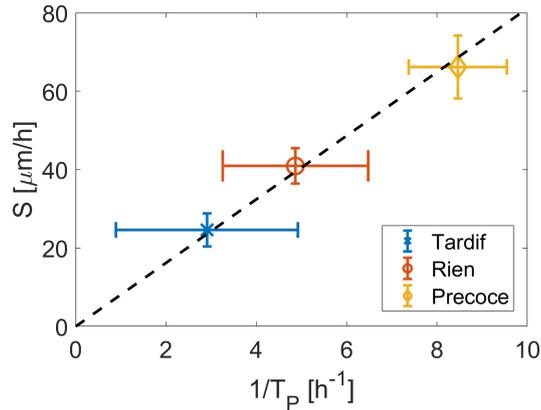


FIGURE VI.4.5 – Vitesse  $S$  en fonction de l'inverse du temps de persistance  $T_P$  du mouvement, selon l'échantillon. Ajustement linéaire donnant une longueur de persistance  $L_P = 8.1 \mu\text{m}$ .

La DLS ne permettant pas de séparer deux populations, les cellules apoptotiques sont retirées avant l'acquisition afin de mesurer uniquement les déplacements des macrophages. Il serait cependant intéressant d'observer la migration des macrophages en présence de leurs cibles. Pour que la lumière diffusée par les cellules apoptotiques soit négligeable devant celle diffusée par les macrophages, on pourrait envisager de donner des nanoparticules d'or à phagocyter aux macrophages. En effet, les nanoparticules d'or sont très diffusantes [185].

Dans le gel 3D, les macrophages se déplacent plus lentement que sur les surfaces 2D et le comportement migratoire est différent. Cette différence de migration entre 2D et 3D a déjà été observée [186] et nécessite des modèles différents de ceux utilisés en 2D [171].

## SUR LA MÉTHODE

Ces dernières décennies ont vu des avancées considérables dans les techniques d'imagerie pour le vivant. Les échantillons épais restent cependant un cas difficile à observer [27] et les sphéroïdes en sont un bon exemple. La DLS donne de meilleurs résultats pour ces échantillons, en se basant sur ce qui limite justement l'imagerie : la diffusion. Comme il ne s'agit pas d'une méthode d'imagerie, la DLS est une technique complémentaire et sa mise en œuvre est relativement simple. La compréhension du signal mesuré n'est pas aussi directe qu'en microscopie, mais on a vu qu'on pouvait relier directement les fluctuations d'intensité  $I$  à la distribution des déplacements relatifs  $Pb(\Delta\mathbf{r})$  des cellules :

$$\frac{\langle I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle_t^2} - 1 = |TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \quad (3)$$

On obtient ainsi le comportement dynamique d'une large population en 2D comme en 3D. On mesure de plus la taille et l'organisation des cellules avec la répartition statique de la lumière, même si la thèse s'est focalisée sur l'aspect dynamique de la diffusion en raison de la problématique adressée.

L'étude d'échantillons 2D a permis de confirmer la technique et la théorie. On peut noter au passage que la DLS peut aussi être utilisée à profit pour l'étude de populations 2D, pour

son grand champ de vue et son affranchissement d'un logiciel de *tracking*. Mais c'est avant tout en 3D que la méthode se montre fructueuse puisqu'elle permet de mesurer la vitesse des cellules dans des sphéroïdes qui sont par ailleurs difficiles à imager. Même pour des sphéroïde d'environ 500  $\mu m$  de diamètre, la mesure donne une réponse claire de la vitesse cellulaire en fonction de la pression. La diffusion multiple impose tout de même une limite d'environ 360  $\mu m$  (pour une longueur d'onde de 850 nm) au-dessus de laquelle la mesure n'est que relative.

Pour dépasser cette limite, une première solution serait d'utiliser la polarisation de la lumière qui est perdue en diffusion multiple [150]. Une seconde possibilité serait de trouver un modèle permettant de prendre en compte les écarts induits par la diffusion multiple. Pour cela, nous avons proposé un modèle simple, intermédiaire entre la diffusion simple et la *Diffusion Wave Spectroscopy*. Il n'a cependant pas été éprouvé expérimentalement.

Pour conclure, la DSL a à mon avis un potentiel intéressant dans l'étude de populations cellulaire. Pour les études 2D, elle permet en complément de la microscopie, de faire des mesures statistiques rapides sur de grande populations. Pour les échantillons 3D dont on ne peut obtenir une image facilement, elle donne un signal clair avec un montage relativement simple. Une application médicale est aussi envisageable, en tant qu'outil pour vérifier l'état de santé d'une population de cellules.

# Bibliographie

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] J Wilson and F Balkwill. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 12(2) :113–120, 2002.
- [2] S Gout and J Huot. Role of cancer microenvironment in metastasis : focus on colon cancer. *Cancer Microenvironment*, 1(1) :69–83, 2008.
- [3] IP Witz. The tumor microenvironment : the making of a paradigm. *Cancer Microenvironment*, 2(1) :9–17, 2009.
- [4] MJ Bissell and WC Hines. Why don't we get more cancer? a proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine*, 17(3) :320, 2011.
- [5] N Li, SI Grivennikov, and M Karin. The unholy trinity : inflammation, cytokines, and stat3 shape the cancer microenvironment. *Cancer cell*, 19(4) :429–431, 2011.
- [6] C Feig, A Gopinathan, A Neesse, DS Chan, N Cook, and DA Tuveson. The pancreas cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.*, 18(16) :4266–4276, 2012.
- [7] M Erreni, A Mantovani, and P Allavena. Tumor-associated macrophages (tam) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer microenvironment*, 4(2) :141–154, 2011.
- [8] DE Ingber. Tensegrity : the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual review of physiology*, 59(1) :575–599, 1997.
- [9] M Thery and M Bornens. Cell shape and cell division. *Current opinion in cell biology*, 18(6) :648–657, 2006.
- [10] C-M Lo, H-B Wang, M Dembo, and Y-L Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1) :144–152, 2000.
- [11] AJ Engler, S Sen, HL Sweeney, and DE Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689, 2006.
- [12] D Wirtz, K Konstantopoulos, and PC Searson. The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 11(7) :512, 2011.
- [13] T Stylianopoulos, JD Martin, VP Chauhan, SR Jain, B Diop-Frimpong, N Bardeesy, BL Smith, CR Ferrone, FJ Hornicek, Y Boucher, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38) :15101–15108, 2012.

- [14] MT Janet, G Cheng, JA Tyrrell, SA Wilcox-Adelman, Y Boucher, RK Jain, and LL Munn. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3) :911–916, 2012.
- [15] MP Lutolf and JA Hubbell. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, 23(1) :47, 2005.
- [16] MA Wozniak and CS Chen. Mechanotransduction in development : a growing role for contractility. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1) :34, 2009.
- [17] GT Haneveld. Compression as a treatment of cancer, a historical survey. *Archivum chirurgicum Neerlandicum*, 31(1) :1–8, 1979.
- [18] RM Sutherland, WR Inch, JA McCredie, and J Kruuv. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 18(5) :491–495, 1970.
- [19] RM Sutherland. Cell and environment interactions in tumor microregions : the multicell spheroid model. *Science*, 240(4849) :177–184, 1988.
- [20] J Friedrich, C Seidel, R Ebner, and LA Kunz-Schughart. Spheroid-based drug screen : considerations and practical approach. *Nature protocols*, 4(3) :309, 2009.
- [21] F Montel, M Delarue, J Elgeti, L Malaquin, M Basan, T Risler, B Cabane, D Vignjevic, J Prost, G Cappello, et al. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Physical review letters*, 107(18) :188102, 2011.
- [22] F Montel, M Delarue, J Elgeti, D Vignjevic, G Cappello, and J Prost. Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New Journal of Physics*, 14(5) :055008, 2012.
- [23] M Delarue, F Montel, O Caen, J Elgeti, J-M Siaugue, D Vignjevic, J Prost, J-F Joanny, and G Cappello. Mechanical control of cell flow in multicellular spheroids. *Physical review letters*, 110(13) :138103, 2013.
- [24] M Delarue, F Montel, D Vignjevic, J Prost, J-F Joanny, and G Cappello. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical journal*, 107(8) :1821–1828, 2014.
- [25] S Monnier, M Delarue, B Brunel, ME Dolega, A Delon, and G Cappello. Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates. *Methods*, 94 :114–119, 2016.
- [26] K Alessandri, BR Sarangi, VV Gurchenkov, B Sinha, TR Kießling, L Fetler, F Rico, S Scheuring, C Lamaze, A Simon, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37) :14843–14848, 2013.
- [27] V Ntziachristos. Going deeper than microscopy : the optical imaging frontier in biology. *Nature methods*, 7(8) :603, 2010.
- [28] T Wilson. Optical aspects of confocal microscopy. *Confocal Microscopy*, pages 93–141, 1990.

- [29] W Denk, JH Strickler, and WW Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [30] F Helmchen and W Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12) :932, 2005.
- [31] J Huisken, J Swoger, F Del Bene, J Wittbrodt, and EHK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.
- [32] J Huisken and DYR Stainier. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mspim). *Optics letters*, 32(17) :2608–2610, 2007.
- [33] PJ Verveer, J Swoger, F Pampaloni, K Greger, M Marcello, and EHK Stelzer. High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nature methods*, 4(4) :311, 2007.
- [34] C Lorenzo, C Frongia, R Jorand, J Fehrenbach, P Weiss, A Maandhui, G Gay, B Ducommun, and V Lobjois. Live cell division dynamics monitoring in 3d large spheroid tumor models using light sheet microscopy. *Cell division*, 6(1) :22, 2011.
- [35] FO Fahrbach, V Gurchenkov, K Alessandri, P Nassoy, and A Rohrbach. Light-sheet microscopy in thick media using scanned bessel beams and two-photon fluorescence excitation. *Optics express*, 21(11) :13824–13839, 2013.
- [36] IM Vellekoop and AP Mosk. Focusing coherent light through opaque strongly scattering media. *Optics letters*, 32(16) :2309–2311, 2007.
- [37] C-E Leroux, S Monnier, I Wang, G Cappello, and A Delon. Fluorescent correlation spectroscopy measurements with adaptive optics in the intercellular space of spheroids. *Biomedical optics express*, 5(10) :3730–3738, 2014.
- [38] Y Liu, P Lai, C Ma, X Xu, AA Grabar, and LV Wang. Optical focusing deep inside dynamic scattering media with near-infrared time-reversed ultrasonically encoded (true) light. *Nature communications*, 6 :5904, 2015.
- [39] Z Yaqoob, D Psaltis, MS Feld, and C Yang. Optical phase conjugation for turbidity suppression in biological samples. *Nature photonics*, 2(2) :110, 2008.
- [40] X Wang, Y Xu, M Xu, S Yokoo, ES Fry, and LV Wang. Photoacoustic tomography of biological tissues with high cross-section resolution : Reconstruction and experiment. *Medical physics*, 29(12) :2799–2805, 2002.
- [41] D Huang, EA Swanson, CP Lin, JS Schuman, WG Stinson, W Chang, MR Hee, T Flotte, K Gregory, CA Puliafito, et al. Optical coherence tomography. *science*, 254(5035) :1178–1181, 1991.
- [42] P Yu, M Mustata, JJ Turek, PMW French, MR Melloch, and DD Nolte. Holographic optical coherence imaging of tumor spheroids. *Applied physics letters*, 83(3) :575–577, 2003.
- [43] JA Izatt, MA Choma, and A-H Dhalla. Theory of optical coherence tomography. *Optical Coherence Tomography : Technology and Applications*, pages 65–94, 2015.

- [44] C-E Leroux, J Palmier, AC Boccara, G Cappello, and S Monnier. Elastography of multicellular aggregates submitted to osmo-mechanical stress. *New Journal of Physics*, 17(7) :073035, 2015.
- [45] D Zhu, KV Larin, Q Luo, and VV Tuchin. Recent progress in tissue optical clearing. *Laser & photonics reviews*, 7(5) :732–757, 2013.
- [46] DS Richardson and JW Lichtman. Clarifying tissue clearing. *Cell*, 162(2) :246–257, 2015.
- [47] JR Mourant, JP Freyer, AH Hielscher, AA Eick, D Shen, and TM Johnson. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Applied optics*, 37(16) :3586–3593, 1998.
- [48] VG Peters, DR Wyman, MS Patterson, and GL Frank. Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. *Physics in Medicine & Biology*, 35(9) :1317, 1990.
- [49] M Oheim, E Beaufepaire, E Chaigneau, J Mertz, and S Charpak. Two-photon microscopy in brain tissue : parameters influencing the imaging depth. *Journal of neuroscience methods*, 111(1) :29–37, 2001.
- [50] A Hopt and E Neher. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 80(4) :2029–2036, 2001.
- [51] E Meijering, O Dzyubachyk, I Smal, et al. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol.*, 504(9) :183–200, 2012.
- [52] M Maška, V Ulman, D Svoboda, P Matula, P Matula, C Ederra, A Urbiola, T España, S Venkatesan, DMW Balak, et al. A benchmark for comparison of cell tracking algorithms. *Bioinformatics*, 30(11) :1609–1617, 2014.
- [53] D Gonzalez-Rodriguez, K Guevorkian, S Douezan, and F Brochard-Wyart. Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science*, 338(6109) :910–917, 2012.
- [54] B Brunel, G Beaune, U Nagarajan, S Dufour, F Brochard-Wyart, and FM Winnik. Nanostickers for cells : a model study using cell–nanoparticle hybrid aggregates. *Soft matter*, 12(38) :7902–7907, 2016.
- [55] P Carmeliet. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6) :653, 2003.
- [56] F Hirschhaeuser, H Menne, C Dittfeld, J West, W Mueller-Klieser, and LA Kunz-Schughart. Multicellular tumor spheroids : an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*, 148(1) :3–15, 2010.
- [57] S Dini, BJ Binder, SC Fischer, C Mattheyer, A Schmitz, EHK Stelzer, NG Bean, and JEF Green. Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(123) :20160649, 2016.
- [58] S Breslin and L O’Driscoll. Three-dimensional cell culture : the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*, 18(5-6) :240–249, 2013.

- [59] I Dufau, C Frongia, F Sicard, L Dedieu, P Cordelier, F Ausseil, B Ducommun, and A Valette. Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics : application to the gemcitabine/chk1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC cancer*, 12(1) :15, 2012.
- [60] LA Kunz-Schughart, JP Freyer, F Hofstaedter, and R Ebner. The use of 3-d cultures for high-throughput screening : the multicellular spheroid model. *Journal of biomolecular screening*, 9(4) :273–285, 2004.
- [61] K Kwapiszewska, A Michalczuk, M Rybka, R Kwapiszewski, and Z Brzózka. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab on a Chip*, 14(12) :2096–2104, 2014.
- [62] J Laurent, C Frongia, M Cazales, O Mondesert, B Ducommun, and V Lobjois. Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3d. *BMC cancer*, 13(1) :73, 2013.
- [63] L Bingle, CE Lewis, KP Corke, MWR Reed, and NJ Brown. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British journal of cancer*, 94(1) :101, 2006.
- [64] MS Steinberg. Reconstruction of tissues by dissociated cells. *Science*, 141(3579) :401–408, 1963.
- [65] P Marmottant, A Mgharbel, J Käfer, B Audren, J-P Rieu, J-C Vial, B Van Der Sanden, AFM Marée, F Graner, and H Delanoë-Ayari. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41) :17271–17275, 2009.
- [66] HM Phillips and MS Steinberg. Embryonic tissues as elasticoviscous liquids. i. rapid and slow shape changes in centrifuged cell aggregates. *Journal of cell science*, 30(1) :1–20, 1978.
- [67] S Douezan, K Guevorkian, R Naouar, S Dufour, D Cuvelier, and F Brochard-Wyart. Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18) :7315–7320, 2011.
- [68] T Hayashi and RW Carthew. Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature*, 431(7009) :647, 2004.
- [69] L-L Pontani, I Jorjadze, V Viasnoff, and J Brujic. Biomimetic emulsions reveal the effect of mechanical forces on cell–cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25) :9839–9844, 2012.
- [70] G Helmlinger, PA Netti, HC Lichtenbeld, RJ Melder, and RK Jain. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology*, 15(8) :778, 1997.
- [71] G Cheng, J Tse, RK Jain, and LL Munn. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS one*, 4(2) :e4632, 2009.

- [72] A Desmaison, C Frongia, K Grenier, B Ducommun, and V Lobjois. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PLoS one*, 8(12) :e80447, 2013.
- [73] A Desmaison, L Guillaume, S Triclin, P Weiss, B Ducommun, and V Lobjois. Impact of physical confinement on nuclei geometry and cell division dynamics in 3d spheroids. *Scientific reports*, 8(1) :8785, 2018.
- [74] ME Dolega, M Delarue, F Ingremeau, J Prost, A Delon, and G Cappello. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nature communications*, 8 :14056, 2017.
- [75] M Delarue, J-F Joanny, F Jülicher, and J Prost. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface focus*, 4(6) :20140033, 2014.
- [76] A Guinier and G Fournet. Small-angle scattering of x-rays, 1955.
- [77] O Glatter and O Kratky. *Small angle X-ray scattering*. Academic press, 1982.
- [78] LA Feigin, DI Svergun, and GW Taylor. *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*. Springer, 1987.
- [79] A Brunsting and PF Mullaney. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophysical journal*, 14(6) :439–453, 1974.
- [80] J Beuthan, O Minet, J Helfmann, M Herrig, and G Müller. The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Physics in Medicine & Biology*, 41(3) :369, 1996.
- [81] B Beauvoit, T Kitai, and B Chance. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver : a theoretical and practical approach. *Biophysical Journal*, 67(6) :2501–2510, 1994.
- [82] M Xu, TT Wu, and JY Qu. Unified mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures. *Journal of biomedical optics*, 13(2) :024015, 2008.
- [83] PF Mullaney, MA Van Dilla, JR Coulter, and PN Dean. Cell sizing : a light scattering photometer for rapid volume determination. *Review of Scientific Instruments*, 40(8) :1029–1032, 1969.
- [84] EJ Meehan and AE Gyberg. Particle-size determination by low-angle light scattering : Effect of refractive index. *Applied optics*, 12(3) :551–554, 1973.
- [85] JV Watson. *Introduction to flow cytometry*. Cambridge University Press, 2004.
- [86] A Dunn and R Richards-Kortum. Three-dimensional computation of light scattering from cells. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2(4) :898–905, 1996.
- [87] R Drezek, A Dunn, and R Richards-Kortum. Light scattering from cells : finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Applied optics*, 38(16) :3651–3661, 1999.

- [88] JR Mourant, TM Johnson, V Doddi, and JP Freyer. Angular dependent light scattering from multicellular spheroids. *J. Biomed. Opt.*, 7(1) :93–99, 2002.
- [89] JM Schmitt, A Knüttel, and M Yadlowsky. Confocal microscopy in turbid media. *JOSA A*, 11(8) :2226–2235, 1994.
- [90] P Theer and W Denk. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. *JOSA A*, 23(12) :3139–3149, 2006.
- [91] W-F Cheong, SA Prahl, and AJ Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE journal of quantum electronics*, 26(12) :2166–2185, 1990.
- [92] M Chaplin. Water structure and science. [http://www1.lsbu.ac.uk/water/water\\_vibrational\\_spectrum.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html).
- [93] DJ Pine, DA Weitz, PM Chaikin, and E Herbolzheimer. Diffusing wave spectroscopy. *Physical review letters*, 60(12) :1134, 1988.
- [94] J Li, G Dietsche, D Iftime, SE Skipetrov, G Maret, T Elbert, B Rockstroh, and T Gisler. Noninvasive detection of functional brain activity with near-infrared diffusing-wave spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 10(4) :044002, 2005.
- [95] M Cheikh, HL Nghiem, D Etti, E Tinet, S Avrillier, and J-M Tualle. Time-resolved diffusing wave spectroscopy applied to dynamic heterogeneity imaging. *Optics letters*, 31(15) :2311–2313, 2006.
- [96] HJ Butler, L Ashton, B Bird, G Cinque, K Curtis, J Dorney, K Esmonde-White, NJ Fullwood, B Gardner, PL Martin-Hirsch, et al. Using raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature protocols*, 11(4) :664, 2016.
- [97] LT Perelman. Optical diagnostic technology based on light scattering spectroscopy for early cancer detection. *Expert Review of Medical Devices*, 3(6) :787–803, 2006.
- [98] J Nallala, O Piot, M-D Diebold, C Gobinet, O Bouché, M Manfait, and GD Sockalingum. Infrared and raman imaging for characterizing complex biological materials : a comparative morpho-spectroscopic study of colon tissue. *Applied spectroscopy*, 68(1) :57–68, 2014.
- [99] BJ Berne and R Pecora. *Dynamic Light Scattering with applications to biology, chemistry and Physics*. Wiley, 1976.
- [100] R Klein and B D’Aguanno. *Static scattering properties of colloidal suspensions*. Clarendon Press : Oxford, England, 1996.
- [101] R Nassif, CA Nader, C Afif, F Pellen, G Le Brun, B Le Jeune, and M Abboud. Detection of golden apples’climacteric peak by laser biospeckle measurements. *Applied optics*, 53(35) :8276–8282, 2014.
- [102] H Conrad, F Lehmkuhler, B Fischer, F Westermeier, MA Schroer, Y Chushkin, C Gutt, M Sprung, and G Grübel. Correlated heterogeneous dynamics in glass-forming polymers. *Phys. Rev. E*, 91(4) :042309, 2015.

- [103] E Tamborini and L Cipelletti. Multiangle static and dynamic light scattering in the intermediate scattering angle range. *Review of scientific instruments*, 83(9) :093106, 2012.
- [104] M Suissa, C Place, E Goillot, and E Freyssingeas. Internal dynamics of a living cell nucleus investigated by dynamic light scattering. *Eur. Phys. J. E*, 26(4) :435–448, 2008.
- [105] J Lee, H Radhakrishnan, W Wu, A Daneshmand, M Klimov, C Ayata, and DA Boas. Quantitative imaging of cerebral blood flow velocity and intracellular motility using dynamic light scattering–optical coherence tomography. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(6) :819–825, 2013.
- [106] DD Nolte, R An, JJ Turek, and K Jeong. Tissue dynamics spectroscopy for three-dimensional tissue-based drug screening. *JALA : Journal of the Association for Laboratory Automation*, 16(6) :431–442, 2011.
- [107] DD Nolte, R An, JJ Turek, and K Jeong. Holographic tissue dynamics spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(8) :087004, 2011.
- [108] B Weber, C Burger, MT Wyss, von GK Schulthess, F Scheffold, and A Buck. Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 20 :2664, 2004.
- [109] F Jaillon, SE Skipetrov, J Li, G Dietsche, G Maret, and T Gisler. Diffusing-wave spectroscopy from head-like tissue phantoms : influence of a non-scattering layer. *Opt. Expr.*, 14 :10181, 2001.
- [110] C Zimmer, B Zhang, A Dufour, A Thébaud, S Berlemont, V Meas-Yedid, and J-CO Marin. On the digital trail of mobile cells. *IEEE Signal Processing Magazine*, 23(3) :54–62, 2006.
- [111] K Jaqaman, D Loerke, M Mettlen, H Kuwata, S Grinstead, SL Schmid, and G Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature methods*, 5(8) :695, 2008.
- [112] K Rohr, WJ Godinez, N Harder, S Wörz, J Mattes, W Tvaruskó, and R Eils. Tracking and quantitative analysis of dynamic movements of cells and particles. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6) :pdb-top80, 2010.
- [113] E Meijering, I Smal, O Dzyubachyk, and J-C Olivo-Marin. Time-lapse imaging. *Microscope Image Processing*, pages 401–440, 2008.
- [114] G Lin, U Adiga, K Olson, JF Guzowski, CA Barnes, and B Roysam. A hybrid 3d watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 56(1) :23–36, 2003.
- [115] A Garrido and NP De La Blanca. Applying deformable templates for cell image segmentation. *Pattern Recognition*, 33(5) :821–832, 2000.

- [116] MK Cheezum, WF Walker, and WH Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical journal*, 81(4) :2378–2388, 2001.
- [117] JB Beltman, AFM Marée, and RJ De Boer. Analysing immune cell migration. *Nature Reviews Immunology*, 9(11) :789, 2009.
- [118] R Colin, R Zhang, and LG Wilson. Fast, high-throughput measurement of collective behaviour in a bacterial population. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(98) :20140486, 2014.
- [119] MV Kristensen, P Ahrendt, TB Lindballe, OHA Nielsen, AP Kylling, H Karstoft, A Imparato, L Hosta-Rigau, B Stadler, H Stapelfeldt, et al. Motion analysis of optically trapped particles and cells using 2d fourier analysis. *Optics express*, 20(3) :1953–1962, 2012.
- [120] F Giavazzi, D Brogioli, V Trappe, T Bellini, and R Cerbino. Scattering information obtained by optical microscopy : differential dynamic microscopy and beyond. *Physical Review E*, 80(3) :031403, 2009.
- [121] VA Martinez, R Besseling, OA Croze, J Tailleur, M Reufer, J Schwarz-Linek, LG Wilson, MA Bees, and WCK Poon. Differential dynamic microscopy : A high-throughput method for characterizing the motility of microorganisms. *Biophysical journal*, 103(8) :1637–1647, 2012.
- [122] FJ Duarte, P Kelley, LW Hillman, and PF Liao. *Dye laser principles : with applications*. Academic Press, 1990.
- [123] JW Goodman. *Introduction to Fourier optics*. Roberts and Company Publishers, 2005.
- [124] T Zemb and P Lindner. *Neutrons, X-rays and light : scattering methods applied to soft condensed matter*. North-Holland, 2002.
- [125] A Einstein. Theorie der opaleszenz von homogenen flüssigkeiten und flüssigkeitsgemischen in der nahe des kritischen zustandes. *Ann. Phys.*, 33 :1275–1298, 1910.
- [126] DE Koppel. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy : the method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics*, 57(11) :4814–4820, 1972.
- [127] SR Aragon and R Pecora. Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6) :2395–2404, 1976.
- [128] B Lorber, F Fischer, M Bailly, H Roy, and D Kern. Protein analysis by dynamic light scattering : methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6) :372–382, 2012.
- [129] BJ Berne and R Pecora. Laser light scattering from liquids. *Annual review of physical chemistry*, 25(1) :233–253, 1974.
- [130] BJ Frisken. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40(24) :4087–4091, 2001.

- [131] KS Furukawa, T Ushida, Y Sakai, M Suzuki, J Tanaka, and T Tateishi. Formation of human fibroblast aggregates (spheroids) by rotational culture. *Cell Transplantation*, 10(4-1) :441–445, 2001.
- [132] NE Timmins and LK Nielsen. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Tissue Engineering*, pages 141–151, 2007.
- [133] PD Kaplan, V Trappe, and DA Weitz. Light-scattering microscope. *Applied Optics*, 38(19) :4151–4157, 1999.
- [134] F Ferri. Use of a charge coupled device camera for low-angle elastic light scattering. *Review of scientific instruments*, 68(6) :2265–2274, 1997.
- [135] AF Fercher and JD Briers. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Optics communications*, 37(5) :326–330, 1981.
- [136] JD Briers. Laser doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological measurement*, 22(4) :R35, 2001.
- [137] L Cipelletti and DA Weitz. Ultralow-angle dynamic light scattering with a charge coupled device camera based multispeckle, multitau correlator. *Review of scientific instruments*, 70(8) :3214–3221, 1999.
- [138] B Brunel, C Blanch, A Gourrier, V Petrolli, A Delon, J-F Joanny, R Carminati, R Pierrot, and G Cappello. Structure and dynamics of multicellular assemblies measured by coherent light scattering. *New Journal of Physics*, 19(7) :073033, 2017.
- [139] Q Tseng, I Wang, E Duchemin-Pelletier, A Azioune, N Carpi, J Gao, O Filhol, M Piel, M Théry, and M Balland. A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip*, 11(13) :2231–2240, 2011.
- [140] JW Goodman. Some fundamental properties of speckle. *JOSA*, 66(11) :1145–1150, 1976.
- [141] JS Pedersen. Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions : modeling and least-squares fitting. *Advances in colloid and interface science*, 70 :171–210, 1997.
- [142] JEM Heaysman. Contact inhibition of locomotion : a reappraisal. *International review of cytology*, 55 :49–66, 1978.
- [143] M Abercrombie. Contact inhibition and malignancy. *Nature*, 281(5729) :259, 1979.
- [144] RP Millane. Phase retrieval in crystallography and optics. *JOSA A*, 7(3) :394–411, 1990.
- [145] Y Shechtman, YC Eldar, O Cohen, HN Chapman, J Miao, and M Segev. Phase retrieval with application to optical imaging : a contemporary overview. *IEEE signal processing magazine*, 32(3) :87–109, 2015.
- [146] O Glatter. Convolution square root of band-limited symmetrical functions and its application to small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, 14(2) :101–108, 1981.

- [147] T Colin, G Dechrste, J Fehrenbach, L Guillaume, V Lobjois, and C Poignard. Experimental estimation of stored stress within spherical microtissues. *Journal of mathematical biology*, pages 1–20, 2018.
- [148] HT Nia, H Liu, G Seano, M Datta, D Jones, N Rahbari, J Incio, VP Chauhan, K Jung, JD Martin, et al. Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nature biomedical engineering*, 1(1) :0004, 2017.
- [149] M Basan, T Risler, J-F Joanny, X Sastre-Garau, and J Prost. Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP journal*, 3(4) :265–272, 2009.
- [150] JM Schmitt, AH Gandjbakhche, and RF Bonner. Use of polarized light to discriminate short-path photons in a multiply scattering medium. *Applied optics*, 31(30) :6535–6546, 1992.
- [151] GDJ Phillies. Suppression of multiple scattering effects in quasielastic light scattering by homodyne cross-correlation techniques. *The Journal of Chemical Physics*, 74(1) :260–262, 1981.
- [152] K Schätzel. Suppression of multiple scattering by photon cross-correlation techniques. *Journal of modern optics*, 38(9) :1849–1865, 1991.
- [153] J-M Tualle, E Tinet, and S Avriillier. A new and easy way to perform time-resolved measurements of the light scattered by a turbid medium. *Optics communications*, 189(4-6) :211–220, 2001.
- [154] S Andersson-Engels, R Berg, S Svanberg, and O Jarlman. Time-resolved transillumination for medical diagnostics. *Optics letters*, 15(21) :1179–1181, 1990.
- [155] TA Wynn, A Chawla, and JW Pollard. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446) :445, 2013.
- [156] SJ Gardai, KA McPhillips, SC Frasnch, WJ Janssen, A Starefeldt, JE Murphy-Ullrich, DL Bratton, P-A Oldenborg, M Michalak, and PM Henson. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of lrp on the phagocyte. *Cell*, 123(2) :321–334, 2005.
- [157] A Hochreiter-Hufford and KS Ravichandran. Clearing the dead : apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(1) :a008748, 2013.
- [158] PM Henson and DA Hume. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in immunology*, 27(5) :244–250, 2006.
- [159] S Nagata, R Hanayama, and K Kawane. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140(5) :619–630, 2010.
- [160] S Franz, US Gaipl, LE Munoz, A Sheriff, A Beer, JR Kalden, and M Herrmann. Apoptosis and autoimmunity : when apoptotic cells break their silence. *Current rheumatology reports*, 8(4) :245, 2006.

- [161] K Lauber, E Bohn, SM Kröber, Y Xiao, SG Blumenthal, RK Lindemann, P Marini, C Wiedig, A Zobywalski, S Baksh, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 113(6) :717–730, 2003.
- [162] VA Fadok, DR Voelker, PA Campbell, JJ Cohen, DL Bratton, and PM Henson. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7) :2207–2216, 1992.
- [163] S Tsuchiya, M Yamabe, Y Yamaguchi, Y Kobayashi, T Konno, and K Tada. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (thp-1). *International journal of cancer*, 26(2) :171–176, 1980.
- [164] S McCartan, LA Powell, BD Green, J McEneny, and A McGinty. The anti-atherogenic effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid are dependent on the stage of thp-1 macrophage differentiation. *Journal of Functional Foods*, 19 :958–969, 2015.
- [165] M Stein, S Keshav, N Harris, and S Gordon. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity : a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*, 176(1) :287–292, 1992.
- [166] CD Mills, K Kincaid, JM Alt, MJ Heilman, and AM Hill. M-1/m-2 macrophages and the th1/th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12) :6166–6173, 2000.
- [167] A Mantovani, A Sica, S Sozzani, P Allavena, A Vecchi, and M Locati. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12) :677–686, 2004.
- [168] KC Navegantes, RS Gomes, PAT Pereira, PG Czaikoski, CHM Azevedo, and MC Monteiro. Immune modulation of some autoimmune diseases : the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of translational medicine*, 15(1) :36, 2017.
- [169] GE Uhlenbeck and LS Ornstein. On the theory of the brownian motion. *Physical review*, 36(5) :823, 1930.
- [170] CL Stokes, DA Lauffenburger, and SK Williams. Migration of individual microvessel endothelial cells : stochastic model and parameter measurement. *Journal of cell science*, 99(2) :419–430, 1991.
- [171] P-H Wu, A Giri, SX Sun, and D Wirtz. Three-dimensional cell migration does not follow a random walk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201318967, 2014.
- [172] JE Glasgow, BE Farrell, ES Fisher, DA Lauffenburger, and RP Daniele. The motile response of alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis*, 139 :320–329, 1989.
- [173] BE Farrell, RP Daniele, and DA Lauffenburger. Quantitative relationships between single-cell and cell-population model parameters for chemosensory migration responses

- of alveolar macrophages to c5a. *Cell motility and the cytoskeleton*, 16(4) :279–293, 1990.
- [174] E Bertseva, D Grebenkov, P Schmidhauser, S Gribkova, S Jeney, and L Forró. Optical trapping microrheology in cultured human cells. *The European Physical Journal E*, 35(7) :63, 2012.
- [175] S Elmore. Apoptosis : a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4) :495–516, 2007.
- [176] TA Ulrich, EM de Juan Pardo, and S Kumar. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer research*, 69(10) :4167–4174, 2009.
- [177] C Lee-Thedieck, N Rauch, R Fiammengo, G Klein, and JP Spatz. Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility. *J Cell Sci*, pages jcs–095596, 2012.
- [178] A Pathak and S Kumar. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26) :10334–10339, 2012.
- [179] PW Oakes, DC Patel, NA Morin, DP Zitterbart, B Fabry, JS Reichner, and JX Tang. Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. *Blood*, 114(7) :1387–1395, 2009.
- [180] P Friedl and E-B Bröcker. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 57(1) :41–64, 2000.
- [181] E Cukierman, R Pankov, DR Stevens, and KM Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547) :1708–1712, 2001.
- [182] DJ Webb and AF Horwitz. New dimensions in cell migration. *Nature Cell Biology*, 5(8) :690, 2003.
- [183] MH Zaman, LM Trapani, AL Sieminski, D MacKellar, H Gong, RD Kamm, A Wells, DA Lauffenburger, and P Matsudaira. Migration of tumor cells in 3d matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29) :10889–10894, 2006.
- [184] D Bi, X Yang, MC Marchetti, and ML Manning. Motility-driven glass and jamming transitions in biological tissues. *Physical Review X*, 6(2) :021011, 2016.
- [185] PK Jain, KS Lee, IH El-Sayed, and MA El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition : applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry B*, 110(14) :7238–7248, 2006.
- [186] S Even-Ram and KM Yamada. Cell migration in 3d matrix. *Current opinion in cell biology*, 17(5) :524–532, 2005.
- [187] A Jeffrey and D Zwillinger. *Table of integrals, series, and products*. Academic Press, 2007.

# Annexes

# A ABERRATIONS SPHERIQUES :

## CALCUL

À cause des aberrations spheriques, il n'est pas souhaitable d'utiliser la totalité d'une lentille. Cette annexe présente le calcul utilisé pour obtenir le rayon effectif utilisable d'une lentille. Ce calcul est fait avec les paramètres des lentilles utilisées (Thorlabs LA1401-B, focale +60 mm) et dans la configuration particulière utilisée. Il n'est donc pas utilisable dans le cas général.

La lentille utilisée est plano-convexe avec les caractéristiques :

- diamètre :  $r = 50.8$  mm (1 pouce)
- épaisseur au centre :  $e=19.3$  mm
- focale : 60.0 mm
- rayon de courbure :  $R=30.9$  mm
- le foyer objet est positionné à  $d_f=(60.0-10.9)$  mm de la face d'entrée de la lentille.
- indice optique :  $n_l = 1.5098$

Pour l'air, on prendra un indice de  $n_{air}1.0027477$ . On fera l'approximation d'un objet très petit devant les dimensions de la lentille et pouvant donc être décrit comme ponctuel. L'erreur induite par l'aberration sphérique sera caractérisée par le décalage entre la position théorique  $h_{th}$  d'un rayon dans le plan focal et sa position réelle  $h$ , comme indiqué en figure A.1. L'objectif est de calculer cette erreur en fonction de  $L$  : hauteur à laquelle arrive un rayon pour la lentille théorique (en pointillé sur la figure).

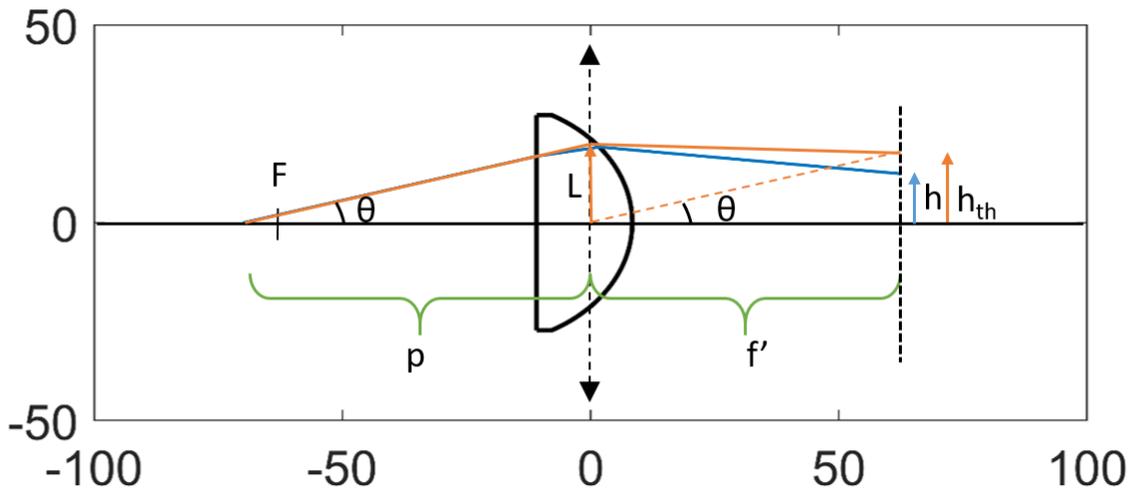


FIGURE A.1 – Schéma des rayons théorique et réel émis par l'échantillon ponctuel.

Pour le cas théorique, on utilise la propriété du plan focal : les rayons parallèles arrivant sur la lentille se croisent dans le plan focal. Si on considère un rayon parallèle passant par le centre de la lentille, on a la relation :

$$\tan(\theta) = \frac{L}{p} = \frac{h_{th}}{f'} \quad (1)$$

Donc :

$$h_{th} = \frac{f'L}{p} \quad (2)$$

Le calcul dans le cas réel est plus compliqué : il faut appliquer la seconde loi de Snell-Descartes aux deux diopres que constitue la lentille. On ne donnera pas la solution littérale finale, mais l'ordre des calculs à effectuer pour aboutir à un résultat numérique. L'angle d'incidence sur la face d'entrée est  $\theta$ , l'angle réfracté  $\alpha$  (voir figure A.2) est :

$$\alpha = \text{asin} \left( \frac{n_{air}}{n_l} \sin(\theta) \right) \quad (3)$$

La hauteur  $h_1$  de la réfraction est :

$$h_1 = \frac{L(p - d_f)}{p} \quad (4)$$

v

FIGURE A.2 – Schéma détaillé du rayon réel passant à travers la lentille.

Pour déterminer la distance  $d$  (voir figure) il faut résoudre une équation du second degré. En effet, on a :

$$R^2 = h_2^2 + (d + R - e)^2 \quad (5)$$

En remplaçant  $h_2 = h_1 + d \tan(\alpha)$  :

$$d^2 [\tan(\alpha)^2 + 1] + d [2 \tan(\alpha) h_1 + 2(R - e)] + [h_1^2 - 2Re + e^2] = 0 \quad (6)$$

Avec  $d$ , on obtient la hauteur de rayon  $h_2$  sur la face de sortie de la lentille :

$$h_2 = h_1 + d \tan(\alpha) \quad (7)$$

L'angle  $\beta$  s'obtient avec :

$$\cos(\alpha + \beta) = \frac{d + R - e}{R} \quad (8)$$

Soit :

$$\beta = \arccos\left(\frac{d + R - e}{R}\right) - \alpha \quad (9)$$

On peut alors utiliser la loi de Snell-Descartes pour la second réfraction :

$$\delta = \arcsin\left(\frac{n_{air}}{n_l} \beta\right) \quad (10)$$

Pour finir :

$$h = h_2 - \tan(\delta - \alpha - \beta)(f' - d + d_f) \quad (11)$$

La figure A.3 montre le résultat pour un échantillon placé à  $p = -70$  mm de la lentille, qui est la configuration utilisée dans notre montage.

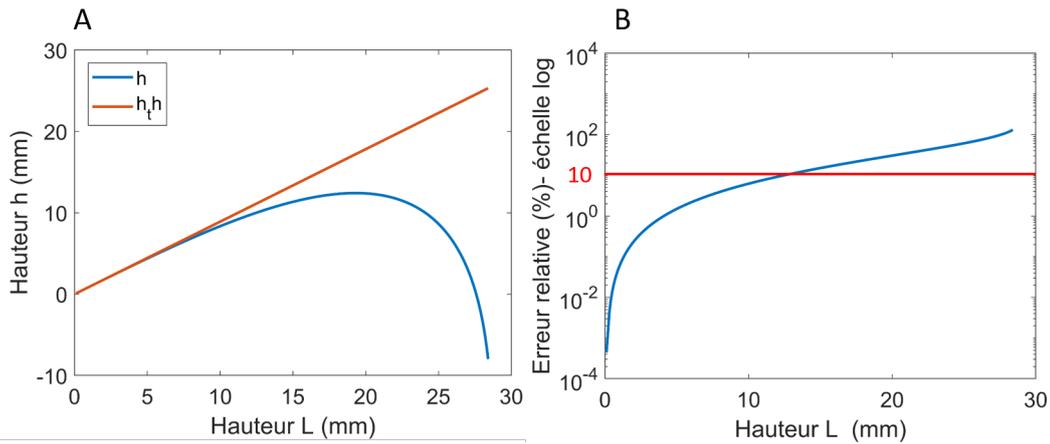


FIGURE A.3 – Hauteur théorique  $h_{th}$  et réelle  $h$  d'un rayon dans le plan focale, en fonction de sa hauteur  $L$  sur la lentille théorique (A). Erreur relative  $(h - h_{th})/h_{th}$  en pourcentage, échelle logarithmique (B).

Pour un décalage inférieur à 10%, on trouve un rayon effectif de  $r = 12.5$  mm, ce qui représente un peu moins de la moitié du rayon réel de la lentille. Au passage, on remarque que la lentille a une focale de 62.4 mm et non 60.0 mm. Remarque : le calcul a aussi été fait en retournant la lentille, les aberrations sont plus fortes.

# B ANALYSE DLS : SECONDE DÉMONSTRATION

Cette annexe présente une seconde démonstration de la relation utilisée pour l'analyse de la DLS :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = |TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r})\}|^2 \quad (1)$$

Le point de départ est de considérer que l'intensité  $I(\mathbf{q})$  est lié aux positions des cellules  $Pos(\mathbf{r})$  par :

$$I = |TF\{Pos\}F|^2 \quad (2)$$

où  $F$  est le facteur de forme. On a alors :

$$\begin{aligned} (C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 &= \langle I(t)I(t+\tau) \rangle \\ &= \langle |TF\{Pos(t)\}F|^2 |TF\{Pos(t+\tau)\}F|^2 \rangle \\ &= \langle |TF\{Pos(t)\}TF\{Pos(t+\tau)\}F^2|^2 \rangle \\ &= \langle |TF\{Pos(t) \otimes Pos(t+\tau)\}F^2|^2 \rangle \end{aligned} \quad (3)$$

Pour  $N$  cellules de positions :

$$Pos(\mathbf{r}, t) = \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) \quad (4)$$

$$Pos(\mathbf{r}, t + \tau) = \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_j + \Delta\mathbf{r}_j)) \quad (5)$$

On a :

$$\begin{aligned} [Pos(t) \otimes Pos(t+\tau)](\mathbf{r}) &= \int \int \int \left( \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{x} - \mathbf{r}_j) \right) \left( \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x} - (\mathbf{r}_j + \Delta\mathbf{r}_j)) \right) d\mathbf{x} \\ &= \int \int \int \sum_{j,k} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{r}_j) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k)) d\mathbf{x} \\ &= \sum_{j,k} \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k) - \mathbf{r}_j) \end{aligned} \quad (6)$$

D'où :

$$\begin{aligned} TF\{[Pos(t) \otimes Pos(t+\tau)]\}(\mathbf{q}) &= \int \int \int \sum_{j,k} \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j)) e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{r} \\ &= \sum_{j,k} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j)} \end{aligned} \quad (7)$$

On reprend l'équation 3 :

$$\begin{aligned}
(C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 &= \langle |TF\{[Pos(t) \otimes Pos(t + \tau)]\}(\mathbf{q})F^2(q)|^2 \rangle \\
&= |F^2(q)|^2 \langle \left( \sum_{j,k} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j)} \right) \left( \sum_{l,m} e^{+i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_l + \Delta\mathbf{r}_l + \mathbf{r}_m)} \right) \rangle \\
&= |F^2(q)|^2 \langle \sum_{j,k,l,m} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_l - \mathbf{r}_m)} \rangle \quad (8)
\end{aligned}$$

En supposant les déplacements  $\Delta r$  indépendant des positions  $\mathbf{r}$  :

$$(C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 = |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,l,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} \rangle \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_l - \mathbf{r}_m)} \rangle \quad (9)$$

En supposant les cellules indépendantes :

$$(C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 = |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_m)} \rangle \left( \left[ \sum_{k \neq l} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_k} \rangle \langle e^{+i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}_l} \rangle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_l)} \right] + \left[ \sum_{k=l} 1 \right] \right) \quad (10)$$

On suppose ensuite que les cellules sont décrites par la même distribution de déplacements :

$$(C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 = |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_m)} \rangle \left( \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \sum_{k \neq l} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_l)} + N \right) \quad (11)$$

$$= |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_m)} \rangle \left( \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \sum_{k,l} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_l)} - N \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 + N \right) \quad (12)$$

$$= \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \langle I^2 \rangle + N |F(q)|^2 \langle I \rangle (1 - \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2) \quad (13)$$

Or  $N |F(q)|^2 = \langle I \rangle$  et donc :

$$(C(\tau) + 1) = \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2} + 1 - \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \quad (14)$$

Soit :

$$C(\tau) = \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \left( \frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right) \quad (15)$$

Le facteur  $\frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1$  correspond au facteur de cohérence  $\beta$ . Si le speckle est complètement développé, on a  $\langle I^2 \rangle = 2 \langle I \rangle^2$  et donc  $\beta = 1$ , d'où :

$$C(\tau, \mathbf{q}) = \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \quad (16)$$

# C FONCTION DE CORRÉLATION POUR DES CELLULES NON INDÉPENDANTES

Cette reprend le calcul de l'annexe précédente dans le cas où on ne peut pas faire l'hypothèse de cellules indépendantes. On suppose ici que les cellule se déplacent par "groupes", à savoir que chaque cellule possède  $p$  voisines dont le mouvement est corrélé au sien, sans être pour autant identique.

On reprend l'équation 9 de l'annexe précédente :

$$(C(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 = |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,l,m} \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} \rangle \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_l - \mathbf{r}_m)} \rangle \quad (1)$$

La modification intervient dans  $\langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} \rangle$  où il y a maintenant une corrélation de mouvement entre certaines cellules. Sans aucune corrélation, on aurait :

$$\begin{aligned} \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} \rangle &= \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta\mathbf{r}_k} \rangle \langle e^{+i\mathbf{q} \cdot \Delta\mathbf{r}_l} \rangle \\ &= | \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta\mathbf{r}} \rangle |^2 \end{aligned} \quad (2)$$

en gardant l'hypothèse d'homogénéité : toutes les cellules ont en moyenne le même comportement. On notera  $C_{corr}$  la nouvelle expression la fonction de corrélation, prenant en compte les corrélation de déplacement entre cellule et la notation  $C$  désignera  $| \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta\mathbf{r}} \rangle |^2$ .

Pour le calcul de 1, on part de l'expression supposant aucune corrélation, puis on va y ajouter des termes correctifs :

$$\begin{aligned} (C_{corr}(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 &= |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,l,m} \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\Delta\mathbf{r}_k - \Delta\mathbf{r}_l)} \rangle \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_l - \mathbf{r}_m)} \rangle \\ &= C(\tau) |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,l,m} \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_l - \mathbf{r}_m)} \rangle \\ &= C(\tau) \langle I^2 \rangle \end{aligned} \quad (3)$$

Les cas où des corrélations viennent ajouter des termes à cette expression sont :

—  $k = l$ , alors  $\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_l)} \rangle = 1$  et il faut ajouter à refoeq :debut :

$$\begin{aligned} A &= |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_l-\mathbf{r}_m)} \sum_k (1 - C(\tau)) \rangle \\ &= (1 - C(\tau)) |F^2(q)|^2 N \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_l-\mathbf{r}_m)} \rangle \\ &= (1 - C(\tau)) \langle I \rangle^2 \end{aligned} \quad (4)$$

—  $l$  est une "voisine" de  $k$ , il faut ajouter le terme :

$$B = |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,m} \sum_v^p \left[ \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle - C(\tau) \right] \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_v-\mathbf{r}_m)} \rangle \quad (5)$$

Comme  $k \neq v$ , le terme  $\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_v-\mathbf{r}_m)} \rangle$  est non nul que si  $j = v$  et  $m = k$ , il est alors égal à 1 :

$$\begin{aligned} B &= |F^2(q)|^2 \sum_k \sum_v^p \left[ \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle - C(\tau) \right] \\ &= |F^2(q)|^2 N p \left[ \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle - C(\tau) \right] \\ &= \langle I \rangle^2 \frac{p}{N} \left[ \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle_{t,k,v} - C(\tau) \right] \end{aligned} \quad (6)$$

où on a à nouveau utilisé l'hypothèse d'homogénéité et  $\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle_{t,k,v}$  est une moyenne sur le temps, les cellules et leurs voisines. Cette moyenne est réelle et non complexe car pour chaque paire de cellules voisines A et B, la somme dont est issue la moyenne comporte  $e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_A-\Delta\mathbf{r}_B)}$  et son complexe conjugué  $e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_B-\Delta\mathbf{r}_A)}$ . Pour reprendre la notation en transformée de Fourier, on peut écrire :

$$\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_v)} \rangle_{t,k,v} = TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{v/k})\} \quad (7)$$

où  $\Delta\mathbf{r}_{v/k}$  désigne les déplacements des cellules voisines dans le référentiel de la cellule centrale.

Pour terminer, on obtient :

$$(C_{corr}(\tau) + 1) \langle I \rangle^2 = C(\tau) \langle I^2 \rangle + (1 - C(\tau)) \langle I \rangle^2 + \langle I \rangle^2 \frac{p}{N} [TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{v/k})\} - C(\tau)] \quad (8)$$

$$\begin{aligned} C_{corr}(\tau) &= C(\tau) \frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} + \frac{p}{N} [TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{v/k})\} - C(\tau)] \\ &= C(\tau) \left( 1 - \frac{p}{N} \right) + \frac{p}{N} TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{v/k})\} \end{aligned} \quad (9)$$

Cette expression permet de comprendre l'impact des corrélations locales des mouvements. Tout d'abord, on voit que l'influence est en  $\frac{p}{N}$ , ce qui veut dire que pour une grande population et un nombre réduit de cellules "voisines"  $p \ll N$ , on peut négliger cette correction et on retrouve bien  $C(\tau)$ . Dans le cas contraire, le signal mesuré est un mélange des déplacements absolus des cellules ( $C(\tau)$ ) et des déplacements relatifs des cellules par

rapport à leurs voisines ( $TF\{Pb_\tau(\Delta\mathbf{r}_{\mathbf{v}/\mathbf{k}})\}$ ). Pour des mouvements coordonnés, les déplacements relatifs sont plus lents, donc avec un temps caractéristique de décorrélation plus long. Enfin, on remarque que si toutes les cellules ont des mouvements identiques,  $p = N$  et  $\Delta\mathbf{r}_{\mathbf{v}/\mathbf{k}} = 0$  donc  $C_{corr}(\tau) = 1$ . On retrouve ici le fait que la figure de diffraction ne dépend pas de la position de l'échantillon (si il est éclairé par une onde plane).

# D CALCUL DE LA FONCTION DE CORRÉLATION SPATIO-TEMPORELLE $C^*$

Pour le calcul de  $C^*$ , on reprend la trame du calcul de  $C(q)$  utilisant les transformées de Fourier, présenté en annexe B. Le point de départ est de considérer que l'intensité  $I(\mathbf{q})$  est lié aux positions des cellules  $Pos(\mathbf{r})$  par :

$$I = |TF\{Pos\}F|^2 \quad (1)$$

où  $F$  est le facteur de forme des cellules. On suppose une distribution d'intensité isotrope en moyenne et on prendra  $d\mathbf{q}$  tel que  $|\mathbf{q} + d\mathbf{q}| = |\mathbf{q}|$ . Ainsi, on aura  $F(\mathbf{q}) = F(\mathbf{q} + d\mathbf{q})$  et  $\langle I(\mathbf{q}) \rangle = \langle I(\mathbf{q} + d\mathbf{q}) \rangle$ . On utilise aussi :

$$\begin{aligned} TF\{Pos\}(\mathbf{q} + d\mathbf{q}) &= \int \int \int Pos(\mathbf{r}) e^{-i(\mathbf{q}+d\mathbf{q},\mathbf{r})} d\mathbf{r} \\ &= \int \int \int Pos(\mathbf{r}) e^{-id\mathbf{q},\mathbf{r}} e^{-i\mathbf{q},\mathbf{r}} d\mathbf{r} \\ &= TF\{Pos(\mathbf{r})e^{-id\mathbf{q},\mathbf{r}}\}(\mathbf{q}) \end{aligned} \quad (2)$$

On a alors :

$$\begin{aligned} G_I^* &= \langle I(\mathbf{q}, t) I(\mathbf{q} + d\mathbf{q}, t + \tau) \rangle \\ &= \langle |TF\{Pos(t)\}F|^2 |TF\{Pos(t + \tau)e^{-id\mathbf{q},\mathbf{r}}\}F|^2 \rangle \\ &= \langle |TF\{Pos(t)\}TF\{Pos(t + \tau)e^{-id\mathbf{q},\mathbf{r}}\}F^2|^2 \rangle \\ &= \langle |TF\{[Pos(t)] \otimes [Pos(t + \tau)e^{-id\mathbf{q},\mathbf{r}}]\}F^2|^2 \rangle \end{aligned} \quad (3)$$

Pour  $N$  cellules de positions :

$$Pos(\mathbf{r}, t) = \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) \quad (4)$$

$$Pos(\mathbf{r}, t + \tau) = \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_j + \Delta\mathbf{r}_j)) \quad (5)$$

On a :

$$\begin{aligned}
[Pos(t) \otimes Pos(t + \tau)e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}](\mathbf{r}) &= \int \int \int \left( \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{x} - \mathbf{r}_j) \right) \left( \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x} - (\mathbf{r}_j + \Delta\mathbf{r}_j)) \right) e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}-\mathbf{x})} d\mathbf{x} \\
&= \int \int \int \sum_{j,k} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{r}_j) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k)) e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{x} \\
&= \sum_{j,k} \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k) - \mathbf{r}_j) e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}-\mathbf{r}_j)} \quad (6)
\end{aligned}$$

D'où :

$$\begin{aligned}
TF\{[Pos(t) \otimes Pos(t + \tau)e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}]\}(\mathbf{q}) &= \int \int \int \sum_{j,k} \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_k + \Delta\mathbf{r}_k + \mathbf{r}_j)) e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}-\mathbf{r}_j)} e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{r} \\
&= \sum_{j,k} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k+\Delta\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j)} e^{+i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_j} \quad (7)
\end{aligned}$$

On reprend l'équation 3 :

$$\begin{aligned}
G_I^* &= \langle |TF\{[Pos(t) \otimes Pos(t + \tau)e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}]\}(\mathbf{q}) F^2(q)|^2 \rangle \\
&= |F^2(q)|^2 \langle \left( \sum_{j,k} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k+\Delta\mathbf{r}_k+\mathbf{r}_j)} e^{+i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_j} \right) \left( \sum_{l,m} e^{+i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_l+\Delta\mathbf{r}_l+\mathbf{r}_m)} e^{-i\mathbf{d}\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}_m} \right) \rangle \\
&= |F^2(q)|^2 \langle \sum_{j,k,l,m} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_l)} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k-\mathbf{r}_l)} e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_m)} \rangle \quad (8)
\end{aligned}$$

En supposant les déplacements  $\Delta r$  indépendant des positions  $\mathbf{r}$  :

$$G_I^* = |F^2(q)|^2 \sum_{j,k,l,m} \langle e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\Delta\mathbf{r}_k-\Delta\mathbf{r}_l)} \rangle \langle e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k-\mathbf{r}_l)} \rangle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_m)} \quad (9)$$

En supposant les cellules indépendantes :

$$G_I^* = |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_m)} \rangle \left( \sum_{k \neq l} \langle e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot\Delta\mathbf{r}_k} \rangle \langle e^{+i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot\Delta\mathbf{r}_l} \rangle e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k-\mathbf{r}_l)} + \sum_{k=l} 1 \right) \quad (10)$$

On suppose ensuite que les cellules sont décrites par la même distribution de déplacements :

$$\begin{aligned}
G_I^* &= |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_m)} \rangle \left( \langle e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot\Delta\mathbf{r}} \rangle^2 \sum_{k \neq l} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k-\mathbf{r}_l)} + N \right) \\
&= |F^2(q)|^2 \sum_{j,m} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}_j-\mathbf{r}_m)} \rangle (C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \sum_{k,l} e^{-i(\mathbf{q}+\mathbf{d}\mathbf{q})\cdot(\mathbf{r}_k-\mathbf{r}_l)} - NC(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) + N) \\
&= |F^2(q)|^2 C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \langle I(\mathbf{q}) I(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \rangle + N |F(q)|^2 \langle I(\mathbf{q}) \rangle (1 - C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q})) \quad (11)
\end{aligned}$$

Or  $N|F(q)|^2 = \langle I \rangle$  et donc :

$$\frac{G_I^*}{\langle I \rangle^2} = C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \frac{\langle I(\mathbf{q}) I(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \rangle}{\langle I \rangle^2} + 1 - C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \quad (12)$$

Comme  $C(\tau)^* = \frac{G_I^*}{\langle I \rangle^2} - 1$  :

$$C(\tau)^* = C(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \left( \frac{\langle I(\mathbf{q}) I(\mathbf{q} + \mathbf{d}\mathbf{q}) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right) \quad (13)$$

# E CALCUL DU PALIER DE LA FONCTION D'AUTOCORRÉLATION C

A cause de signaux parasites, la fonction d'autocorrélation ne C est décalée et ne tend pas vers 0 pour un délai  $\tau$  infini, mais vers un certain palier. Cette annexe présente le calcul de ce palier, à partir de quelques hypothèses sur la nature du signal parasite. Le calcul est largement inspiré de celui fait par Cipelleti et al. dans [137].

On considère un bruit composé du bruit quantique D (*Dark noise*) de la caméra et des réflexions parasites du laser donnant un champ  $E_p$  fonction de  $\mathbf{q}$  mais constant dans le temps. Ce bruit est superposé au champ E diffusé par l'échantillon. Le signal S en intensité sur la caméra est alors :

$$S(t) = D(t) + [E(t) + E_p][\overline{E(t)} + \overline{E_p}] \quad (1)$$

On introduit la notation suivante pour l'autocorrélation d'une fonction f réelle ou complexe :

$$G_f(q, \tau) = \langle f(t) \overline{f(t + \tau)} \rangle_{\phi, t} \quad (2)$$

On note  $I = \overline{E E}$  et  $I_p = \overline{E_p E_p}$ . Pour plus de concision,  $E(t)$  est noté simplement E, tandis que  $E(t + \tau)$  est noté  $E^\tau$ .

Pour connaître l'effet du signal parasite sur C, on commence par calculer  $G_S$  :

$$\begin{aligned} G_S &= \langle (D + [E + E_p][\overline{E + E_p}])(D^\tau + [E^\tau + E_p^\tau][\overline{E^\tau + E_p^\tau}]) \rangle_{\phi, t} \\ &= G_I + 2 \langle I_p \rangle_{\phi} \Re(G_E) + 2 \langle I_p \rangle_{\phi} \langle I \rangle_{\phi, t} + \langle I_p^2 \rangle_{\phi} \\ &\quad + G_D + 2 \langle D \rangle_{\phi, t} [\langle I_p \rangle_{\phi} + \langle I \rangle_{\phi, t}] \end{aligned} \quad (3)$$

où on a fait les hypothèses :

- E et  $E_p$  sont indépendant,
- $\langle E_p \rangle_{\phi} = \langle E \rangle_{\phi, t} = 0$ ,
- $\langle I \rangle_{\phi}$  est constante dans le temps,
- D est indépendant du reste et  $\langle D \rangle_{\phi}$  est constante.

D est un bruit quantique non corrélé, ce qui implique :  $G_D = \langle D^2 \rangle_{\phi, t}$  pour  $\tau = 0$  et  $G_D = \langle D \rangle_{\phi, t}^2$  pour  $\tau \neq 0$ . Comme on cherche le palier aux temps longs, on prendra

$G_D = \langle D \rangle_{\phi,t}^2$ . En utilisant la relation de Siegert :  $G_I = \langle I \rangle^2 + |G_E|^2$ , on a :

$$\begin{aligned} G_S &= |G_E|^2 + 2 \langle I_p \rangle_{\phi} \Re(G_E) + \langle I \rangle_{\phi,t}^2 + 2 \langle I_p \rangle_{\phi} \langle I \rangle_{\phi,t} + \langle I_p^2 \rangle_{\phi} \\ &\quad + \langle D \rangle_{\phi,t}^2 + 2 \langle D \rangle_{\phi,t} [\langle I_p \rangle_{\phi} + \langle I \rangle_{\phi,t}] \\ &= |G_E|^2 + 2 \langle I_p \rangle_{\phi} \Re(G_E) + \langle S \rangle_{\phi,t}^2 - \langle I_p \rangle_{\phi}^2 + \langle I_p^2 \rangle_{\phi} \end{aligned} \quad (4)$$

car  $\langle S \rangle^2 = (\langle D \rangle + \langle I \rangle + \langle I_p \rangle)^2 = \langle D \rangle^2 + \langle I \rangle^2 + \langle I_p \rangle^2 + 2 \langle I \rangle \langle I_p \rangle + 2 \langle D \rangle (\langle I \rangle + \langle I_p \rangle)$ . En utilisant la notation  $g_1 = \frac{G_E}{\langle I \rangle}$ , où on retrouve la fonction  $g_1$  vue précédemment, on obtient pour la fonction d'autocorrélation mesurée  $C_m$  :

$$\begin{aligned} C_m + 1 &= \frac{G_S}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \\ &= |g_1|^2 \frac{\langle I \rangle_{\phi,t}^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} + 2 \frac{\langle I_p \rangle_{\phi} \langle I \rangle_{\phi,t}}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \Re(G_E) + 1 + \frac{\langle I_p^2 \rangle_{\phi} - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \end{aligned} \quad (5)$$

Soit pour  $C_m$  :

$$C_m = |g_1|^2 \frac{\langle I \rangle_{\phi,t}^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} + 2 \frac{\langle I_p \rangle_{\phi} \langle I \rangle_{\phi,t}}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \Re(g_1) + \frac{\langle I_p^2 \rangle_{\phi} - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \quad (6)$$

En comparaison de la mesure théorique de  $C = |g_1|^2$  :

$$C_m = C \frac{\langle I \rangle_{\phi,t}^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} + 2 \frac{\langle I_p \rangle_{\phi} \langle I \rangle_{\phi,t}}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \Re(g_1) + \frac{\langle I_p^2 \rangle_{\phi} - \langle I_p \rangle^2}{\langle S \rangle_{\phi,t}^2} \quad (7)$$

# F CALCUL DE LA FRACTION DE DIFFUSION MULTIPLE

Dans cette annexe, nous allons calculer la proportion de photons diffusés  $k$ -fois lorsqu'un laser gaussien de waist  $2\sigma$  traverse un sphéroïde de rayon  $R$ . On connaît le libre parcours moyen  $L_{633} = 56.4 \pm 0.8\mu m$  ou  $L_{850} = 76 \pm 4\mu m$ . La probabilité d'être diffusé  $k$  fois en traversant une épaisseur  $h$  de sphéroïde est :

$$Pb(k, h) = \frac{e^{-h/L}(h/L)^k}{k!} \quad (1)$$

On suppose que le laser à un profil Gaussien :

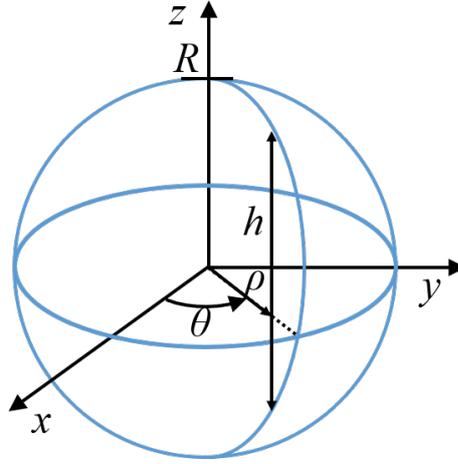


FIGURE F.1 – Schéma d'un sphéroïde avec les coordonnées polaire et l'épaisseur  $h$ .

$$I(\rho, \theta) = I_0 e^{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

où  $\theta$  et  $\rho$  correspondent aux coordonnées polaires. Ainsi si sur l'ensemble du sphéroïde, on a :

$$\begin{aligned} Pb_s(k) &= \frac{1}{I_{tot}} \int_0^{2\pi} \int_0^\infty I(\rho, \theta) Pb(k, h(\rho)) \rho d\rho d\theta \\ &= \frac{2\pi}{I_{tot}} \int_0^\infty I(\rho, \theta) Pb(k, h(\rho)) \rho d\rho \end{aligned} \quad (3)$$

où  $I_{tot}$  est l'intensité totale du faisceau laser :

$$I_{tot} = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty I(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta = I_0 2\pi \sigma^2 \quad (4)$$

On a donc :

$$Pb_s(k) = \frac{1}{\sigma^2} \int_0^\infty e^{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}} Pb(k, h(\rho)) \rho d\rho \quad (5)$$

Pour  $k \neq 0$ , c'est-à-dire une diffusion ou plus, la portion du laser passant à côté du sphéroïde ne contribue pas. Dans ce cas, on peut donc stopper l'intégration à  $\rho = R$ .

$$Pb_s(k) = \frac{1}{\sigma^2} \int_0^R e^{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}} Pb(k, h(\rho)) \rho d\rho \quad (6)$$

Pour le cas  $k = 0$ , on ajoutera  $S$  :

$$S = \frac{1}{\sigma^2} \int_R^\infty e^{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}} \rho d\rho = e^{-\frac{R^2}{2\sigma^2}} \quad (7)$$

Il faut ensuite exprimer  $h(\rho)$ . Comme on peut le voir sur le schéma F.1, on a :

$$\rho^2 + \left(\frac{h}{2}\right)^2 = R^2 \iff h = 2\sqrt{R^2 - \rho^2} \quad (8)$$

On utilise cette relation pour le changement de variable  $\rho d\rho = hdh/4$  avec  $h$  appartenant à l'intervalle  $[0, 2R]$ . On obtient :

$$Pb_s(k) = \frac{e^{-\frac{R^2}{2\sigma^2}}}{4\sigma^2} \int_0^{2R} e^{\frac{h^2}{8\sigma^2}} \frac{e^{-h/L} (h/L)^k}{k!} hdh \quad (9)$$

Il n'y a pas d'expression analytique pour cette intégrale dans le cas général. On se contentera donc d'un résultat numérique. Dans le cas d'une illumination uniforme de la taille du sphéroïde  $\frac{I}{I_{tot}} = \frac{1}{\pi R^2}$ , il existe une expression analytique. L'équation 9 devient :

$$\begin{aligned} Pb_s(k) &= \frac{1}{2R^2} \int_0^{2R} \frac{e^{-h/L} (h/L)^k}{k!} hdh \\ &= \frac{1}{2k!} \left(\frac{L}{R}\right)^2 \gamma(k+2, 2R/L) \end{aligned} \quad (10)$$

d'après [187] page 346, où  $\gamma$  est la fonction gamma incomplète.

# G MODÈLE ANALYTIQUE DE L'IMPACT DE LA DIFFUSION MULTIPLE

Cette annexe détail le calcul analytique de la fonction de phase  $P_m$  et de la fonction de corrélation  $C$ , mesurées en diffusion multiple selon le modèle de la section IV.6.1. On utilise les hypothèses indiquées dans cette section. On ne s'intéresse qu'à la lumière diffusée, la lumière non diffusée étant soustraite de la mesure. On commence le calcul par le cas particulier de 1 ou 2 diffusions, puis on généralise à  $n$  diffusions. On prend les notations de la figure G.1.

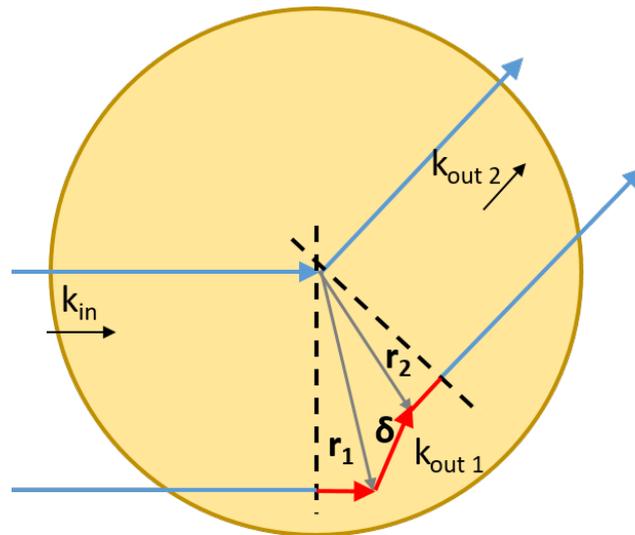


FIGURE G.1 – Diffraction double dans un sphéroïde, géométrie

## Fonction de phase

Toutes directions confondues, si on considère un nombre total  $N$  de photons diffusés par le sphéroïde, la fraction  $\alpha N$  diffusé 1 fois peut être calculée comme indiqué dans la section IV.1.1. On ne considère que les photons diffusés 1 ou 2 fois dans ce calcul et la fraction de photons diffusés 2 fois est donc  $(1 - \alpha)N$ . Si on cherche maintenant le nombre de photons diffusés dans une direction d'observation  $\mathbf{q}_2$ , il faut prendre en compte la répartition angulaire des photons : la fonction de phase  $P$  (équation 1). Pour le nombre de photons diffusés 1 fois, on a :

$$N_1^{q_2} = \alpha NP(\mathbf{q}_2) \quad (1)$$

Pour  $N_2^{q_2}$ , la proportion dépend aussi de  $\mathbf{q}_1$ . En effet la proportion de photons diffusé dans la direction  $\mathbf{q}_1$  puis  $\mathbf{q}_2$  est  $P(\mathbf{q}_1)P(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1)$  et :

$$\begin{aligned} N_2^{q_2} &= (1 - \alpha)N \int P(\mathbf{q}_1)P(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1)d\mathbf{q}_1 \\ &= (1 - \alpha)N[P \circledast P](\mathbf{q}_2) \end{aligned} \quad (2)$$

On obtient donc une intensité moyenne dans la direction  $\mathbf{q}_2$  :

$$\langle I(\mathbf{q}_2) \rangle = (N_1 + N_2)E_0^2 \quad (3)$$

et une fonction de phase mesurée  $P_m$  :

$$P_m(\mathbf{q}_2) = \frac{\langle I(\mathbf{q}_2) \rangle}{I_{total}} = \frac{N_1^{q_2} + N_2^{q_2}}{N} = \alpha P(\mathbf{q}_2) + (1 - \alpha)[P \circledast P](\mathbf{q}_2) \quad (4)$$

Ce raisonnement peut être généralisé à n diffusions, et donne :

$$P_m = \sum_{k=1}^n \alpha_k [P \circledast^{k-1} P] \quad (5)$$

où  $P \circledast^k P$  représente P convoluée avec elle même k fois, avec la convention  $P \circledast^0 P = P$ .

## Fonction de corrélation

Pour la fonction de corrélation C, on part de sa définition :

$$C(\mathbf{q}_2) = \left| \frac{\langle E(\mathbf{q}_2, t) \overline{E(\mathbf{q}_2, t + \tau)} \rangle_t}{\langle I(\mathbf{q}_2, t) \rangle_t} \right|^2 \quad (6)$$

avec

$$E(\mathbf{q}_2, t) = \sum_j^N E_j e^{-i\phi_j} \quad (7)$$

pour N diffuseurs. Le déphasage  $\phi_j$  est dans le cas de la diffusion simple  $\phi_j = \mathbf{q}_2 \cdot \mathbf{r}_j$  et dans le cas de la diffusion double (section IV.6.1)  $\phi_j = \mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_j + (\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \mathbf{r}_j$ .

On prend à part :

$$G_1(\tau) = \langle E(\mathbf{q}_2, t) \overline{E(\mathbf{q}_2, t + \tau)} \rangle_t = \sum_j^N \sum_k^N E_0^2 \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_k(t+\tau)} \rangle_t \quad (8)$$

Grâce aux hypothèses réalisées, les termes croisés tels que  $j \neq k$  sont nuls :

$$\begin{aligned} G_1(\tau) &= E_0^2 \sum_j^N \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_t \\ &= E_0^2 \left[ \sum_{1diffusion}^{N_1} \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_t + \sum_{2diffusions}^{N_2} \langle e^{-i\phi_k(t)} e^{+i\phi_k(t+\tau)} \rangle_t \right] \\ &= E_0^2 \left[ N_1 \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_{\Phi} + N_2 \langle e^{-i\phi_k(t)} e^{+i\phi_k(t+\tau)} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} \right] \end{aligned} \quad (9)$$

où on a fait l'hypothèse d'ergodicité pour la dernière étape, en remplaçant une moyenne sur le temps par une moyenne sur les configurations des déplacements  $\Phi$  des cellules et des  $\mathbf{q}_1, \mathbf{j}$ . Ainsi on peut séparer la contribution des  $N_1$  diffuseurs sur lesquels la diffusion est simple et les  $N_2$  diffuseurs sur lesquels la diffusion est double.  $N_1$  et  $N_2$  répondent au même proportions que  $N_1^{q^2}$  et  $N_2^{q^2}$  définis plus haut selon les équations 1 et 2. L'équation 9 devient :

$$G_1(\tau) = E_0^2 \left[ \alpha N P \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_{\Phi} + (1 - \alpha) N [P \otimes P] \langle e^{-i\phi_k(t)} e^{+i\phi_k(t+\tau)} \rangle_{\Phi} \right] \quad (10)$$

Dans le cas de la diffusion simple, on avait déjà montré :

$$\langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_{\Phi} = TF\{Pb(\Delta r)\} \quad (11)$$

Dans le cas simple, cette fonction était alors la fonction de corrélation du champ  $g_1$ . Ce n'est plus le cas en diffusion multiple, mais on gardera tout de même la notation :

$$g_1 \equiv TF\{Pb(\Delta r)\} \quad (12)$$

On obtient pour la fonction de corrélation :

$$\begin{aligned} C(\tau) &= \frac{G_1(\tau)}{\langle I(\mathbf{q}_2) \rangle} \\ &= \frac{G_1(\tau)}{NP_m} \\ &= \left| \frac{\alpha P g_1(\tau)}{P_m} g_1 + \frac{(1 - \alpha) [P \otimes P]}{P_m} \langle e^{-i\phi_k(t)} e^{+i\phi_k(t+\tau)} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} \right|^2 \end{aligned} \quad (13)$$

On cherche ensuite à exprimer :

$$\begin{aligned} \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} &= \langle e^{-i(\mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_1(t) + (\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \mathbf{r}_2(t))} e^{+i(\mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{r}_1(t+\tau) + (\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \mathbf{r}_2(t+\tau))} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} \\ &= \langle e^{i(\mathbf{q}_1 \cdot \Delta \mathbf{r}_1(\tau) + (\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \Delta \mathbf{r}_2(\tau))} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} \\ &= \langle \langle e^{i(\mathbf{q}_1 \cdot \Delta \mathbf{r}_1(\tau))} \rangle_{\Phi} \langle e^{i((\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) \cdot \Delta \mathbf{r}_2(\tau))} \rangle_{\Phi} \rangle_{\mathbf{q}_1} \end{aligned} \quad (14)$$

J'ai fait ici l'approximation de  $\mathbf{q}_1$  constant dans le temps. Cette approximation est valable si la distance entre les diffuseurs (de l'ordre du *mean free path*) est grande par rapport au déplacements  $\Delta \mathbf{r}_1(\tau)$  et  $\Delta \mathbf{r}_2(\tau)$ . Pour la dynamique de nos sphéroïdes cette approximation est bonne.

On reconnaît dans le terme de gauche  $g_1(\mathbf{q}_1, \tau)$  et dans le terme de droite  $g_1(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1, \tau)$ . Ce qui donne :

$$\begin{aligned} \langle e^{-i\phi_j(t)} e^{+i\phi_j(t+\tau)} \rangle_{\Phi, \mathbf{q}_1} &= \langle g_1(\mathbf{q}_1, \tau) g_1(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1, \tau) \rangle_{\mathbf{q}_1} \\ &= \frac{1}{[P \otimes P](\mathbf{q}_2)} \int P(\mathbf{q}_1) P(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) g_1(\mathbf{q}_1) g_1(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) d\mathbf{q}_1 \\ &= \frac{1}{[P \otimes P](\mathbf{q}_2)} \int (P \times g_1(\tau))(\mathbf{q}_1) (P \times g_1(\tau))(\mathbf{q}_2 - \mathbf{q}_1) d\mathbf{q}_1 \\ &= \frac{[(P \times g_1(\tau)) \otimes (P \times g_1(\tau))](\mathbf{q}_2)}{[P \otimes P](\mathbf{q}_2)} \end{aligned} \quad (15)$$

On obtient comme résultat :

$$C = \left| \frac{\alpha P g_1 + (1 - \alpha)[(P \times g_1) \otimes (P \times g_1)]}{P_m} \right|^2 \quad (16)$$

On peut aussi exprimer cette équation dans l'espace direct, en gardant les mêmes hypothèses que celles utilisées pour l'analyse de la section II.3.3 :

$$TF^{-1}\{\sqrt{C}P_m\} = \alpha[\tilde{P} \otimes Pb(\Delta r)] + (1 - \alpha)(2\pi)^2[\tilde{P} \otimes Pb(\Delta r)]^2 \quad (17)$$

où  $\tilde{P} = TF^{-1}\{P\}$  et on a utilisé la relation :  $TF^{-1}\{g_1\} = Pb(\Delta r)$ .

Par le même raisonnement, on peut montrer que dans le cas de  $n$  diffusions, on obtient :

$$C = \left| \frac{1}{P_m} \sum_{k=1}^n \alpha_k [(P \times g_1) \otimes^{k-1} (P \times g_1)] \right|^2 \quad (18)$$

$$TF^{-1}\{\sqrt{C}P_m\} = \sum_{k=1}^n \alpha_k (2\pi)^{2(k-1)} [Pb(\Delta r) \otimes \hat{P}]^k \quad (19)$$

# H MODÈLE DE MARCHÉ ALÉATOIRE ET FONCTION DE CORRÉLATION C ASSOCIÉE

Cette section présente un modèle de marche aléatoire à partir duquel il est possible d'obtenir l'expression analytique de la fonction de corrélation C. Il s'agit d'un modèle plus simple que le *Persistent Random Walk* présenté en section V.2.2. Dans ce modèle, les cellules sont toutes identiques et on a une distribution de vitesse f :

$$f(v) = \frac{4v}{\bar{v}^2} e^{-2v/\bar{v}} \quad (1)$$

où  $\bar{v}$  est la moyenne. Les cellules se déplacent en ligne droite pendant un temps T, puis changent de direction aléatoirement avant de se diriger à nouveau dans une direction donnée, avec une nouvelle vitesse. Le temps de persistance T est identique à toutes les cellules. On cherche à calculer l'expression de  $C(\mathbf{q}, \tau)$  :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{q}, t) I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle \langle I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle} - 1 = \left| \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}(\tau)} \rangle \right|^2. \quad (2)$$

Pour cela on s'intéresse à  $\Delta \mathbf{r}(\tau)$ , la distance vectorielle parcourue par une cellule entre  $t$  et  $t + \tau$ . On décompose  $\Delta \mathbf{r}(\tau)$  en :

1. un déplacement balistique entre  $t$  et  $t + T_0$ , instant où le premier changement de direction se produit, d'une durée  $t_1 = T_0$  ;
2. une succession de N mouvements balistiques d'une durée  $t_j = T$ , séparés par les changements de direction aléatoires, avec  $N = \text{floor}[(|\tau - T_0|)/T]$  ;
3. le dernier déplacement entre  $T_0 + N * T$  et  $\tau$ , d'une durée de  $t_{N+2} = \tau - T_0 - N * T = (\tau - T_0)[T]$ . Les crochets dénotent le modulo.

$$\Delta \mathbf{r} = \sum_{j=1}^{N+2} \mathbf{r}_j = \sum_{j=1}^{N+2} v_j t_j (\cos(\theta_j) \mathbf{x} + \sin(\theta_j) \mathbf{y}). \quad (3)$$

où  $\theta_j$  est l'angle entre la direction du j-ème déplacement et l'axe  $\mathbf{x}$  du repère orthogonal (O,  $\mathbf{x}$ ,  $\mathbf{y}$ ). Pour un échantillon isotropique, on peut choisir  $\mathbf{q}$  parallèle à  $\mathbf{x}$  et on obtient :

$$e^{-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}(\tau)} = e^{-iq \sum_{j=1}^{N+2} v_j t_j \cos(\theta_j)} = \prod_{j=1}^{N+2} e^{-iq v_j t_j \cos(\theta_j)} \quad (4)$$

Donc :

$$\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(t+\tau)} \rangle = \int_0^T \int_0^\infty \dots \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \dots \int_0^{2\pi} \prod_{j=1}^{N+2} e^{-iqv_j t_j \cos(\theta_j)} \frac{d\theta_1}{2\pi} \dots \frac{d\theta_{N+2}}{2\pi} f(v_1) dv_1 \dots f(v_{N+2}) dv_{N+2} \frac{dT_0}{T} \quad (5)$$

Comme les angles  $\theta_j$  sont indépendants entre eux, de même que pour les vitesses  $v_j$  :

$$\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(t+\tau)} \rangle = \int_0^T \prod_{j=1}^{N+2} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} f(v_j) e^{-iqv_j t_j \cos(\theta_j)} \frac{d\theta_j dv_j dT_0}{2\pi T} \quad (6)$$

On utilise le résultat analytique suivant :

$$\frac{1}{2\pi} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} e^{-iqv\tau \cos\theta} f(v) d\theta dv = \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}\tau}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \quad (7)$$

Ce qui donne :

$$\begin{aligned} \langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(t+\tau)} \rangle &= \int_0^T \prod_{j=1}^{N+2} \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}t_j}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \\ &= \int_0^T \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T_0}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T}{2} \right)^2 \right)^{-3N/2} \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}(\tau - T_0)[T]}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \frac{dT_0}{T} \\ &= \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T}{2} \right)^2 \right)^{-3N/2} \int_0^T \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T_0}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}(\tau - T_0)[T]}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \frac{dT_0}{T} \end{aligned} \quad (8)$$

Ici, on a oublié de prendre en compte un cas particulier important : le cas où  $\tau < T_0$ . Dans ce cas, le premier et le dernier saut sont en fait le même :  $N=0$  et  $\theta_1 = \theta_2$ . On doit donc obtenir :

$$\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot\Delta\mathbf{r}(t+\tau)} \rangle = \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}\tau}{2} \right)^2 \right)^{-N/2} \quad (9)$$

Pour cela, on remplace  $T_0$  dans l'équation 8 par  $T_0^* = T_0(T_0 < \tau)$ , i.e.  $T_0$  si  $T_0 < \tau$  et 0 si  $T_0 > \tau$ . On peut vérifier que l'équation 8 donne bien alors ce qu'il faut dans le cas particulier.

Pour finir, on a :

$$C(\mathbf{q}, \tau) = \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T}{2} \right)^2 \right)^{-3N} \left[ \int_0^T \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}T_0^*}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \left( 1 + \left( \frac{q\bar{v}(\tau - T_0^*)[T]}{2} \right)^2 \right)^{-3/2} \frac{dT_0}{T} \right]^2 \quad (10)$$

avec  $N = \text{floor}[(|\tau - T_0|)/T]$  et  $T_0^* = T_0(T_0 < \tau)$

Cette expression peut ensuite être utilisée pour ajuster  $C(\mathbf{q}, \tau)$ . Appliqué au cas des macrophages polarisés M1 et M2, on obtient les résultats présentés dans la table H.1. Le coefficient de diffusion associé est  $D_2 = 3\bar{v}^2 T/8$ . Le tableau H.2 rappelle les résultats obtenus avec le modèle *Persistent Random Walk*. Le tableau H.1 comporte aussi  $\langle \sqrt{v^2} \rangle$ , soit  $\sqrt{3/2}\bar{v}$ , pour comparer avec S.

TABLE H.1 – Vitesse  $\bar{v}$ , persistance  $T$  et coefficient de diffusion  $D_2$  obtenus avec l'ajustement 10.

Polarisation	$\bar{v}$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$\langle \sqrt{v^2} \rangle$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	T (s)	$D_2$ ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ )
M1	$66 \pm 1$	$81 \pm 2$	$640 \pm 80$	$292 \pm 40$
M2	$86 \pm 1$	$105 \pm 2$	$360 \pm 40$	$276 \pm 34$

TABLE H.2 – Vitesse  $S$ , persistance  $T_P$  et coefficient de diffusion  $D$  pour le modèle Persistent Random Walk

Polarisation	S ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	$T_P$ (s)	D ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ )
M1	$82 \pm 1$	$407 \pm 16$	$377 \pm 17$
M2	$129 \pm 6$	$158 \pm 15$	$364 \pm 45$

Les résultats obtenus suivent les mêmes tendances.

# I FORMULAIRE DE TRANSFORMÉES DE FOURIER DE FONCTIONS ISOTROPES

Cette annexe présente l'expression analytique de la transformée de Fourier de plusieurs fonctions isotropes en 2D et en 3D. La dimension est notée  $n$ . Ce formulaire est utilisé pour faire le lien entre un ajustement de la fonction de corrélation  $C(\mathbf{q})$  et la distribution de déplacements  $Pb(\Delta r)$  selon la relation :

$$C(\mathbf{q}) = |TF\{Pb(\Delta r)\}|^2 \quad (1)$$

pour un délai  $\tau$  donné.

## Gaussienne

Si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \sum_1^N A_i e^{-\frac{1}{2}(q\sigma_i)^2} \right]^2 \quad (2)$$

Avec  $\sum_1^N A_i = 1$ . Alors la distribution de déplacements correspondante est :

$$Pb(\Delta r) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}} \sum_1^N \frac{A_i}{\sigma_i^n} e^{-\frac{1}{2}(\Delta r/\sigma_i)^2} \quad (3)$$

La distance moyenne parcourue par les cellules est :

$$2D : \langle |\Delta r| \rangle = \sqrt{\pi/2} \sum_1^N A_i \sigma_i \quad 3D : \langle |\Delta r| \rangle = 2\sqrt{2/\pi} \sum_1^N A_i \sigma_i \quad (4)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = n \sum_1^N A_i \sigma_i^2 \quad (5)$$

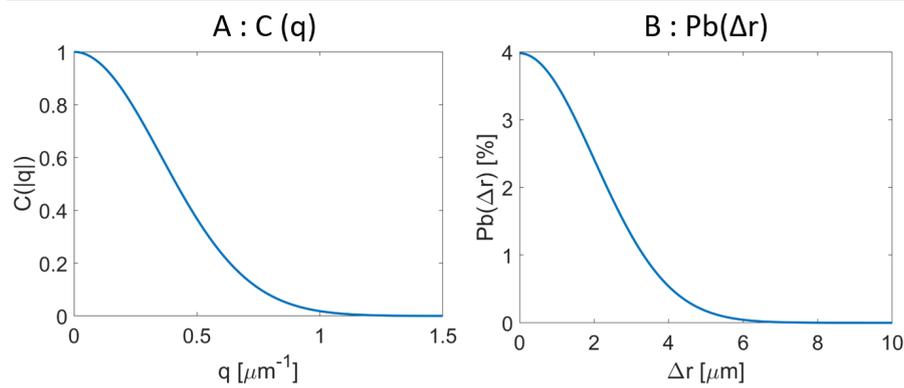


FIGURE I.1 – Fonction de corrélation  $C$  (A) et distribution des déplacements associée (B).  $n = 2, N = 1, \sigma = 2 \mu m$ .

## Exponentielle

Si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ e^{-qL} \right]^2 \quad (6)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est ([187], page 702) :

$$Pb(\Delta r) = \frac{1}{2^{3-n} \pi^{n-1} L^n} \left[ \frac{1}{1 + (\Delta r/L)^2} \right]^{\frac{n+1}{2}} \quad (7)$$

Le soucis est que la moyenne parcourue est infinie, de même pour la MSD.

A l'inverse, si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{1}{1 + (qL)^2} \right]^{n+1} \quad (8)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est :

$$Pb(\Delta r) = \frac{1}{2^{2n-3} \pi L^n} e^{-\Delta r/L} \quad (9)$$

La distance moyenne parcourue par les cellules est :

$$\langle |\Delta r| \rangle = nL \quad (10)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = 6(n-1)L^2 \quad (11)$$

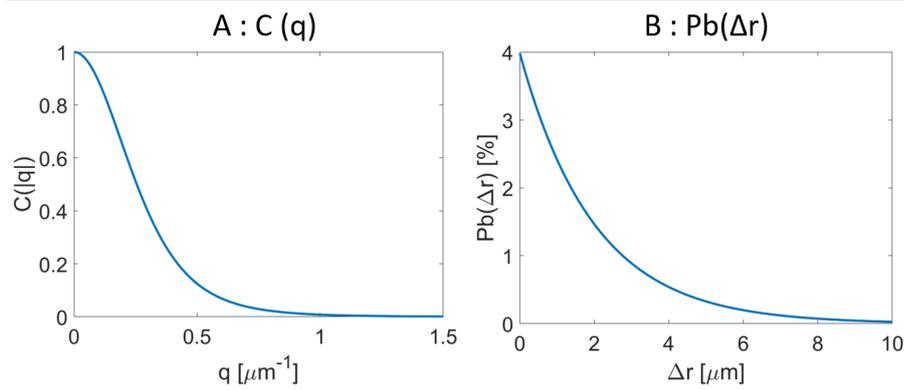


FIGURE I.2 – Fonction de corrélation  $C$  (A) et distribution des déplacements associée (B).  $n = 2$  et  $L = 2 \mu m$ .

### Fonction de Bessel modifiée - 2D

Si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{1}{1 + (qL)^2} \right]^{2p} \quad (12)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est ([187], page 678) :

$$Pb(\Delta r) = \frac{1}{2\pi L^2 \Gamma(p)} \left( \frac{\Delta r}{2L} \right)^{p-1} K_{p-1}(\Delta r/L) \quad (13)$$

avec  $\Gamma$  la fonction gamma d'Euler,  $K_{p-1}$  la fonction de Bessel modifiée d'ordre  $p-1$  et la condition  $p > 0.25$ . Pour  $p > 1$ ,  $Pb(\Delta r)$  a pour valeur en zéro :

$$Pb(0) = \frac{1}{4\pi L^2 (p-1)} \quad (14)$$

Remarque : on retrouve le résultat de la section précédente pour  $p = 3/2$ . La distance moyenne parcourue par les cellules est ([187], page 676) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{\sqrt{\pi} \Gamma(1/2 + p)}{\Gamma(p)} L \quad (15)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = 4pL^2 \quad (16)$$

A l'inverse, si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{2}{\Gamma(p-1)} (qL/2)^{p-1} K_{p-1}(qL) \right]^2 \quad (17)$$

avec  $p > 1$ . Alors la distribution de déplacements correspondante est :

$$Pb(\Delta r) = \frac{p-1}{\pi L^2} \left[ \frac{1}{1 + (\Delta r/L)^2} \right]^p \quad (18)$$

La distance moyenne parcourue par les cellules est pour  $p > 1.5$  ([187], page 325) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{\sqrt{\pi}\Gamma(p - 3/2)}{2\Gamma(p - 1)}L \quad (19)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est pour  $p > 2$  :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = \frac{L^2}{p - 2}. \quad (20)$$

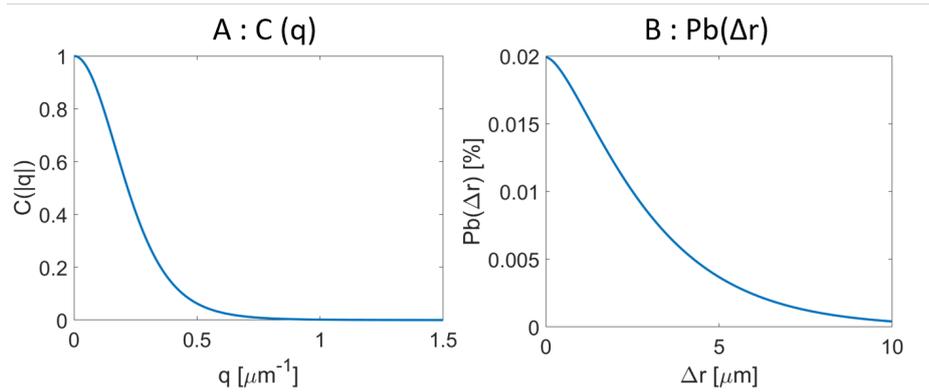


FIGURE I.3 – Fonction de corrélation  $C$  selon l'équation 12, avec  $L = 2 \mu\text{m}$ ,  $n = 2$  et  $p=2$ , (A) et distribution des déplacements associée (B).

### Fonction de Bessel modifiée - 3D

Si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{1}{1 + (qL)^2} \right]^{2p} \quad (21)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est pour ([187], page 442) :

$$Pb(\Delta r) = \frac{1}{4\Gamma(p)} \left( \frac{2}{\pi L \Delta r} \right)^{3/2} \left( \frac{\Delta r}{2L} \right)^p K_{3/2-p}(\Delta r/L) \quad (22)$$

avec la condition  $p > 0.5$ . La distance moyenne parcourue par les cellules est ([187], page 676) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{4\Gamma(p + 1/2)}{\sqrt{\pi}\Gamma(p)}L \quad (23)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = 6pL^2 \quad (24)$$

A l'inverse, si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{2}{\Gamma(p - 1)} (qL/2)^{p-1} K_{p-1}(qL) \right]^2 \quad (25)$$

avec  $p > 1$ . Alors la distribution de déplacements correspondante est :

$$Pb(\Delta r) = \frac{\Gamma(p + 1/2)}{\Gamma(p - 1)\pi L^3} \left[ \frac{1}{1 + (\Delta r/L)^2} \right]^{p+1/2} \quad (26)$$

La distance moyenne parcourue par les cellules est pour  $p > 1.5$  ([187], page 325) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{2\Gamma(p - 3/2)}{\sqrt{(\pi)\Gamma(p - 1)}} L \quad (27)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est pour  $p > 2$  :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = \frac{3}{8\pi(p - 2)} L^2 \quad (28)$$

### Exponentielle arrondie - 3D

Si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \exp(2A[1 - \sqrt{1 + (qL)^2}]) \quad (29)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est ([187], page 491) :

$$Pb(\Delta r) = \frac{\sqrt{A}}{L^3(2\pi)^{3/2}K_{1/2}(A)} \frac{K_2(\sqrt{A^2 + (\Delta r/L)^2})}{A^2 + (\Delta r/L)^2} \quad (30)$$

avec la condition  $L > 0$ . La distance moyenne parcourue par les cellules est ([187], page 693) :

$$\langle |\Delta r| \rangle = \frac{4}{\pi} A e^A K_0(A) L \quad (31)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = 3AL^2 \quad (32)$$

A l'inverse, si on ajuste la fonction de corrélation par :

$$C(q) = \left[ \frac{K_2(\sqrt{A^2 + (qL)^2})}{K_2(A)(1 + (qL)^2)} \right]^2 \quad (33)$$

Alors la distribution de déplacements correspondante est :

$$Pb(\Delta r) = \frac{A}{4\pi L^3 (2K_1(A)/A + K_0(A))} \exp(-A\sqrt{1 + (\Delta r/L)^2}) \quad (34)$$

La distance quadratique moyenne (MSD) est ([187], page 365) :

$$\langle |\Delta r|^2 \rangle = \frac{12K_2(A)/A + 3K_1(A)}{2K_1(A) + AK_0(A)} L^2 \quad (35)$$

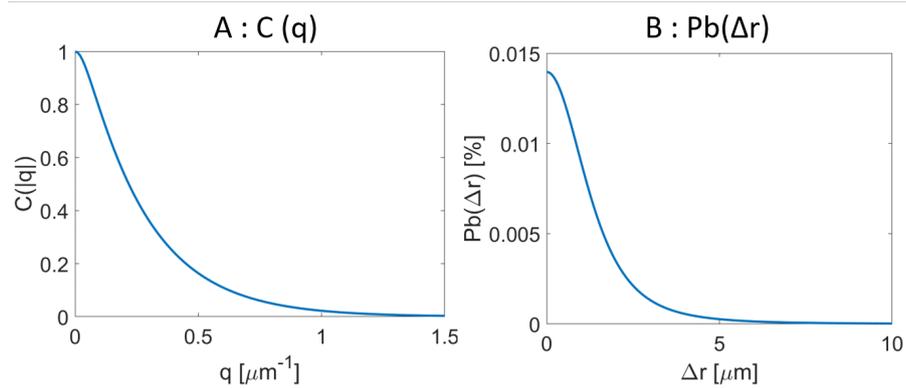


FIGURE I.4 – Fonction de corrélation  $C$  selon l'équation 29, avec  $L = 20 \mu\text{m}$  et  $A=0.1$ , (A) et distribution des déplacements associée (B).

# J PROTOCOLES

## Décongeler les cellules

- préparer flasque avec 6 mL de milieu et mettre à l'incubateur (30 min) ;
- aller chercher les cellules : porte du haut du freezer, premier rack, boîte Monika, CT26 wt ;
- mettre la fiole rapidement au bain-marie ;
- quand il ne reste qu'un petit glaçon, retirer du bain et bien nettoyer l'extérieur de l'alicot à l'éthanol ;
- prélever le tout sous hotte (1mL) et mettre dans flasque chaude ;
- passer les cellules 2 jours après.

## Passer les cellules

- préchauffer trypsin et milieu ;
- retirer le milieu ;
- rincer avec 2 mL de PBS ;
- ajouter 1 mL de trypsin ;
- mettre 3-5 min à l'incubateur ;
- préparer la nouvelle flasque : 6 mL milieu et indiquer "CT26 +n° de passage+nom+date" ;
- ajouter 4 mL de milieu à la flasque incubée : solution intermédiaire ;
- pour un passage au 10<sup>ème</sup> : prendre 500  $\mu$ L, mettre dans la nouvelle flasque.

La concentration finale doit être idéalement entre 200-250kC/boîte.

## Fabriquer les spheroides

I Préparer les puits avec l'agarose :

- préparer une plaque 64 puits + la multipipette + une seringue multipipette (3eme tirroir ou à gauche du frigo de la salle de manip) ;
- laver le récipient à gel : eau distillée, alcool puis séchage à l'air (salle de chimie) ;
- peser 100 mg d'agarose pour 10mL de PBS (1 % en masse) ;
- mettre au micro-onde (3<sup>ème</sup> étage) avec le bouchon mal fermé. Arrêter quand ça commence à bouillir. Mélanger et recommencer jusqu'à ce qu'on ne voit plus de grains ;

- 
- retour à la hotte : remplir 10mL de la seringue. Vider les premiers jets. Remplir les puits : 100  $\mu\text{L}$ /puits ;
  - laisser refroidir au frigo.
- II Ajouter les cellules A partir de la solution intermédiaire :
- préparer la cellule Mallassez : une goutte d'eau de chaque côté + lamelle tenue par les gouttes ;
  - compter cellules : 20  $\mu\text{L}$  de solution. Compter 10 cases, nombre de cellules =  $N * 10 \text{ kC/mL}$  ;
  - rincer Mallassez : eau puis alcool ;
  - diluer la solution intermédiaire pour avoir 2kC/mL (\*150  $\mu\text{L}$  = 300 C/puits) ;
  - mettre 150  $\mu\text{L}$ /puits avec le multipipette parallèle ou une pipette normale ;
  - (centrifuger 900 RPM, 5 minutes) ;
  - attendre au moins 2 jours.

### **Préparer l'échantillon sphéroïde**

- préchauffer 3mL de milieu dans un Falcon ;
- mettre 1 mL de Polylysine dans une boîte de pétri et laisser 10 minutes ;
- reprendre la Polylysine (ne pas la jeter) ;
- rincer 1 fois au PBS (1mL) ;
- mettre 2mL de milieu préchauffé ;
- mettre le sphéroïde au centre.

L'adhésion du sphéroïde sur le fond de la boîte de pétri se fait en 30 minutes environ.

# K MÉTHODE DES MOINDRE CARRÉS MANUELLE SUR MATLAB

On souhaite ajuster les mesures  $(x_i, y_i)$ ,  $i = 1 : N$ , par un modèle  $f(x, \alpha)$  où  $\alpha$  est le vecteur des  $p$  paramètres d'ajustement. On donne à chaque point  $x_i$  le poids  $\omega_i$ . En général, on prend  $\omega_i = 1/\sigma_i^2$  avec  $\sigma_i$  l'écart-type des mesures utilisées pour le point  $x_i$ .

La méthode des moindres carrés revient à minimiser  $\chi^2$  :

$$\chi^2(\alpha) = \sum_1^N \omega_i [f(x_i, \alpha) - y_i]^2 \quad (1)$$

Pour trouver la solution, on a besoin de calculer :

- les résidus  $r_i = y_i - f(x_i, \alpha)$
- la variance des résidus  $\sigma_r = \frac{1}{N-p} \sum_i^N \omega_i r_i^2$  ( $N - p$  : nombre de degrés de liberté)
- la matrice des poids  $\mathbf{W}$ , matrice diagonale telle que  $W_{ik} = \delta(i - k)\omega_i$
- le jacobien  $\mathbf{J}$  tel que  $J_{ik} = \left(\frac{\partial f}{\partial \alpha_k}\right)_{x_i}$

Si  $f$  est linéaire, c'est-à-dire :

$$f = \sum_1^p \alpha_i \Phi_i(x) \quad (2)$$

où les  $\Phi_i(x)$  sont  $p$  fonctions quelconques. La solution est donnée par :

$$\alpha = (\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J})^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{y} \quad (3)$$

Sinon, on pourra utiliser la fonction `fminsearch`.

Il faut ensuite estimer l'intervalle de confiance  $\Delta\alpha$  des paramètres ainsi obtenus. L'incertitude s'apparentera ici à un écart-type.

$$\Delta\alpha = \sigma_r \sqrt{\text{diag}[(\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J})^{-1}]} \quad (4)$$

où *diag* désigne les éléments de la diagonale de la matrice (les autres éléments étant liés aux covariances entre paramètres), réalisée avec la fonction *diag* dans Matlab. L'inversion de matrice est obtenue avec *inv* et la transposée avec l'apostrophe. Pour le cas d'un seul paramètre alpha, on a :

$$\Delta\alpha = \sigma_r \sqrt{\sum_1^N \left[ \left(\frac{\partial f}{\partial \alpha}\right)_{x_i} \right]^2} \quad (5)$$





**Titre** Mesure des déplacements cellulaires dans les tissus non transparents, une application de la diffusion dynamique de la lumière

**Résumé** Lorsqu'une tumeur grossit, elle exerce une pression sur les tissus environnants et est comprimée en retour. Des expériences sur un modèle de tumeur *in vitro*, appelé sphéroïde, ont montré que cette pression influence largement le devenir du tissu cancéreux, notamment en freinant sa croissance, mais aussi en le rendant plus invasif. Pour mieux comprendre ce dernier effet, nous avons cherché à étudier le comportement migratoire des cellules à l'intérieur d'un sphéroïde sous pression. Observer l'intérieur d'un sphéroïde pose cependant un problème technique car les méthodes usuelles d'imagerie ne sont pas utilisables dans des tissus épais ( $> 100 \mu m$ ). L'imagerie classique étant limitée en profondeur à cause de la diffusion de la lumière, nous nous sommes tournés vers une méthode qui utilise justement celle-ci : la diffusion dynamique de lumière ou DLS (Dynamic Light Scattering). Nous avons développé son application à la migration cellulaire, afin d'obtenir la distribution des déplacements relatifs des cellules au cours du temps. Cette mesure est faite sans utiliser de marqueurs spécifiques et est applicable à des sphéroïdes allant jusqu'à  $400 \mu m$  de diamètre. Nous avons ainsi mis en évidence une organisation radiale du sphéroïde en termes de mobilité, avec des cellules rapides en surface et plus lentes au centre. Nous avons aussi montré qu'en appliquant une contrainte au sphéroïde, la vitesse moyenne diminue jusqu'à être réduite de moitié pour des pressions supérieures à 15 kPa. Nous avons montré que cette sensibilité à la pression est une propriété qui émerge de l'organisation 3D du tissu, dans laquelle la matrice extracellulaire joue un rôle primordial. Enfin, pour explorer les possibilités qu'offre notre technique, nous l'avons appliquée à une autre question : comment la migration des macrophages est-elle affectée par les signaux provenant de cellules apoptotiques ? Les résultats ont montré que les cellules apoptotiques précoces augmentent la vitesse des macrophages tandis que les cellules apoptotiques tardives la réduisent. D'un cas à l'autre, la longueur de persistance du mouvement est conservée.

**Mots-clés** Diffusion dynamique de lumière, Motilité cellulaire, Sphéroïde, Cancer, Speckle

**Title** Measuring cells displacements inside non-transparent tissues, an application of dynamic light scattering

**Abstract** As a tumor grows, it exerts a mechanical pressure on its surrounding tissue and is compressed back as a reaction. Recent experiments on an *in vitro* tumor model, called spheroid, have shown that this pressure is crucial for the fate of the cancerous tissue. In particular, the pressure slows down its growth, but makes it more invasive. To further understand the latter effect, we decided to study the migration of cells inside spheroids under pressure. However, imaging the inside of a spheroid is technically challenging as usual microscopy methods do not work on thick tissues ( $> 100 \mu m$ ). Standard imaging methods are limited in terms of depth penetration because of light scattering. For this reason, we decided to take advantage of this scattered light with a method called Dynamic Light Scattering (DLS). We developed its application to cell migration in order to measure the distribution of cells displacements over time. The measurement is label-free and works with spheroids as thick as  $400 \mu m$  in diameter. By this means, we revealed a radial organization inside the spheroid in terms of mobility, with fast cells at the surface and slower cells in the core. We also showed that applying a pressure onto spheroids decreases the average cell speed by a factor up to two for pressure greater than 15 kPa. We demonstrated that this sensitivity to an external pressure is a 3D emergent property, in which the extracellular matrix plays an essential role. Finally, we explored the potential of our technique by addressing another question : how do apoptotic cells signals affect the migration of macrophages ? We found that early apoptotic cells increase the speed of macrophages whereas late apoptotic cells decrease it. In both cases, the persistence length of the motion is the same.

**Keywords** Dynamic Light Scattering, Cell motility, Spheroid, Cancer, Speckle