



HAL
open science

Cartographie des contraintes mécaniques in situ dans les tissus vivants

Alexandre Souchaud

► **To cite this version:**

Alexandre Souchaud. Cartographie des contraintes mécaniques in situ dans les tissus vivants. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT: 2020UNIP7213. tel-03377205

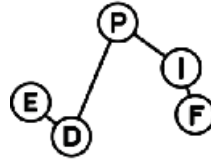
HAL Id: tel-03377205

<https://theses.hal.science/tel-03377205>

Submitted on 14 Oct 2021

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

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



Thèse de doctorat de “Biophysique”

pour obtenir le grade de docteur délivré par

l'Université de Paris

École doctorale n° 564 : Physique Ile de France

Cartographie des contraintes mécaniques *in situ* dans les tissus vivants

présentée et soutenue publiquement par

Alexandre SOUCHAUD

dirigée par : **François GALLET**

et co-dirigée par : **François GRANER**

le 17 Décembre 2020

Jury

M. Pierre NASSOY,	Directeur de recherche, CNRS Bordeaux	Rapporteur
Mme. Emmanuèle HELFER,	Chargée de recherche, CNRS Marseille	Rapporteuse
Mme. Isabelle BONNET,	Maître de conférences, Sorbonne Université Institut Curie	Examinatrice
Mme. Muriel GRAMMONT,	Chargée de recherche, CNRS Lyon	Examinatrice
M. François GALLET,	Professeur, Université de Paris Paris	Directeur de thèse
M. François GRANER,	Directeur de recherche, CNRS Paris	Co-directeur de thèse

Université de Paris

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

UMR 7057, 75205 Paris cedex 13

Résumé

Les contraintes mécaniques dans les tissus sont aujourd'hui au centre de beaucoup d'études permettant une meilleure compréhension des systèmes vivants. Ainsi, une étude quantitative sur l'impact des effets mécaniques sur le développement des tissus vivants nécessite une connaissance précise des contraintes mécaniques, de l'échelle subcellulaire à l'échelle tissulaire.

Dans ce travail, je décris une nouvelle méthode permettant une mesure directe de la distribution des contraintes de cisaillement dans un tissu vivant. La technique consiste à utiliser des micro-capteurs sphériques d'une trentaine de microns de diamètre (ordre de grandeur d'une taille cellulaire), constitués d'un gel de PDMS, élastique et déformable. Le micro-capteur est inséré dans le tissu dans le but de mesurer les contraintes de cisaillement locales.

Un marquage fluorescent du PDMS a été développé afin de pouvoir imager les capteurs en 3D dans les tissus. Ensuite, grâce à une méthode informatique de contour actif, le contour du capteur peut être détecté. Un ajustement de ce contour par un ellipsoïde permet de déterminer les déformations et les orientations principales du capteur dans le tissu. Connaissant les propriétés mécaniques du gel élastique, le tenseur des contraintes de cisaillement peut être directement déduit des déformations du capteur.

Un étalonnage des propriétés élastiques du gel à l'échelle macroscopique a été réalisé à l'aide d'une étude rhéométrique classique. Une calibration indépendante *in situ* dans des agrégats sphériques a également été effectuée. Les deux calibrations ont fourni des résultats similaires : le module d'Young est d'environ ≈ 1500 Pa (comparable à celui d'une cellule). Ainsi, de la connaissance des caractéristiques mécaniques du gel, il est possible d'effectuer une mesure absolue de la contrainte de cisaillement sans aucun modèle mécanique du tissu.

Les micro-capteurs ainsi développés ont été testés dans des études *in vitro* et *in vivo*.

L'étude *in vitro* dans les agrégats cellulaires sphériques au cours de leur étalement a permis d'établir une première carte des contraintes de cisaillement dans les agrégats. Elle a mis en évidence les orientations préférentielles radiales et orthoradiales des directions des contraintes de cisaillement. Également, on observe une variation de la norme de la contrainte de cisaillement totale le long du rayon de l'agrégat.

Une étude exploratoire *in vivo* chez l'embryon de poisson zèbre a également permis d'établir une cartographie préliminaire des contraintes de cisaillement développées dans la plaque pré-chordale durant différents stades de l'épibolie.

Ces deux résultats permettent de conclure sur la capacité des micro-capteurs développés d'établir la carte spatio-temporelle des contraintes de cisaillement dans les tissus vivants.

Mots-clés : Biophysique, cartographie, contrainte, mécanique, *in situ*, *in vivo*, mesure, développement, marquage.

Abstract

Measuring the mechanical stresses in a living tissue is critical to link the development with the spatial and temporal distribution of forces. A quantitative study about the impact of mechanical effects on morphogenesis requires a precise knowledge of mechanical stresses, from the subcellular scale to the tissue scale.

In this work, I describe an original method enabling for a direct measurement of the stress distribution within a living tissue. The technique consists in using micro-beads (30 μm of diameter, similar to a cell size), made of a soft elastic PDMS (Young's modulus ≈ 1500 Pa, similar to a cell rigidity), embedded in the tissue, as micrometric sensors of local stresses. An efficient fluorescent labelling of the PDMS has been developed in order to image the captors in 3D in the tissues. Then, through an active contour method, the captor border is reconstructed and fitted with an ellipsoid. Knowing the mechanical properties of the elastic gel, the shear stress tensor can be directly retrieved from the captor deformations.

A first calibration of the bulk gel elastic properties has been performed with a classical rheometer. Another independent calibration has been performed *in situ* in cell aggregates. Both calibrations have yielded similar results and enable for absolute measurements of the shear stress without requiring any mechanical model for the tissue.

The captors have been used for both *in vitro* and *in vivo* studies.

The *in vitro* study in cell aggregates has enabled to map, at successive times, the shear stress within the aggregate. These results highlighted preferential radial and orthoradial orientations of the shear stress main directions. Besides, one observed a variation of its norm along the aggregate's radius.

An exploratory study *in vivo* in the zebra fish embryo has also enabled to map the shear stress developed into the pre-chordal plate during epiboly.

Both these results permit to conclude on the efficiency of the developed micro-captors to establish spatio-temporal maps of the shear stress within living tissues.

Key-words: Biophysics, mechanical stress, living tissues, strain, imaging, labelling, development, mapping, *in situ*, *in vivo*.

Table des matières

Table des matières	i
I Introduction	1
1 Motivation de l'étude	3
1.1 Contexte : apport de la mécanique dans l'étude du développement	5
1.2 L'embryogenèse	10
1.3 Objectifs : mesure des contraintes locales dans un système biologique	14
2 État de l'art	15
2.1 Mesure de contraintes	15
2.1.1 Définitions	15
2.1.2 L'ablation laser	17
2.1.3 Micro-pipettes	18
2.1.4 Micro-plaques	19
2.1.5 Microscopie à force de traction	20
2.1.6 Leviers ou AFM	22
2.1.7 FRET	22
2.1.8 Inférence de force	24
2.1.9 Les pinces optiques	25
2.1.10 Pinces magnétiques	26
2.1.11 Micro-capteurs : introduction	27
2.2 Micro-capteurs	28
2.2.1 Goutte d'huile	28
2.2.2 Micro-billes d'hydrogel	29
2.3 Récapitulatif	32
3 Travail proposé	33
3.1 Cahier des charges	33
3.2 Principe de mesures	37

3.3	Systèmes d'études envisagés	TABLE DES MATIÈRES
3.3.1	<i>In vitro</i>	38
3.3.1.1	Epithélium mono-couche de MDCK	38
3.3.1.2	Agrégats cellulaire	39
3.3.2	<i>in vivo</i>	40
3.3.2.1	Systèmes envisagés	40
3.3.2.2	Le poisson-zèbre	41
II	Méthodes expérimentales	47
4	Les capteurs	49
4.1	L'élastomère constitutif	49
4.1.1	Composition chimique	49
4.1.2	Réaction de polymérisation	50
4.1.3	Effet de l'inhibiteur sur la polymérisation	50
4.2	Production des capteurs	52
4.2.1	Micro-fluidique : concentration de flux (flow focusing)	52
4.2.2	Polymérisation à chaud	53
4.2.3	Conservation des capteurs	53
4.3	Marquage fluorescent et visualisation des capteurs	54
4.3.1	Techniques explorées (non retenues)	54
4.3.1.1	Méthodes classiques	54
4.3.1.2	La Cryptolyte™	54
4.3.1.3	Points quantiques (QDs)	55
4.3.2	Couplage entre l'élastomère et la rhodamine B-isothiocyanate	59
4.3.3	Méthodes de microscopie	60
4.3.3.1	Le confocal	60
4.3.3.2	Le spinning-disk	60
4.3.3.3	La microscopie 2-photons	61
4.4	Fonctionnalisation des capteurs	62
4.4.1	Biocompatibilité de l'élastomère	62
4.4.2	Fibronectine	63
4.4.3	Cadhérine	64
4.4.4	Traitement PAA	64
5	Analyse	67
5.1	Relation contrainte-déformation dans un solide élastique et incompressible	67
5.2	Méthode pour la caractérisation mécanique	71
5.2.1	A l'échelle macroscopique : rhéomètre	71
5.2.2	A l'échelle d'un capteur : banc de compression uni-axiale	73
5.2.2.1	Définition de la problématique	73

TABLE DES MATIÈRES

5.2.2.2	Calibration des capteurs	73
5.3	Reconstitution 3D de la forme des capteurs	75
5.3.1	Contour actif	75
5.3.1.1	Énergie interne	76
5.3.1.2	Énergie de l'image	76
5.3.1.3	Énergie de contexte	77
5.3.2	Déroulé de l'algorithme	78
5.3.3	Mesure des déformations	78
III	Résultats	79
6	Caractérisation de la production des capteurs	81
6.1	Dispersion de taille	81
6.2	Homogénéité de la fluorescence	82
7	Étalonnage des capteurs	85
7.1	Rhéologie macroscopique du gel	85
7.1.1	Étude rhéologique de l'élastomère pendant la polymérisation	85
7.1.1.1	Module de cisaillement en fonction de la fréquence	85
7.1.1.2	Cinétique de polymérisation et comparaison avec le modèle	86
7.1.1.3	Conclusion partielle	88
7.1.2	Effet de la température sur la polymérisation	88
7.1.3	Effet de la composition du gel	89
7.1.4	Effet du temps d'attente du mélange polymérisable à 5°C	90
7.1.5	Effet de l'émulsification	91
7.1.6	Conclusion	93
7.2	Calibration <i>in situ</i> : compression uni-axiale	93
7.2.1	Expérience	93
7.2.2	Extraction des données	94
7.2.3	Résultats	96
7.2.4	Comparaison avec les mesures rhéométriques macroscopiques	98
7.2.5	Incertitudes de mesure	99
7.3	Conclusion sur la calibration mécanique	100
8	Étude des contraintes de cisaillement dans des agrégats cellulaires	101
8.1	Contexte et méthode	101
8.2	Résultats et discussion	104
8.2.1	Répartition des contraintes dans l'espace	104
8.2.2	Évolution dans le temps	107

9	Mesure des contraintes de cisaillement au cours du développement de l'embryon du poisson-zèbre	111
9.1	Contexte	111
9.2	Méthodes	111
9.3	Résultats	112
9.3.1	Suivi des contraintes exercées sur un capteur en fonction du temps	112
9.3.2	Cartographie des contraintes dans l'espace et le temps	115
9.4	Discussion	116
IV	Conclusion et perspectives	119
V	Annexes	123
10	Culture des cellules	125
10.1	Milieu de culture	125
10.2	Transfection des cellules	125
10.3	Congélation des cellules	127
10.4	Décongélation des cellules	127
10.5	Traitement de surface pour les F9	128
10.6	Passage des cellules	128
10.7	Formation des agrégats par agitation	128
11	Préparation de l'élastomère	131
11.1	Liste des constituants utilisés	131
11.2	Traitement de surface des points quantiques (QD) par le POAMA	132
11.2.0.1	Préparation du POAMA (Poly (moléc anhydride-alt-1-octadecene))	132
11.2.0.2	Passage de la solution à l'évaporateur rotatif	133
11.2.1	Réaction des anhydrides avec les amines (9-11% Aminopropylmethylsiloxane)- Dimethylsiloxane copolymer)	133
11.2.2	Dispersion dans le DMS	133
11.3	Traitement de la rhodamine-B isothiocyanate par l'allylamine	134
11.4	Formation du mélange polymérisable	135
12	Modélisation de la cinétique de gélification	137
12.1	Notations	137
12.2	Cinétique de polymérisation	137
12.3	Théorie de la gélification et élasticité du gel	138
13	Réalisation des circuits micro-fluidiques	141
13.1	Dessin du circuit	141
13.2	Préparation d'une galette de silicium	142
13.3	Fabrication du moule d'époxy	142

TABLE DES MATIÈRES

13.4 Circuit micro-fluidique de PDMS	143
14 Production des capteurs	145
14.1 Injection dans la puce micro-fluidique et formation de l'émulsion	145
14.2 Polymérisation à chaud	146
14.3 Silanisation des récipients	147
14.4 Traitement de surface par le poly-acide acrylique (PAA)	148
14.5 Couplage du PAA avec un fluorophore aminé	149
15 Calibration mécanique directe des capteurs <i>in situ</i>	151
15.1 Modélisation des contraintes dans un agrégat en compression uniaxiale	151
15.2 Condition d'équilibre mécanique	152
15.3 Conditions aux limites à la surface de l'agrégat	153
15.4 Bilan de force global	153
15.5 Hypothèses sur l'expression de $\bar{\sigma}(r, z)$	154
15.6 Calcul des contraintes	155
15.6.1 Agrégat de forme quelconque	155
15.6.2 Agrégat de profil circulaire	156
15.7 Déformation d'un capteur inséré dans l'agrégat	157
15.8 Hypothèse sur la valeur de B	158
16 Correction géométrique de l'image d'un capteur	161
16.1 Position du problème	161
16.2 Mesure du facteur correctif	162
17 Code utilisé pour la détection de contour actif	165
17.1 Fonctions utilisées pour l'analyse d'image	165
17.2 Coeur du programme : détermination du contour	173
17.3 Coeur du programme : ajustement du contour à un ellipsoïde	174
17.4 Représentation 3D des axes principaux	176
VI Bibliographie	181

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Motivation de l'étude

La biologie a permis de nombreuses avancées autant dans la découverte des mécanismes fondamentaux que dans les applications thérapeutiques. Longtemps centrée sur la compréhension des interactions à un niveau moléculaire, la biologie s'est vue, au cours du dernier siècle, enrichie par l'apport d'autres disciplines, comme les mathématiques et ses études statistiques, la chimie, l'informatique ou encore la physique.

Les échelles de temps et de longueurs tissulaires et cellulaires sont assez semblables à celle de la matière molle et de la micro-physique. Cette similarité permet le transfert des connaissances et de leurs applications au monde du vivant. Ainsi, à travers les techniques employées, les outils méthodologiques utilisés, et les modèles créés, de nombreux phénomènes biologiques ont pu être étudiés du point de vue de la physique.

Les techniques employées, par exemple l'introduction de protéines et molécules fluorescentes, de nano-cristaux (points quantiques), couplées à l'émergence de systèmes optiques performants (microscopie confocale, bi-photonique, spectroscopie optique), ont autorisé l'observation et la quantification de phénomènes cellulaires et subcellulaires. La biologie structurale a pu fortement se développer grâce à l'application des lois de l'électromagnétisme dans les études de spectroscopies par Résonance Magnétique Nucléaire, spectroscopies Raman, ou encore l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).

Les outils fondamentaux de la physique ont eux aussi été moteurs des avancées en biologie. En effet, les principes thermodynamiques ont pu être appliqués à l'étude de divers phénomènes biologiques. Par exemple les effets de tension de surfaces (insecte sur l'eau, forme cellulaire...), les échanges membranaires (isotonie, canaux ioniques...), la rhéologie du vivant (rhéologie cellulaire, tissulaire, rhéofluidification du sang, aussi étudié en hydrodynamique et micro-fluidique), les bilans énergétiques (complexe ATP/ADP+P), sont autant de domaines étudiés à travers l'application de ces principes thermodynamiques. La physique statistique, quant à elle, a permis l'élaboration de divers modèles et théories cellulaires (dynamique des membranes ...). L'essor de l'informatique a également permis de nombreux progrès par le biais de calculs et modélisations puissantes (simulation d'interactions moléculaires, études génétiques, analyse d'image...). Enfin, les lois de la mécanique

autorisent à la fois la description et la compréhension des évolutions morphologiques des cellules et des tissus (mouvement des plantes, action d'un muscle, force générée par les cellules, migration cellulaire...). En effet, les interactions et les mouvements cellulaires sont omniprésents dans le monde du vivant : il existe un lien étroit entre la mécanique et le développement des cellules, et plus généralement d'un tissu. Déterminer ce lien se révèle essentiel à la compréhension du monde vivant.

1.1 Contexte : apport de la mécanique dans l'étude du développement

Rôle de la mécanique en biologie.

Les liens directs qu'il peut exister entre la mécanique et le développement ont longtemps été ignorés, et c'est Wilhelm His en 1914 [1] [2], puis avec D'Arcy Thompson, qui publia en 1917 "On growth and Form" [3], que les contraintes mécaniques sont apparues comme ayant une contribution active au développement, et non plus seulement comme de simples conséquences de celui-ci.

A l'échelle de la cellule unique, comme à l'échelle tissulaire, diverses forces entrent en compétition. Les cellules peuvent subir ces forces, mais aussi en être la source. En effet, des forces extérieures s'exercent sur les cellules : que ces forces soient de pression ou de cisaillement, la cellule n'en est pas la source et doit pouvoir les supporter mécaniquement. C'est par exemple le cas dans un embryon en développement, qui voit ses cellules proliférer [4] [5], changer de taille et de forme [5], migrer [6], mourir, changer de voisins [7] etc. . . Tous ces phénomènes se déroulent dans un environnement physique restreint. Des contraintes de pression exercées sur les frontières physiques sont alors subies par les cellules de l'embryon sans qu'elles en soient pour autant directement motrices.

Cependant, les cellules peuvent également être actives dans la génération de forces avec l'activation de moteurs moléculaires entraînant leur changement de forme ou leur mouvement. Lorsqu'une cellule se déplace par exemple, elle active des moteurs moléculaires. Ce processus entraîne le mouvement de la cellule qui entre en interaction avec son environnement et développe des contraintes sur ce dernier. Que cet environnement soit cellulaire ou non, ces contraintes se propagent : la cellule devient donc génératrice de forces.

Les cellules doivent pouvoir s'adapter à leur environnement pour leur survie et leur bon fonctionnement. Elles doivent donc pouvoir répondre physiologiquement aux divers stimuli auxquels elles sont soumises. Ces derniers peuvent être de nature chimique, lorsque des molécules entrent en contact avec la cellule, ou mécanique, lorsqu'une contrainte est appliquée sur la cellule.

La réponse d'une cellule à une stimulation chimique est étudiée depuis longtemps, et un certain nombre de mécanismes de réponse sont aujourd'hui connus, avec par exemple l'émission d'hormones spécifiques régulant des processus cellulaires, ou encore le fonctionnement d'une synapse, liaison entre deux neurones. La mise en évidence d'une réponse cellulaire à un stimulus mécanique est venu plus tardivement, au cours du 20^{ème} siècle. Depuis, il a été montré que des stimulations mécaniques sur une cellule, tout comme les contraintes mécaniques générées par les mouvements morphogénétiques eux mêmes [8] peuvent-être à l'origine de modifications d'expression génétique : ce phénomène est celui de la mécano-transduction.

Mécanisme générique de réponse d'une cellule.

Finalement, si, tout comme la chimie, la mécanique influe sur le destin cellulaire, encore faut-il comprendre comment une cellule peut répondre à un stimulus externe. Dès lors, progressivement tout au long du XX^{ème} siècle, les études se sont développées et ont permis de mettre en évidence l'exis-

tence de différentes cascades de réponses cellulaires à des stimuli externes, chimiques ou physiques. Pour s'adapter et répondre à son environnement, la cellule possède des récepteurs en surface de sa membrane cytoplasmique. Ces récepteurs permettent de capter les signaux externes et de les traduire en un signal biochimique interprétable par la cellule : c'est ce que l'on appelle la transduction du signal. Suite à la réception de ce signal par le récepteur membranaire, une cascade de réactions biochimiques, plus ou moins complexe, s'ensuit dans la cellule, pouvant *in fine* inhiber ou activer une expression génétique spécifique (fig. 1.1). Les récepteurs sont souvent différents d'un stimulus à un autre, permettant une réponse ciblée au stimulus capté.

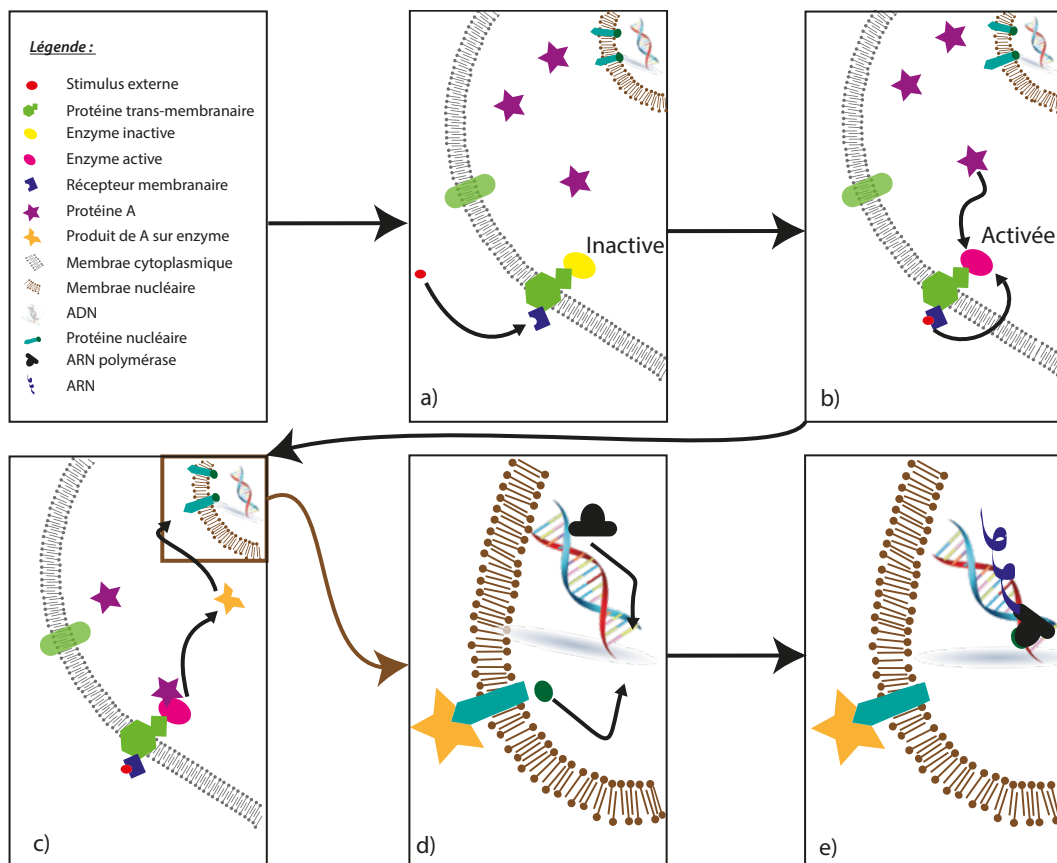


FIGURE 1.1 – Exemple générique d'une voie de signalisation d'une cellule en réponse à un stimulus extérieur. a) activation d'une protéine membranaire par un stimulus, ici chimique. b) L'activation de la protéine membranaire active une seconde enzyme cytoplasmique. Cette activation permet la modification d'une tierce protéine dans le cytoplasme. c) La protéine cytoplasmique modifiée peut alors se fixer sur un récepteur de la membrane nucléaire. d) L'activation de ce récepteur nucléaire permet de relâcher un facteur de transcription qui se fixe sur l'ADN. e) Une ARN polymérase peut alors démarrer la transcription du gène cible et ainsi amorcer la réponse génétique de la cellule au stimulus initial.

Mécanisme de réponse d'une cellule à une contrainte mécanique

Le champ de recherche sur la transduction des signaux mécaniques est très récent. En effet, la mécanotransduction est apparue notamment avec la mise en évidence, dans les années 90, de gènes dont il est possible d'activer l'expression par une action mécanique externe [9]. Ces gènes, dit mécano-

sensibles, démontrent l'importance de la mécanique dans l'évolution des tissus biologiques [8] [10].

Il existe différents schémas de mécanotransduction. Certains sont assez bien connus, comme par exemple l'ouverture de canaux ioniques lors de la déformation d'une membrane sous l'effet d'une contrainte. L'ouverture de ces canaux permet de modifier la concentration en ions dans la cellule, modifiant alors son pH, et donc l'activité de certaines enzymes. L'inhibition ou l'activation de ces enzymes modifient alors l'activité globale de la cellule, et donc son comportement.

Un autre exemple de mécanisme de mécano-transduction est celui de la protéine p130Cas, protéine transmembranaire liée à la Kinase-Cas. Récemment Yasuhiro Sawada *et al.* ont montré à travers leur travaux [11] que p130Cas permettait par sa propre élongation, la transduction du signal d'allongement de la cellule. En effet, p130Cas est un complexe situé au niveau des membranes cytoplasmiques, sur laquelle une kinase agit. Le produit *ex vivo* de la phosphorylation entre ces deux protéines est plus important lorsque la protéine p130Cas est en conformation dépliée. Or l'activité de cette dernière a pu être directement liée à l'activité d'un gène contrôlant la rigidité cellulaire. Finalement, suite à un stimulus mécanique (déformation par élongation de la membrane), une protéine est déformée (p130Cas), augmentant son activité (augmentation du produit de phosphorylation) et favorisant alors l'expression d'un gène contrôlant l'effet même du mécanisme. La cellule a ainsi répondu au stimulus mécanique.

D'autres exemples de voie de signalisation de mécano-transduction sont aujourd'hui mis en évidence [12].

Effet de la mécanique à différentes échelles

Échelle cellulaire. Les phénomènes de mécano-transduction peuvent être observés à l'échelle de la cellule unique. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont un bon exemple de réponse à un stimulus mécanique externe. En effet, lorsque l'on impose une rigidité de substrat spécifique (stimulus), la différenciation (réponse) de ces cellules multipotentes en un type cellulaire précis, qui dépend de la rigidité du substrat, peut être induite *in vitro* [13] [14]. Les cellules MSC peuvent donc sonder leur environnement et traduire cette information en une information biochimique, permettant une réponse adaptée : une expression génétique spécifique afin d'adapter son type cellulaire à son environnement.

Les cellules du tissu mésenchymateux de l'embryon du Xénope fournissent un second exemple de mécano-transduction sur une cellule unique. En effet, il est possible de générer une polarisation spécifique en appliquant une contrainte de traction sur un côté de la cellule [15].

Le destin cellulaire peut donc être modifié par l'environnement mécanique. Les capacités de réponse cellulaires sont essentielles à leur survie et au bon fonctionnement d'un tissu. En effet, la capacité des cellules à répondre à une action mécanique de l'environnement permet une réponse ciblée et localisée de l'organisme aux différents stimuli : le système biologique peut ainsi se former en adéquation avec son environnement et ses besoins.

Échelle tissulaire. A l'échelle d'un tissu, nous retrouvons également l'importance du lien étroit entre la mécanique et la génétique. L'étude de certains tissus pathologiques dont le développement [16] et la réaction à l'environnement diffèrent généralement de celui d'un tissu sain, démontrent le poids de la mécanique dans le développement tissulaire.

Dans le cas des cancers, les cellules malades ont vu leur patrimoine génétique altéré de telle sorte qu'elles prolifèrent de manière excessive, sans que le phénomène d'apoptose puisse avoir lieu et sans qu'elles ne soient détectées par le système immunitaire comme corps étranger. Lorsque les cellules cancéreuses se multiplient de façon incontrôlée, elles forment une masse cellulaire pathologique appelée tumeur. Outre les différents effets cliniques néfastes des cancers (métastase, dérèglement hormonal, altération du système immunitaire...), les tumeurs, de par leur taille, peuvent également avoir des effets secondaires délétères. En effet, la tumeur communique avec son environnement via des signaux qui peuvent être séparés en deux grandes catégories : les signaux chimiques, largement étudiés [17], et les signaux mécaniques, encore assez méconnus.

Le stroma entourant la tumeur (stroma tumoral) est perfusé par les vaisseaux sanguins, le système lymphatique, et est composé de diverses protéines extra-cellulaires, permettant une communication chimique efficace et permanente avec son environnement. Cependant, l'espace est initialement partagé entre le stroma et les tissus environnants. Lors de l'apparition de la tumeur, une compétition spatiale s'installe entre la tumeur qui grossit et ces mêmes tissus [18] [19]. La tumeur perturbe alors l'organisation des tissus sains environnants. Cette compétition a pour effet d'augmenter les contraintes locales. Ces dernières sont transmises aux tissus voisins qui vont être endommagés, voir nécrosés : c'est ce qu'on appelle l'effet de masse tumorale [20]. Cependant, le stroma et les tissus environnants vont eux aussi exercer en retour une contrainte sur la tumeur.

Pour permettre l'étude mécanique des tumeurs, l'agrégat cellulaire est un modèle tumoral largement utilisé aujourd'hui [21]. En effet, l'utilisation d'agrégats cellulaires permet de découpler les réponses biochimiques du micro-environnement de celles des réponses mécaniques. Ainsi, il a été montré que lorsqu'un agrégat est mécaniquement contraint, un changement de comportement est observé : l'application d'une contrainte de compression isotrope sur un agrégat inhibe la prolifération des cellules au niveau du point de restriction de réplication (phase G1 de la division cellulaire [22]). Lors de cette phase, une importante quantité de facteur de croissance doit être produite. La compression de l'agrégat entraîne une sur-expression de la protéine p27^{kip1}, inhibiteur de la Kinase. L'inhibition de cette dernière, qui est un facteur de croissance de la cellule, réduit en partie la prolifération cellulaire dans l'agrégat [22]. L'effet mécanique de la compression entraîne donc ici aussi, dans un tissu pathologique, une réponse génétique.

Échelle d'un organisme. Enfin, à l'échelle d'un organisme, le lien réciproque entre mécanique et développement peut également être retrouvé. Le processus d'embryogenèse concentre de nombreux exemples dans ce domaine [4] [5] [23] [24]. Comme mentionné précédemment, dans un embryon spatialement confiné, les cellules sont contraintes par les cellules voisines et par les limites physiques de l'embryon. Or l'effet de ces contraintes mécaniques [25] joue un rôle prépondérant dans l'élaboration de la forme et le développement de l'embryon, comme c'est le cas pour les formations

CHAPITRE 1. MOTIVATION DE L'ÉTUDE

des axes antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV) [26]. En effet, il a, par exemple, été montré *in vitro* que l'application de contraintes mécaniques externes est nécessaire à l'embryon pour la définition de ces axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Cette expérience suggère qu'il pourrait en être de même *in vivo* : l'intervention d'une contrainte mécanique externe, appliquée par les tissus utérins de la mère par exemple, afin que les axes AP et DV puissent apparaître.

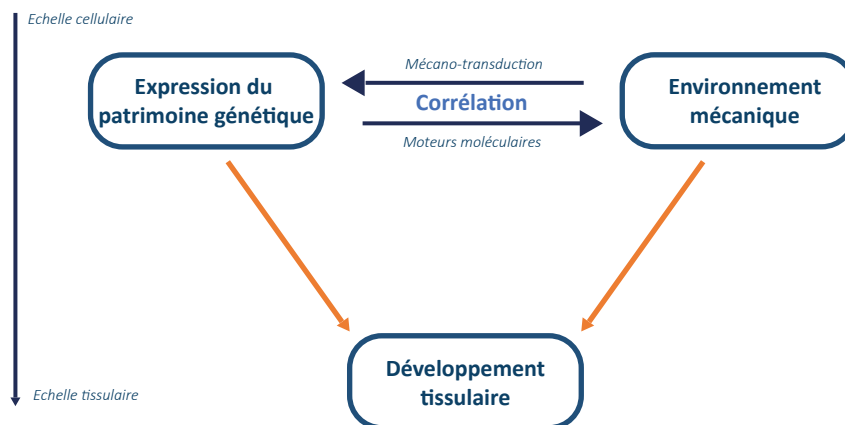


FIGURE 1.2 – Le développement du tissu est contrôlé par l'expression génétique et les contraintes mécaniques, qui influent l'une sur l'autre.

Finalement, une expression génétique peut induire un comportement mécanique du tissu particulier, par le biais d'une différenciation spécifique (myocytes ou fibroblastes) [27], tandis qu'une contrainte mécanique subie peut réciproquement induire une expression génétique spécifique [28]. Une relation étroite s'installe alors entre la mécanique et l'expression génétique dans la morphogénèse d'un tissu (fig. 1.2). Dans le but de mieux comprendre cette relation, le processus d'embryogénèse est riche. A travers l'étude de ce dernier, de nombreuses questions sont soulevées et peuvent être explorées.

1.2 L'embryogenèse

L'étude du développement des tissus et organismes est un domaine de recherche très actif ayant pour objectif la compréhension des phénomènes de développement et de régénération des tissus, pathologiques ou non. L'embryogenèse concentre aujourd'hui la majeure partie des études dans ce domaine. Ces études consistent à déterminer et comprendre les mécanismes aboutissant à la formation d'un organisme multicellulaire organisé, à partir de la rencontre de deux gamètes parentales formant le zygote (œuf).

L'embryogenèse pose alors 4 questions fondamentales que l'on peut formuler ainsi :

- Suite à la fécondation, comment le zygote peut-il engendrer un système multicellulaire aussi complexe, avec plus de 200 types cellulaires aux propriétés et fonctions différentes?
- Comment les cellules peuvent-elles communiquer entre elles afin d'organiser le développement?
- Vient ensuite la question de la morphogénèse : comment les cellules s'agencent-elles les unes par rapport aux autres pour donner la forme adéquate au tissu?
- Et enfin, comment la division cellulaire est-elle contrôlée pour obtenir le nombre de cellules nécessaire pour former l'organisme final?

Détaillons un peu chacune de ces questions.

La différenciation cellulaire

Au cours du développement, les cellules du zygote sont pluripotentes et peuvent se différencier en un nombre important de types cellulaires pour donner naissance à des lignées qui ne pourront ensuite plus, pour la plupart, se différencier. Ces processus trouvent leur origine dans l'expression génétique spécifique à chaque cellule. En effet, il existe des gènes ubiquistes, c'est-à-dire qui s'expriment dans toutes les cellules (gène codant l'ARN polymérase par exemple), mais il existe également des gènes qui ne s'expriment que dans certaines conditions et pour certaines cellules. Ces différences d'expression sont causées par des facteurs épi-génétiques et peuvent trouver leur origine dans beaucoup de phénomènes environnementaux à la cellule, chimiques ou physiques.

Ainsi, à travers les travaux d'embryogenèse, il est important de comprendre à la fois quels sont les facteurs épi-génétiques, et quels sont les gènes associés aux différents types et comportements cellulaires.

La communication intercellulaire

Les cellules d'un organisme peuvent communiquer entre elles afin de contrôler leur devenir. Dans certains cas, cela peut se traduire par une différenciation, une division, l'expression d'un gène spécifique, une migration, ou encore une apoptose. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les moyens de communication sont de deux types.

CHAPITRE 1. MOTIVATION DE L'ÉTUDE

Le premier est la communication biochimique avec la diffusion de molécules (ions, protéines...) qui sont détectées par la cellule réceptrice. La reconnaissance des molécules par la cellule réceptrice déclenche un processus de réponse plus ou moins complexe. Ainsi, la cellule réceptrice agit en conséquence de l'information biochimique délivrée par une cellule environnante (fig. 1.1).

Le second moyen est la communication mécanique. En effet, les cellules sont en situation d'adhésion les unes avec les autres, ainsi qu'avec leur environnement (voir fig. 1.3). Un mouvement mécanique d'une cellule entraîne la sollicitation mécanique d'une cellule voisine. Ces sollicitations déclenchent, de nouveau, des phénomènes plus ou moins complexes dans la cellule réceptrice. Ces cascades de signalisation sont les réponses, là encore, aux contraintes mécaniques imposées par le milieu environnant.

Dans les deux cas, il est important de comprendre et déterminer comment les cellules communiquent et se transmettent les différentes informations pour répondre à leurs besoins et à ceux de l'organisme.

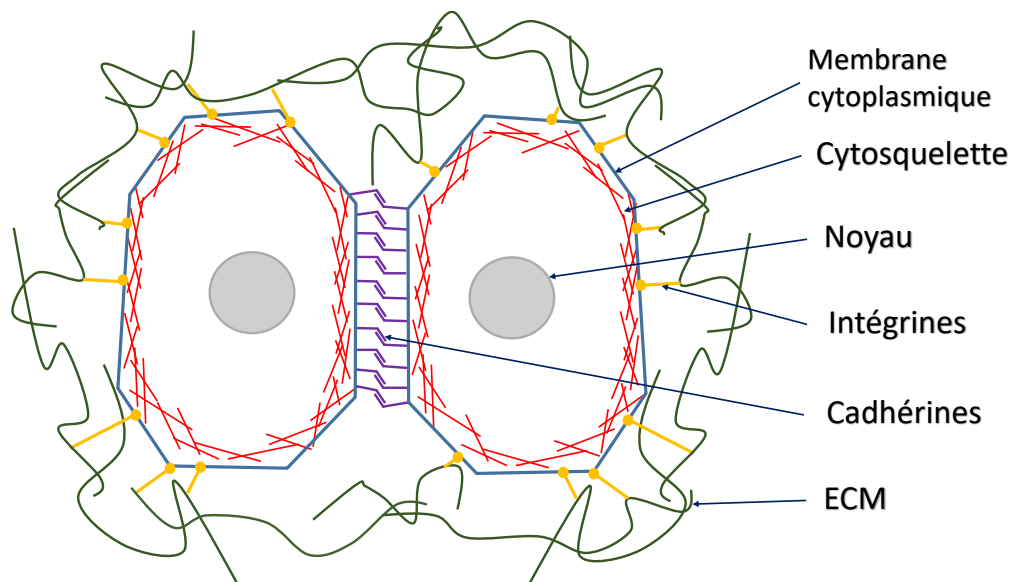


FIGURE 1.3 – Schéma d'adhésion cellule-cellule et cellule - matrice extra-cellulaire (ECM). Les cellules sont formées, entre autre, d'un noyau, d'une membrane cytoplasmique (les séparant de l'extérieur) et d'un réseau d'acto-myosine formant le cytosquelette (en rouge). Ce réseau permet à la cellule de garder sa forme et éventuellement de se contracter pour une division, ou une migration, par exemple. En surface des membranes, deux types de protéines d'adhésion transmembranaire sont représentés ici. Les intégrines (en jaune) permettent l'adhésion à l'ECM (en vert), tandis que les cadhérines (en violet) permettent l'adhésion aux autres cellules. Le niveau de l'expression génétique d'une cellule dépend à la fois du type cellulaire (ex : quantité de cadhérines différents dans une cellule neurale ou épidermique), mais également de la position sur la cellule (quantité de cadhérines différents selon le pôle de la cellule).

La morphogénèse

Au cours du développement d'un organisme, ou d'un tissu, pathologique ou non, les cellules s'organisent, se lient, et développent une forme bien définie. On le constate tous les jours, en observant que tous les organismes d'une même espèce ont des formes semblables et souvent très proches.

Comme on a pu le dire précédemment, les cellules sont adhérentes entre elles et/ou avec la matrice extra-cellulaire, grâce à des protéines membranaires d'adhésion (cadhérines et intégrines, voir fig. 1.3). L'importance de ces molécules d'adhésion ne se limite pas à la simple cohésion du tissu, mais réside également dans la capacité des cellules à se reconnaître entre cellules du même type ou de types différents. Vecteur de communication intercellulaire, ces adhésions sont prépondérantes pour la morphogénèse du tissu. En 1955, Townes et al. [29] montraient déjà que des assemblages de cellules embryonnaires de différents types avaient la capacité de se ségréger spontanément en deux groupes distincts. L'adhésion entre cellules de même type est plus faible que celle entre cellules de types cellulaires différents. Ce différentiel d'adhésion induit la ségrégation des cellules en deux groupes de cellules de même type. Ainsi, la tension de surface entre cellules est un facteur important dans la morphogénèse.

De même, le cytosquelette cellulaire est primordial dans l'élaboration de la forme d'un tissu. En effet, il permet des mouvements cellulaires par migration, mais aussi des contractions et des modifications locales de formes. Par exemple, l'invagination opérée lors de l'internalisation du tube neural chez les vertébrés est initiée par une contraction locale de cellules, modifiant ainsi la courbure locale de l'ectoderme de l'embryon. Cette courbure est propagée aux cellules voisines, entraînant ainsi l'étape d'invagination.

Enfin, la composition de la matrice extra-cellulaire peut varier d'un endroit à l'autre. Ces modifications changent les propriétés mécaniques locales, ce qui influe sur la distribution et l'amplitude des contraintes établies dans le système. Ces différences peuvent également modifier le destin des cellules, et donc du tissu.

Finalement, outre les messages biochimiques qui existent dans un tissu, l'environnement biophysique des cellules dans un tissu influe sur le développement et la forme finale du le tissu. Cependant, bien qu'il soit établi que les contraintes mécaniques jouent un rôle dans la morphogénèse des tissus, par quels mécanismes ces contraintes orientent-elles la forme définitive du tissu ?

La division cellulaire

Le processus de division cellulaire est lui aussi primordial dans le développement d'un tissu. En effet, les cellules doivent se diviser jusqu'à former un tissu de la dimension voulue. En fonction des étapes de croissance, et des localisations dans le tissu en formation, il existe différents types de mitose (sans croissance, asymétrique, exponentielle...). Cependant, il est nécessaire que cette division se fasse au bon endroit, et puisse s'arrêter lorsque le tissu est définitivement formé (on retrouve cette problématique pour les phénomènes de cicatrisation). Pour cela, il existe différents facteurs de croissance et de contrôle du cycle cellulaire qui doivent être déclenchés selon des voies de signalisation spécifiques. Enfin, afin de fournir aux tissus et aux organes les propriétés requises, la matrice extra-cellulaire doit également se développer grâce à l'apport des protéines nécessaires. Ainsi, comment ces processus sont-ils organisés au sein du tissu et par quels biais ?

CHAPITRE 1. MOTIVATION DE L'ÉTUDE

C'est à travers ces quatre questions fondamentales, et leur ramifications associées, que l'intérêt de l'embryogenèse est mis en exergue. De plus, de par sa taille réduite, et la rapidité des processus cellulaires mis en jeu (de l'ordre de la minute à la journée), l'embryon est un outil d'étude riche à la fois pour la biologie moléculaire, et pour l'étude biomécanique. Car, comme on a pu le voir, la mécanique joue un rôle déterminant. Cependant, bien que cette importance soit maintenant admise et démontrée, les mécanismes exacts liant mécanique et développement sont bien souvent méconnus.

De ce manque d'information naît la nécessité de comprendre le rôle et les effets des contraintes sur les processus biologiques. Pour mener à bien cette investigation, il est nécessaire de connaître la nature, l'amplitude et l'orientation des contraintes développées dans le tissu, pour ensuite les relier à des effets et marqueurs biologiques.

1.3 Objectifs : mesure des contraintes locales dans un système biologique

Une mesure locale de ces contraintes relève d'un enjeu fondamental, car c'est elle qui permettra de relier directement les contraintes mécaniques aux marqueurs biologiques cellulaires locaux.

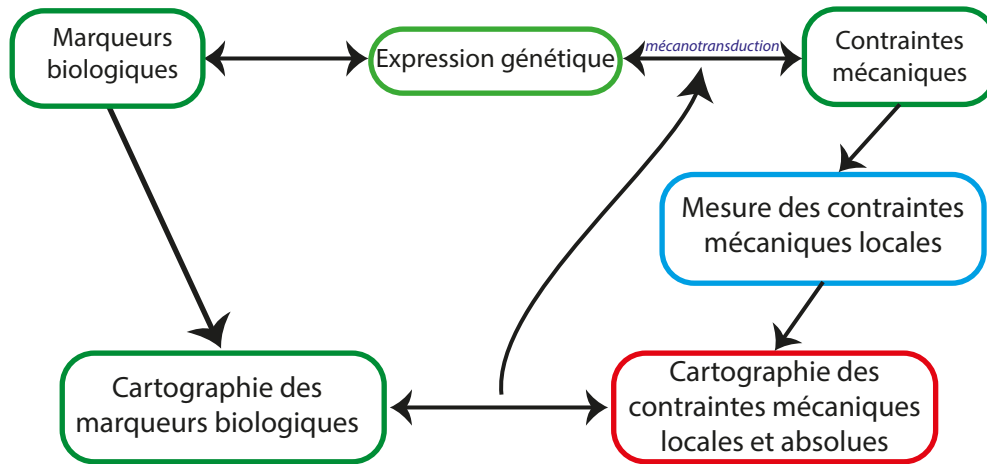


FIGURE 1.4 – Schéma récapitulatif des liens réciproques qui existent entre l'expression génétique et les contraintes mécaniques ainsi qu'avec les marqueurs biologiques. Il est aujourd'hui possible d'obtenir une cartographie des marqueurs biologiques dans un tissu. Pouvoir mesurer les contraintes mécaniques locales dans un tissu, et en tirer une cartographie de ces mêmes contraintes, permettra alors de relier les contraintes mécaniques et les marqueurs biologiques afin de mieux comprendre les mécanismes de mécano-transduction.

Les mesures des contraintes mécaniques dans le cadre de ce travail répondent à des exigences précises pour permettre une étude complète : elles doivent être absolues, précises et locales. Or la mesure des contraintes mécaniques locales, *in vitro* comme *in vivo*, reste un défi de la biophysique actuelle. Pour réaliser une telle mesure, différentes approches peuvent être envisagées (Chap. 2), mais la recherche d'une mesure absolue non-perturbative semble exiger l'utilisation d'un capteur calibré, intégré directement au tissu. Un tel capteur, mis en place *in situ* permettrait alors une mesure des contraintes mécaniques dans un tissu, ainsi que son évolution dans le temps, sans interférer dans le développement du système biologique après l'insertion.

C'est pourquoi, l'objectif de ce travail est de pouvoir fabriquer et utiliser des capteurs mécaniques qui puissent être implantés dans des systèmes biologiques *in vitro* comme *in vivo*, et qui fourniraient une mesure directe et absolue des contraintes mécaniques locales à l'échelle cellulaire. Cette mesure doit permettre *in fine* d'établir la cartographie des contraintes mécaniques dans les différents tissus, et être ainsi liée aux cartographies d'expression génétique établies.

Chapitre 2

État de l'art

2.1 Mesure de contraintes

2.1.1 Définitions

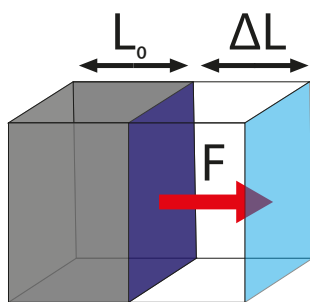


FIGURE 2.1 – Définitions. Sous l'effet de la force F appliquée sur la surface d'aire A , le matériau s'allonge de ΔL . La contrainte σ est le rapport de la force par l'aire A . La déformation ϵ est donc égale au rapport $\frac{\Delta L}{L_0}$.

$$\sigma = \frac{F}{A}$$
$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Commençons par brièvement définir le terme de contrainte (nous reviendrons plus en détail sur cette définition dans le chapitre 5.1).

Les contraintes

Les forces ne s'appliquent pas en un point unique mais sur des surfaces. C'est pourquoi, pour l'étude mécanique des matériaux, la notion de contrainte (σ) est plus pertinente que celle de force. Une définition simplifiée d'une contrainte mécanique est le rapport d'une force (F) par l'aire (A) sur laquelle cette force s'exerce (fig. 2.1), c'est-à-dire : $\sigma = \frac{F}{A}$.

Notons également la définition succincte (sur laquelle nous reviendrons également plus longuement) de la déformation, autre notion clé en mécanique des milieux continus.

Déformation

Les contraintes appliquées sur une surface peuvent déformer le matériau. La déformation est notée ϵ et représente le changement relatif de taille d'un objet, par rapport à son état non contraint. Cette notion, qui sera développée dans un chapitre ultérieur, permet de mesurer les contraintes mécaniques appliquées à un objet, quelle que soit sa nature, et si l'on connaît la loi de comportement qui relie la contrainte à la déformation.

Origine des contraintes

Maintenant que nous les avons définies, il est légitime de s'interroger sur l'origine des contraintes mécaniques développées au sein d'un tissu.

Tout d'abord, la cohésion d'un tissu est maintenue par l'équilibre de ses forces internes. Une première contribution aux contraintes d'un tissu est alors les forces générées par les tensions surfaciques des cellules entre elles et avec la matrice extra-cellulaire. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les cellules disposent de protéines membranaires permettant l'adhésion entre elles (les cadhérines), ou l'adhésion au substrat environnant, notamment avec la matrice extra-cellulaire (les intégrines) (fig. 1.3). Ces différentes protéines membranaires ne sont pas exprimées de façon équivalentes selon le type cellulaire, et selon leur emplacement dans le tissu (pôle basal, apical, et faces latérales plus ou moins denses en protéines d'adhésions). La variabilité d'expression de ces protéines détermine en partie la propension du tissu à développer des contraintes de tension superficielle : plus les cellules sont cohésives entre elles, plus les tensions sont importantes, et donc plus les contraintes développées dans le tissu peuvent l'être.

Une seconde contribution aux contraintes internes provient des moteurs moléculaires agissant sur le cytosquelette présent dans chaque cellule, et principalement les complexes acto-myosine. Le cytosquelette, et notamment le cortex cellulaire (support mécanique de la couche interne de la membrane plasmique), est riche en actine et myosine, dont la concentration varie selon le type cellulaire. Ces protéines permettent le maintien de la cellule et les mouvements cellulaires. Selon leur concentration, la cellule est plus ou moins rigide, et peut générer des tractions plus ou moins importantes. De plus, le cytosquelette cortical est directement relié à des protéines membranaires (cadhérines), permettant une communication directe avec les cellules voisines.

Et enfin, comme nous l'avons dit, le tissu peut être également soumis à des contraintes qui lui sont externes. Ces contraintes se répartissent dans le tissu et participent donc aux contraintes subies par chaque cellule composant le tissu.

Ces trois facteurs, les forces adhésives, les forces générées par les moteurs moléculaires et les forces extérieures, couplés les uns aux autres sont, pour une grande partie, à l'origine des contraintes internes dans le tissu.

Les contraintes mécaniques, ainsi que les forces, ne sont généralement pas des quantités directement accessibles. Pour les mesurer, diverses méthodes ont été développées au cours des dernières décennies. Dans cette partie, nous présentons brièvement ces différentes méthodes [30] [31], des plus utilisées vers les moins utilisées, en insistant sur les informations qu'elles peuvent fournir, ainsi que sur leurs limites d'utilisation dans les tissus biologiques *in vitro* et *in vivo*. En particulier, nous introduisons les méthodes développées ces dernières années utilisant des micro-capteurs [32], avant d'en préciser l'utilisation et le fonctionnement dans le chapitre suivant.

2.1.2 L'ablation laser

Lorsqu'un tissu est sectionné, ses contraintes internes sont relâchées, et le tissu relaxe vers un nouvel équilibre. Selon la dynamique d'ouverture du tissu, il est ainsi possible de déterminer, qualitativement, l'orientation des tensions appliquées dans le tissu [33]. En effet, si après section le tissu s'ouvre, cela démontre que la tension avant section était positive, si la section est recouverte, alors la tension était négative (compression).

Cette méthode est aujourd'hui appliquée à l'aide de nano-pulses laser, concentrés, suffisamment énergétiques pour opérer la section d'un objet biologique. Le domaine de section opérable est large puisqu'il est possible d'effectuer des sections d'objets de taille subcellulaire [34], cellulaire (tension de contact entre deux cellules) [35], ou encore tissulaire [36] [37] (l'ablation d'une zone large du tissu afin de déterminer les tensions internes au tissu). Ainsi la gamme d'étude peut varier de 100 nm à 1 mm.

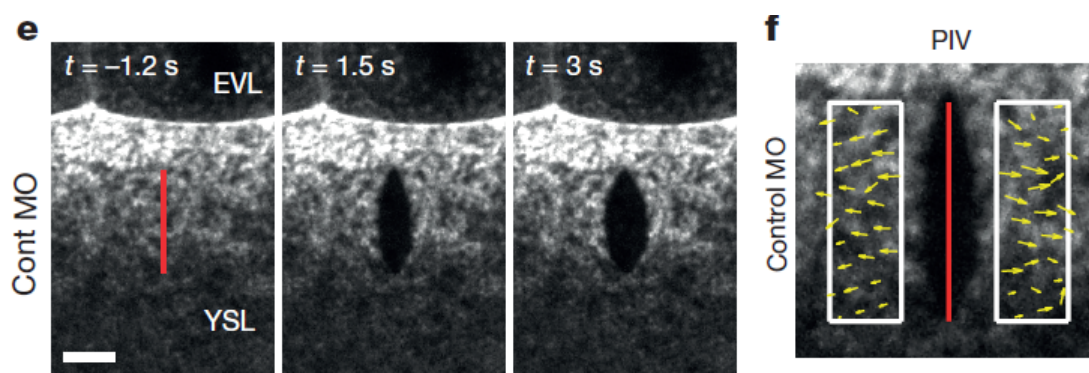


FIGURE 2.2 – Ablation Laser. e) L'anneau d'actomyosine d'un embryon de poisson mutant "hirage" est coupé sur une longueur de 20 μm (en rouge). Cet anneau cellulaire est le front du tissu mésendodermique en progression au cours de l'épibolie. On observe une ouverture du tissu en fonction du temps, permettant de définir la direction des contraintes subies avant section. f) PIV (Particle Image Velocimetry) permettant d'obtenir le champ de vitesse (flèches jaunes) du réseau d'actine en relaxation. [36]

L'acquisition d'un film de la relaxation de l'objet sectionné permet l'analyse de la réponse mécanique (fig. 2.2) : la vitesse et le taux de déplacement peuvent être mesurés en fonction du temps. Il est alors possible d'analyser les tensions présentes dans le tissu avant l'ablation. Cependant, cette méthode ne permet pas une mesure absolue des contraintes. En effet, la dynamique de relaxation de l'objet dépend des propriétés mécaniques de l'objet lui-même (élasticité, viscosité...) et des propriétés de son environnement (trainée visqueuse...). Or ces différents paramètres ne sont généralement pas accessibles. L'hypothèse sous-jacente à cette méthode est donc que toutes les propriétés sont considérées homogènes sur toutes les zones de mesures du tissu [38], autorisant ainsi la comparaison des mesures au sein d'un même tissu et donc d'offrir une mesure relative des contraintes. Notons également que si l'on connaît l'ordre de grandeur de la viscosité tissulaire η , alors on peut en déduire l'ordre de grandeur de la contrainte puisque le temps de relaxation est $\tau = \frac{\eta}{E}$ et que la contrainte vaut $\sigma = E\varepsilon$, ou E est le module d'Young du tissu.

Bien que la méthode soit destructive, le système de nano-pulse est, malgré son coût, facilement intégrable à beaucoup de microscopes actuels (confocal, multiphotons). Elle permet l'acquisition ra-

pide d'un grand nombre de mesures, à différents points de l'objet, offrant de précieuses informations relatives aux contraintes internes du système. Enfin, bien que la pénétration du laser puisse être perturbée par les inhomogénéités des tissus 3D, cette méthode est applicable, sous certaines conditions, à l'étude *in vivo*, comme c'est le cas pour l'embryon [39] [38].

L'ablation laser, bien que ne permettant pas une mesure quantitative des forces et contraintes, permet une étude qualitative fiable des contraintes au sein d'un même tissu *in vitro* comme *in vivo*. Sa facilité de mise en œuvre et sa propension à fournir des résultats en quantité fait d'elle une méthode couramment utilisée dans l'étude mécanique des systèmes biologiques.

2.1.3 Micro-pipettes

Pour cette méthode, une partie d'une cellule, d'un agrégat ou d'un tissu est localement aspirée par une micro-pipette d'ouverture de forme circulaire connue [40].

La pression d'aspiration, pouvant aller de 1 Pa à 1 kPa, est contrôlée. Les déformations résultantes sont enregistrées en fonction du temps (fig. 2.3 a-c). A l'équilibre, la forme de l'échantillon aspiré par la pipette résulte de l'équilibre entre la tension de surface du tissu et la pression d'aspiration [41], permettant leur mesure. Cependant, lorsque l'équilibre ne peut pas être atteint, alors il est uniquement possible de mesurer la viscosité du tissu (fig. 2.3 c). Ainsi, la mesure des rayons de courbures du tissu et/ou de la longueur de la langue du tissu aspiré, fournissent de précieuses informations. De l'étude statique et dynamique de l'évolution de l'échantillon, à la fois de la partie aspirée et de la partie en dehors de la pipette, et à l'aide des lois de Laplace (fig. 2.3 d), il est possible de déduire quantitativement la tension de surface (allant de quelques $\mu\text{N/m}$ à quelques mN/m), ainsi que certaines propriétés mécaniques du système, comme le module élastique et la viscosité du tissu. Les mesures effectuées avec cette méthode offrent des mesures précises de la tension de surface. Dans bien des cas, la variabilité des paramètres biologiques, d'un échantillon à un autre, sera plus importante que l'erreur faite sur la mesure elle-même.

L'aspiration par micro-pipette est l'une des techniques les plus anciennes pour étudier la mécanique cellulaire. Développée en 1954 [42] initialement pour l'étude d'embryons *in vivo*, cette mé-

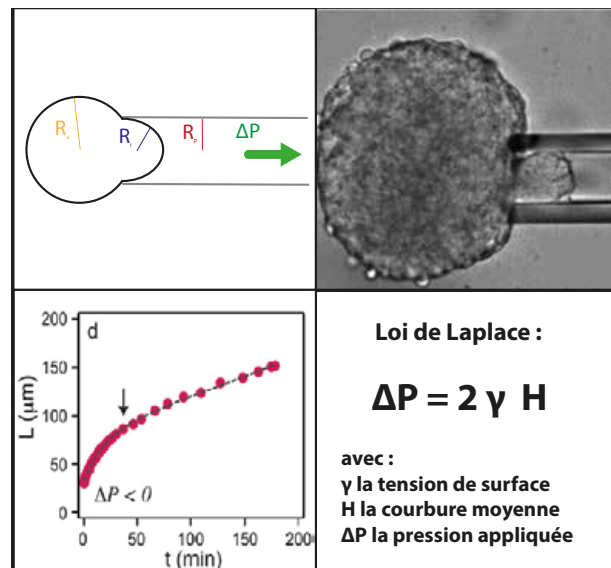


FIGURE 2.3 – Micro-pipettes. a) schéma de principe de la méthode. La cellule ou le tissu, en noir, est aspirée, avec une pression contrôlée, par une micro-pipette. L'objet se déforme. b) Image d'un agrégat cellulaire, après 160 minutes d'aspiration dans une pipette de $R=30 \mu\text{m}$ de rayon et sous une pression $\delta P = 1370 \text{ Pa}$ [44]. c) enregistrement de la déformation en fonction du temps, en réponse à une aspiration [44]. d) explicitation de la loi de Laplace, reliant la pression, la tension de surface et les rayons de l'objet aspiré et de la pipette, à l'équilibre.

thode a ensuite largement été utilisée pour des études *in vitro*, offrant des mesures quantitatives aux échelles de la cellule [41] [40] [43], des agrégats [44], ou des tissus [45]. Cette méthode peut donc s'appliquer à la fois aux études *in vitro* comme *in vivo*.

Cependant la manipulation dure quelques minutes et donc, contrairement à d'autres méthodes, comme les pinces optiques et magnétiques par exemple, les temps engagés sont relativement longs (de l'ordre de la minute), et ne permettent donc pas d'étudier des phénomènes plus rapides. De plus, cette méthode nécessite un contact permanent avec le tissu ou la cellule. Cette interaction peut avoir un effet néfaste sur la structure du tissu, mais peut également entraîner des effets secondaires, comme une réponse active du tissu par mécano-transduction. Enfin, outre le fait que *in vivo* les tissus ne sont pas systématiquement atteignables (comme pour la puppe de la Drosophile, où il est nécessaire de retirer la couche protectrice avant de pouvoir effectuer une mesure), l'hétérogénéité de certains tissus rend l'exploitation des résultats difficile.

Finalement, l'aspiration par micro-pipette des objets biologiques est une méthode qui fournit des informations quantitatives précises sur la tension de surface et les propriétés mécaniques des tissus. Cependant cette méthode reste difficile à mettre en œuvre dans beaucoup de situations, et notamment pour l'évolution de tissus *in vivo*, comme durant la morphogénèse.

2.1.4 Micro-plaques

La méthode des micro-plaques consiste en l'application d'une compression uni-axiale sur la surface d'un échantillon, entre deux micro-plaques parallèles (fig. 2.4). En général, les plaques sont grandes devant la taille de l'échantillon. L'une d'elle est rigide tandis que la seconde a une élasticité connue ou est accrochée à un ressort de raideur connue, tel qu'elle puisse agir comme transducteur de contrainte. Lorsqu'on applique une compression, on peut enregistrer la loi de comportement de l'échantillon, à travers le rapport contrainte / déformation. Pour cela, on analyse l'évolution de la forme de l'objet sous une contrainte connue, ou on mesure la force nécessaire appliquée sur la plaque élastique pour maintenir une déformation constante de l'objet entre les deux plaques.

Cette méthode permet une mesure absolue de la tension de surface et des contraintes (entre 0,1-10 Pa) [46], ainsi que les propriétés mécaniques (rigidité et viscosité) des objets biologiques étudiés, pouvant aller de la cellule [47] [48] à l'agrégat [49] [46] [50].

Cependant, cette méthode, ne permet pas une cartographie précise dans le tissu, et bien qu'elle ait été largement utilisée pour des expériences *in vitro*, elle est difficilement applicable à des études *in vivo* [51]. En effet, comme pour les aspirations par micro-pipette, les AFM et cantilevers que nous verrons par la suite, les micro-plaques nécessitent d'imposer une contrainte avec contact constant sur des temps longs (de l'ordre de la minute) avec le tissu. Ce besoin risque de déformer le tissu de manière irréversible, ou d'influer sur son futur en déclenchant des mécanismes de mécano-transduction.

Enfin, cette méthode se limite au sondage des tissus superficiels, et ne permet pas la mesure des contraintes dans des tissus internes *in vivo* qui ne sont pas accessibles.

Les micro-plaques offrent, elles aussi, la possibilité d'effectuer des mesures absolues et précises des contraintes et des propriétés mécaniques dans un tissu *in vitro*. Leur large utilisation dans des expériences à l'échelle de la cellule, et sur les agrégats *in vitro* démontre leur importance comme outil de mesure de forces et contraintes en biologie. En revanche, cette méthode se limite à des tissus superficiels et leur utilisation *in vivo* demeure compliquée.

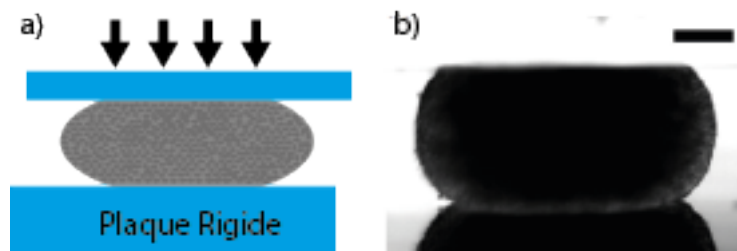


FIGURE 2.4 – Micro-plaques. a) schéma de principe de la méthode. L'agrégat ou la cellule est comprimée par la plaque élastique du dessus. L'agrégat se déforme et agit en réponse sur cette même plaque. b) Image de déformation d'un agrégat comprimée.[46]

2.1.5 Microscopie à force de traction

La Microscopie à Force de Traction (Traction Force Microscopy; TFM) est l'une des technologies de sondage de forces et de contraintes très employées, car elle offre la possibilité d'obtenir des mesures quantitatives des contraintes développées par un tissu ou une cellule, à un faible coût [52]. En effet, cette méthode consiste à cultiver des cellules, ou un tissu [53] [52], sur un gel élastique déformable aux propriétés mécaniques connues, et dont la surface est traitée avec une protéine d'adhésion cellulaire pour permettre la croissance du tissu [54]. Lorsque les cellules sont en contact avec un substrat, elles exercent sur lui une force contractile, qui va le déformer (fig. 2.5). Afin de suivre cette déformation, des nano-billes fluorescentes sont incorporées au gel. Par imagerie, on peut alors suivre le déplacement dans le temps de ces marqueurs pour ensuite, en résolvant le problème élastique inverse, en déduire les contraintes mises en jeu par la cellule [53] ou par le tissu [55].

La simplicité relative de la mise en œuvre permet de mettre en place cette méthode avec tous types de microscopie moderne [52] (confocal, spinning-disk, multi photonique). De plus, il existe de nombreux gels aux propriétés mécaniques connues et modulables [58] (comme le PAA dont le module d'Young peut aller de 10^3 à 10^6 Pa selon la composition), et à faible coût, faisant de cette technique une méthode de choix. Ayant été conçue initialement pour étudier les forces de traction (10 - 10^4 Pa) développées par une cellule unique ou un tissu mono-couche [55], la TFM a ensuite été adaptée à des systèmes 3D [59], mais ne permet pas encore une étude *in vivo* du développement tissulaire. Enfin, qu'il s'agisse de 2D ou de 3D, les calibrations sont faites dans un régime élastique linéaire, ne permettant pas de mesurer des forces trop importantes, comme cela peut être le cas lors du développement d'un tissu en expansion, notamment au cours de l'embryogenèse.

Dans le cadre des mesures de TFM, on mesure le déplacement du substrat, et on en déduit les contraintes exercées sur celui-ci. Cependant, cette méthode ne permet pas de remonter aux contraintes internes au tissu. La méthode d'inférence Bayésienne est une méthode statistique permettant de résoudre ce problème, en déduisant les contraintes internes à un tissu à partir des mesures de TFM. Cette méthode est donc appelée la microscopie à contrainte d'inversion bayésienne (BISM) [60] [61].

Une méthode analogue à la microscopie à force de traction est la technique des micro-piliers

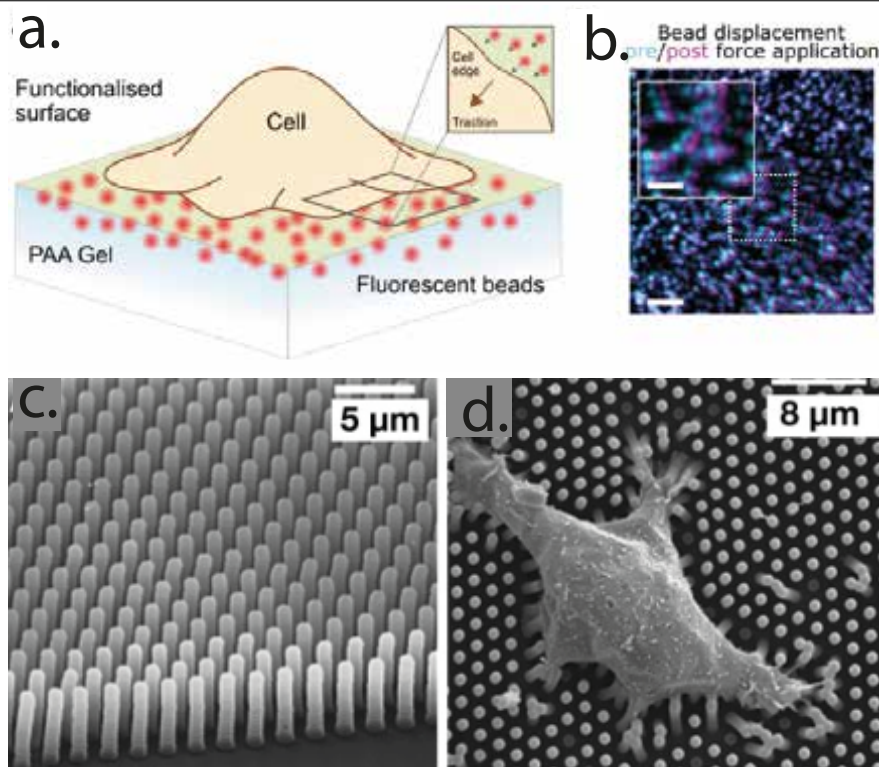


FIGURE 2.5 – Microscopie à force de traction. a) Schéma d'une expérience classique de TFM. La cellule, ou le tissu, se développe sur une fine couche de gel (classiquement du PAA de 30 μm d'épaisseur), à laquelle sont incorporées des micro-billes fluorescentes. Pour favoriser le développement, le gel a été recouvert de protéines d'adhésion. Au cours du développement, la cellule génère des forces de traction le long du gel, et fait ainsi bouger les micro-billes. b) Image confocale montrant en fluorescence la position des micro-billes avant (cyan) et après (magenta) l'application de la traction. Échelle : 2 μm . c) Image par microscopie électronique d'un tapis de micro-piliers en PDMS espacés régulièrement. échelle : 5 μm . d) Une cellule seule adhère sur ce tapis de micro-piliers. On observe une déviation de certains micro-piliers en bordure de la cellule. Cette déformation peut être mesurée. Echelle : 8 μm . Figures a. et b. tirées de la revue de Colin-York, H. et Fritzsche, M. [56]. Figure c. et d. issue de Ladoux et al. [57]

[57] (fig. 2.5). Cette technique consiste à faire développer des cellules, ou un tissu, sur des piliers élastiques déformables de taille micrométrique. Les piliers cylindriques sont espacés de 1-10 μm et ont un rayon de l'ordre de 1 μm [62]. En se développant, les cellules s'accrochent aux piliers qui se déforment. Cette déformation peut être mesurée par microscopie. Comme pour la microscopie à force de traction, la relation force/déformation des piliers a été calibrée au préalable. Cependant, tout comme pour la microscopie à force de traction, l'utilisation en 3D reste limitée par son champ d'action possible, et par la difficulté de mise en place *in vivo*.

La Microscopie à Force de Traction est une méthode largement utilisée car elle permet la mesure des forces de traction développées par une cellule ou un tissu 2D en développement. Cependant la nécessité de contact permanent avec le tissu limite son utilisation pour des systèmes complexes, et notamment à des systèmes *in vivo*.

2.1.6 Leviers ou AFM

Le principe des leviers (cantilever) ou des AFM repose sur la déformation d'un levier au contact d'une surface [63]. En effet, un levier avec une pointe au bout, fait d'un matériau aux propriétés élastiques connues, va se déformer au contact d'un objet [64]. La mesure de cette déformation permet de connaître la force appliquée à l'objet. Cette mesure, couplée à la mesure de la déformation de l'objet, fournit une information sur ses propriétés mécaniques (rigidité, viscosité), et sur les forces et contraintes mises en jeu [65]. Il est alors possible, en déplaçant le levier sur la surface, de cartographier [66] [67] précisément les propriétés locales du matériau sondé [68]. A l'inverse, il est également possible d'imposer une force connue sur la surface, et d'en observer les effets sur le tissu.

La possibilité de moduler les propriétés mécaniques du levier, et la taille de la pointe (allant du nanomètre au millimètre) permet de balayer un large éventail de forces, allant du pN au μN , et donc de contraintes, allant de 0.1 Pa à 100 Pa. La méthode permet également de sonder une gamme d'objets de tailles diverses, allant de la cellule unique [69] [64], jusqu'au tissu *in vitro* et dans certain cas *in vivo* [67] [70]. Cependant, bien que la méthode fournisse, comme pour l'aspiration par micro-pipette (cf Chap. 2.1.3), des mesures précises et absolues, les limitations restent les mêmes : les cantilevers et AFM nécessitent un contact mécanique constant avec la surface sondée. Les systèmes biologiques ne doivent donc pas évoluer au cours de la mesure, et les couches profondes du tissu ne sont pas accessibles par cette méthode. Quelques expériences ont pu être menées *in vivo* [71], mais elles restent rares car les limitations y sont plus importantes. Enfin, l'application des AFM et cantilevers peut également perturber le système que l'on souhaite étudier, en appliquant une force mécanique à laquelle le tissu ou la cellule peut réagir par mécano-transduction.

Les AFM et cantilevers, à l'instar de l'aspiration par micro-pipette, permettent une mesure absolue et précise des contraintes et propriétés mécaniques d'un tissu. Ils sont largement utilisés dans l'étude de contraintes et propriétés mécaniques des cellules et tissus monocouches. Cependant, malgré les performances indéniables de ces techniques, il est encore compliqué d'appliquer cette méthode à des système *in vivo*, et elle ne permet pas l'étude des couches profondes des tissus.

2.1.7 FRET

La méthode de mesure du transfert d'énergie entre molécules fluorescente (FRET) est un outil basé sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores : un accepteur et un donneur. Le transfert a lieu lorsque l'accepteur et le donneur sont suffisamment proches. Ensuite, lorsque le transfert est permis, les fluorophores accepteurs émettent de la lumière [72]. Plus ils sont proches, plus le transfert est probable. L'efficacité E du transfert est décrite par l'équation $E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$ [73] (fig. 2.6 Ab)) : plus le donneur et l'accepteur sont proches, plus les fluorophores émettent de la lumière. En utilisant des constructions protéiques, la technologie de FRET a pu être adaptée à la mesure de force à une échelle nanométrique [74].

Pour cela, une séquence peptidique définie est ajoutée à une protéine d'intérêt [73]. Cette séquence fait office de ressort dont la raideur est calibrée. Aux extrémités de la protéine sont également associées des fluorophores, formant le système de FRET (fig. 2.6 Aa)). Ainsi, lorsque la protéine

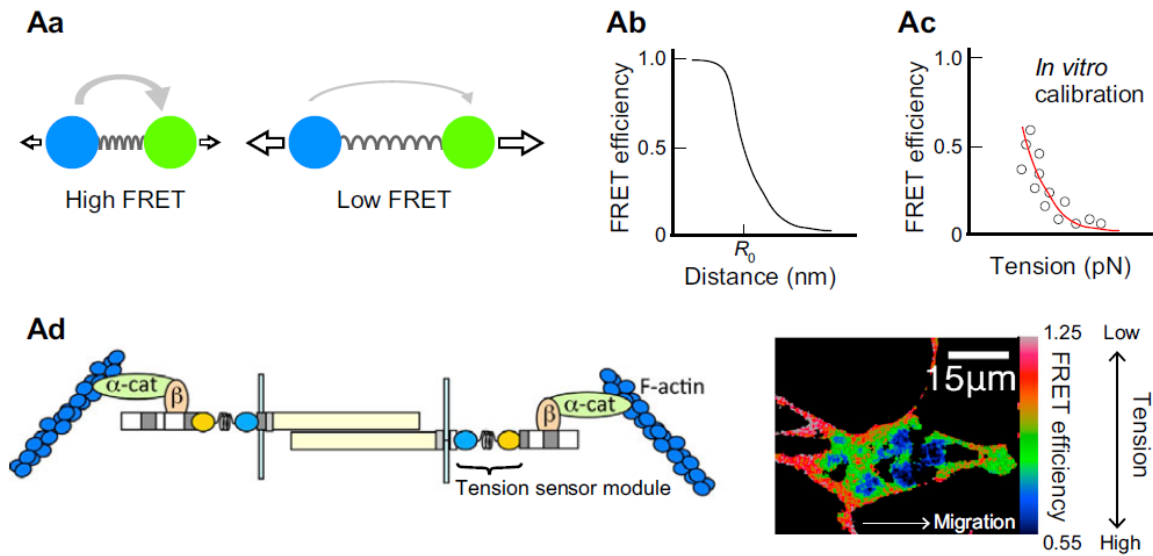


FIGURE 2.6 – FRET. Aa. Senseur de tension par méthode de FRET. Cette méthode consiste en deux fluorophores, un donneur (bleu) et un accepteur (vert) reliés par une molécule jouant le rôle d'un ressort de raideur connu. Plus le donneur et l'accepteur sont proche, plus le transfert d'énergie est important. Ab. efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance des deux modules du FRET. Ac. Efficacité du FRET en fonction de la force de tension appliquée lors d'une calibration *in vitro*. Ad. Module Fret-ressort intégré à une molécule de E-Cadhérine. Ce complexe permet alors de mesurer les forces de tension et de traction au sein des E-Cadhérines. A droite, une image de l'efficacité de la méthode sur des cellules frontalières à l'ovaire de la drosophile. (figure tirée de la revue de Sugimura et al. [30])

d'intérêt est stimulée mécaniquement, le ressort est comprimé, ou au contraire étiré. La distance entre l'accepteur et le donneur varie, et par conséquent l'efficacité du transfert d'énergie du système FRET : l'intensité de l'émission lumineuse résultante dépend ainsi de la distance entre les deux fluorophores, donc des contraintes qui s'exercent sur le ressort. La fluorescence émise peut être enregistrée par microscopie puis, moyennant une calibration préalable, quantifiée et enfin directement reliée à la tension appliquée (correspondant à des tension de plusieurs pN, donc à des contraintes pouvant aller jusqu'à 10^6 Pa) (fig. 2.6 Ac.).

Initialement développée *in vitro*, la méthode de FRET a ensuite pu être implémentée *in vivo*. La force de cette méthode est qu'il est possible de créer des mutants tels que la protéine d'intérêt couplée à un système de FRET soit génétiquement programmée. Ainsi, on évite l'étape d'injection, et une étude suivie dans le temps et l'espace, sans perturber le système biologique, peut alors être réalisée [75].

Cette méthode a notamment permis de mettre en évidence l'implication de certains mécanismes cellulaires dans la mécanotransduction, mais également d'étudier les forces d'interaction entre cellules [76], ainsi que les interaction entre les cellules et le substrat [77]. Les forces mesurées peuvent aller jusqu'à la centaine de pico-newton [78]. Cependant, la calibration du ressort peptidique reste un défi dans de nombreux cas. Les mouvements stochastiques au niveau moléculaire, et les effets d'environnement chimiques variables rendent cette calibration difficile. De plus, la résolution optique des microscopes ne permet pas d'isoler une molécule unique rendant la quantification des

phénomènes souvent impossible.

La méthode de FRET permet d'accéder aux forces exercées au niveau moléculaires, et donc aux processus de la mécano-transduction à cette échelle.. Cependant, cette méthode reste encore aujourd'hui difficile à calibrer et mettre en œuvre.

2.1.8 Inférence de force

Le plus souvent, la description mécanique des tissus peut être interprétée comme une succession dans le temps d'états d'équilibre mécanique. En effet, les mouvements sont suffisamment lents pour que les accélérations soit négligeables. Ainsi, l'équation de Newton s'écrit à tout instant : le bilan des forces est nul, équivalent à un équilibre. Au cours de cette évolution quasi-statique, la géométrie des cellules résulte directement des contraintes qu'appliquent les cellules les unes sur les autres. Par exemple, si trois jonctions cellulaires se rencontrent en un même point avec la même tension, alors les angles respectifs doivent être de 120° . En revanche, si on observe un écart à ces 120° , c'est qu'il existe des différences de tension entre ces trois jonctions, et leur rapport peut être déterminé [79].

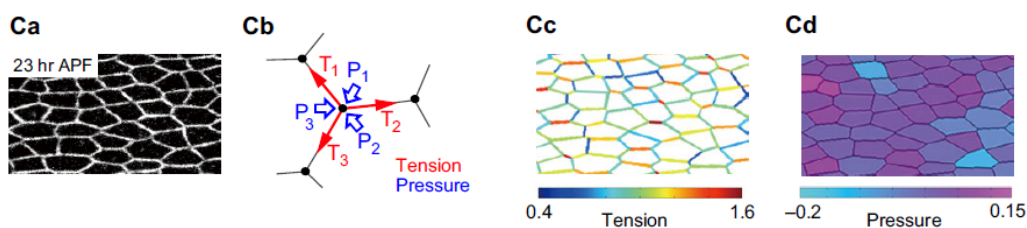


FIGURE 2.7 – Inférence de force. Ca. Image de l'épithélium de l'aile dans la puppe de Drosophile, après 23 h de métamorphose. Cb. Analyse d'image qui, par analyse de la formes des cellules, donne les positions des sommets et des liens entre cellules. On peut alors écrire les équations d'équilibre des forces, reflétant l'équilibre des tensions entre les cellules (T) et les différences de pression cellulaire (P). Cc. Cartographie des tensions relatives dans le tissu par résolution des équations. Cd. Cartographie des différences relatives de pression par résolution des équations. (figure tirée de la revue de Sugimura et al. [30])

Ainsi, comme son nom l'indique, la méthode d'inférence de forces permet de calculer les forces [80] [81], ou plus exactement le ratio entre les forces, en écrivant l'équilibre local (fig. 2.7 Cb)), déduit de la géométrie des cellules (fig. 2.7 Ca)). L'écriture de l'intégralité des équations pour chaque jonction est facilitée par le fait que la tension d'une jonction est la même à ses deux extrémités : on peut alors écrire et résoudre simultanément les équations d'équilibre dans un réseau connecté [82]. De plus, il est possible d'ajouter les courbures des jonctions afin de déduire les différences de pression locale [83] (fig. 2.7 Cd.). Cette méthode a prouvé sa cohérence et solidité à travers différents tests informatiques sur des réseaux tests. Cependant, outre la difficulté d'obtenir des images nettes, il est nécessaire de pouvoir extraire le contour de l'ensemble du réseau cellulaire, sans que les erreurs liées à ce procédé ne puissent fausser l'intégralité des calculs.

L'inférence de force a permis d'obtenir des résultats *in vivo* [84], notamment avec l'étude du tissu épithélial chez la Drosophile en développement [83] (fig. 2.7). Cette méthode fournit à la fois une cartographie des tensions dans un tissu (fig. 2.7 Cc.), tout en permettant l'accès aux informations locales (au niveau de la cellule). En revanche, les forces déduites sont uniquement les forces latérales.

Depuis maintenant quelques années, cette méthode, initialement développée pour étudier des systèmes 2D, a été généralisée à des études de tissus en 3D [81]. En effet, pour opérer ce passage, les outils 2D ont d'abord été adaptés au 3D dans certaines circonstances : lorsqu'un tissu 3D n'est pas trop incurvé (thorax dorsal de la puppe de drosophile [83] (fig. 2.7)), alors ce tissu peut être directement traité avec les outils 2D. Pour les tissus ne répondant pas à ce critère, il a été montré que l'ajout d'une tension de ligne dans le réseau cellulaire [85] permet de résoudre les incohérences soulevées par l'analyse d'un même tissu dans un plan apical et dans une vue en coupe [86]. Ainsi, à travers ces travaux, l'inférence de force semble pouvoir développer des performances accrues en 3D. Cependant, l'analyse 3D implique une difficulté supplémentaire de la segmentation nécessaire [81].

Bien qu'à elle seule elle ne puisse fournir que des valeurs relatives, l'inférence de force permet une cartographie du ratio de force et des différences de pression au sein d'un tissu, et s'ouvre, depuis quelques années, à l'analyse de tissus en 3D et *in vivo*. Ces avancés sont aujourd'hui limitées par la capacité à segmenter les images des tissus, mais sont en perpétuelle progression, faisant de cette méthode un outil essentiel pour l'avenir.

2.1.9 Les pinces optiques

Une pince optique est un outil permettant la manipulation d'objets diélectriques, de taille micrométrique (0,5-5 μm), injectés au sein d'un système biologique, souvent au sein même d'une cellule [87]. Les objets injectés sont des micro-sphères, généralement de silice ou de latex, de diamètre allant de 100 nm à quelques micromètres, transparentes et d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu environnant. L'objet est piégé dans un gradient d'intensité formé par le faisceau d'un laser focalisé à son niveau. Le diélectrique étant piégé par le laser, sa manipulation est alors permise en déplaçant simplement le point de focalisation.

Grâce à ce système, il est possible d'imposer une force sur la micro-sphère, et donc sur toute la surface avec laquelle elle est en contact. Il est donc possible d'imposer une contrainte calibrée (dans la gamme de 0,01-10 Pa [88]) et d'en déduire des propriétés du matériau. En revanche les manipulations ne peuvent pas être de trop longue durée : les lasers génèrent un important échauffement qui cause d'importants dommages au milieu biologique. Cette limitation empêche l'étude de mécanismes longs, comme lors de mouvement morpho-génétiques embryonnaire sur plusieurs heures.

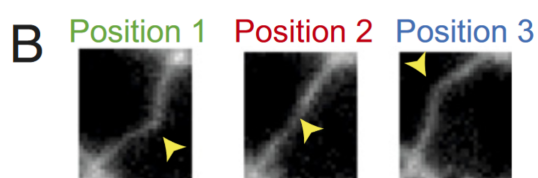


FIGURE 2.8 – Pinces optiques. Déformation d'une paroi cellule-cellule par le biais du piégeage optique des molécules interne à la membrane. [89]

Afin de pouvoir être utilisées quantitativement, les pinces optiques nécessitent une calibration préalable. Bien qu'elle soit devenue assez standard pour les études *in vitro* [87], cette calibration demeure compliquée pour l'étude des systèmes *in vivo*. En effet, cette calibration dépend à la fois de la nature de l'objet piégé, de l'intensité du faisceau lumineux et du milieu environnant. De plus, la profondeur de pénétration du laser dépend à la fois de sa puissance, de sa longueur d'onde mais aussi des propriétés op-

tiques du milieu (homogénéité, densité etc..).

Des mesures ont cependant pu être réalisées *in vivo*, en piégeant directement une région de la membrane cellulaire aux propriétés optiques connues [89]. Il a ainsi été démontré que, par le piégeage optique de la membrane, on peut déformer efficacement les interfaces cellule-cellule et mesurer la tension aux jonctions cellulaires (fig. 2.8).

Les pinces optiques sont facilement intégrables aux différents systèmes optiques modernes, et permettent un certain nombre de mesures de propriétés mécaniques *in vitro*. Avec les récents progrès, elles peuvent être utilisées pour certaines études *in vivo*, mais elles restent difficiles à mettre en œuvre selon le tissu étudié (profondeur, densité..) et potentiellement destructrice pour le tissu à cause de l'élévation locale de température générée par le laser.

2.1.10 Pincés magnétiques

Il existe une variante des pinces optiques que sont les pinces magnétiques. Le principe est semblable à celui des premières en utilisant, cette fois, des particules magnétiques manipulées au sein d'un gradient de champ magnétique [90]. Ceci permet, en faisant varier le gradient, de générer des contraintes contrôlées dans le système, dont la réponse peut être enregistrée. L'intervalle des contraintes applicables est plus grand que celui des pinces optiques ($0,01 - 10^4$ Pa [88]). Les pinces magnétiques permettent également d'éviter les dommages causés par la chaleur d'un faisceau optique. Enfin, elles offrent la possibilité de solliciter un tissu en profondeur, sans perdre en précision puisque le champ magnétique n'est pas perturbé par le tissu.

L'utilisation des pinces magnétiques a ainsi permis d'effectuer des mesures sur cellule unique [91] ou, à plus grande échelle, sur des tissus [92]. A cette échelle, des expériences *in vitro* ont permis de mesurer la tensions de surface des agrégats [93] grâce à l'internalisation de particules magnétiques par les cellules, conférant à l'agrégat entier un moment magnétique. *In vivo*, la méthode a également pu être testée chez la souris : la greffe d'un aimant dans le côlon, permet l'application permanente d'un champ magnétique sur un agrégat de cellules magnétiques également greffé à la souris [94].

Cependant, alors que les pinces optiques peuvent piéger directement certains objets biologiques, la méthode magnétique est plus invasive puisqu'il est nécessaire d'injecter des particules magnétiques afin de pouvoir les manipuler par la suite. Dans le cas des manipulations de cellules uniques, il est nécessaire d'internaliser des billes magnétiques de taille importante (20-40 μm) afin d'appliquer des forces suffisantes : l'injection y est difficile, notamment *in vivo* où l'utilisation d'aiguilles larges de 30 μm chez l'embryon de la drosophile n'est pas possible.

Les pinces magnétiques sont des outils puissants permettant l'application de forces et la mesure absolue de propriétés mécaniques et de contraintes dans les systèmes biologiques. Au niveau cellulaire comme tissulaire leur utilisation reste cependant limitée par la nécessité d'intégration des particules magnétiques au système.

2.1.11 Micro-capteurs : introduction

Les méthodes précédentes, bien qu'ayant toutes prouvées leurs intérêts, sont souvent limitées par leur difficulté d'application *in vivo*, du fait qu'elles ne sont pas quantitatives, ou encore par leur limitation d'application sur des tissus profonds. Pour pallier à ces limitations, une nouvelle approche a fait son apparition ces dernières années : l'insertion, au sein des tissus, de capteurs micrométriques déformables, en matériaux bio-compatibles, et aux propriétés mécaniques connues.

Afin d'optimiser les mesures, différents matériaux ont été testés, comme le recours à des gouttes d'huiles liquides (cf 2.2.1) ou bien l'utilisation d'hydrogels élastiques (cf 2.2.2). Dans les deux cas, que nous détaillerons dans la partie suivante, l'objectif est de pouvoir analyser par imagerie la forme de l'objet. Les propriétés mécaniques du matériau utilisé étant au préalable connues, les contraintes appliquées au capteur *in situ* peuvent être déduites de l'analyse de cette déformation.

L'insertion des capteurs est une étape charnière dans l'application de ces méthodes. En effet, même lorsque la taille du capteur est réduite, il doit pouvoir être inséré par micro injection, ou par une autre méthode, dans la région d'intérêt sans pour autant perturber ou altérer les tissus.

Une fois l'insertion réalisée, ces méthodes permettent le suivi de l'évolution des contraintes locales d'un tissu, au cours de son développement. De plus, du fait de leur bio-compatibilité et de leur taille réduite (de l'ordre de la taille d'une cellule), ces systèmes se veulent peu perturbatifs. L'insertion d'une série de capteurs au sein d'un même tissu permet alors d'obtenir une cartographie des contraintes.

2.2 Micro-capteurs

Dans un premier temps nous présenterons une méthode utilisant des gouttes d'huile liquide en guise de capteur, puis dans un deuxième temps nous verrons des micro-billes élastiques, faites d'hyrogel.

2.2.1 Goutte d'huile

L'injection dans le tissu de gouttes liquides d'huile bio-compatible permet, par le biais d'une mesure des déformations locales, de mesurer les contraintes mécaniques normales s'appliquant à la goutte. Les gouttes sont de la taille caractéristique d'une cellule, pouvant aller de 10 à 100 μm de diamètre.

Cette gamme de dimension permet d'éviter certaines difficultés. En effet, une goutte de taille trop petite risque d'être internalisée par les cellules, tandis qu'une goutte trop grosse serait trop perturbante. De plus, une taille comprise entre 10 et 100 μm permet une bonne visualisation par microscopie, avec suffisamment de détail pour analyser efficacement les déformations locales de la goutte, causées par les cellules environnantes.

En effet, du fait de la minimisation de l'énergie de surface, les gouttes sont, en l'absence de contrainte, maintenues sphériques. Lorsqu'une goutte est introduite dans un tissu, elle est déformée (fig. 2.9 a.) par les contraintes exercées par les cellules voisines et la matrice extra-cellulaire.

À l'aide d'un marquage fluorescent de l'huile et d'une visualisation par microscopie confocale (fig. 2.9 b.), il est possible de déterminer la géométrie tridimensionnelle de la goutte déformée. De cette déformation, on extrait l'anisotropie des contraintes normales locales qui lui sont appliquées (fig. 2.9 d.). La déformation peut être mesurée à $\pm 5\%$, et ainsi, selon la tension de surface de la goutte, les contraintes mesurables peuvent aller de 0,1 à quelques kPa environ (fig. 2.9 d.).

Afin d'optimiser l'intégration au tissu, les gouttelettes doivent être fonctionnalisées. Pour cela, des ligands surfaciques permettant l'adhésion aux récepteurs cellulaires sont ajoutés : ces ligands, reconnus par les protéines d'adhésion cellulaires, sont fixés en surface de la gouttelette et peuvent

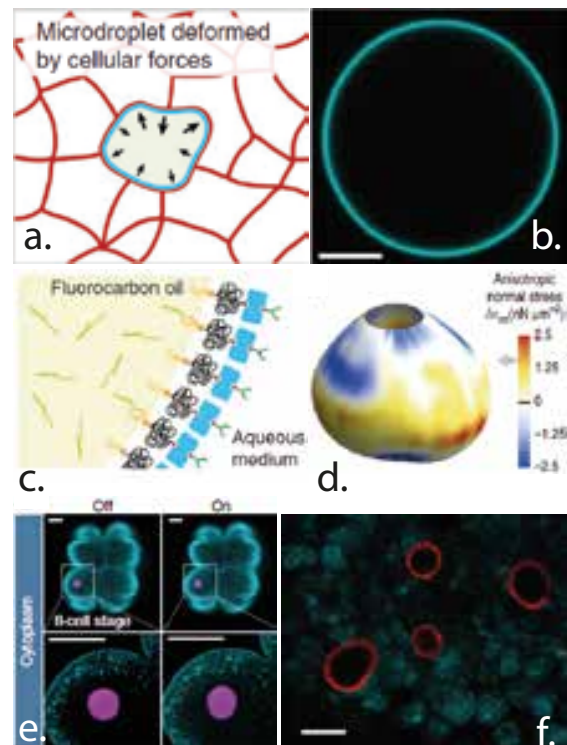


FIGURE 2.9 – Goutte d'huile. a) schéma d'une goutte d'huile déformée par les contraintes normales générées par les cellules alentours. b) Section confocale d'une goutte d'huile de fluocarbone fonctionnalisée avec le Cy5-streptavidine (cyan). c) Schéma de la fonctionnalisation des gouttelettes afin d'optimiser l'adhésion cellule-gouttelettes. d) reconstitution 3D de la forme d'une goutte d'huile insérée dans un agrégat de cellules MSC. e) Section confocale présentant une gouttelette avec ferrofluide (magenta), intégrée dans embryon du poisson-zèbre au stade de 8-cellules. f) Coupe confocale à travers un agrégat de cellules épithéliales dont on peut observer l'ADN (cyan) et les gouttelettes d'huile (rouge) fonctionnalisées par des E-Cadhérines. (Figures et images extraite des articles Campàs.O et al. 2013 [95] et Mongera et al. 2018 [96])

ainsi se lier aux protéines des membranes cellulaires (cadhérines, intégrines) [95] (fig. 2.9 c.). Cette intégration biologique au tissu permet aux capteurs d'être sensibles à l'anisotropie des contraintes normales. De plus, ajouté à la taille cellulaire des capteurs, la fonctionnalisation diminue l'aspect perturbatif : le capteur n'est plus perçu par les cellules comme un corps étranger. De ce fait, le capteur peut rester en place, dans le système, plusieurs jours. Cela offre alors la possibilité de cartographier les contraintes en injectant plusieurs gouttelettes, et de suivre l'évolution du tissu dans le temps (fig. 2.9 e. et f.). Enfin, l'ajout de ferrofluide à l'huile utilisée, permet également, en plus de mesurer l'anisotropie des contraintes normales générées, d'appliquer sur le tissu une contrainte locale contrôlée à l'aide d'un champ magnétique [97].

En revanche, cette méthode ne permet pas la mesure de la composante isotrope des contraintes (la pression). En effet, l'huile est incompressible et ne subit aucune déformation sous ces contraintes. Également, il n'est pas possible de mesurer les contraintes tangentielles à la surface. Enfin, cette méthode, bien que performante pour la mesure de l'anisotropie des contraintes normales, requiert une connaissance précise de la tension de surface entre la goutte et la cellule. Cette quantité est très difficile à mesurer et à contrôler, puisque pouvant changer d'un tissu à un autre, et extrêmement dépendante des conditions expérimentales.

Finalement, l'utilisation de gouttelettes d'huile, bien que ne permettant pas de mesurer les contraintes tangentielles ni la composante isotrope des contraintes de pression, est une méthode puissante pour mesurer les composantes locales de l'anisotropie des contraintes normales dans un système *in vitro* [95] comme *in vivo* [96]. Elle permet notamment un suivi dans le temps et l'espace de ces contraintes mais reste cependant difficile à calibrer du fait que la tension de surface huiles/cellules soit très dépendante des conditions expérimentales.

2.2.2 Micro-billes d'hydrogel

Un autre angle d'approche des micro-capteurs est l'utilisation de micro-billes d'hydrogel, en polyacrylamide (PAA) [98]. Ce gel est un solide élastique poreux et bio-compatible, très bien caractérisé mécaniquement [100]. En plus de ses propriétés élastiques, le polyacrylamide est un solide compressible car il a la propriété de gonfler en absorbant de l'eau. Cette caractéristique est déterminante pour la mesure des contraintes isotropes (de pression) [98].

Le gel de PAA a initialement été utilisé en biologie comme substrat, puis comme générateur de contrainte [101]. Par exemple, du fait de sa compressibilité et de ses propriétés mécaniques proches de la matrice extra-cellulaire (dont le module d'Young se situe entre 1 et 50 kPa en moyenne [102]), un tissu développé dans une cavité de PAA peut alors être contraint en modifiant l'osmolarité autour du gel [103] : le gel se dilate ou se comprime, imposant alors une contrainte au tissu situé à l'intérieur.

Les mêmes propriétés du PAA sont utilisées dans la mesure des contraintes locales. Une micro-bille de PAA, initialement sphérique, est introduite dans le système biologique. Tout comme pour les gouttes d'huile, les cellules alentours vont exercer des contraintes sur la micro-bille, entraînant sa déformation. La partie isotrope des contraintes fait varier le volume du capteur, tandis que la partie de cisaillement modifiera sa forme [104] [99]. Un marquage fluorescent permet d'imager le capteur

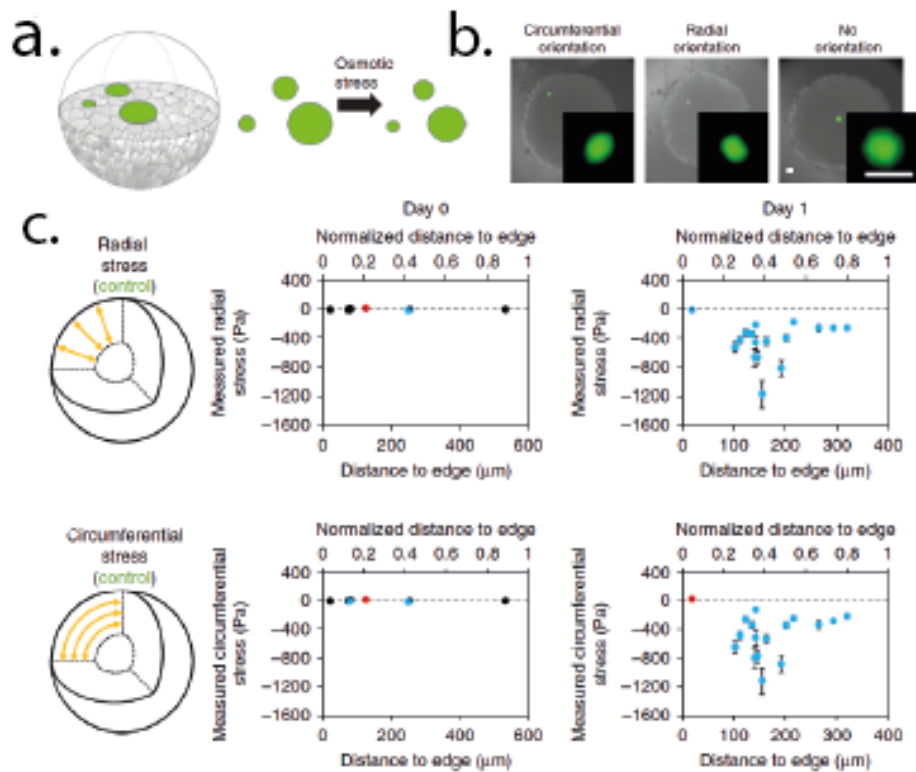


FIGURE 2.10 – Micro-bille d'hydrogel. a) Schéma de principe de mesure de la contrainte isotrope. Des capteurs de la taille d'une cellule, fabriqués en PAA et marqués en fluorescence peuvent, sous l'effet de la pression, changer de volume. La mesure de cette variation de volume permet de déduire la valeur des contraintes de la pression locale. La calibration se fait en imposant une pression osmotique et en observant la variation de volume induite. Figure extraite de Cappello et al. 2017 [98]. b) Capteurs d'hydrogel intégrés dans un agrégat de cellules (MSC). On observe une variation de forme : le capteur s'est éloigné de sa forme sphérique initiale. De cette déformation, une mesure des contraintes de cisaillement peut être effectuée. c) Mesure des contraintes radiales et des contraintes orthoradiales en fonction de la distance au centre de l'agrégat. Ces résultats démontrent qu'il est possible de mesurer les contraintes au sein d'un agrégat : les contraintes sont nulles au bord de l'agrégat, puis la contrainte passe par un maximum avant de se stabiliser en approchant du centre de l'agrégat. Figures extraites de Moraes et al. 2019 [99]

en 3D et ainsi de mesurer la variation du volume et les déformations de la bille [104].

Afin de calibrer les variations de volume en fonction de la pression, on applique une pression osmotique contrôlée. Pour cela, une solution de chaînes longues de polymère (comme le Dextran), ne pouvant pas pénétrer dans les mailles du PAA, est utilisée. Cette pression entraîne une variation de volume du capteur [103] [105]. En mesurant le volume du capteur en solution en fonction de la pression osmotique, il est possible de calibrer la déformation en fonction de la contrainte équivalente appliquée (pouvant aller de 0.1 à 10 kPa [98]). Cependant, dans une expérience in situ dans un agrégat il est difficile de conclure sur l'origine exacte des contraintes isotropes issues des mesures. En effet, elles peuvent être attribuées à la pression mécanique exercée par le tissu, mais également à la pression osmotique locale. Il n'est alors pas possible de séparer ces composantes.

En plus des contraintes normales isotropes, les micro-billes d'hydrogel permettent également une mesure des contraintes de cisaillement développées dans le tissu. En effet, le PAA est un solide élastique : lorsque des contraintes de cisaillement s'appliquent sur la bille alors sa forme change. Les

modules élastiques du PAA étant au préalable calibrés, il est possible de relier cette déformation aux contraintes qui les ont causées [106] (fig. 2.10). Dans l'article de Guck et al. [106], ils démontrent la présence de contraintes tangentielles (1-1000 Pa) et de contraintes normales, en plus des contraintes isotrope *in vivo*, dans un embryon de poisson-zèbre en développement.

La difficulté de calibration reste importante pour plusieurs raisons : d'une part, il faut connaître le volume initial du capteur, afin de connaître sa variation de volume. D'autre part, il est important que toutes les propriétés mécaniques soient également connues. En effet, le PAA se comporte comme un solide purement élastique uniquement aux faibles déformations [105]. Mais du fait des variations importantes de volume en fonction de la pression, son module d'Young peut évoluer également aux grandes déformations.

Pour optimiser l'intégration au sein des tissus, les capteurs peuvent être également fonctionnalisés par des protéines d'adhésion cellulaire ou matricielle [98] [99] [107]. Tout comme pour les gouttes liquides, ce traitement permet de rigidifier la connexion cellule-capteur (ou matrice-capteur) et ainsi d'être sensible aux diverses forces qui peuvent être générées (tension, compression, cisaillement...).

Finalement, cette méthode permet à la fois une mesure des contraintes de cisaillement et des contraintes de pression locales. Cependant, l'analyse des résultats est rendue compliquée par l'incertitude sur la nature des contraintes exercées, et par la non linéarité des propriétés mécaniques du gel.

2.3 Récapitulatif

Méthode	Valeur mesurée	Echelle	Temps	Quantitatif	Plage de mesure	Avantages	Inconvénients	In vivo
Ablation laser	Contraintes tissulaires	1µm-1mm	s	-	N.a	<ul style="list-style-type: none"> • Facilement intégrable • Nombre de mesures 	Destructif	Oui
Micropipette	Tension cellulaire et propriétés mécaniques	10µm-1mm	min-h	+	1-1000 Pa	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure fiable • Facile à mettre en place 	<ul style="list-style-type: none"> • Contact permanent perturbatif • In vivo limité 	Non
Micros plaques	Tension cellulaire et contraintes	10µm-1mm	s-min	+	0.1-1000 Pa	Mesure précise	Plage d'objets biologique à mesurer limitée	Non
Microscopie à force de traction	Traction cellulaire	10µm-1mm	min-h	+	1-10 ⁴ Pa	Facile à mettre en place en 2D	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible au bruit • 3D limitée 	Non
AFM et cantilever	Propriétés mécaniques et tension cellulaire	10µm-1mm	s-min	+	0.01-100 Pa	Cartographie	<ul style="list-style-type: none"> • Uniquement surfacique • Contact permanent 	Non
FRET	Force moléculaire	0.5-1µm	s	+	1-10 Pa	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure de force moléculaire • Cartographie 	<ul style="list-style-type: none"> • Non directionnelle • Difficile à calibrer 	Oui
Inférence de force	Tension	10µm-1mm	ms	-	Na	<ul style="list-style-type: none"> • Non invasif • Cartographie 	<ul style="list-style-type: none"> • Segmentation difficile • Sensible au bruit 	Oui
Pinces optiques	Tension cellulaire	1-10µm	ms-min	+	0.01-10 Pa	Facilement intégrable aux systèmes optique	<ul style="list-style-type: none"> • Dommages du tissu • Calibration difficile 	Oui
Pinces magnétiques	Tension cellulaire	1-100µm	ms-min	+	0.01-100 Pa	Permet de manipuler en profondeur	Invasif	Oui
Goutte d'huile	Contraintes normales	1-100µm	s-h	+	0.1-100 Pa	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi du développement • Cartographie 	<ul style="list-style-type: none"> • Calibration difficile • Seulement les contraintes normale anisotropes 	Oui
Hydrogel	Contraintes isotrope Contraintes de cisaillement	1-100µm	s-h	+	10-10 ³ Pa	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi du développement • Cartographie 	<ul style="list-style-type: none"> • Calibration difficile • Analyse résultats compliquée 	Oui

TABLEAU 2.1 – Tableau récapitulatif des méthodes

Chapitre 3

Travail proposé

Afin de mieux appréhender les interactions qui existent entre la mécanique et la biologie, il est nécessaire de mesurer les contraintes dans les systèmes biologiques *in vivo*, mais aussi dans les systèmes modèles *in vitro*. Les méthodes précédemment présentées restent soumises à des conditions expérimentales difficiles à contrôler (tension de surface, pression osmotique...), l'approche à l'aide de micro-capteurs pallie à certaines limitations en permettant la mesure des contraintes *in situ*. Leur intégration biologique offre également la possibilité d'obtenir une cartographie des contraintes dans le tissu, et donc de les relier aux marqueurs biologiques exprimées localement au cours du temps.

Notre projet s'inscrit dans cette même démarche : la conception d'un capteur de taille micro-métrique, déformable par les contraintes biologiques, permettant la cartographie des contraintes *in situ*, *in vitro* comme *in vivo*.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord présenter les caractéristiques techniques des capteurs que nous souhaitons développer, puis le principe des mesures à effectuer. Enfin, nous présenterons les divers systèmes envisagés pour effectuer des mesures aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

3.1 Cahier des charges

Nous souhaitons développer des micro-capteurs innovants, permettant de répondre à certaines des difficultés rencontrées dans l'utilisation des micro-capteurs existants (gouttes d'huile et micro-billes d'hydrogel).

Idéalement les capteurs doivent être compressibles et élastiques afin de pouvoir se déformer et mesurer toutes les composantes des contraintes existantes : les contraintes de cisaillement comme les contraintes de compression. Nous n'avons pas souhaité nous diriger vers les hydrogels dont, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent (cf chap. 2.2.2), l'analyse peut être difficile et dont il est compliqué de séparer les contributions osmotiques des contributions de pression. Toutefois, il n'existe pas, à notre connaissance et à ce jour, un gel élastique, autre que les hydrogels, dont le module de compressibilité soit suffisamment faible pour permettre une mesure de pression dans un système biologique.

Du fait de cette impossibilité technique, le parti de ne mesurer que les contraintes de cisaillement

a donc été pris. En effet, les études des deux dernières décennies montrent que les contraintes de cisaillement jouent un rôle prédominant dans le développement des tissus et embryons [108]. L'accès à cette mesure nous semble donc, dans ce cadre, tout à fait pertinente.

Finalement, le capteur que nous souhaitons développer doit permettre, via ses déformation, de cartographier les contraintes locales de cisaillement *in situ*. Pour cela le capteur doit remplir certaines conditions que nous allons maintenant présenter.

La raideur

Tout d'abord, le module d'élasticité du matériau doit être dans la gamme de celui d'un tissu. En effet, comme les méthodes précédentes ont pu le mettre en évidence, les contraintes développées dans les tissus peuvent varier entre 1 Pa et 1 kPa. Les modules d'Young d'un tissu, caractéristiques de l'élasticité d'un matériau, varient de quelques dizaines à plusieurs milliers de pascal, selon les tissus. C'est pourquoi, pour que le capteur puisse être déformé par les contraintes développées par le tissu, son module d'Young doit être du même ordre de grandeur que celui du tissu, c'est à dire de quelques centaine de Pascal. A l'inverse, son module d'Young ne doit pas être trop faible : en effet, nous souhaitons étudier les déformations dans le régime élastique linéaire. Si les déformations subies par le capteurs son trop importantes (plus de 20 %), des effets d'élasticité non linéaire interviennent et sont difficiles à analyser.

C'est pourquoi nous souhaitons un matériau dont le module d'Young se situe entre 100 et 3000 Pa. Cette valeur peut être modulée selon les besoins d'étude (selon la rigidité du tissu, ou la taille des capteur par exemple).

Forme

La forme sphérique du capteur s'impose, pour des raisons à la fois pratique (facilité de production) mais aussi par souci de simplicité d'analyse des déformations.

Taille

L'ordre de grandeur de taille du capteur détermine la localité de la mesure des contraintes. Dans un tissu, l'échelle cellulaire est une des échelles de référence. Les dimensions des cellules animales sont, en moyenne, de 20 μm en longueur et entre 5 et 10 μm en épaisseur. Elles constituent, les briques élémentaires d'un tissu. Pour mesurer les contraintes à l'échelle cellulaire, le capteur ne peut pas dépasser quelques fois cette taille. De plus, les capteurs doivent pouvoir être intégrés facilement à des systèmes biologiques : plus ils sont gros, plus il est difficile de les intégrer *in situ* sans perturber, voire détériorer, le tissu.

Il est important que le capteur ne soit pas trop petit non plus. En effet, aux échelles micrométriques, du fait de la petite taille du capteur, les effets capillaires ne sont plus négligeables et une compétition avec l'élasticité du volume s'installe.

Pour être plus précis, les effets capillaires tendent à minimiser la surface d'un objet en développant une contrainte normale proportionnelle à la courbure et à la tension de la surface. Cet effet modifie l'élasticité effective du capteur, en s'opposant aux déformations. L'ampleur de cet effet,

est déterminé par le rapport des contraintes capillaires typiques sur le module d'Young : $\frac{\gamma}{RE}$, avec γ la tension de surface entre le capteur et le milieu biologique, R le rayon de la bille et E le module d'Young du capteur. Si ce rapport est largement inférieur à 1, alors les déformations seront dominées par l'élasticité du capteur. Plus ce rapport grandit, plus les effets de capillarité contribuent à la rigidité effective du capteur. Or, aux dimensions auxquelles nous travaillons, pour un module d'Young $E = 1500$ Pa, un rayon R de l'ordre de $10 \mu\text{m}$ et une tension de surface γ de l'ordre de 15mN/m , le rapport $\frac{\gamma}{RE}$ vaut 1. Il est donc clair que les effets capillaires ne sont pas négligeables, et qu'il faut éventuellement en tenir compte.

Finalement, pour à la fois permettre une mesure des contraintes locales et éviter la prédominance des effets capillaires, le rayon du capteur doit se situer idéalement entre 5 et $25 \mu\text{m}$.

Fonctionnalisation

Pour assurer que les contraintes développées par le système biologique sont proches de leur valeur naturelle, le capteur doit être le moins perturbatif possible. Pour cela il est préférable d'effectuer une fonctionnalisation des surfaces par des protéines d'adhésion cellulaire. Cette fonctionnalisation a pour objectif de mimer les interactions cellule-cellule ou cellule-ECM. Ainsi, par le biais de ces interactions, le capteur optimise son rôle de transducteur de force, améliorant le réalisme de la mesure. Cette interaction est notamment nécessaire pour mesurer les forces de traction des cellules.

Visualisation

Pour visualiser la déformation et pour reconstituer la forme du capteur en 3D, il est nécessaire de pouvoir l'imager *in situ*. Pour cela, nous nous tournons vers les techniques de microscopie actuelles (confocal, multiphotons) qui permettent une localisation précises de marqueurs fluorescents, à l'intérieur d'un tissu biologique (jusqu'à $250 \mu\text{m}$ de profondeur). C'est pourquoi, afin de visualiser le volume de la bille, un marqueur fluorescent doit être intégré au gel utilisé pour la conception des capteurs.

Calibration

Comme nous l'avons évoqué, à l'échelle micrométrique, l'élasto-capillarité est un problème à prendre en compte. S'il est possible de facilement connaître le module d'Young du gel à l'échelle macroscopique E_{macro} , il faut aussi connaître le module d'Young effectif du capteur $E_{effectif}$ défini par : $E_{effectif} = E_{macro} + E_{capillarité}$, avec $E_{capillarité}$ la contribution des effets capillaires. Ces derniers, comme nous l'avons vu, dépendent à la fois du matériau utilisé, de la taille du capteur, du milieu, et du traitement de surface effectué sur la surface du capteur (γ est alors modifié).

Finalement, afin de pouvoir analyser quantitativement les déformations du capteur, il doit pouvoir être calibré, au préalable, en situation d'insertion dans un tissu biologique afin de connaître ses propriétés mécaniques à l'échelle micrométrique.

En conclusion, nous souhaitons développer un capteur de taille cellulaire, dont la raideur est proche de celle d'un tissu biologique. Ce capteur doit pouvoir être fonctionnalisé en surface par des protéines d'adhésion cellulaire et être calibré *in situ* avant son utilisation. Par son intégration, le capteur sera soumis aux contraintes naturelles du tissu. Ses déformations pourront être visualisées en microscopie grâce à un marquage fluorescent intégré au matériau du capteur. Les propriétés mécaniques du capteur doivent être calibrées à l'échelle microscopique et *in situ*. Enfin, de l'analyse de ses déformations, il sera possible de déduire les contraintes de cisaillement développées dans le tissu.

3.2 Principe de mesures

Maintenant que le cahier des charges a été établi, détaillons un peu plus le principe de la mesure. La bille de gel élastique formée et fonctionnalisée comme décrit précédemment, doit être insérée dans le tissu (fig. 3.1). Elle s'intègre en créant des liaisons biochimiques grâce à ses protéines d'adhésion en surface. La bille est alors, tout comme les autres cellules et la matrice extra-cellulaire, soumise aux contraintes environnantes.

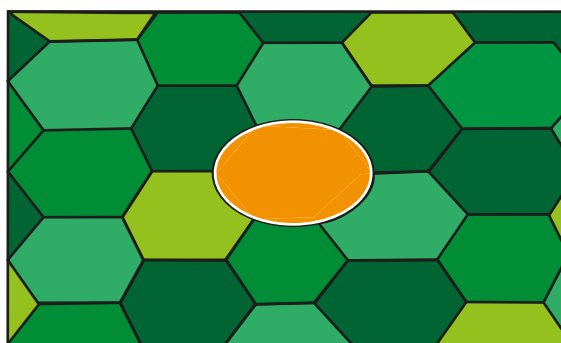


FIGURE 3.1 – Schéma de principe d'utilisation des micro-bille de gel polymérisable. Une micro-bille (jaune), de taille cellulaire, est insérée dans un tissu (vert). Un marquage de surface par des protéines d'adhésion cellulaire (blanc) permet d'optimiser l'insertion. L'interaction cellule-captteur permet à la bille d'optimiser son intégration de façon non perturbative. La bille est déformée sous l'effet des contraintes générées par le tissu. Cette déformation est imagée en 3D par microscopie à fluorescence.

Grâce à une imagerie confocal ou multi-photonique, la bille d'élastomère marquée par fluorescence peut être imagée en 3D. Différents plans de coupe de la bille, espacés régulièrement, sont enregistrés.

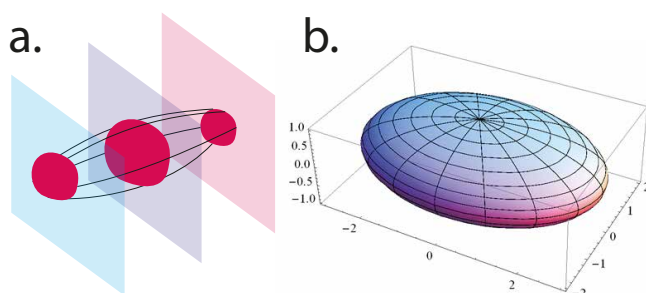


FIGURE 3.2 – a) Trois plans successifs du capteur en 3D. Les lignes représentent le volume qui peut être reconstitué. b) Ajustement de la forme 3D de la bille en un ellipsoïde dont on mesure les grands axes, la position et l'orientation.

Un traitement informatique permet d'assembler les différents plans ainsi acquis, et de reconstituer la forme de la bille en trois dimensions (fig. 3.2 a.).

Du fait que la bille a été déformée, sa forme dévie de la sphère. Le capteur est suffisamment petit, de l'ordre de la taille d'une cellule, pour que les contraintes s'appliquant sur lui soient supposées homogènes. Ainsi, au premier ordre, la déviation du capteur à la sphère peut être ajustée par un ellipsoïde (fig. 3.2 b.). De plus, la raideur effective du capteur doit être suffisamment importante pour que

les déformations soient petites (c'est à dire de moins de 20 %), afin que la réponse du capteur reste dans le domaine des effets élastiques linéaires.

Ainsi, l'orientation et la longueur des axes principaux de l'ellipsoïde obtenu permettent de définir le tenseur $\underline{\underline{\epsilon}}$ des déformations de cisaillement.

Si le gel élastique est non compressible, il obéit à la loi : $E = 3\mu$ avec E le module d'Young et μ le module de cisaillement. Finalement, grâce à la relation suivante, on détermine les contraintes de cisaillement locales dans le tissu

$$\sigma_{ii} = 2\mu\varepsilon_{ii} \quad (3.1)$$

Avec σ_{ii} la contrainte de cisaillement diagonale selon l'axe principal i , μ le module de cisaillement du capteur et ε_{ii} la déformation selon l'axe i .

De la déformation du capteur sphérique, et en utilisant de la formule 3.1 reliant contraintes de cisaillement et déformation, on obtient à la fois la valeur absolue des contraintes de cisaillement mais aussi leur orientation. En plaçant plusieurs capteurs dans un système, il est alors possible de cartographier avec précision les contraintes de cisaillement dans le tissu.

3.3 Systèmes d'études envisagés

Dans ce chapitre, nous allons présenter dans un premier temps les systèmes *in vitro* qui ont été envisagés et conservés (ou non) pour cette étude, puis nous ferons de même avec les organismes candidats pour une étude *in vivo*.

3.3.1 *In vitro*

Afin de mettre en place et de calibrer le capteur que nous développons, il est nécessaire de pouvoir étudier son comportement *in vitro* au préalable. Pour cela deux systèmes d'études ont été envisagés, mais un seul a finalement été retenu.

3.3.1.1 Epithélium mono-couche de MDCK

Le premier système est un épithélium mono-couche de MDCK (Madin Darby Canine Kidney) développé sur un substrat plan. En effet, un nombre important d'études [109] [110] a été réalisé sur cette lignée cellulaire canine rénale offrant une connaissance poussée de ces cellules. De plus, leur culture en laboratoire est classique, et il existe de nombreuses lignées transgéniques [110] permettant l'étude ciblé de certains mécanismes.

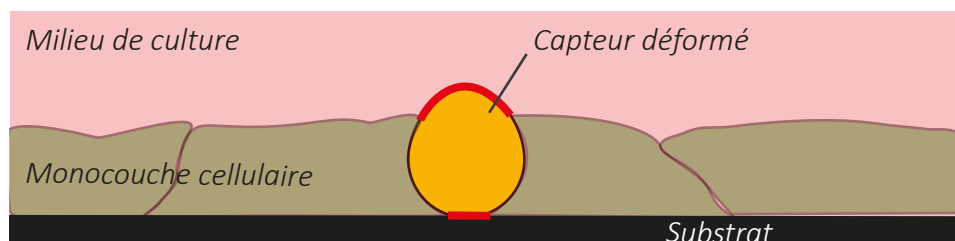


FIGURE 3.3 – Schéma d'un capteur (jaune) intégré dans une mono-couche épithéliale. Le capteur est déformé par les contraintes imposées par le tissu, mais ne peut pas être entièrement inséré dans le tissu. Les zones en rouges montrent les interactions différentes des interactions Capteur-Cellules. Cela modifie la tension de surface locale du capteur avec le milieu, et donc le comportement de déformation du capteur.

L'insertion de capteurs dans une mono-couche de MDCK doit permettre, du fait des éventuelles forces générées, de déformer le capteur. Cependant, étant donné la taille de ce dernier, il est compliqué d'intégrer le capteur entièrement dans le tissu. En effet, si l'on prend une cellule moyenne de 15 μm de longueur et 8 μm d'épaisseur, un capteur d'un rayon de 10 μm a nécessairement une partie de son volume non intégré au tissu, et donc est partiellement en interaction avec le substrat, ou avec le milieu de culture (fig. 3.3). Ces interactions modifient localement les effets de tension de surface, et donc perturbent l'analyse des déformations du capteur. Ces modifications locales rendent impossible, à l'heure actuelle, l'analyse d'un capteur partiellement intégré à un tissu. Pour rendre l'analyse quantitative d'un épithélium *in vitro*, il faudrait diminuer la taille du capteur (ce qui suppose de diminuer drastiquement la tension de surface) ou avoir des cellules plus épaisses pouvant intégrer entièrement le capteur, ou bien étudier un épithélium de plusieurs couches.

Au cours de ce travail, nous avons choisi de ne pas poursuivre les études sur les épithéliums mono-couches, considérant l'étude des agrégats plus pertinente et plus appropriée à la mesure des contraintes de cisaillement en 3 dimensions.

3.3.1.2 Agrégats cellulaire

Les agrégats cellulaires sont des systèmes modèles largement utilisés en biologie [111]. Les agrégats sont des amas cellulaires, plus ou moins cohésifs, généralement sphériques. Ils peuvent être formés *in vitro* par différentes techniques [112] (goutte pendante, agitation, agrégation magnétique, centrifugation...). Ces techniques sont aujourd'hui classiques en biologie et permettent la formation d'agrégats de tailles très variées. En effet, la taille d'un agrégat peut aller d'une cinquantaine de micromètre de diamètre, taille proche de celle d'un embryon au début de son développement, jusqu'à plusieurs millimètres de diamètre. De plus, des méthodes comme celle de l'agrégation par magnétisme permettent de donner des formes plus complexes à l'agrégat (cylindre...).

L'étude du comportement cellulaire collectif *in vitro* est permise par les agrégats. Outre la facilité de formation, leur utilisation largement répandue en mécano-biologie réside également dans leur importance physiologique : l'agrégat cellulaire est un excellent modèle tumoral [21]. En effet, les tumeurs désignent des grosseurs plus ou moins volumineuses d'un tissu, suite à une multiplication excessive et désordonnée de cellules malades. Ces grosseurs prennent généralement une forme plus ou moins sphériques.

Cependant, étudier les réponses d'une tumeur *in vivo* est très compliqué. En effet, la tumeur est soumise à la fois à son environnement biochimique, et à son environnement mécanique. S'il est éventuellement possible de contrôler l'environnement mécanique *in vivo*, il est très difficile de contrôler l'environnement biochimique qui dépend de tout l'organisme. De ce fait, l'agrégat cellulaire *in vitro* se révèle être un outil très puissant puisqu'il est possible de découpler la chimie et la mécanique.

Diverses études démontrent d'ores et déjà l'importance de la mécanique dans l'évolution des agrégats [22]. Comme on a pu le voir dans le chapitre 2.2.2, l'utilisation de capteurs d'hydrogel a permis de mettre en évidence l'existence de contraintes de cisaillement dans les agrégats (fig. 2.10).

Dans un premier temps, l'utilisation d'agrégats nous permettra de calibrer notre méthode dans des conditions biologiques. Dans un second temps, nous pourrions cartographier les contraintes de cisaillement dans les agrégats et les comparer avec les études précédentes. A terme, ces travaux peuvent également permettre une étude de la tension de surface entre le capteur et différents types cellulaires ainsi que d'étudier des liens entre contraintes mécaniques et réponses biochimiques.

Enfin, dans la perspective de faire des mesures *in vivo*, les agrégats peuvent également permettre des tests d'injections. En effet, les capteurs doivent être, à priori, placés manuellement dans les tissus d'intérêt. Ceci nécessite donc une injection des capteurs *in situ*, au risque de perturber et détériorer les tissus d'intérêts et environnants. Les agrégats étant des objets fabriqués de façon rapide et en quantité, il est ainsi possible, en principe, de tester les méthodes d'injection, avant de pouvoir procéder aux tests *in vivo*.

En plus des perspectives pour mieux comprendre les comportements des tissus pathologiques que sont les tumeurs, l'utilisation d'agrégats cellulaires est également une excellente porte d'entrée pour les mesures *in vivo*, en permettant à la fois la calibration de la méthode mais aussi le test des méthodes d'injection.

3.3.2 *in vivo*

Afin de pouvoir effectuer des mesures de contraintes de cisaillement dans un système biologique *in vivo*, ce dernier doit répondre à certain critère. Tout d'abord, le système considéré doit poser une ou plusieurs questions biologiques où l'anisotropie des contraintes joue un rôle à des échelles de 10 à 30 μm . Ensuite, l'injection puis l'imagerie des capteurs doit être possible. Enfin, le capteur doit être maintenu dans le tissu afin d'en suivre les contraintes.

3.3.2.1 Systèmes envisagés

Différents systèmes *in vivo* ont ainsi été envisagés afin d'y mesurer des contraintes mécaniques. Le premier système envisagé est la drosophile. En effet, de nombreuses études démontrent l'importance des contraintes mécaniques dans le développement de la puppe de la drosophile. Cependant, l'injection des capteurs est un réel défi, et les capteurs que nous produisons sont de taille trop élevée pour ce système. Nous avons alors préféré nous concentrer sur des systèmes où l'injection est plus simple et qui nous permettent de démontrer l'efficacité de la méthode utilisée.

Des tests ont été effectués dans l'embryon de poulet en collaboration avec Vincent Fleury, MSC. Au cours de l'embryogenèse, l'embryon se referme autour du sac vitellin dans le processus de neurulation. Il est observé que des gouttes de jaune d'œuf s'aplatissent au cours de cette étape, indiquant la présence de contraintes mécaniques. Le test a permis d'injecter des capteurs au niveau de l'axe médian, où l'embryon se referme, puis de les imager en microscopie ordinaire. L'avantage de ce système est la facilité d'insertion des capteurs sans dégradation du tissu biologique. Cependant, les capteurs n'étaient, à cette étape, pas encore marqués par fluorescence et en lumière blanche, les capteurs pouvaient être confondus avec des gouttes de jaune d'œuf. Ce projet s'est donc arrêté aux phases préliminaires.

Un travail préliminaire sur la méduse *Aurelia Aurita* a également été effectué, en collaboration avec Annemiek Cornelissen, MSC. Le développement de ces animaux est rapide et implique la formation de nombreux canaux entre l'endoderme et la couche musculaire située sous la méduse. La formation des canaux est génératrice de contraintes qui pourraient être impliquées dans une expression génétique localisée et spécifique. L'objectif a donc été d'injecter les capteurs au niveau de l'endoderme, où se forme les canaux, afin de mesurer les contraintes développées, puis de les relier à une carte d'expression génétique. Cependant, l'endoderme est un tissu très fin ($\approx 50 \mu\text{m}$ d'épaisseur), entouré de mésoglé, un réseau réticulé extrêmement mou. L'injection des capteurs exactement à l'endroit voulu est donc compliquée. De plus, même une fois anesthésiée, des micro-contractions réflexes de la méduse ont lieu, rendant l'imagerie difficile.

Finalement, nous nous sommes tournés vers un quatrième système : l'embryon du poisson-zèbre. En effet, ce système réunit toutes les conditions pour mener une étude : un intérêt biologique (voir section suivante), une injection relativement simple, et une possibilité d'imager facilement les phénomènes étudiés.

3.3.2.2 Le poisson-zèbre

Système modèle



FIGURE 3.4 – Photographie d'un poisson-zèbre à l'âge adulte.

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un poisson originaire du sud-est de l'Asie, de 2 à 4 cm de long au stade adulte (fig. 3.4). Trouvant son nom de référence auprès du zèbre, du fait de ses rayures bleues sur toute la longueur de son corps, le poisson-zèbre est utilisé dans la recherche depuis les années 60, et est devenu depuis un organisme modèle majeur pour l'étude du développement [113].

En effet, le poisson-zèbre présente de nombreux avantages pour une telle étude. Tout d'abord, l'embryon de ce poisson est transparent tout au long du développement (fig. 3.5). Cette caractéristique permet d'étudier et de visualiser par microscopie le développement des organes, avec précision, au cours de l'embryogenèse.

Les stades précoces sont également accessibles à l'observation car au moment de la reproduction, les œufs sont fertilisés et se développent entièrement en dehors du corps des parents : il est donc facile de les isoler et de les observer. D'autant que, à l'état d'embryon comme à l'état adulte, le poisson-zèbre est petit et robuste. La manipulation de l'embryon sous un microscope présente peu de risques de lui causer d'importants dégâts.

Outre ses qualités physiologiques, le poisson-zèbre est un vertébré qui, à ce titre, est assez proche de l'Homme d'un point de vue évolutif, et dont la proximité génétique a pu être établie. Depuis 2013, l'intégralité de son génome a été séquencée et publiée [114]. 70 % de notre génome est commun avec celui du poisson-zèbre, et 84 % des gènes associés à des maladies génétiques humaines ont un équivalent chez cet animal modèle. Ces équivalences ont d'ores et déjà permis d'importantes avancées dans la lutte contre le cancer [115] [116] ou des dystrophies musculaires [117], par exemple.

De même, les organes et tissus humains ont un équivalent chez cet animal, avec pour avantage qu'ils se développent bien plus rapidement; l'évolution sur 24 h d'un embryon de poisson-zèbre équivaut à 1 mois de développement d'embryon humain. Cette rapidité de développement permet d'étudier et de suivre des phénomènes auxquels il est souvent difficile d'accéder chez l'homme.

Outre l'avantage que comporte la proximité génétique entre l'homme et le poisson-zèbre, le séquençage de son patrimoine génétique a également autorisé une production de mutants [113], permettant des études ciblées de certaines voies de signalisation et de fonctionnement de mécanismes moléculaires.

Enfin, en plus des avantages purement biologiques, ce système modèle a également un avantage économique. En effet, le coût d'entretien des poissons-zèbre est très bas, là où le coût d'élevage de souris est extrêmement élevé. Les poissons-zèbre demandent peu d'entretien et fournissent, chaque semaine, une importante quantité d'embryons (quelques milliers d'embryons par poisson femelle et par semaine).

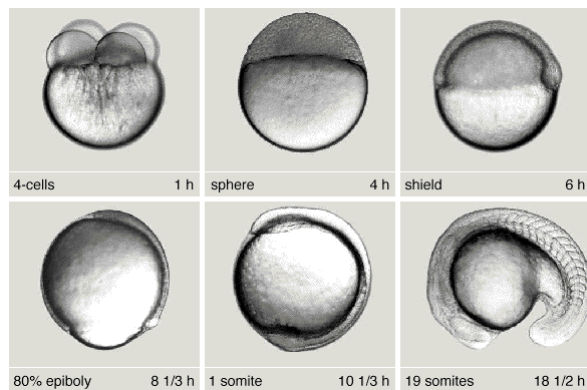


FIGURE 3.5 – Image en microscopie en lumière blanche d'un embryon de poisson-zèbre à différents stade du développement. [118]

Le poisson-zèbre dispose de nombreuses qualités biologiques, physiologiques et économiques justifiant son utilisation comme système modèle en biologie et en biomécanique.

Stade du développement embryonnaire

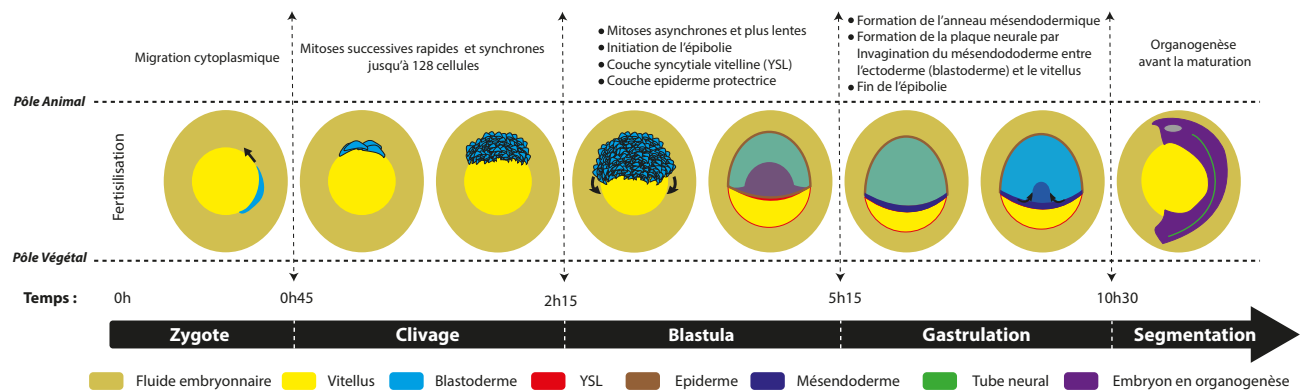


FIGURE 3.6 – Schéma des étapes au cours des 24 premières heures du développement embryonnaire du poisson-zèbre.

Le développement d'un embryon du poisson-zèbre s'étale sur une trentaine de jour, mais bon nombre des processus critiques et communs à beaucoup d'espèces se déroulent au cours des 24 premières heures (fig. 3.6). Voyons tout d'abord, sommairement, les différentes étapes de l'embryogenèse [119] du poisson-zèbre.

- Tout d'abord nous avons la période du Zygote, qui dure environ 45 minutes. Cette étape survient dès que l'œuf est fertilisé par la rencontre des deux gamètes.

L'œuf fertilisé se compose alors d'un fluide embryonnaire, d'un cytoplasme et d'une vésicule appelée « vésicule vitelline », ou vitellus, qui est la réserve nutritive de l'embryon. Le cytoplasme et le noyau diploïde formés par la fertilisation sont sur la paroi du vitellus, lui-même au centre du fluide embryonnaire.

Dès que l'œuf est fertilisé, la cellule formée par le cytoplasme et le noyau diploïde, que l'on appelle blastomère, se met en mouvement vers le pôle animal. Une fois arrivé à destination, le blastomère prend du volume et s'étale partiellement sur le vitellus pour former le blastoderme. Ce dernier effectue une première mitose, donnant deux blastomères de tailles identiques.

- Cette première mitose est la première d'une longue succession de divisions rapides : c'est l'étape de clivage. Durant cette période d'une heure et demie, les blastomères passent du nombre de 2 à 128. Six divisions successives se font, toutes les 15 minutes, de façon synchrones et sans variation de volume global : à chaque division, les cellules filles sont deux fois plus petites que la cellule mère.
- A $t=2h15$, l'embryon est composé de 128 blastomères disposés en dôme sur le vitellus du côté du pôle animal : cette structure est appelée la blastula. L'épibolie débute à ce stade : les cellules du blastoderme commencent à envahir la paroi du vitellus tout en continuant à se diviser. Les divisions deviennent progressivement asynchrones et les cycles s'allongent avec le temps.
- A 512 cellules, on atteint la structure de mid-blastula. L'épibolie continue, et une augmentation de la transcription zygotique s'opère, aboutissant à la formation des trois premières lignées cellulaires distinctes de l'embryon.

Deux de ces lignées sont extra-embryonnaires : la première est la couche externe qui recouvre le dôme du blastoderme (épiderme), et la seconde est la couche syncytiale vitelline (YSL) qui sépare le blastoderme de la réserve vitelline [120].

Le blastoderme est la troisième lignée qui formera l'embryon a proprement parler.

- A partir de $t=5h15$, 50 % de l'épibolie est effectuée : c'est alors l'étape de gastrulation qui débute. Le front des cellules du blastoderme en progression s'épaissit formant un anneau de cellule : le mésendoderme.

Le blastoderme (ou ectoderme) continue à envahir le vitellus avec, en front de progression, le mésendoderme. Cette structure forme alors le neurectoderme. Dans le même temps, une partie du mésendoderme progresse en sens inverse, vers le pôle animal, entre le blastoderme et le vitellus : c'est la formation de la plaque pré-chordale.

- A partir de $t=10h30$, c'est la période de segmentation, durant laquelle les différents feuilletts se connectent et s'organisent dans l'espace les uns par rapport aux autres.
- Cela est suivi par l'organogenèse, au cours de laquelle les organes se forment. Cette période dure plusieurs jours.

- Et enfin, nous avons la maturation, au cours de laquelle l'organisme grossit et finit de se développer pour donner une larve qui deviendra un poisson-zèbre mature au bout de 30 jours.

Qu'il s'agisse de réarrangements morphologiques, ou d'activation génétique en réponse aux contraintes externes, la mécanique joue un rôle essentiel dans de nombreux processus au cours du développement embryonnaire.

Plus particulièrement, l'étape de gastrulation est une étape riche en terme de morphogénèse et de mouvements cellulaires : c'est au cours de cette étape que l'embryon est le plus modifié dans son ensemble, avec l'épibolie, une internalisation du mésendoderme, et la convergence et extension des différents tissus. Cependant, les mécanismes engendrant ces formations sont encore assez méconnus. Nous allons nous intéresser plus précisément à l'un d'entre eux : la formation de la plaque pré-chordale.

Problématique

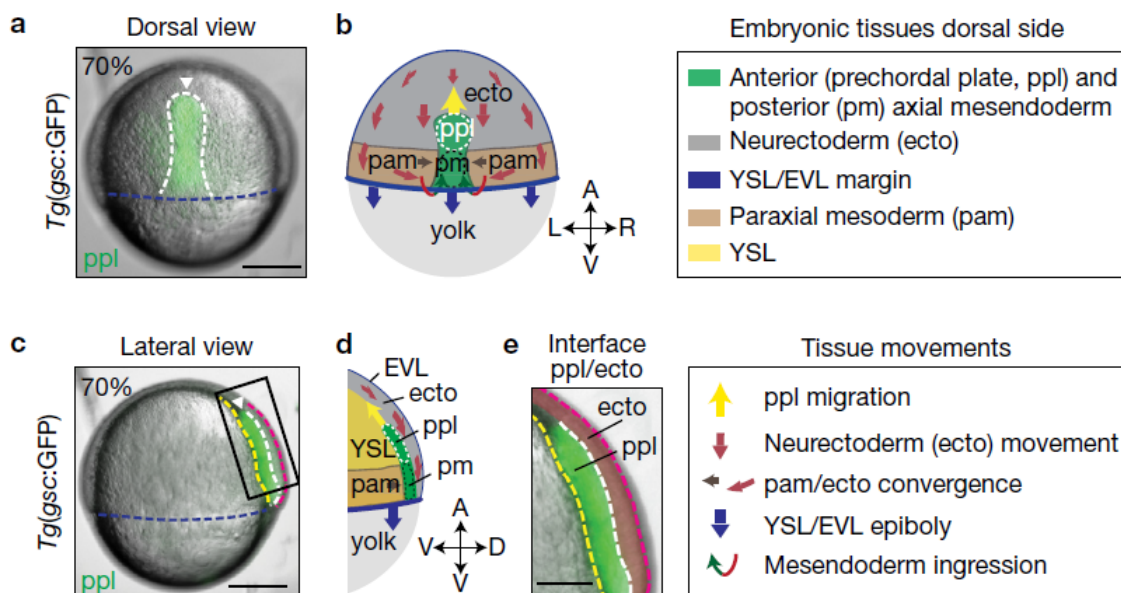


FIGURE 3.7 – Morphogénèse du neurectoderme (ecto) et de la plaque pré-chordale (ppl) pendant la gastrulation. (a,c) Image en lumière blanche d'un embryon du poisson-zèbre en gastrulation. Un marqueur GFP permet la visualisation en fluorescence des cellules de la plaque pré-chordale. (a) Vue dorsale de l'embryon. La ligne en pointillé blanc montre la délimitation de la plaque pré-chordale. (c) Vue latérale de l'embryon. La ligne pointillée blanc sépare la plaque pré-chordale du neurectoderme. La ligne jaune montre la délimitation entre la couche vitelline (YSL) et la plaque pré-chordale. (e) est un zoom de l'encadré noir de (c). (b) et (d) sont les schémas associés aux images (a) et (c-e) respectivement. Le neurectoderme (ecto) envahi le vitellus en direction du pôle végétal (flèche rouge). Le front de l'anneau du mésendoderme (bleu) continue sa progression avec le neurectoderme. Pendant le même temps, un mouvement paraxial du mésendoderme se fait latéralement (pam / marron). Une invagination se fait alors, et des cellules entrent en progression vers le pôle animal (flèche jaune). Figure issue de l'article [121]

Parmi les phénomènes mis en jeu, le processus de formation de la plaque pré-chordale reste encore incompris.

La plaque pré-chordale est formée au cours de la gastrulation, à partir des cellules de l'anneau mésendodermique. Ces dernières s'invaginent entre le blastoderme et la couche vitelline (YSL), puis migrent vers le pôle animal (fig. 3.7 b. et d.). La structure en migration est alors formée de la plaque pré-chordale en tête de cortège, et du mésendoderme axial postérieur (notochorde) en retrait (fig. 3.7 b.). Cette migration se fait à contre-sens de celle du neurectoderme qui continue sa progression vers le pôle végétal en recouvrant le vitellus.

La question qui se pose est : par quel mécanisme la plaque pré-chordale et la notochorde sont-elles conduites vers le pôle animal ?

Pour qu'une cellule migre dans une direction donnée, elle doit être polarisée. L'étude menée par Weber et al. [122] sur des cellules uniques du mésendoderme du Xénope indique que ces cellules ne sont pas naturellement polarisées mais qu'il est possible d'induire une polarité grâce à l'application d'une contrainte de traction, entre 2 et 4 Pa [122], d'un côté de la cellule. Lors de cette traction, la cellule se polarise en développant des protrusions à l'opposé de la contrainte appliquée. Cette polarisation indique donc qu'en réponse à une contrainte de traction, la cellule se polarise en direction opposée à cette traction.

D'autre part, Dumortier et al. [15], ont effectué la greffe d'une cellule unique du mésendoderme sur un embryon en développement au début de l'invagination du mésendoderme. La cellule unique est placée sur la trajectoire de la plaque en développement. Tant qu'elle reste isolée, la cellule conserve ses capacités de migration et se déplace de façon aléatoire, sans direction définie. Cependant, dès que la cellule unique rencontre la plaque pré-chordale endogène, la cellule se repolarise afin d'entamer un déplacement coordonné avec la plaque pré-chordale en formation, vers le pôle animal.

Cette seconde expérience suppose donc qu'il existe une signalisation entre les cellules, leur permettant de se polariser de telle sorte qu'elles migrent collectivement en direction du pôle animal. De plus, étant donné que la cellule unique ne se repolarise qu'au contact de la plaque pré-chordale endogène, on suppose que le contact entre cellules est nécessaire pour que l'information puisse être transmise.

Dans une autre étude, Smutny et al. [121] montrent que des forces de friction sont générées à l'interface entre les cellules du mésendoderme de la plaque pré-chordale qui migrent vers le pôle animal, et les cellules du neurectoderme qui migrent vers le pôle végétal (fig. 3.7 d.). Les E-Cadhérines sont des protéines transmembranaires reliées au cytosquelette de la cellule et permettent les liens intercellulaires. Elles sont exprimées par les deux types cellulaires, le neurectoderme et la plaque pré-chordale. Le travail cité a montré que la déplétion en E-cadhérine dans l'embryon diminue drastiquement la capacité de la plaque pré-chordale à se polariser en direction du pôle animal. Ainsi, la présence de ces liaisons E-Cadhérines, entre les cellules de la plaque pré-chordale et celles du neurectoderme, est nécessaire pour que les cellules de la plaque pré-chordale se polarisent correctement et migrent vers le pôle animal.

Enfin, une expérience menée par Boutillon & David [unpublished observations], montre que lorsqu'on effectue une ablation du lien entre la notochorde et la plaque pré-chordale, alors cette dernière s'immobilise sa migration jusqu'à ce que la migration de la notochorde permette de rattraper la plaque pré-chordale. Dès lors que le lien est rétabli, la plaque pré-chordale ré-initie sa migration vers le pôle animal.

Ces différents éléments suggèrent donc la présence d'un gradient de contraintes au sein de la plaque pré-chordale et de la notochorde, toutes les deux en progression vers le pôle animal (fig. 3.7). Ces contraintes pourraient être générées par la friction entre les deux tissus. Afin de tester cette hypothèse, et donc déterminer le mécanisme de la progression de la plaque pré-chordale vers le pôle animal, nous avons proposé d'insérer nos capteurs de contraintes au sein de la notochorde et de la plaque pré-chordale, afin de mesurer et cartographier les contraintes de cisaillement au cours du développement.

Deuxième partie

Méthodes expérimentales

Chapitre 4

Les capteurs

4.1 L'élastomère constitutif

4.1.1 Composition chimique

L'élastomère constitutif des capteurs est un polymère réticulé (fig. 4.1) à partir de deux composants : le DMS-V22 (DiMéthylSiloxane-V22, Gelest™, Cas n° 68083-19-2) et un hydrure de silyle (le Methylhydrosiloxane-Dimethylsiloxane copolymer trimethylsiloxane terminated, Gelest™, Cas n°68037-59) (fig. 4.2). La réaction de réticulation est une création de liaison entre un carbone vinylique et un atome de silicium [123].

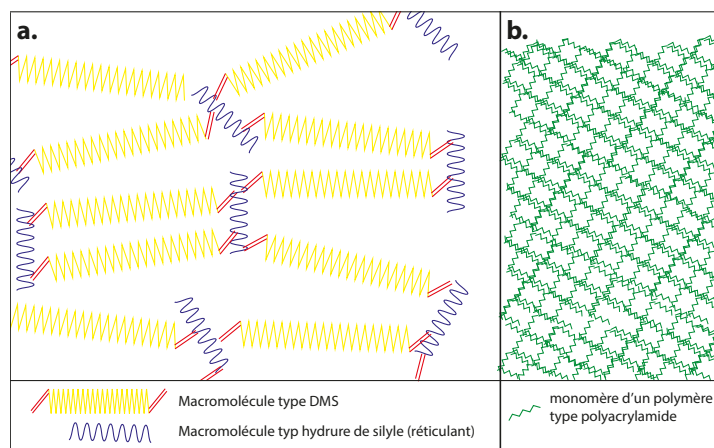


FIGURE 4.1 – (gauche) Schéma du réseau de l'élastomère produit. (droite) Schéma classique d'un polymère type poly-acrylamide.

Cette réticulation diffère de celles plus classiques, comme celle du polyacrylamide par exemple, car les éléments du réseaux sont eux-mêmes des macromolécules préalablement formées (fig. 4.1). Si toutefois nous faisons une analogie avec la réticulation du polyacrylamide, le DMS est le bloc élémentaire, équivalent au monomère du polyacrylamide : c'est le composant majoritaire de l'élastomère. Il porte en réalité deux fonctions réticulables à ses extrémités.

L'hydrure de silyle (noté χ) sera ci-après dénommé réticulant car c'est le composé minoritaire. Celui-ci porte environ 7 sites réactifs par molécules.

La nature macromoléculaire du monomère et du réticulant confère à ce gel une structure à larges pores, très lâche, et donc de faible module élastique.

De plus, afin que la réaction de polymérisation ait lieu, il est nécessaire d'ajouter un catalyseur, un complexe de platine, appelé catalyseur de Karstedt [124] (que nous noterons Pt). Enfin, afin de contrôler la cinétique de réaction, un inhibiteur (noté Υ), le diallylmaleate, est également ajouté. Ces trois composés sont mélangés en proportion molaire suivantes par rapport au DMS (voir protocole 11.4 en annexe) :

$$q(\chi) = \frac{n(\chi)}{n(\text{DMS})} = 1,37.10^{-1} \quad (4.1)$$

$$q(\Upsilon) = \frac{n(\Upsilon)}{n(\text{DMS})} = 3,82.10^{-2} \quad (4.2)$$

$$q(\text{Pt}) = \frac{n(\text{Pt})}{n(\text{DMS})} = 4,13.10^{-3} \quad (4.3)$$

La proportion en réticulant χ correspond à celle nécessaire pour obtenir un élastomère de module de cisaillement final d'environ 500 Pa, mais cette proportion est ajustable selon le module élastique que l'on veut obtenir. Les propriétés mécaniques du gel sont en revanche moins sensibles aux variations de quantité de catalyseur et d'inhibiteur.

4.1.2 Réaction de polymérisation

Plus spécifiquement, la réaction de réticulation est une hydrosilylation d'oléfine catalysée par un complexe de platine [123] [125], appelé catalyseur de Karstedt [124] (Platinum(0) in Xylène, SigmaTM, Cas n^o : 68478-92-2). Cette réaction fait intervenir dans son mécanisme les étapes élémentaires typiques de la réactivité organométallique. Le platine y sert tantôt d'accepteur d'électrons, tantôt de donneur d'électron, ce qui lui permet de rompre ou former des liaisons dans sa sphère de coordination. Ainsi, il assiste la rupture de la liaison Si-H, celle de la double liaison vinylique et promeut la formation de deux nouvelles liaisons C-H et C-C. Le mécanisme détaillé est donné en figure (4.3 a). Il met en évidence les variations de densité électronique sur le platine au cours de la réaction ainsi que les ruptures et créations de liaisons d'intérêt pour la réticulation. La figure 4.3b explicite le bilan de la réaction de polymérisation. Les lecteurs souhaitant un complément d'information sur les étapes mécanistiques décrites dans la figure sont invités à se référer à un livre de chimie organométallique (ex : Shiver and Atkins [126]).

4.1.3 Effet de l'inhibiteur sur la polymérisation

Dans le schéma réactionnel précédent, l'inhibiteur n'apparaît pas mais il est présent dans la composition de l'élastomère : c'est un dialcène (diallylmaleate, fig. 4.2, SigmaTM, Cas n^o : 999-21-3). Il présente une réactivité similaire à celle du bloc principal (DMS). Il peut donc lui aussi subir une ré-

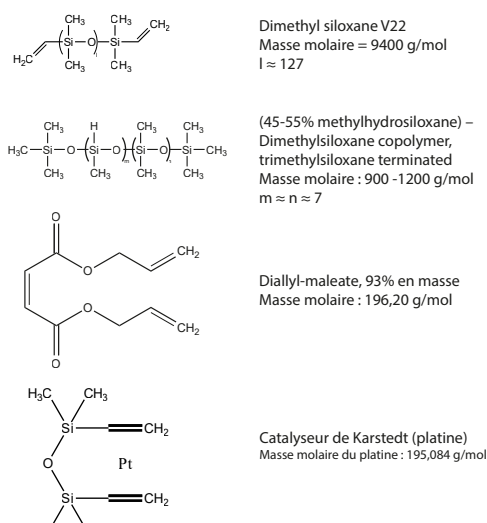


FIGURE 4.2 – Formules développées des produits composants le gel. Le bloc élémentaire : DiMéthylSiloxane-V22. Réticulant : (45-55% methylhydrosiloxane)-Dimethylsiloxane copolymer, trimethylsiloxane terminated (hydrure de silyle, noté χ). Catalyseur de Karstedt : le platine (noté Pt). Inhibiteur : DiallylMaleate (noté Υ)

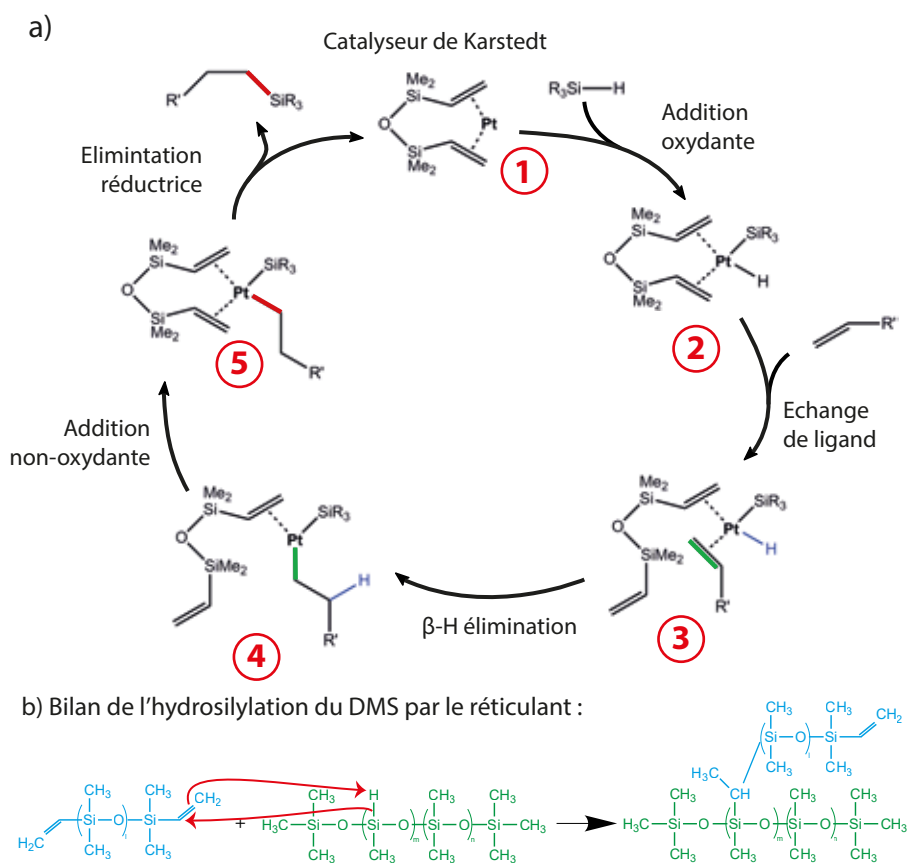


FIGURE 4.3 – a. Schéma de la réaction d'hydrosilylation par le catalyseur de Karstedt. b. Bilan réactionnel de la réaction entre le DMS et le réticulant utilisé.

action d'hydrosilylation suivant le même mécanisme. L'intermédiaire réactionnel 4 ainsi formé est stable à basse température. Il peut être isolé et caractérisé par spectroscopie. Cela signifie qu'il est très peu réactif. Sous la forme de l'intermédiaire 4 du diallylmalléate, le catalyseur se trouve donc cinétiquement bloqué. Si le diallylmalléate est introduit en excès par rapport au Pt, comme cela est le cas pour l'élastomère que nous utilisons, la réactivité du catalyseur se trouve significativement entravée, le mélange réactionnel est dans un état figé. Pour déstabiliser l'intermédiaire réactionnel obtenu avec l'inhibiteur, il est nécessaire d'augmenter la température. Cet apport d'énergie permet de libérer le catalyseur et de relancer la réaction de réticulation de l'élastomère : le DMS est en compétition avec le diallylmalléate qui est progressivement consommé. En plus des quantités de catalyseur et d'inhibiteur, la température joue donc elle aussi un rôle crucial puisqu'elle permet la réticulation sur commande de l'élastomère, ainsi que le contrôle de sa cinétique.

Afin d'obtenir un élastomère aux propriétés reproductibles, chaque concentration de produit doit être mesurée avec une grande précision, et la température de durcissement contrôlée.

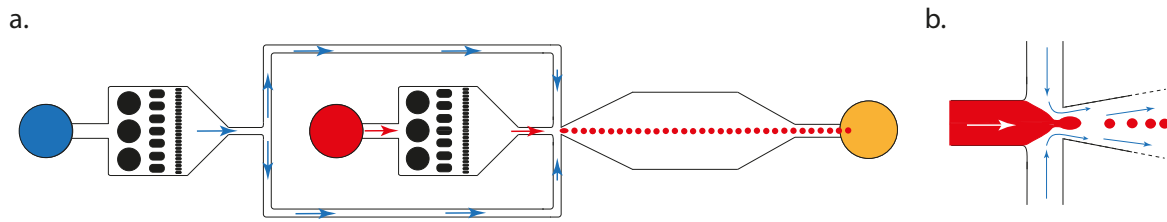


FIGURE 4.4 – Schéma de principe de fonctionnement du circuit micro-fluidique à concentration de flux. L'eau (bleue) est injectée en amont. Le mélange polymérisable (rouge) est injecté sous pression contrôlée. Les jets d'eau et de mélange polymérisable se rencontrent perpendiculairement. L'eau exerce une force de cisaillement sur le filet de mélange polymérisable qui s'écoule. L'instabilité de Rayleigh-Plateau entraîne le décrochage d'une goutte qui est emportée dans le flux d'eau vers la sortie (jaune). A droite, un grossissement de l'intersection entre l'eau et le mélange polymérisable.

4.2 Production des capteurs

La production des capteurs sphériques se fait en deux étapes : dans un premier temps, une émulsion mono-disperse du mélange polymérisable est faite, puis on procède à la réticulation à chaud des gouttes formées.

4.2.1 Micro-fluidique : concentration de flux (flow focusing)

L'émulsion du mélange polymérisable est réalisée à l'aide d'un système classique de micro-fluidique, dit à « focalisation de flux » (ou « flow-focusing ») [127], couramment utilisé pour l'émulsification de deux phases non miscibles. Cette méthode permet la production d'une émulsion contrôlée très mono-disperse et stable dans le temps grâce au contrôle des pressions d'injection.

Dans cette méthode, le mélange polymérisable (liquide visqueux avant polymérisation), que nous appellerons phase disperse (phase D), est émulsifié dans une phase porteuse (phase P) : de l'eau. Les deux phases se rencontrent à un embranchement de 4 canaux perpendiculaires : l'eau est injectée symétriquement et perpendiculairement au mélange polymérisable et les deux phases s'écoulent ensuite dans un même canal de sortie (fig. 4.4b).

Les injections sont contrôlées en imposant, indépendamment pour les deux phases, les pressions d'entrée à l'aide d'un générateur de pression. La phase D est poussée vers le canal de sortie par sa pression d'injection, mais est également soumise à des forces de cisaillement imposées par la phase P [128].

Ainsi, à l'embranchement des canaux, un filet de la phase D se met en place. Ce filet s'amincit au niveau de l'embranchement de manière quasi-stationnaire [129] sous l'effet du forçage hydrodynamique de la phase P. Du fait de son injection constante, le mélange progresse vers la sortie, et une excroissance se forme en aval du filet. L'écoulement devient instable en raison des instabilités capillaires de Rayleigh-Plateau. C'est alors qu'une goutte se détache du filet et est emportée dans le flux de la phase porteuse vers la sortie. Une nouvelle excroissance se forme : le processus recommence.

Ce processus est bien connu pour la formation de bulles dans un liquide. Cependant, bien que des modèles existent [130] [131], étant donné la variabilité de rapports d'aspect géométriques caractérisant les dispositifs de focalisation de flux, et la difficulté de connaître les paramètres de tension de surface entre le mélange polymérisable et la phase porteuse, aucune loi simple ne permet de prédire la taille des gouttelettes. Il apparaît que la taille des canaux est cruciale pour fixer la taille maximum des gouttes formées. Ensuite, la taille peut être modulée par les pressions d'injection des différentes phases.

En nous basant sur la littérature existante et sur les tests expérimentaux que nous avons réalisés, nous avons conçu un circuit adapté à nos besoins, dont les dimensions sont présentées dans l'annexe 13.1. Les gouttes de mélange polymérisables formées dans l'eau peuvent avoir un diamètre allant de 10 μm à 40 μm , selon les pressions imposées. L'intégralité du procédé de production des gouttes de mélange polymérisable est détaillé dans l'annexe. 14.1.

4.2.2 Polymérisation à chaud

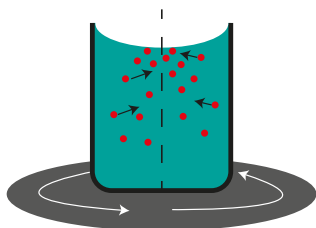


FIGURE 4.5 – L'émulsion de mélange polymérisable est mise sur un plateau tournant (2tr/sec) afin de permettre aux gouttes (et aux capteurs après polymérisation) de se re-concentrer au centre du récipient et ainsi éviter le contact avec les surfaces.

La polymérisation des gouttes de mélange polymérisable doit être effectuée à chaud. Pour cela, on place l'émulsion eau/mélange polymérisable à 80°C dans un récipient fermé. Une fois l'élastomère polymérisé, il est très collant et adhère sur toute paroi avec laquelle il est en contact (verre, plastique... et même le teflon). Il est donc impératif de limiter les interactions entre les surfaces des contenants et les capteurs. Pour cela, on tire profit du fait que les capteurs ont une densité inférieure à celle de l'eau (environ 0,96) et se concentrent à la surface libre air/eau par effet de crémage. On place le contenant de l'émulsion sur un agitateur rotatif tournant à environ 2tr/s, lui même dans une étuve à 80°C. Les gouttes polymérisent et, par effet centripète, se rassemblent au centre du récipient. Ainsi, après 5 heures de polymérisation, les capteurs polymérisés peuvent être récupérés à l'aide d'un cône de micropipette

en plastique. Au centre de la surface la suspension l'échantillon prélevé est alors très concentré en capteurs. Pour limiter les effets de collage des capteurs sur la surface, l'embouchure de la pipette doit être d'un diamètre supérieur à environ 2 mm.

4.2.3 Conservation des capteurs

Une fois les capteurs produits, il est nécessaire de pouvoir les conserver plusieurs jours. Pour cela, nous congelons les échantillons très rapidement dans l'azote liquide pour éviter que les billes ne collent aux parois du contenant pendant que l'eau gèle. Les tubes Eppendorf sont mis au congélateur jusqu'à utilisation. Il suffit alors de laisser décongeler l'échantillon avant utilisation. On a pu vérifier que l'état des capteurs avant et après congélation est identique. La fluorescence n'est pas altérée non plus par ce processus.

4.3 Marquage fluorescent et visualisation des capteurs

4.3.1 Techniques explorées (non retenues)

4.3.1.1 Méthodes classiques

Afin de rendre l'élastomère fluorescent, nous nous sommes dans un premier temps tournés vers les fluorophores classiquement utilisés en biologie, en sélectionnant ceux qui ont un caractère hydrophobe afin de mieux s'incorporer au DMS. Ainsi, nous avons essayé d'incorporer au DMS successivement de la fluorescéine, de la fluorescéine diacétate, du Rouge du Nil (Nile Red), et enfin du Xylénol orange. Cependant, ces composés sont tous partiellement hydrophiles et, par conséquent, difficilement miscibles au DMS. Cette immiscibilité partielle entraîne la formation d'émulsions du fluorophore dans le DMS, et donc une séparation des composés, conduisant à une inhomogénéité de la fluorescence.

Lors de l'intégration du Nile Red, le plus lipophile de ces composés, l'élastomère formé est fluorescent à l'échelle macroscopique. Cependant, à l'échelle d'un capteur, une inhomogénéité de la dispersion du Nile Red est visible. Cette inhomogénéité est un réel problème pour une détection précise des contours. On peut remédier à ce problème en intégrant de faibles quantités de Nile Red : la fluorescence est alors homogène mais devient trop faible pour être exploitable en milieu biologique. De plus, cette fluorescence diminue avec le temps : le composé diffuse à travers les pores de l'élastomère et est partiellement relargué dans l'eau.

4.3.1.2 La Cryptolyte™

En cherchant un fluorophore compatible avec les élastomères, la Cryptolyte™[132] est apparu comme une solution simple. Ce produit, qui est utilisé pour des effets spéciaux au théâtre et au cinéma, est un additif liquide permettant de rendre fluorescent les matériaux siliconés. Ainsi, sous l'effet d'une source U.V., le silicone est rendu fluorescent. Lors de l'ajout de ce produit au mélange polymérisable (entre 0,5% et 1% en masse), les capteurs produits ont une fluorescence notable et homogène, permettant une bonne reconstitution des contours du volume.

Cependant, au cours de diverses expériences, il est apparu que la fluorescence observée diminuait avec le temps. Pour quantifier ce phénomène, nous avons mesuré la perte de signal sur plusieurs jours, en imageant dans les mêmes conditions des séries de capteurs et en moyennant leurs intensités. On observe une perte des deux tiers du signal après seulement deux jours (courbe fig. 4.6). Au-delà du fait que ce niveau de fluorescence n'était pas suffisant pour une reconstitution efficace du contour du capteur en trois dimensions, nous avons supposé que le fluorophore diffusait dans l'eau de suspension des capteurs : le relargage d'un composé chimique de synthèse dans des tissus biologiques vivants n'est pas souhaitable. De plus, la composition du produit est protégée par un brevet : nous ne pouvons pas manipuler ou transformer ce composé. Nous avons donc décidé d'arrêter l'utilisation de ce produit.

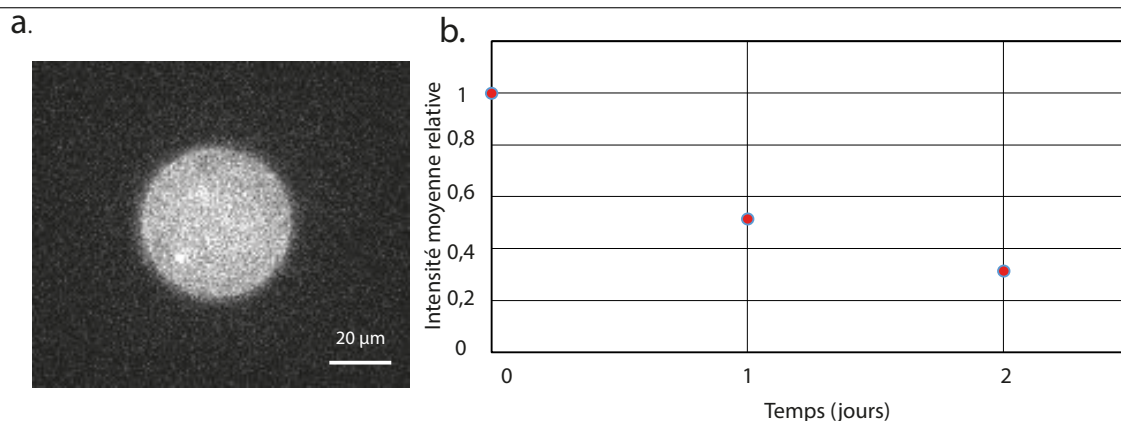


FIGURE 4.6 – a. Image par microscopie spinning disk d'un capteur avec de la Cryptolyte™(60x) [132]. b. évolution de la fluorescence des capteurs en fonction du temps.

4.3.1.3 Points quantiques (QDs)

Suites aux divers essais que nous avons pu mener précédemment, il apparait que pour rendre l'élastomère fluorescent, un objet remplissant les conditions suivantes doit être trouvé :

- un objet hydrophobe et qui se disperse facilement dans le DMS
- suffisamment gros pour qu'il reste piégé dans les mailles du réseau de l'élastomère, ou qu'il puisse se fixer à ce dernier
- et enfin, fluorescent dans les longueurs d'onde usuelle de microscopie classique

Les points quantiques colloïdaux (QD) sont des fluorophores faits de nanocristaux de matériaux semi-conducteurs de quelques nanomètres de diamètre. Leur synthèse est généralement réalisée en solvant organique apolaire et conduit à des QDs hydrophobes. Ils ont donc constitué notre troisième cible. Cette méthode est ici détaillée bien qu'elle n'ait pas permis d'offrir de résultats satisfaisant dans le temps qui nous a été imparti. En effet, nous pensons que cette méthode est prometteuse et peut permettre un marquage fluorescent efficace de l'élastomère moyennant quelques ajustements du protocole décrit.

Présentation des points quantiques Les points quantiques colloïdaux (QD) sont des nanocristaux fluorescents sous l'effet d'une excitation lumineuse. Cette dernière apporte suffisamment d'énergie pour permettre à un ou plusieurs électrons de franchir la bande interdite, le faisant passer de la bande de valence du QD à la bande de conduction. Le QD a alors un électron excité dans la bande de conduction et un trou dans la bande de valence. La paire électron-trou relaxe progressivement vers son état fondamental : l'électron transfère une partie de son énergie au trou par interaction coulombienne, puis le trou relaxe de façon non radiative jusqu'au sommet de la bande de valence par émission de phonons. Dès lors que la paire électron-trou est dans son état de plus basse énergie, l'électron transite vers la bande de valence en émettant un photon d'énergie équivalente à l'écart énergétique de la bande interdite.

L'utilisation des QDs offre de nombreux avantages. Tout d'abord, ils sont beaucoup moins sujets au photo-blanchiment, permettant alors une durée d'irradiation et une intensité plus importantes. De plus, leur section efficace d'absorption est plus élevée : à rendements quantiques et concentrations égales, les QDs sont plus brillants que les fluorophores organiques. Enfin, leur longueur d'onde d'émission est, en principe, plus facile à ajuster à l'application souhaitée que celle d'un fluorophore organique donné : les QDs de diamètre plus petit conduisent à une bande interdite plus grande, donc une émission décalée vers le bleu par rapport aux QDs de plus grand diamètre.

Les QDs que nous avons testés, en collaboration avec Gaëlle Charron (laboratoire MSC), possèdent un gradient de composition entre un noyau de Cadmium-Sélénium (CdSe) et une couche externe de Zinc-Soufre (ZnS). On peut représenter schématiquement ces QDs par trois couches successives CdSe/CdS/ZnS (figure 4.8). D'autre part, pour assurer leur stabilité colloïdale, les QDs sont passivés en surface par des acides oléiques. Ce traitement rend la surface hydrophobe, et permet alors de maintenir les QDs en solution organique sans qu'ils ne s'agrègent.

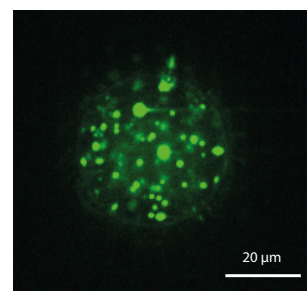


FIGURE 4.7 – Image au spinning disk d'un capteur avec des points quantiques CdSe-ZnS non traités (x60).

Introduction des points quantiques bruts Nous avons voulu incorporer les points quantiques CdSe dans l'élastomère. Les QDs sont maintenus en solution dans du chloroforme, parfaitement miscible au DMS, et facilement extrait du mélange puisque très volatil. Cependant, après incorporation de la solution de QDs et évaporation du chloroforme, lors de la réticulation de l'élastomère, des zones d'agrégation de QDs se forment (fig. 4.7). Comme pour le Nile Red, l'inhomogénéité de la fluorescence empêche la détection efficace du contour du volume et risque d'induire des inhomogénéités mécaniques dans l'élastomère. De plus, après plusieurs jours, on observe une décroissance de la fluorescence dans le gel. Ceci s'explique par la diffusion des QDs à travers les mailles de l'élastomère. Ce dernier étant lâche avec une taille de maille du réseau importante ($\sim 10 - 20$ nm), les QDs d'une dizaine de nanomètres de diamètre environ peuvent diffuser à travers l'élastomère : une partie des QDs diffusent dans le milieu, et de nouveaux agrégats se forment dans l'élastomère.

Pour optimiser l'incorporation des QDs dans l'élastomère, deux méthodes ont été envisagées. La première est d'augmenter la taille de la couche protectrice des QDs pour éviter leur diffusion dans l'élastomère, et ensuite d'optimiser leur dispersion dans le mélange polymérisable. La seconde méthode est de créer des liaisons covalentes entre les mailles de l'élastomère et les acides oléiques en surface des QDs.

Optimisation 1 : Gonflement de la couche lipophile des points quantiques Pour cette première méthode, nous avons décidé de grossir artificiellement la couche de stabilisation des QDs en enrobant ces derniers de POAMA (Poly (maleic anhydride-alt-1-octadecene)), un copolymère alterné à brosse, dont les chaînes latérales sont longues de 16 carbones et fortement hydrophobes. Cette brosse de polymère s'intercale entre les chaînes d'acide oléique présentes en surface des QDs, expo-

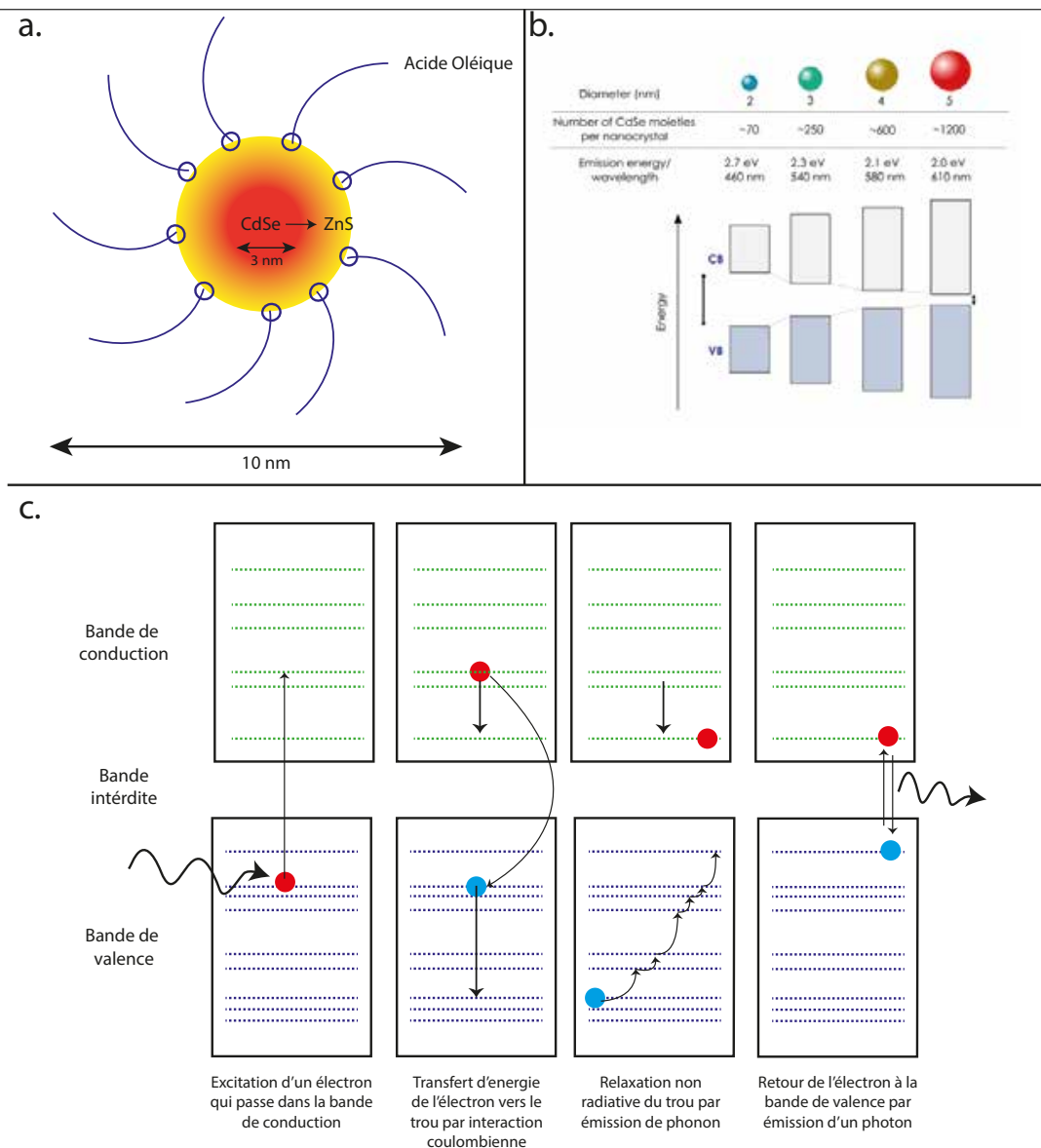
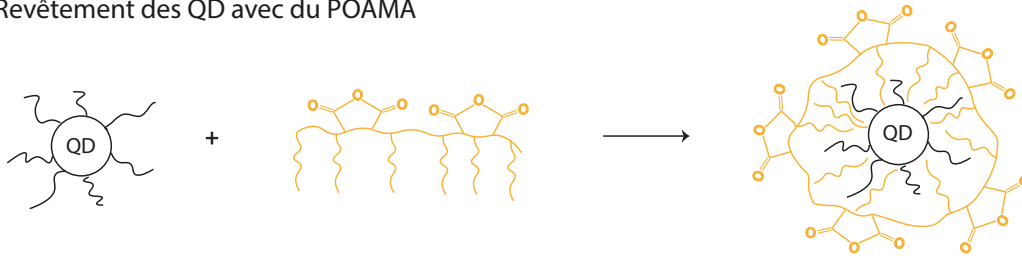


FIGURE 4.8 – a. Schéma simplifié d'un point quantique de coeur CdSe (Cadmium-Sélénium) et de couche externe de ZnS (Zinc-Soufre). b. Evolution de la couleur d'émission des QDs et de la taille de la bande interdite en fonction du diamètre du point quantique (figure extraite de Jasienuak et al. [133]). c. Schéma de principe de fonctionnement d'émission d'un photon par les QDs (figure extraite de la thèse de I. Mallek-Zouari [134]).

sant ainsi vers la solution aqueuse des groupements anhydrides maléiques (fig. 4.9) [135]. Les anhydrides maléiques sont très réactifs vis-à-vis des amines, ce qui permet de fonctionnaliser la surface par la suite. Cette propriété est mise à profit pour greffer à la surface des QDs une chaîne siloxane portant des fonctions amines primaires. Le composé finalement obtenu est constitué d'un QD enrobée d'une gangue hydrophobe et en surface de laquelle s'étendent des brins siloxanes similaires aux brins constitutifs de l'élastomère. Cette stratégie a pour but d'améliorer la dispersion des QDs dans la matrice élastomère tout en minimisant leur diffusion hors des billes.

Cette méthode a permis de diminuer le nombre d'agrégats dans l'élastomère. Cependant, bien que le protocole pour disperser efficacement les QDs traités dans le mélange polymérisable puisse être amélioré, le nombre d'agrégat est resté trop élevé. Cette méthode ne s'est donc pas montrée suffisamment efficace pour être utilisable et la méthode que nous proposons dans la suite présente de meilleurs résultats et est moins lourde expérimentalement.

1- Revêtement des QD avec du POAMA



2- Couplage des QD enrobés par le POAMA, avec un PDMS aminé réactif aux anhydrides

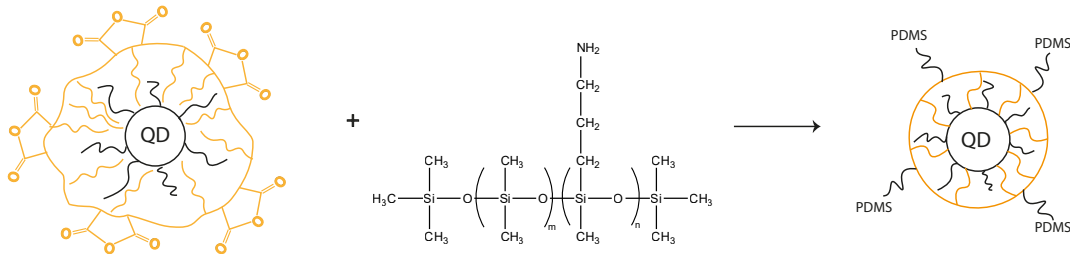


FIGURE 4.9 – Schéma de principe de protocole de gonflement de la couche lipophile des QDs. 1. Une chaîne longue de POAMA vient se fixer fortement par interactions de Van der Waals avec la couche lipophile des QDs. 2. Les groupements anhydrides présents sur le POAMA sont réactifs avec l'amine présent sur le PDMS aminé, permettant ainsi de fixer ce dernier au QD. La couche de revêtement du QD est ainsi gonflée, diminuant la diffusion des QDs dans l'élastomère.

Optimisation 2 : Introduction d'une liaison covalente avec l'élastomère Créer une liaison covalente entre les mailles du réseau et les QDs est la solution la plus efficace afin d'avoir une fluorescence homogène et stable dans le temps. Pour cela, nous avons mis en œuvre le même principe réactionnel que la polymérisation de l'élastomère. En effet, lors de la réaction de polymérisation de l'élastomère (hydrosilylation), une fonction vinyle du réticulant réagit avec un atome de Silicium (sec. 4.1.2). Ici, on souhaite alors utiliser les fonctions vinyloxy présentes sur les acides oléiques stabilisant les QDs afin de lier covalamment ces derniers avec les mailles de l'élastomère.

De premiers essais ont été réalisés mais la présence d'un grand nombre d'acides oléiques sur chaque QD entraîne la formation de multiples liaisons sur un même QD. Cet effet indésirable a tendance à augmenter par endroits la réticulation du polymère et rend hétérogène les propriétés mécaniques de l'élastomère. Ce problème devrait être néanmoins surmontable avec un travail supplémentaire raisonnable. Cependant, afin d'obtenir une fluorescence fonctionnelle dans un délai rapide, nous avons finalement concentré nos efforts sur la méthode de marquage décrite ci-dessous.

4.3.2 Couplage entre l'élastomère et la rhodamine B-isothiocyanate

L'idée est de limiter la diffusion du fluorophore dans la matrice du polymère, que ce soit la diffusion vers l'extérieur de la matrice, ou la diffusion en son sein conduisant à la formation d'agrégats, en le liant de façon covalente aux chaînes de polymères. Pour perturber le moins possible la réaction de polymérisation, l'idéal est d'utiliser pour cette fonctionnalisation par les fluorophores la même réaction d'hydrosilylation que celle permettant la réticulation. Cette stratégie paraissant compliquée à implémenter avec les QDs, nous nous sommes à nouveau tournés vers des fluorophores moléculaires plus classiques.

Après des recherches chez différents fournisseurs, nous n'avons pas réussi à trouver de fluorophore commercial portant une fonction hydrure de silyle ou une fonction vinyle. Nous avons donc entrepris d'en synthétiser un nous-mêmes, en collaboration avec Gaëlle Charron (laboratoire MSC). La stratégie employée consiste à coupler un fluorophore réactif aux amines, la rhodamine-B isothiocyanate, à une amine portant un groupement vinyle, l'allylamine (fig. 4.10a).

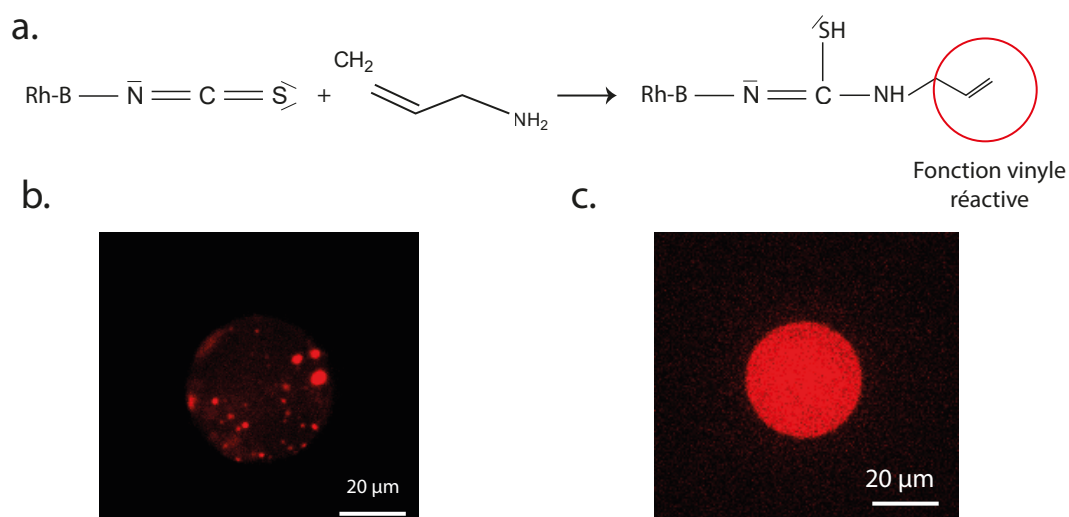


FIGURE 4.10 – a. Bilan réactionnel entre la rhodamine-B isothiocyanate et l'allylamine. Le produit formé dispose d'une fonction vinyl (entourée en rouge), pouvant réagir avec le réticulant selon le mécanisme d'hydrosilylation présenté. b. Image confocale d'un capteur avec de la rhodamine-B isothiocyanate avant traitement par l'allylamine : la rhodamine est agrégée. c. Image confocale (60x) d'un capteur fonctionnalisé par la rhodamine-B isothiocyanate couplée à l'allylamine : la fluorescence est homogène.

La rhodamine-B isothiocyanate est un fluorophore couramment utilisé : sa longueur d'onde d'excitation optimale est de 544 nm et sa longueur d'onde d'émission de 562 nm. Le groupement isothiocyanate est très réactif avec les amines. Il réagit ainsi avec l'amine primaire de l'allylamine : une fonction vinyle est ainsi associée au fluorophore et peut réagir, à l'instar du DMS, avec l'hydrure de silyle.

En pratique, afin d'obtenir une fluorescence homogène, il est nécessaire d'optimiser la dispersion du fluorophore transformé dans le DMS en passant le mélange au sonificateur pendant plusieurs minutes, tout en maintenant une température inférieure à 40°C à l'aide d'un bain de glace pour éviter

toute dégradation des composés.

Avec cette méthode, on obtient une fluorescence homogène dans l'élastomère, permettant une bonne visualisation par microscopie du volume (fig 4.10c). C'est, à notre connaissance, la seule méthode existante permettant un marquage en fluorescence homogène et stable du PDMS (voir annexe 11.3).

4.3.3 Méthodes de microscopie

Différentes méthodes de microscopie (fig. 4.11) nous permettent de visualiser en 3 dimensions, avec une bonne précision, un capteur marqué en fluorescence. Ces techniques ont chacune des avantages différents : leur utilisation doit être choisie avec soin selon les systèmes étudiés.

4.3.3.1 Le confocal

Une des méthodes de microscopie 3D très répandue est le confocal (fig. 4.11 a) [136]. Un laser est focalisé à l'aide d'un premier "trou d'épingle" (pinhole en anglais, ou sténopé) dont on fait l'image sur un point précis de l'échantillon. Ce laser excite localement l'échantillon dont les molécules fluorescentes renvoient à leur tour des photons de longueur d'onde différente. Sur le chemin optique des rayons émis, un second pinhole est placé, conjugué optiquement au premier : il permet la collecte ciblée de la fluorescence émanant uniquement d'un point focal donné du plan focal. L'ouverture de ce pinhole permet de définir la résolution de l'image obtenue : plus il est fermé, plus la résolution est grande aux dépens de l'intensité lumineuse collectée. Cette méthode de microscopie permet l'étude 3D jusqu'à 100 μm de profondeur dans un tissu vivant. Puisque l'image faite est ponctuelle, il est nécessaire d'opérer un balayage sur l'échantillon afin d'en observer l'intégralité : ce balayage est coûteux en temps et empêche donc d'observer des dynamiques cellulaires rapides. Finalement, il faut un compromis entre l'intensité d'éclairement, le nombre de voxels par image, et la vitesse d'acquisition. Pour pallier à cela, l'intensité du laser et les temps d'excitation sont souvent augmentés, élevant les risques de photo-toxicité et de photo-blanchiment des échantillons.

Pour notre étude, le temps de balayer l'intégralité du volume de notre capteur est de l'ordre de la minute, durée pendant laquelle des mouvements cellulaires peuvent fausser la reconstitution de forme.

4.3.3.2 Le spinning-disk

Le spinning-disk [137] est une technologie dérivant du confocal, qui permet de s'affranchir certaines de ses limitations (fig 4.11 b.). En effet, avec ce second type de microscope on balaye plusieurs points simultanément à l'aide d'un disque Nipkow. Ce disque possède des micro-trous d'épingles (les pinholes) d'une cinquantaine de micromètres de diamètre, arrangés en spirale. La présence de ces trous permet de balayer tous les points de l'échantillon à chaque rotation du disque (une dizaine par seconde). Le spinning-disk permet d'augmenter la vitesse d'acquisition d'un échantillon par rapport à un confocal classique, et donc de diminuer le temps d'exposition de l'échantillon au laser. Cela limite le photo-blanchiment et la photo-toxicité. Cependant le spinning-disk a une résolution plus faible que celle du confocal et les profondeurs de travail sont comparables à celles du confocal (100 μm maximum également).

4.3.3.3 La microscopie 2-photons

La troisième technologie (fig. 4.11c, d), plus récente, utilise le principe d'absorption à deux photons [138]. En effet, certaines molécules, peuvent absorber simultanément deux photons (ou plus). C'est grâce à l'utilisation de laser pouvant délivrer des impulsions sub-picoseconde que l'on atteint des intensités suffisantes pour exciter un échantillon de cette manière : par un mécanisme non-linéaire, la molécule absorbe deux photons d'énergie identique, chacun ayant à la moitié de l'énergie nécessaire à l'excitation de la molécule (fig 4.11 d.), donc de longueur d'onde deux fois plus grande que pour une excitation à un photon. Une fois excitée, la molécule se désexcite selon un processus classique à un photon, que l'on récupère sur un capteur pour reconstituer l'image.

La microscopie à deux photons tire profit du fait que la longueur de diffusion des rayons lumineux dans les tissus biologiques aux grandes longueurs d'onde est moins importante qu'aux petites (10 fois moins importante à 800 nm qu'à 450 nm), permettant l'imagerie d'objet jusqu'à 300 μm de profondeur. De plus, la section efficace d'absorption à deux photons est proportionnelle au carré de l'intensité de la lumière incidente. La probabilité d'absorption diminue donc très rapidement lorsqu'on s'éloigne du point de focalisation du laser, ce qui diminue le bruit de fond de la fluorescence. La taille du pinhole de focalisation peut être ainsi augmentée, optimisant la quantité de lumière récupérée par la fluorescence sans pour augmenter les intensités lumineuse d'excitation. Néanmoins, cette technologie reste très coûteuse, demande un excellent alignement des lasers et n'est pas toujours adaptée à l'étude de systèmes vivants (contrôle en CO₂, thermalisation...). Enfin, le choix de la molécule fluorescente doit être fait avec soin pour optimiser sa fluorescence pour ce type de microscopie.

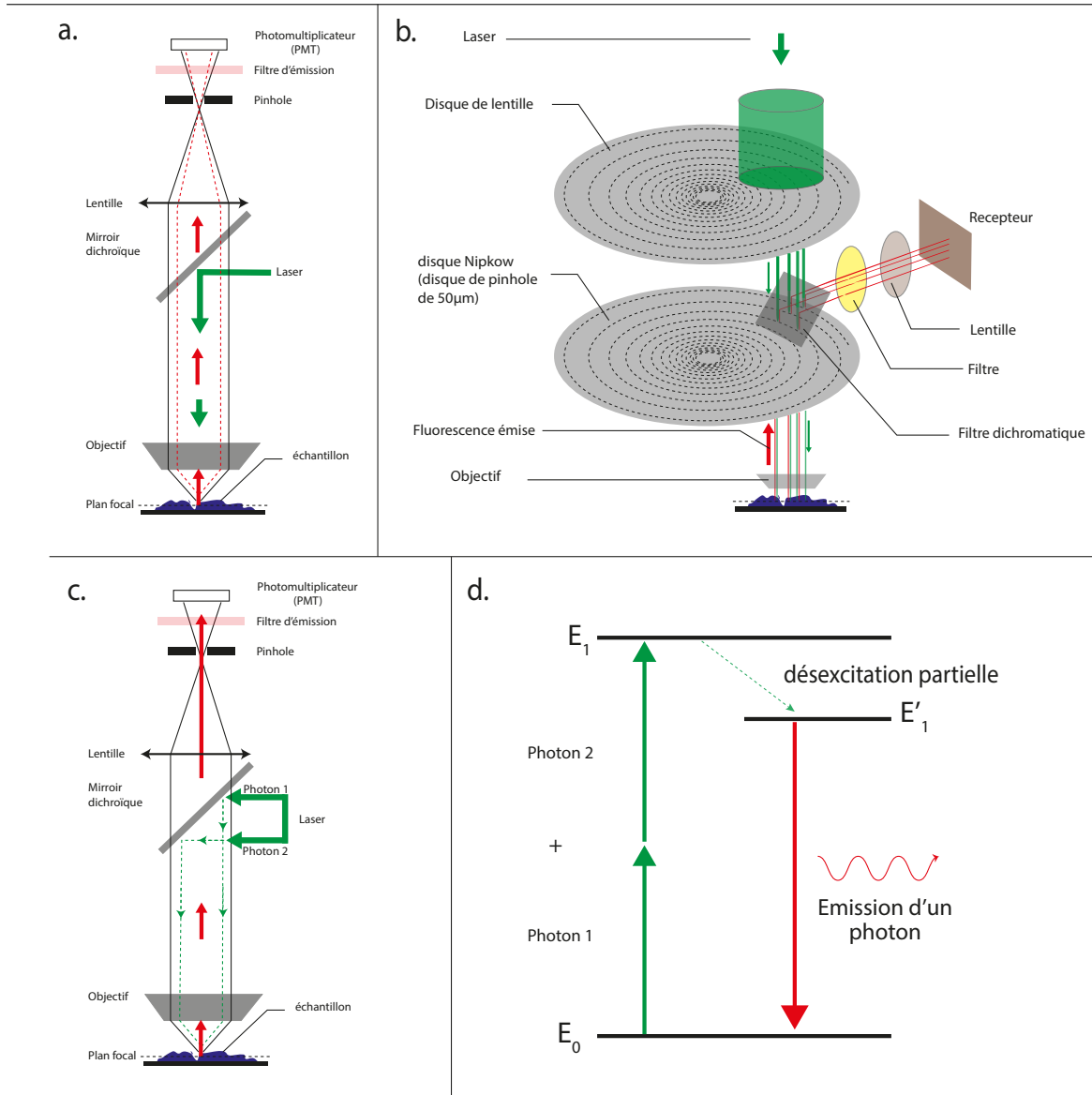


FIGURE 4.11 – a. Schéma du fonctionnement d'un microscope confocal. [136] b. Schéma de principe d'un microscope Spinning-disk [137]. c. Schéma du fonctionnement d'un microscope à 2-photons. d. Principe d'excitation et désexcitation d'une molécule par deux photons d'énergie égale. [138]

4.4 Fonctionnalisation des capteurs

4.4.1 Biocompatibilité de l'élastomère

Pour que les capteurs puissent être utilisés sur des systèmes biologiques, l'élastomère doit être biocompatible, et interférer au minimum avec le développement du système étudié. Pour s'assurer de ce point, trois types cellulaires (MDCK, CT26 et F9) que nous avons étudiés ont été mis en culture dans des boîtes avec un substrat en élastomère. Mis à part un ralentissement de la croissance (d'environ 30%), les trois types cellulaires se sont développés normalement sur l'élastomère (fig. 4.12) et atteignent la confluence. Le ralentissement de croissance peut notamment s'expliquer par le fait que l'élastomère est très mou, et que les cellules s'y ancrent difficilement.

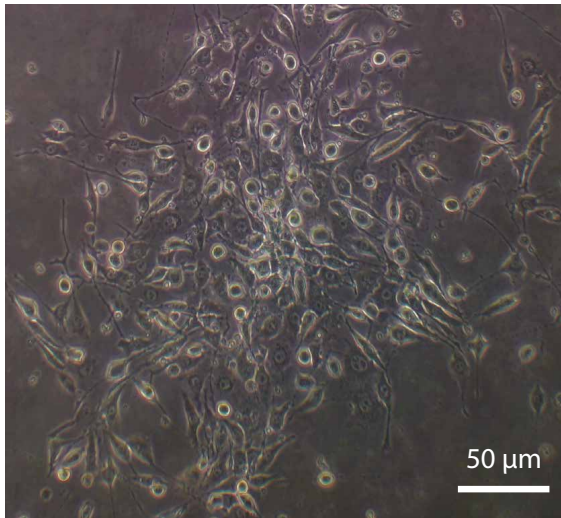


FIGURE 4.12 – Image en lumière blanche de cellules CT26 se développant sur une surface recouverte de l'élastomère. On constate que les cellules peuvent se développer en adhérant correctement. Leur aspect est équivalent à celui de cellules se développant sur substrat dur.

Pour optimiser l'insertion des capteurs dans les systèmes biologiques, il est nécessaire de fonctionnaliser leur surface avec des protéines d'adhésion cellulaire. Cette fonctionnalisation peut varier selon les protéines membranaires exprimées par le type cellulaire étudié. Les deux grandes familles de protéines d'adhésion cellulaire sont les cadhérines pour l'adhésion entre cellule et les intégrines pour l'adhésion de la cellule à son substrat (la matrice extracellulaire en général). Cependant, toutes les cellules n'expriment pas les deux familles de protéines.

4.4.2 Fibronectine

Pour les types cellulaires exprimant majoritairement des intégrines et peu de cadhérines, un traitement de surface par des protéines se fixant à ces intégrines [139] [140] doit être effectué. La fibronectine est une protéine candidate idéale pour cela : couramment utilisée en biologie pour le traitement de surface, c'est une glycoprotéine présente dans la matrice extra-cellulaire et se fixant spécifiquement aux intégrines membranaires [140]. La fonctionnalisation des surfaces par la fibronectine est simple : on prépare une solution à 50 µg/mL de fibronectine dans du PBS. On laisse incuber cette solution en contact avec la surface à traiter, à 37°C pendant une 1h. On rince ensuite avec du PBS.

Dans notre cas, il est difficile de rincer les capteurs : ces derniers sont déjà en solution aqueuse et les en retirer entrainerait leur adhésion aux parois, les rendant donc inutilisables. Pour qu'une opération de rinçage soit possible, il faut éviter au maximum le contact avec les parois du contenant. On peut en principe utiliser une membrane semi-perméable, permettant de rincer progressivement la suspension. Il est également possible de tirer avantage du crémage des capteurs (c'est-à-dire de la remontée à la surface des capteurs sous l'effet de la poussée d'Archimède). Après crémage, on retire la moitié du contenant de la solution à l'aide d'un robinet de vidange, puis on remplit à nouveau le récipient avec une solution de PBS, et on laisse de nouveau crémier. On répète l'opération autant que nécessaire, jusqu'au rinçage optimal.

Cependant, ces étapes de rinçage sont très compliquées à mettre en œuvre. C'est pourquoi nous n'avons pas opéré de rinçage dans nos expériences. Nous considérons que l'excédent de fibronectine restant en solution est suffisamment dilué lorsqu'il est injecté avec le milieu de culture utilisé pour

la culture des cellules ou des agrégats. En effet, pour la formation de ces derniers, nous ajoutons 2 mL de suspension de capteurs (soit environ 50 µg de préparation de fibronectine) dans 20 mL de milieu de culture. Nous avons donc ajouté la fibronectine directement à la suspension de capteur, laissé incuber à 37°C pendant 1 h, puis utilisé la solution telle quelle.

4.4.3 Cadhérine

Les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines membranaires assurant l'adhésion intercellulaire. Leur lien avec la caténine permet un pont mécanique direct entre l'extérieur de la cellule et son cytosquelette [141] [142]. Étant exprimées par une grande partie des cellules, effectuer un traitement de surface des capteurs par ces protéines augmenterait la pertinence de la mesure effectuée : les cellules se fixeraient au capteur fonctionnalisé par des cadhérines comme à une autre cellule, rendant la présence du capteur la moins perturbative possible. Les cellules exerceraient ainsi des contraintes mécaniques sur le capteur dans des conditions proches des conditions physiologiques.

Cependant, traiter une surface d'élastomère par une cadhérine est plus compliqué que par la fibronectine. En effet, d'une part le coût financier des cadhérines est très élevé, et les étapes de fonctionnalisation de l'élastomère sont plus nombreuses et plus compliquées qu'avec la fibronectine. D'autre part, il ne s'agit pas de traiter une surface macroscopique plane, mais la surface divisée des micro-capteurs en suspension, processus dans lequel les étapes de rinçage sont déterminantes. Dans un premier temps nous avons travaillé sur la pré-fonctionnalisation des capteurs par une molécule intermédiaire, pour permettre ensuite la fixation des cadhérines, ou tout autre protéine d'intérêt.

4.4.4 Traitement PAA

Afin de fonctionnaliser la surface des capteurs, la stratégie est d'y greffer d'abord une fonction chimique qui sera réactive avec la protéine d'intérêt (cadhérine, fibronectine ou autre). Les fonctions acides carboxyliques COOH sont de bonnes candidates puisqu'elles sont très réactives avec les amines portées par l'ensemble des protéines.

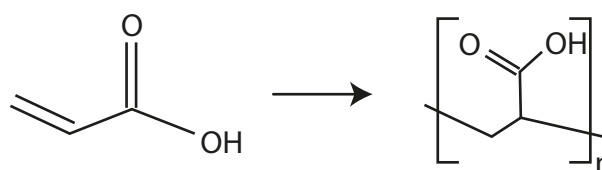


FIGURE 4.13 – Formule développée de l'acide acrylique et du poly-acide acrylique (PAA) après polymérisation.

Pour fonctionnaliser les capteurs par une fonction carboxylique COOH, on a choisi de faire polymériser de l'acide acrylique (AA) à leur surface (fig. 4.13). Cette polymérisation nécessite un amorceur : la benzophénone [143][144][145]. Ce dernier est introduit au mélange polymérisable (0,25% en masse, cf protocole 14.4 et 4.14). Nous avons vérifié que cet ajout ne modifie pas le protocole de formation des capteurs et nous avons vérifié qu'il ne change pas les propriétés mécaniques du gel. L'acide acrylique est directement ajouté à la suspension de capteurs : lorsque la benzophénone qui

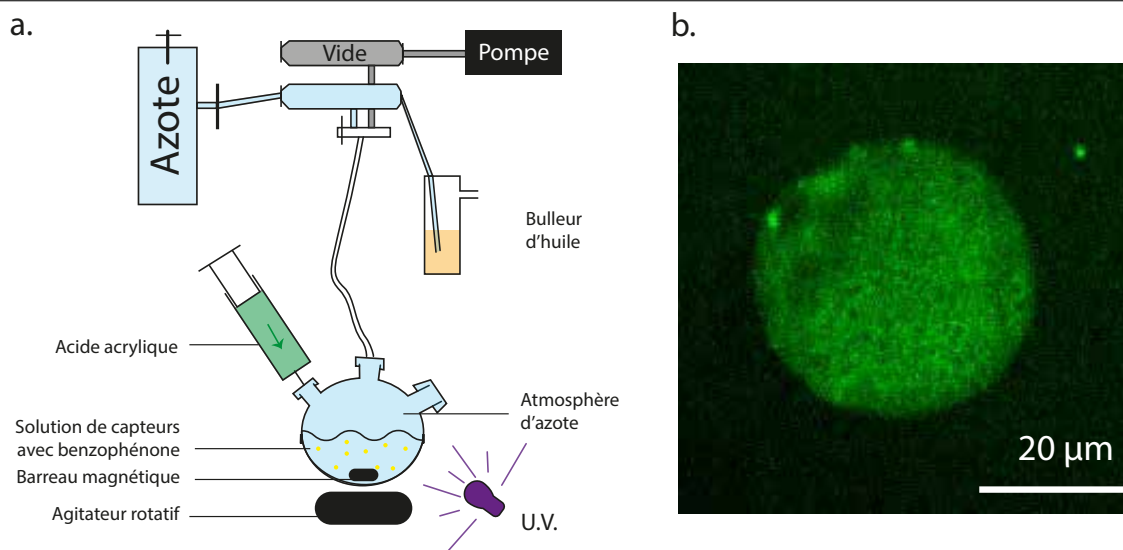


FIGURE 4.14 – Schéma du montage de traitement de surface des capteurs par le poly-acide-acrylique. Les capteurs en suspension sont mis sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation de l'acide acrylique par le dioxygène. On injecte une solution d'acide acrylique, et illumine par des U.V. lointain (240 nm) pendant 3 minutes. L'excès d'acide acrylique en solution est ensuite neutralisé avec de la soude, jusqu'à ce que la suspension de capteurs soit à pH neutre. b. Image confocale (grossissement x20) d'un capteur fonctionnalisé par PAA. Le gel n'a pas été marqué par fluorescence au préalable. L'ajout de la benzophénone a été fait à 0,25% en masse. Le capteur traité en surface a ensuite été mis en solution avec de la fluoresceine.

est en surface des capteurs se retrouve au contact de l'acide acrylique, et sous une exposition d'U.V. lointain (240 nm), l'acide acrylique polymérise sur la benzophénone et une couche de PAA se forme à la surface des capteurs. A l'issue de cette étape, la surface de l'élastomère possède des fonctions carboxyliques, réactives aux amines. En principe, ces fonctions devraient permettre la fixation de protéines à la surface par réaction avec leurs amines. Cependant, les capteurs doivent être récupérés et rincés de l'excès d'acide acrylique : n'ayant pas pu trouver un traitement de surface du verre empêchant la perte des capteurs, nous n'avons pas été en mesure de poursuivre ce traitement de surface avec l'étape de fixation des cadhérines.

Si la fonctionnalisation par les cadhérines n'a pas pu être effectuée, nous avons cependant pu nous assurer que le couplage entre les fonctions carboxyliques fixées en surface de l'élastomère et les amines est fonctionnel. Pour cela, un fluorophore aminé (cf annexe 14.5) a été mis en contact avec la surface plane de l'élastomère (coulé dans une boîte de Petri) traité par l'acide acrylique. La visualisation au microscope permet d'observer une fluorescence en surface de l'élastomère, indiquant que le couplage entre les PAA et l'amine du fluorophore est effectif. Ce couplage a également été réalisé sur quelques capteurs qui ont pu être récupérés après fonctionnalisation au PAA. A l'issue du traitement, ces capteurs présentent une fluorescence en surface et également en volume. Cette observation confirme que le couplage est là aussi fonctionnel, mais indique également que la polymérisation de l'acide acrylique ne se fait pas uniquement en surface de l'élastomère. En effet, puisque la benzophénone est présente en volume dans le capteur et que la taille des mailles de l'élastomère est suffisamment grande pour laisser pénétrer l'acide acrylique dans le capteur, celui-ci polymérise également sur la benzophénone présente dans le capteur. Ensuite, lors de l'ajout du fluorophore, ce

dernier peut également pénétrer dans le capteur et se fixer sur le PAA : une fluorescence dans le volume du capteur est alors observée.

La fonctionnalisation des capteurs par des cadhérines n'est donc pas achevée du fait de la difficulté à récupérer et rincer les capteurs après un traitement. Néanmoins, la pré-fonctionnalisation par des acides carboxyliques est fonctionnelle et permet un couplage avec les amines.

Chapitre 5

Analyse

5.1 Relation contrainte-déformation dans un solide élastique et incompressible

Tenseur des contraintes

Comme nous l'avons défini dans l'introduction, une contrainte représente le rapport d'une force divisée par l'aire de la surface sur laquelle cette force s'exerce. Au contraire d'une force qui est un vecteur, la contrainte au sein d'un élément de volume matériel (fig. 5.1) est un tenseur d'ordre 2, représenté par une matrice 3x3 en dimension 3.

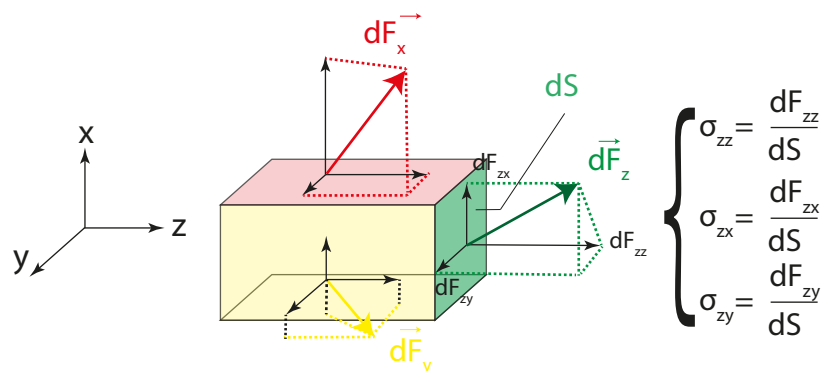


FIGURE 5.1 – Définition du tenseur des contraintes sur un volume élémentaire et dans une base (x,y,z).

Pour un volume élémentaire parallélépipédique, chaque composante σ_{ij} du tenseur des contraintes s'exprime en fonction de la force élémentaire $d\vec{F}_i$ qui s'exerce sur un élément de surface limitant le volume (fig. 5.1). Cette force élémentaire peut être décomposée selon les trois axes de la base choisie. On obtient alors par exemple $\sigma_{zz} = \frac{dF_{zz}}{dS}$ avec $dS_z = dx dy$; et de même on a $\sigma_{zx} = \frac{dF_{zx}}{dS}$; $\sigma_{zy} = \frac{dF_{zy}}{dS}$. Ce résultat peut être généralisé à toutes les faces du parallélépipède. Le tenseur $\bar{\bar{\sigma}}$ ainsi construit exprime les contraintes mécaniques existant localement en un point du solide. En notation matricielle

il s'écrit :

$$\bar{\bar{\sigma}} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (5.1)$$

$$\forall (i, j) \quad \sigma_{ij} = \sigma_{ji}$$

En effet, on montre que ce tenseur est symétrique [146]. Il se décompose en deux parties. La première composante, notée $\bar{\bar{\sigma}}_c$ est la composante isotrope dite de compression. La seconde composante est le déviateur de la composante de compression, dite de cisaillement : $\bar{\bar{\sigma}}_d$. Ainsi, on peut écrire le tenseur tel que :

$$\bar{\bar{\sigma}} = \bar{\bar{\sigma}}_c + \bar{\bar{\sigma}}_d = \frac{tr(\bar{\bar{\sigma}})}{3} \mathbb{1} + \begin{pmatrix} \sigma_{xx} - \frac{tr(\bar{\bar{\sigma}})}{3} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{xy} & \sigma_{yy} - \frac{tr(\bar{\bar{\sigma}})}{3} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{xz} & \sigma_{yz} & \sigma_{zz} - \frac{tr(\bar{\bar{\sigma}})}{3} \end{pmatrix} \quad (5.2)$$

où la trace du tenseur est $tr(\bar{\bar{\sigma}}) = \sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}$ et $\mathbb{1}$ est la matrice identité.

De plus, la matrice de $\bar{\bar{\sigma}}$ est symétrique et réelle, donc il existe une base orthonormée (X,Y,Z) dans laquelle elle est diagonale. Si P est la matrice de passage avec $P^t = P^{-1}$ de la base (x,y,z) vers (X,Y,Z), on a :

$$P \bar{\bar{\sigma}} P^t = \begin{pmatrix} \sigma_{XX} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{YY} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{ZZ} \end{pmatrix} = \frac{tr(\bar{\bar{\sigma}})}{3} \mathbb{1} + \begin{pmatrix} \frac{2\sigma_{XX} - \sigma_{YY} - \sigma_{ZZ}}{3} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2\sigma_{YY} - \sigma_{XX} - \sigma_{ZZ}}{3} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{2\sigma_{ZZ} - \sigma_{XX} - \sigma_{YY}}{3} \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

En effet, $tr(\bar{\bar{\sigma}}) = tr(P \bar{\bar{\sigma}} P^t)$. Les deux matrices des composantes isotropes sont égales avec $tr(\bar{\bar{\sigma}}) = -3p$, où p est la pression isotrope dans le matériau.

Sous l'effet de contraintes mécaniques, un solide peut se déformer de manière visco-élastique, voire plastique. La nature et l'intensité des déformations dépendent du temps et du type de matériau qui est sollicité : chaque matériau possède sa propre loi de comportement. A l'échelle de la dizaine de micromètre (cellules, capteur..), pour des temps supérieurs à la seconde, nous considérons que le PDMS est purement élastique (voir Chap. 5.2.1), c'est-à-dire que, suite à l'application d'une contrainte, la réponse élastique est mesurée lorsque le régime transitoire (la relaxation) est terminé. De plus, dans toute la suite de ce travail, nous nous intéressons uniquement aux petites déformations, c'est-à-dire de moins de 10%. A ce niveau de déformation, en considérant le solide comme purement élastique, homogène et isotrope, on se place dans la limite de l'élasticité linéaire.

Dans le cas particulier d'un matériau incompressible, celui-ci ne change pas de volume. Le capteur que nous développons a une taille suffisamment faible devant l'échelle de variation des contraintes, pour faire pour l'hypothèse que le tenseur des contraintes est homogène sur tout le volume du capteur.

Tenseur des déformations

Dans ce travail, on souhaite mesurer les déformations d'un objet initialement sphérique afin d'en déduire les contraintes qui lui sont appliquées à l'instant de la mesure. Pour décrire les déformations, introduisons le tenseur des déformations $\bar{\bar{\epsilon}}$. A l'instar du tenseur des contraintes, il est d'ordre 2 et s'écrit, dans une base orthonormée, sous la forme d'une matrice 3x3, réelle, symétrique et donc diagonalisable.

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \begin{pmatrix} \epsilon_{xx} & \epsilon_{xy} & \epsilon_{xz} \\ \epsilon_{yx} & \epsilon_{yy} & \epsilon_{yz} \\ \epsilon_{zx} & \epsilon_{zy} & \epsilon_{zz} \end{pmatrix} \quad (5.4)$$

$$\forall (i, j) \quad \epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}$$

Le matériau utilisé est supposé purement élastique, avec un module d'Young E. On note ν le coefficient de Poisson du matériau définissant sa compressibilité : $\nu \leq \frac{1}{2}$ dans le cas général et $\nu = \frac{1}{2}$ pour un matériau parfaitement incompressible. En considérant une déformation isotherme [146] la relation liant $\bar{\bar{\epsilon}}$ et $\bar{\bar{\sigma}}$ est donnée par :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \frac{1 + \nu}{E} \bar{\bar{\sigma}} - \frac{\nu}{E} tr(\bar{\bar{\sigma}}) \mathbb{1} \quad (5.5)$$

On peut réécrire l'équation 5.5 en remplaçant $\bar{\bar{\sigma}}$ par sa décomposition en la somme des contraintes de cisaillement et des contraintes isotropes telle que $\bar{\bar{\sigma}} = \bar{\bar{\sigma}}_d + \bar{\bar{\sigma}}_c$, et on obtient :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \frac{1 + \nu}{E} \left(\bar{\bar{\sigma}} - \frac{1}{3} tr(\bar{\bar{\sigma}}) \mathbb{1} \right) + \frac{1 + \nu}{E} \left(\frac{1}{3} tr(\bar{\bar{\sigma}}) \mathbb{1} \right) - \frac{\nu}{E} tr(\bar{\bar{\sigma}}) \mathbb{1} \quad (5.6)$$

En simplifiant l'expression 5.6, on obtient :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \frac{1 + \nu}{E} \bar{\bar{\sigma}}_d + \frac{1 - 2\nu}{E} \bar{\bar{\sigma}}_c \quad (5.7)$$

Or, le matériau est ici incompressible donc $\nu = \frac{1}{2}$. De l'équation 5.7, on obtient directement la formule :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \frac{3}{2E} \bar{\bar{\sigma}}_d \quad (5.8)$$

ayant pour propriété que $tr(\bar{\bar{\epsilon}}) = 0$ du fait de l'incompressibilité du matériau, compatible avec $tr(\bar{\bar{\sigma}}_d) = 0$, propriété du déviateur.

De plus, le module d'Young E est lié au module de cisaillement μ par la relation :

$$E = 2(1 + \nu)\mu \quad \text{or} \quad \nu = \frac{1}{2} \quad \text{donc} \quad E = 3\mu \quad (5.9)$$

En injectant l'équation 5.9 dans l'équation 5.8, on obtient la loi de Hooke :

$$\boxed{\bar{\bar{\sigma}}_d = 2\mu \bar{\bar{\epsilon}}} \quad (5.10)$$

Lorsque la contrainte appliquée à un capteur sphérique est homogène, au premier ordre, alors le capteur se déforme en un ellipsoïde. Finalement, de cette dernière équation 5.10, en mesurant les déformations et en connaissant les propriétés élastiques du matériaux, on peut déduire les contraintes de cisaillement qui s'exercent sur l'objet.

Cas particulier de la déformation d'une sphère incompressible

Pour le cas particulier d'un capteur initialement sphérique et de rayon a , lorsqu'il est contraint, on ajuste sa forme à un ellipsoïde de demi-axes (a_x, a_y, a_z) tel que $a_x a_y a_z = a^3$ (conservation du volume d'un solide incompressible). Finalement, pour une déformation infinitésimale dans une des directions propre i de la base naturelle de l'ellipsoïde, on a :

$$\epsilon_i = \frac{(x_i + dx_i) - x_i}{x_i} = \frac{dx_i}{x_i}$$

Pour une déformation finie, dans la base formée par les axes principaux de l'ellipsoïde, on a :

$$\int_a^{a_i} \frac{dx_i}{x_i} = \ln\left(\frac{a_i}{a}\right) \quad (5.11)$$

Cette définition est la "vraie déformation", utilisée en ingénierie. De plus, comme $a_x a_y a_z = a^3$, on a :

$$\sum_i \ln(a_i) = 3 \ln(a) \text{ et donc } \sum_i \ln\left(\frac{a_i}{a}\right) = 0 \quad (5.12)$$

Dans l'approximation des petites déformations on a $\ln\left(\frac{a_i}{a}\right) \approx \frac{a_i - a}{a}$ donc, dans la base des axes principaux de l'ellipsoïde, la matrice du tenseur des déformations est diagonale et s'écrit :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \begin{pmatrix} \ln\left(\frac{a_x}{a}\right) & 0 & 0 \\ 0 & \ln\left(\frac{a_y}{a}\right) & 0 \\ 0 & 0 & \ln\left(\frac{a_z}{a}\right) \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} \frac{a_x - a}{a} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{a_y - a}{a} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{a_z - a}{a} \end{pmatrix} \quad (5.13)$$

Donc finalement, dans la base naturelle à l'ellipsoïde, on a :

$$\boxed{\forall i \in (X, Y, Z) \quad \sigma_{d_i} = 2\mu \frac{a_i - a}{a}} \quad (5.14)$$

Ainsi, de l'ajustement du capteur au premier ordre par un ellipsoïde, on peut déterminer le tenseur des déformations du capteur dans la base des axes de l'ellipsoïde. A l'aide de la formule 5.14, et si on a mesuré indépendamment les coefficients élastiques du matériau, on en déduit le tenseur des contraintes de cisaillement, qui est diagonal dans cette même base.

5.2 Méthode pour la caractérisation mécanique

5.2.1 A l'échelle macroscopique : rhéomètre

Pour caractériser les propriétés mécaniques de l'élastomère utilisé, on cherche à déterminer son module de cisaillement μ , introduit dans la partie précédente. Pour cela on utilise un rhéomètre rotatif à déformation imposée. Cet outil permet, par l'application d'un cisaillement oscillant à une fréquence donnée, de déterminer les modules viscoélastiques (module de conservation G' et module de perte G''), et les forces normales. Les résultats donnés par ces rhéomètres sont des moyennes sur l'échantillon à grande échelle.

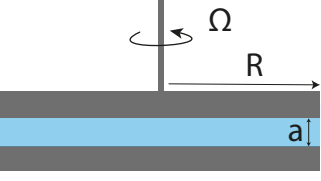
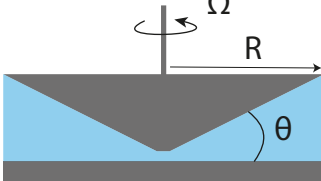
Géométrie plan-plan	Gradient de cisaillement	Contrainte de cisaillement
	$\dot{\gamma} = \frac{\Omega r}{a}$	$\frac{3C}{2\pi r^3} \left(3 + \frac{1}{3} \frac{d \ln(C)}{d \ln(\dot{\gamma})} \right)$
	$\dot{\gamma} = \frac{\Omega}{\theta}$	$\frac{3C}{2\pi R^3}$

FIGURE 5.2 – Schéma des deux géométries plan-plan et cône-plan [147] couramment utilisées pour l'étude rhéométrique des matériaux. A chaque géométrie est associée une expression du gradient de cisaillement développée par la rotation à la vitesse angulaire Ω de la partie mobile du rhéomètre (le rotor), et l'expression des contraintes de cisaillement. Pour la géométrie plan-plan, les deux sont dépendants du rayon auquel la mesure est faite, tandis que la géométrie cône-plan est exempte de cette dépendance. γ est la déformation, $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement appliqué, ou taux de déformation appliquée, et C le couple du rhéomètre.

Pour réaliser l'étude rhéologique, l'échantillon est introduit entre deux pièces coaxiales : l'une est mobile et l'autre est fixe. La partie mobile (le rotor) se voit appliquer un couple mécanique (oscillant à une pulsation ω) qui impose un cisaillement alternatif à l'échantillon situé entre les deux surfaces. En pratique, les deux surfaces sont souvent deux plans, un cône et un plan ou deux cylindres coaxiaux (géométrie de Couette)[147]. Dans nos études, nous utilisons uniquement les deux premières géométries.

Le taux de cisaillement appliqué $\dot{\gamma}$ que subit l'échantillon est déterminée à la fois par la vitesse de rotation du rotor Ω , et la géométrie de l'entrefer. Tandis que la géométrie cône-plan permet d'obtenir un cisaillement du matériau directement proportionnel à la vitesse de rotation du rotor et indépendant de la distance r à laquelle est effectuée cette mesure, la géométrie plan-plan conserve une dépendance avec le rayon. C'est pourquoi la déformation du matériau lors de l'utilisation d'une

géométrie cône-plan est homogène dans l'entrefer, facilitant l'analyse des résultats, mais ne l'est pas pour une géométrie plan-plan. Cependant, cette dernière permet une plus grande souplesse sur les paramètres d'entrefer, et donc sur les gammes d'étude des différents paramètres (taille, fréquences, viscosité ...) [148].

Lorsque l'échantillon subit un cisaillement, il exerce en retour un couple sur le rotor du rhéomètre. En enregistrant ce couple et en supposant que l'écoulement est homogène et sans glissement, la contrainte de cisaillement est calculée (fig. 5.2).

On applique une déformation de cisaillement telle que :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_0 \sin(\omega t) = \varepsilon_0 \frac{\exp(i\omega t) - \exp(-i\omega t)}{2i} \quad (5.15)$$

La réponse du matériau sondé est enregistrée et la contrainte est telle que :

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) = \sigma_0 \exp(i\delta) \frac{\exp(i\omega t) - \exp(-i\omega t)}{2i} \quad (5.16)$$

Le module de cisaillement est :

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{\varepsilon(\omega)} = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \exp(i\delta(\omega)) = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta(\omega)) + i \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin(\delta(\omega)) \quad (5.17)$$

et donc :

$$\begin{aligned} G^*(\omega) &= G'(\omega) + iG''(\omega) \\ G'(\omega) &= \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta(\omega)) \\ G''(\omega) &= \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin(\delta(\omega)) \end{aligned}$$

Où G' est le module de conservation et G'' le module de perte.

Finalement, de la déformation imposée et du calcul de la contrainte subie, on peut déterminer le module de cisaillement complexe G^* , en fonction de la fréquence d'oscillation $f = 2\frac{\pi}{\omega}$. Cependant, comme nous l'avons vu dans la partie précédente 5.1, nous utilisons le module de cisaillement réel μ . En effet, il est légitime de confondre G^* et μ lorsque $G' \gg G''$ car :

$$\mu = \|G^*\| = (G'^2 + G''^2)^{\frac{1}{2}} \simeq \text{Re}(G^*) = G'$$

Notons qu'il existe également un mode de fonctionnement du rhéomètre à contrainte imposée, et dans lequel le taux de cisaillement est alors calculé à partir de la mesure de la vitesse de rotation du rotor.

5.2.2 A l'échelle d'un capteur : banc de compression uni-axiale

5.2.2.1 Définition de la problématique

La caractérisation de l'élastomère en volume offre une première information sur ses propriétés mécaniques. Cependant, les capteurs que nous produisons sont de taille micrométrique. A cette échelle, les effets de tension superficielle ne sont plus négligeables et modifient la réponse mécanique de l'objet. En effet, grâce à la mesure du volume de gouttes qui se détachent en sortie d'un tuyau de diamètre connu, nous avons évalué la tension superficielle entre l'élastomère et un milieu de culture à $\gamma \approx 3.5.10^{-2} \text{ N.m}^{-1}$. Ainsi, en comparant le module d'Young typique $E = 3\mu \approx 1,5.10^3 \text{ Pa}$ avec la pression de Laplace d'un capteur sphérique de rayon $R = 2.10^{-5} \text{ m}$, on a :

$$\frac{\Delta P}{E} = \frac{\gamma}{R E} \quad (5.18)$$

Donc :

$$\frac{\Delta P}{E} \approx 1, 1 \quad (5.19)$$

Cette valeur montre que les effets de tension superficielle sur le capteur sont du même ordre de grandeur que la raideur de l'élastomère (effet élasto-capillaire). Cette tension tend à maintenir une surface minimale du capteur, c'est-à-dire une sphère, et s'oppose aux contraintes exercées par les cellules voisines. De ce fait, les contraintes de cisaillement déduites des déformations mesurées ne peuvent être directement calculées en appliquant la formule 5.14. On montre qu'il est possible de rendre compte de ces effets capillaires en introduisant un module d'Young effectif E_{eff} et un module de cisaillement effectif μ_{eff} . On a alors :

$$\forall i \in (X, Y, Z) \quad \sigma_{di} = 2\mu_{eff} \frac{a_i - a}{a} \quad (5.20)$$

5.2.2.2 Calibration des capteurs

Comme nous l'avons vu précédemment, les capteurs ont un module de cisaillement effectif μ_{eff} qui peut différer du module de cisaillement en volume μ . Cependant, puisque nous n'avons pas accès à la tension superficielle entre l'élastomère et le tissu biologique, et que nous ne connaissons pas la relation exacte entre le module de cisaillement et le module de cisaillement effectif, il est nécessaire de mesurer la valeur du module de cisaillement effectif μ_{eff} par une expérience de calibration directe *in situ* à l'échelle des capteurs.

Pour effectuer la calibration, on introduit un capteur dans un agrégat cellulaire sphérique (sphéroïde, annexe 10.7). A cet agrégat, on applique une contrainte connue au moyen d'un banc de compression uniaxiale (fig. 5.3 a_1 et a_2). Ce banc est composée de deux lames de verres parallèles : l'une est rigide et fixe, tandis que la seconde est mobile, souple et se comporte comme un ressort de raideur connue k de l'ordre de $100 \text{ nN.}\mu\text{m}^{-1}$. La contrainte est appliquée en imposant un écart fixe entre les lames (fig. 5.3 b_1 . et b_2). Lorsque la contrainte est appliquée, la flexion de la lame souple est mesurée ce qui permet de déduire la force F imposée par l'agrégat (de l'ordre du μN). De cette force, on

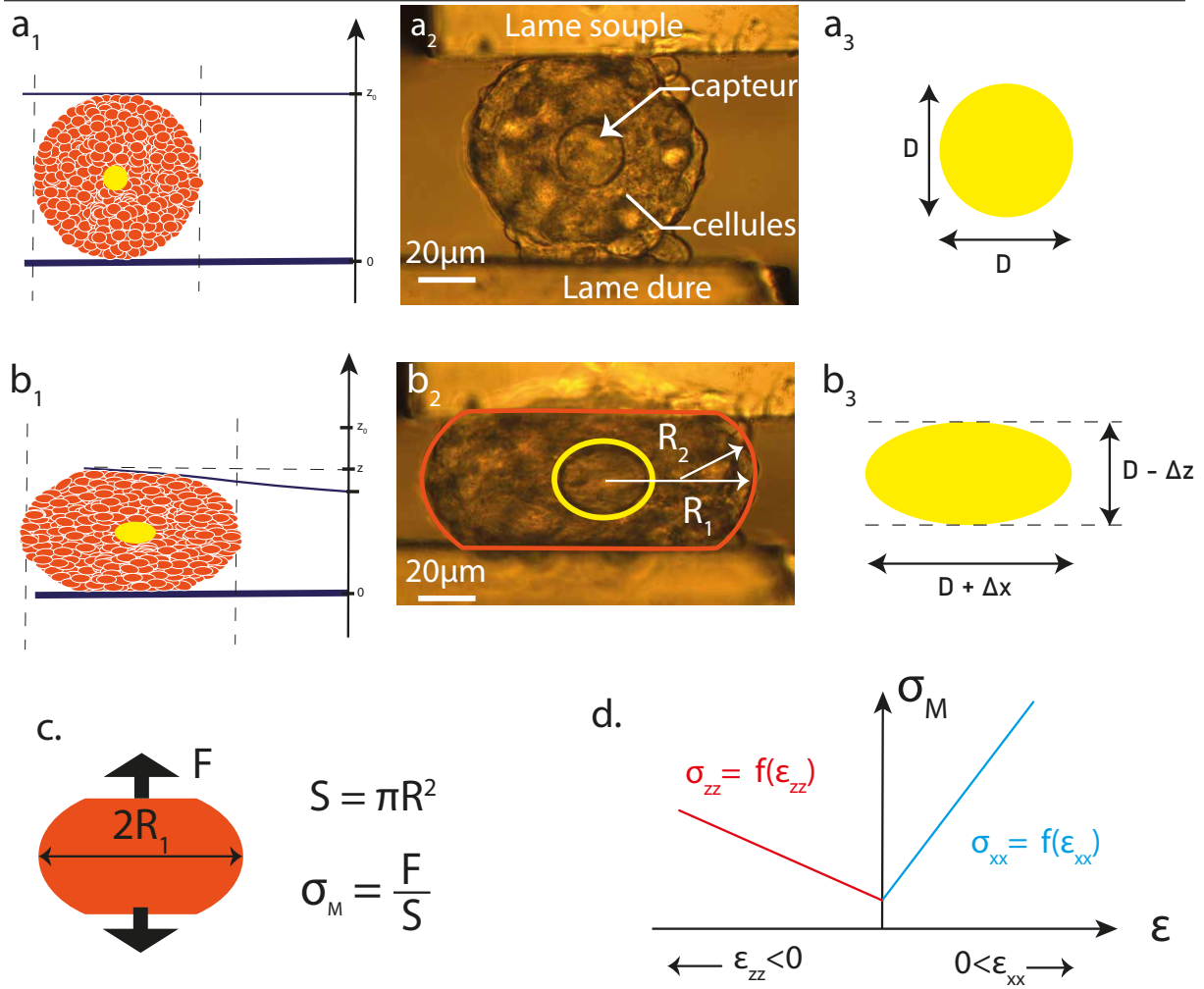


FIGURE 5.3 – Méthode de calibration *in situ* des capteurs de contraintes de cisaillement. (a₁)(a₂) Un agrégat cellulaire sphérique (sphéroïde, en orange), avec un capteur de contrainte au centre (en jaune), est placé entre deux lames de verre. [149] La lame du bas est rigide (indéformable), tandis que la lame du haut est mobile et déformable, de raideur connue. (a₃) Le capteur est sphérique de diamètre D. (b₁)(b₂) On impose une déformation au sphéroïde en imposant une distance inter-plaque. Le sphéroïde déformé exerce une force F contre la lame de verre souple, qui maintient constante la distance entre les plaques par rétro-action. (b₃) Le capteur devient ellipsoïdal. (c.) La force F est enregistrée. On mesure la surface équatoriale S du sphéroïde pour calculer la contrainte σ appliquée au capteur. (a₃ et b₃) Dans le même temps, on mesure la déformation du capteur. (d.) On peut alors tracer la courbe de la contrainte en fonction de la déformation ϵ_{zz} ou ϵ_{xx} . Le coefficient directeur des courbes est évalué selon un modèle, et est fonction de μ_{eff} .

calcule la contrainte caractéristique exercée sur l'agrégat $\sigma_M = \frac{F}{S}$ en mesurant la surface équatoriale S de l'agrégat (contrainte de quelques centaines de pN/ μm).

Simultanément à l'application de la contrainte, on mesure la déformation du capteur (fig. 5.3 a₃ et b₃). Ainsi, de la connaissance de la contrainte appliquée au capteur (fig. 5.3 c.) et de sa déformation, on déduit la relation contrainte-déformation *in situ*, et donc le module de cisaillement effectif μ_{eff} (fig. 5.3 d.).

En pratique, il n'est pas possible d'imager le capteur en 3D et d'avoir accès aux déformations dans toutes les directions. L'agrégat et le capteur étant initialement sphériques et supposés concentriques,

il est fait l'hypothèse d'une symétrie axiale, perpendiculaire aux lames et passant par le centre du sphéroïde et du capteur. Ainsi, les mesures de déformation et de surfaces peuvent donc être réalisées dans le plan transverse au sphéroïde et passant par son centre. De plus, un modèle simplifié (voir annexe 15.1) permet de déterminer la relation entre la contrainte caractéristique σ_M et les déformations du capteur :

$$\epsilon_{zz} = -2\epsilon_{xx}$$

$$\sigma_M = -\frac{3\mu_{eff}}{1 + \frac{R_1}{2R_2}}\epsilon_{zz} + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) \quad (5.21)$$

où R_1 est le rayon de courbure de l'agrégat dans le plan équatorial, et R_2 le rayon de courbure de l'agrégat dans le plan de l'image, et γ_{ag} la tension de surface entre l'agrégat et le milieu de culture.

5.3 Reconstitution 3D de la forme des capteurs

Pour pouvoir ajuster un ellipsoïde au capteur imagé par microscopie, il est nécessaire de déterminer sa forme réelle de façon la plus rigoureuse possible, et indépendante de celui qui fait la mesure. Après différents essais, il s'est avéré que les résultats obtenus par l'application de seuils couplés à divers filtres ne sont pas reproductibles : en effet, la qualité du signal et l'intensité de l'image ne sont pas constantes, et le seuil doit donc être ajusté manuellement par l'utilisateur pour chaque cas. Outre le fait du temps que cela implique, nous avons pu constater que les résultats entre deux manipulateurs diffèrent significativement, mais aussi qu'un même manipulateur peut obtenir deux mesures différentes sur une même image. Le manque de fiabilité de cette méthode nous a poussés à trouver une méthode plus objective. Après diverses discussions et recherches, nous nous sommes tournés vers les méthodes de contours actifs.

5.3.1 Contour actif

Les modèles de contour actif, initialement introduit par Kass et al. [150] [151] dans les années 1980, ont connu un large essor avec les algorithmes de « snakes », ou courbes minimisantes. Initialement développé en 2D, ce nom d'algorithme découle de l'aptitude des courbes à se déformer comme un serpent afin de s'adapter à la forme d'un contour recherché [152]. Depuis les premiers articles parus, les méthodes se sont multipliées [153] [154] et les progrès ont permis diverses applications aussi bien en 2D qu'en 3D, allant de la reconnaissance de forme, à la simulation ou encore la segmentation d'image, notamment dans le domaine médical.

Les modèles de contours actifs sont définis par la déformation d'une courbe (en 2D) ou d'une surface (en 3D, ce qui nous intéresse ici), continue et mobile en tout point, fermée ou non, et à extrémités fixes ou non [155] [156] (fig. 5.4). Définissons v une surface et $v(s, n)$ la position d'un point de la surface après n itération. $s=(s_1, s_2)$ est la coordonnée surfacique spatiale du point sur la surface, et

(x,y,z) les coordonnées cartésiennes du point sur l'image. On a donc :

$$\begin{aligned} \forall (s_1, s_2) \in [0, 1] \times [0, 1] \ \& \ n \in [0, +\infty] \\ v(s, n) &= (x(s, n), y(s, n), z(s, n)) \end{aligned} \quad (5.22)$$

Afin de déterminer le contour recherché, une surface initialement définie se déforme en étant soumise à des forces : elle épouse petit à petit les contours de l'objet étudié, jusqu'à ce qu'un hamiltonien (fonction équivalente à une énergie) soit minimisé. Cette fonction d'énergie est définie par la somme de trois termes :

$$\Phi(v) = E_{interne}(v) + E_{image}(v) + E_{contexte}(v) \quad (5.23)$$

Explicitons brièvement ces trois contributions à l'énergie.

5.3.1.1 Énergie interne

L'énergie interne, $E_{interne}$, est l'énergie qui détermine la cohésion de la surface et est définie comme suit :

$$E_{interne} = \alpha(s) \left\| \frac{\partial v}{\partial s} \right\| + \beta(s) \left\| \frac{\partial^2 v}{\partial s^2} \right\| = E_{surface} + E_{courbure} \quad (5.24)$$

Le terme premier terme correspond à une énergie de tension de surface. Sa valeur peut être importante lorsque la surface s'étend et nulle en cas de discontinuité. Le second terme est l'énergie de courbure de la surface. Elle traduit la rigidité du contour et permet de lisser plus ou moins les surfaces. L'énergie interne correspond donc à la raideur de la surface.

5.3.1.2 Énergie de l'image

L'énergie de l'image, E_{image} , est l'énergie potentielle liée aux données d'intensité de l'image. Elle permet de définir les contours comme les points de fort gradient de l'intensité de l'image :

$$E_{image}(x, y, z) = \|\vec{\nabla} I(x, y, z)\|^2 \quad (5.25)$$

La plupart du temps, afin de rendre les contours plus nets, on applique d'abord un filtre gaussien [157]. L'énergie devient donc la norme au carré du gradient de la convolution de l'image par une gaussienne :

$$E_{image}(x, y, z) = \|\vec{\nabla}(g_{\sigma} * I)(x, y, z)\|^2 \quad (5.26)$$

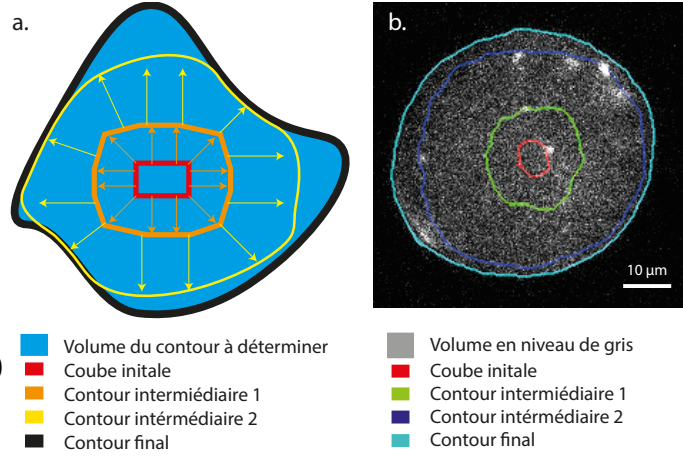


FIGURE 5.4 – Présentation de l'évolution d'un contour actif. a. Principe de fonctionnement de la détermination d'un contour avec une méthode de contour actif. b. Étapes de détermination du contour d'une section d'un capteur imagé au Spinning-disk (x60). L'image initiale est en niveau de gris. On observe la progression de la courbe initiale (rouge) après 20 itérations (vert), 100 itérations (bleu), et en fin de programme (cyan).

où g_σ est la gaussienne centrée d'écart type σ .

5.3.1.3 Énergie de contexte

La dernière énergie est celle de contexte. C'est une énergie qui permet d'ajouter des informations préalablement connues sur l'objet recherché. L'énergie la plus couramment implémentée est l'énergie ballon [158]. L'ajout de cette énergie tend à faire gonfler le contour actif [159]. La force "ballon" dont découle l'énergie est :

$$\vec{F}_{ballon} = k\vec{n}(s, n) \quad (5.27)$$

où $\vec{n}(s, n)$ est le vecteur unitaire normal à la surface au point $v(s, n)$ orienté vers l'extérieur si on part d'un contour initial plus petit que le contour recherché (fig. 5.4). Ainsi, selon la valeur de k , cette force permet à la surface en progression de dépasser les minima locaux du gradient, pour atteindre une frontière plus nettement marquée, et donc limiter les effets du bruit. L'énergie qui lui est associée peut être écrite comme suit :

$$E_{contexte} = \pm\delta \int dV \quad (5.28)$$

avec $-\delta$ lorsque l'on veut faire gonfler le contour initial vers le contour à déterminer, et $+\delta$ lorsque le contour initial rétrécit.

5.3.2 Déroulé de l'algorithme

Les algorithmes des contours actifs, présentés dans la figure 5.4, suivent tous un même schéma présenté comme suit :

Données : Image en niveau de gris

Résultat : Surface d'énergie minimum

Initialisation d'une surface initiale;

tant que *L'énergie n'est pas minimale* **faire**

pour *Tous les points de la surface* **faire**

 Calculer l'énergie

 Normaliser l'énergie

 Minimiser l'énergie pour obtenir le nouveau point ;

 Placer les nouveaux points ;

Algorithme 1 : Algorithme schématique du Snake

La figure 1 permet de résumer le procédé de traitement pour déterminer la surface d'énergie minimum de l'image (2D ou 3D), et donc le contour recherché : l'énergie de la surface en extension est calculée puis cette énergie est minimisée pour tous les points simultanément. Les nouveaux points sont alors placés. Si l'énergie n'est toujours pas minimale, une nouvelle itération est faite.

Dans ce travail le langage de programmation utilisé est Python. La fonction de contour actif que nous avons ainsi utilisée est une fonction libre d'utilisation de la librairie Scikit-image nommé MorphGAC [158] [153]. L'intégralité du code qui a été développé pour traiter les données est présenté en annexe 17.2.

5.3.3 Mesure des déformations

Afin de déterminer les caractéristiques du capteur, un ajustement à l'ellipsoïde le plus proche est réalisée. De cet ellipsoïde sont extrait la longueur et l'orientation caractérisant le capteur. Les contraintes de cisaillement appliquées au capteur sont ensuite calculées selon la formule 5.14. Les déformations sont le rapport de la différence des demi-axes sur le rayon moyen du capteur.

Étant donné la variabilité du contraste des images, afin de s'assurer que la déformation mesurée est significative, un critère a été établi : deux demi-axes sont considérés comme de longueurs différentes si cette différence est supérieure à $0,5 \mu\text{m}$. En dessous de ce seuil, nous estimons être dans la limite de détection du traitement effectué. Ce seuil peut toutefois dépendre du système et des paramètres d'acquisition utilisés, et notamment la distance entre chaque plan d'acquisition du capteur.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 6

Caractérisation de la production des capteurs

6.1 Dispersion de taille

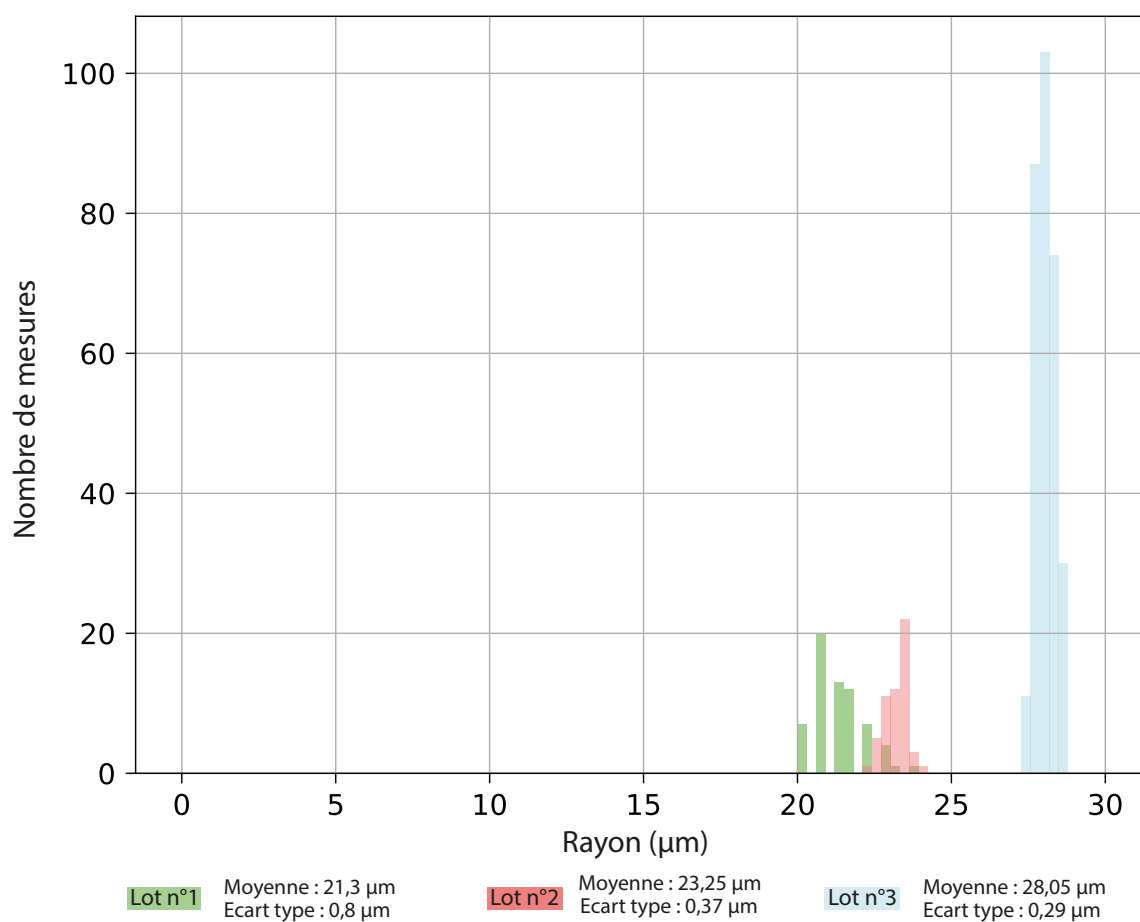


FIGURE 6.1 – Distribution du rayon des capteurs produits lors de trois productions différentes. Les productions sont très mono-disperses mais le rayon moyen peut varier d’une production à l’autre.

La fabrication des capteurs par la méthode micro-fluidique à concentration de flux permet une production de capteurs très mono-disperse. Cette dispersion a été caractérisée pour différents lots de production (fig. 6.1). Pour chaque production la distribution a un seul pic et son écart type est inférieur à 1 μm .

Cette monodispersité présente un avantage pour l'analyse de la forme des capteurs *in situ*. Lors de la reconstitution 3D de la forme d'un capteur *in situ*, on a accès à son volume qui est constant du fait de l'incompressibilité de l'élastomère. Si le rayon moyen des capteurs d'un lot est connu, il est possible de comparer le volume mesuré *in situ* avec le volume moyen initial. Cela permet de discriminer des erreurs éventuelles de mesures et de détection de contour.

Bien que chaque lot soit monodisperse, le rayon moyen des capteurs dépend des conditions de production. La figure 6.1 présente trois lots de productions différents. Outre les rapports d'aspect du micro-circuit, la taille des capteurs dépend de deux paramètres fondamentaux :

- la propreté des micro-circuits : la présence de poussières ou d'aspérités sur la puce modifie sensiblement la dynamique d'écoulement des fluides.
- la viscosité du mélange polymérisable : les pressions d'injection en dépendent. Cette viscosité varie sensiblement en fonction de la composition exacte du mélange, mais aussi dans le temps. Comme on ne connaît pas les lois d'évolution de la viscosité, les pressions d'injection ne peuvent être fixées pour obtenir une taille de goutte donnée. Cela entraîne une variabilité du rayon moyen des capteurs d'une production à l'autre.

La variabilité du rayon des capteurs est cependant limitée par les rapports d'aspect fixes des circuits micro-fluidique : la plage maximale possible pour le rayon est comprise entre 15 et 30 μm .

6.2 Homogénéité de la fluorescence

La visualisation des capteurs en lumière blanche, en suspension ou *in situ*, ne permet pas de reconstituer la forme 3D : les contours ne sont pas suffisamment marqués pour être repérés (fig. 6.2 a_1 , b_1). Le contraste est d'autant moins marqué que l'on sort du plan équatorial du capteur.

Le marquage fluorescent par la rhodamine-B isothiocyanate (chap. 4.3) permet d'imager l'intégralité du volume par microscopie confocale (fig. 6.2 a_2 et b_2) ou deux-photons (fig. 6.2 c_1). Le rapport signal sur bruit ainsi obtenu permet une visualisation nette des contours pour un capteur en suspension dans l'eau (fig. 6.2 a_2) et *in situ* dans un tissu (fig. 6.2 b_2 , c_1).

L'homogénéité de la fluorescence dans l'élastomère permet d'imager le capteur plan par plan. Ensuite, une première reconstitution du volume en 3D peut se faire par juxtaposition de ces plans. Les figures 6.2 a_3 , b_3 et c_2 présentent des reconstitutions en 3D des capteurs avec l'outil ImageJ qui permettent une visualisation mais se substitue pas à la méthode de détection précise par la méthode du contour actif. La définition du volume final obtenu dépend de la distance entre chaque plan : la figure 6.2 a_3 est la juxtaposition de plans distants de 0,5 μm , tandis que la figure 6.2 b_3 est la juxtaposition de plan distants de 1,5 μm : la définition y est donc moins bonne.

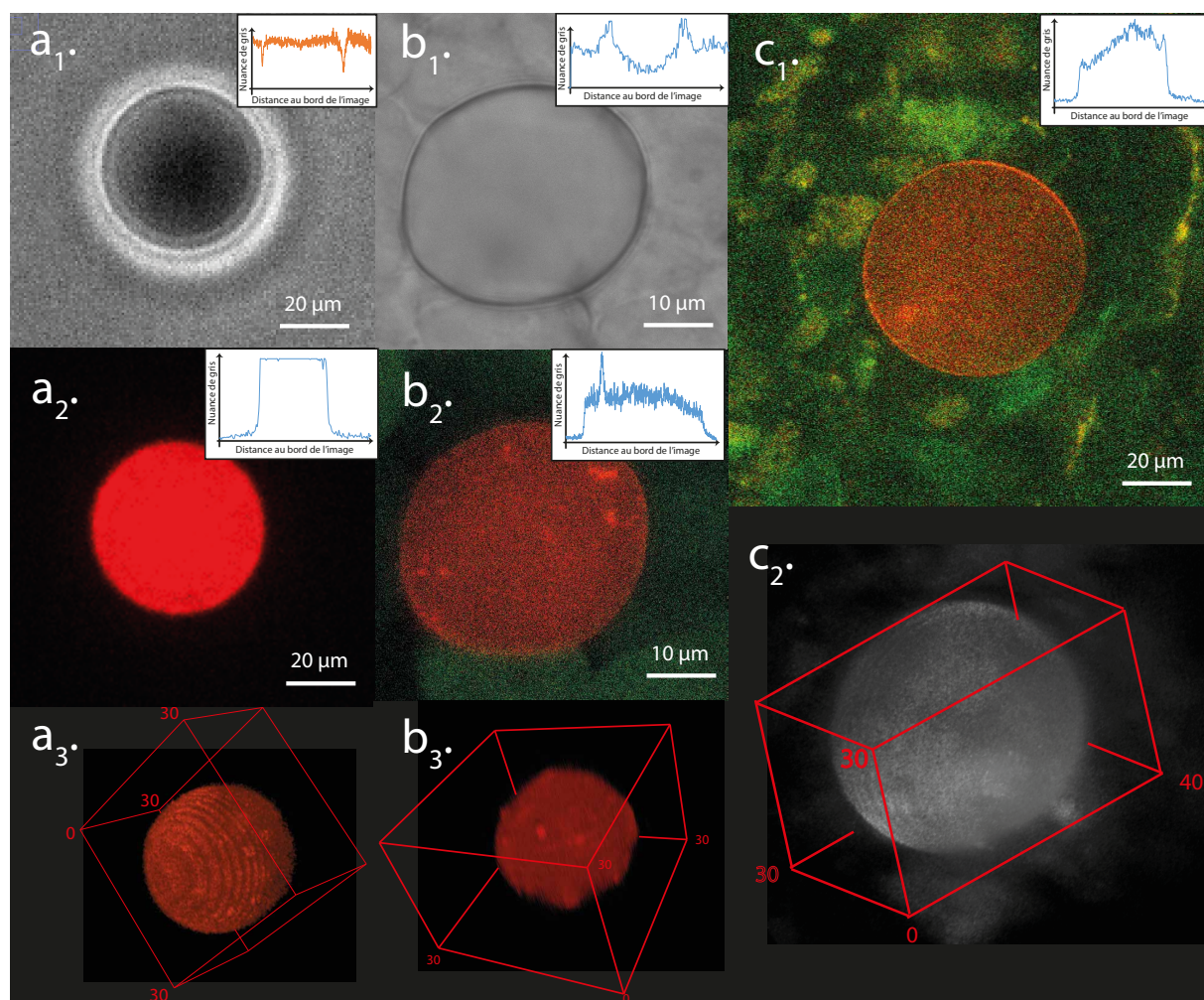


FIGURE 6.2 – (a_1 , a_2 , a_3) Image d'un capteur en suspension dans l'eau, marqué par RhBITC, au spinning-disk. Le capteur est imagé en lumière blanche (a_1) puis en fluorescence à 580 nm (a_2). (a_3) Reconstitution en 3D du capteur imagé en fluorescence avec l'outil ImageJ. (b_1 , b_2 , b_3) Image spinning-disk d'un capteur intégré dans un embryon de poisson-zèbre. (b_1) Image en lumière blanche. (b_2) Image en fluorescence du même capteur (rouge) et des cellules marquées en GFP (vert). (b_3) Reconstitution en 3D du volume du capteur avec l'outil ImageJ. (c_1) Image deux photons du plan équatorial d'un capteur marqué en RhBITC. Le capteur (rouge) est intégré dans un agrégat cellulaires de CT26 marquées LifeAct-GFP. (c_2) Reconstitution en 3D du volume du capteur l'outil ImageJ. Les inserts des images (a_1 , a_2 , b_1 , b_2 et c_1) sont les profils d'intensité à travers le diamètre horizontal du capteur à l'image.

Chapitre 7

Étalonnage des capteurs

7.1 Rhéologie macroscopique du gel

7.1.1 Étude rhéologique de l'élastomère pendant la polymérisation

L'étude des propriétés mécaniques de l'élastomère que nous présentons ici a été effectuée sur un rhéomètre à déformation, dont le principe de fonctionnement a été décrit dans le chapitre 5.2.1. Le mélange polymérisable est déposé sur la plateforme fixe, et la partie supérieure (le rotor) est mobile et applique un cisaillement alternatif au gel. La plateforme est connectée à un système de chauffage par effet Peltier afin de contrôler la température. Les expériences ont été réalisées à température constante, et avec une géométrie plan-plan d'entrefer 0,5 mm. Les mesures effectuées avec une géométrie cône-plan ont permis de s'assurer de la robustesse de la mesure. Cependant, la géométrie plan-plan nous permet une plus grande flexibilité.

7.1.1.1 Module de cisaillement en fonction de la fréquence

Les modules de conservation G' et de perte G'' sont mesurés à 11 fréquences de cisaillement allant de 0,1 à 10 Hz. La figure 7.1 présente les résultats de G' et G'' en fonction de la fréquence de cisaillement pour un gel de composition standard (c'est-à-dire de fraction molaire $q(\chi) = 1,37 \cdot 10^{-1}$, $q(Y) = 3,82 \cdot 10^{-2}$ et $q(Pt) = 4,13 \cdot 10^{-3}$), après 20 h de polymérisation à 60°C.

Le module de conservation G' varie seulement de 20 % entre un cisaillement à 0,1 Hz et un cisaillement à 10 Hz. En revanche, le module de perte est très dépendant de la fréquence : une évolution quasi linéaire en log-log, de coefficient directeur $\sim 0,83$, voisin de 1, est observé sur la gamme de fréquence sondée. De par ses caractéristiques, l'élastomère peut être en première approximation modélisé comme un solide viscoélastique de Kelvin-Voigt (fig. 7.1 (gauche)), c'est-à-dire par un ressort et un amortisseur en parallèle. Dans ce modèle, le module de conservation est constant et le module de perte vaut $G'' = 2\pi\eta f$, où η est la viscosité et f la fréquence de cisaillement. Pour un tel solide, l'annulation des contraintes appliquées provoque un retour complet du solide vers son état initial. Enfin, à basse fréquence, on a $G' \gg G''$. Physiologiquement, les contraintes imposées par les tissus biologiques sont très lentement variables et donc assimilables à des contraintes à basse fréquence $f \lesssim 0,1$ Hz. C'est pourquoi, comme nous l'avons vu dans le chapitre 5.1, nous confondrons

par la suite le module de cisaillement μ avec le module de conservation G' mesuré à la fréquence la plus basse $f = 0.1$ Hz. Pour une composition standard de l'élastomère, on obtient un module de cisaillement d'environ $G' = 400$ Pa, ce qui est l'ordre de grandeur recherché.

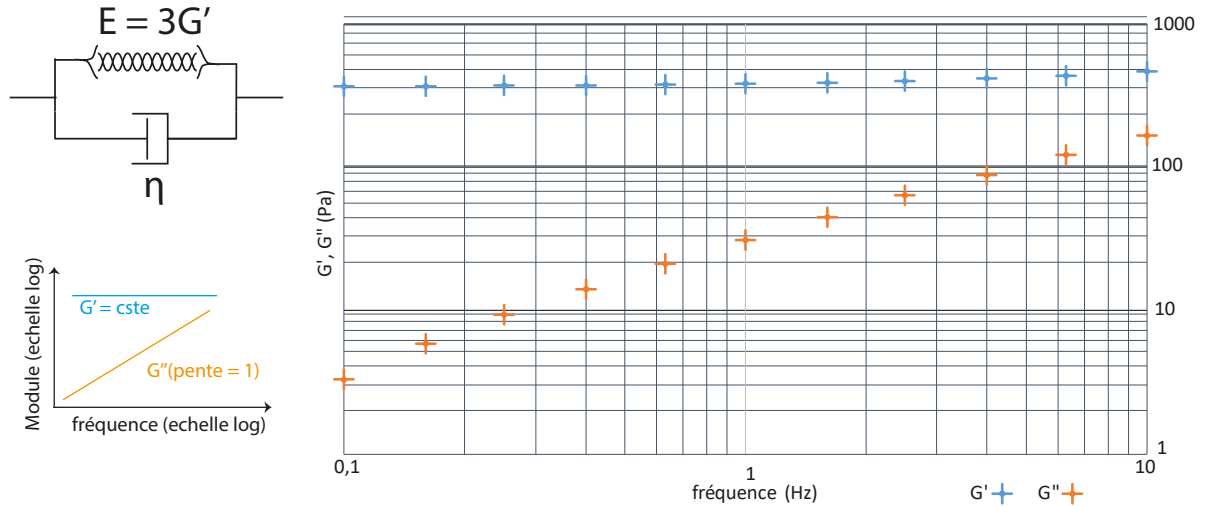


FIGURE 7.1 – (à gauche) Modèle de solide de Kelvin-Voigt : le tissu est représenté mécaniquement comme un ressort et un amortisseur en parallèle. En dessous, la représentation log-log de l'évolution caractéristique de G' et G'' en fonction de la fréquence de cisaillement, pour un solide viscoélastique de Kelvin-Voigt. (à droite) Modules de conservation G' (bleu) et de perte G'' (orange) en fonction de la fréquence de déformation imposée (échelle log-log). Pour un gel de composition standard, polymérisé à 60°C pendant 20 h.

7.1.1.2 Cinétique de polymérisation et comparaison avec le modèle

L'évolution du module de conservation G' en fonction du temps, au cours de la polymérisation précédente, est présentée sur la figure 7.2.

Après un temps de latence, le module de cisaillement $G'(t)$ augmente rapidement pendant les deux premières heures, puis tend lentement vers une valeur finale G'_{final} . Le temps nécessaire moyen pour atteindre cette valeur à 60°C est d'environ 24 h. Dans une section suivante, nous évaluerons les effets de la température sur la cinétique de polymérisation.

La courbe d'évolution $G'(t)$ peut être ajustée par un modèle de cinétique de gélification donné en annexe 12 et développé par François Gallet, d'après [160] [161]. Ce modèle permet d'ajuster $G'(t)$ avec la fonction :

$$F(t) = G'_{final} p_\chi^2(t) \left(1 - \min \left[1, \left(\frac{1 - r p_\chi^2(t)}{1 - C(1 - r p_\chi^2(t))^D} \right)^{f_c} \right] \right) \quad (7.1)$$

avec :

- $p_\chi(t) = \frac{1 - \exp[-(1 - r)t/\tau]}{1 - r \exp[-(1 - r)t/\tau]}$
- $\lim_{t \rightarrow +\infty} F(t) = G'_{final}$
- τ le temps caractéristique de gélification.

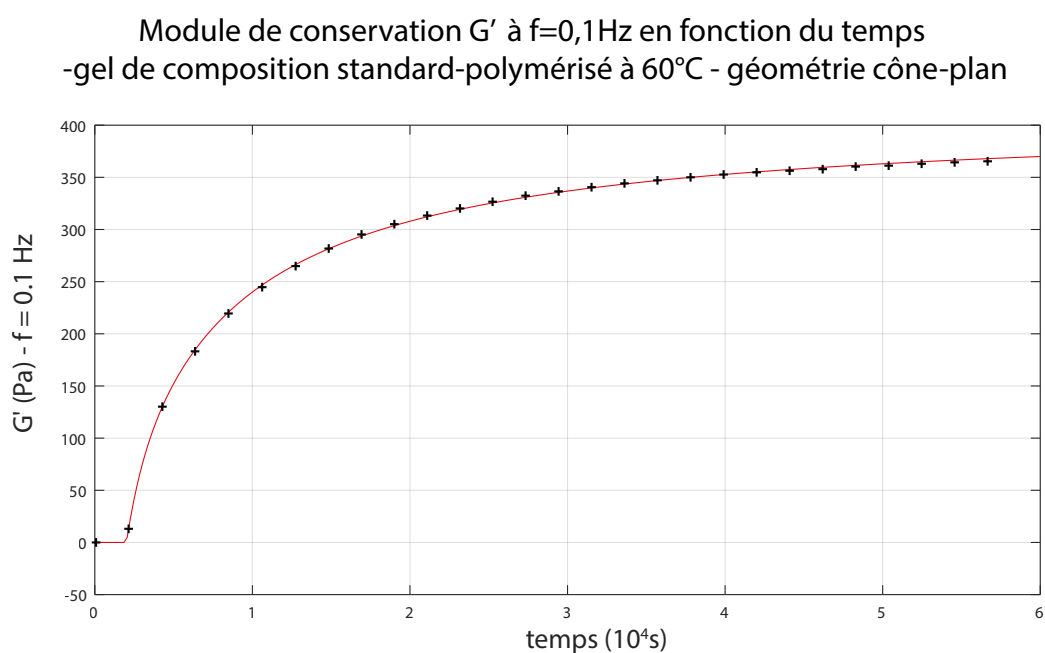


FIGURE 7.2 – Évolution du module de conservation G' en fonction du temps. La mesure a été effectuée avec un rhéomètre à déformation, à une fréquence de déformation de $f = 0.1\text{ Hz}$ et sur une géométrie cône-plan. Le gel a la composition standard et a été polymérisé à 60°C . Les croix en noir correspondent aux points expérimentaux mesurés par le rhéomètre. La courbe continue rouge est le résultat de l'ajustement fait par le modèle. Les valeurs obtenues sont $G'_{final} = 380\text{ Pa}$, $f_c = 7.65$, $r = 0.90$ et $\tau = 3300\text{ s}$.

- $r = \frac{N_x}{N_{\text{DMS}}}$ le rapport du nombre de sites réactifs du réticulant par le nombre de sites réactifs du DMS. Pour un gel de composition standard, la valeur attendue est $r_{th} = 0.475$
- f_c le taux de coordination, c'est-à-dire le nombre de sites du réticulant effectivement liés dans le gel à l'état final. Théoriquement, on s'attend à $f_{th} = 6,62 \simeq 7$.

Dans le cas présenté en figure 7.2, l'ajustement offre une bonne concordance avec les données expérimentales et on a :

- $G'_{final} = 380\text{ Pa}$
- $\tau = 3300\text{ s}$
- $r = 0,90$
- $f_c = 7,65$

La valeur de G'_{final} est en accord avec les mesures faites sur des gels de composition similaire. Le taux de coordination f_c est proche du taux attendu. En pratique, selon les gels, il est compris entre 5 et 10. La variation peut s'expliquer par les variations de quantité d'inhibiteur et de réticulant introduit, permettant une réticulation plus ou moins importante, et donc une coordination plus ou moins grande.

En revanche, le rapport r est systématiquement supérieur au r_{th} . Une hypothèse vraisemblable pouvant expliquer cet écart est que le modèle ne prend pas en compte l'ajout d'inhibiteur et de catalyseur dans la formation du gel. L'inhibiteur se fixant sur le DMS et le catalyseur permettant d'accélérer la formation des liaisons leur introduction peut modifier le rapport r . De plus, le réticulant et le DMS sont des macromolécules : des facteurs d'encombrement stérique sont susceptibles de diminuer artificiellement le nombre de sites réactifs accessibles du DMS, et donc de faire augmenter artificiellement r .

Ce modèle permet un bon ajustement des données de gélification du gel. Il permet la caractérisation de la cinétique grâce à l'obtention d'un temps caractéristique τ , et également d'extrapoler les mesures expérimentales vers les temps longs pour obtenir une valeur finale du module de cisaillement G'_{final} .

7.1.1.3 Conclusion partielle

Finalement, l'élastomère étudié répond aux critères mécaniques exigés dans le cahier des charges : le module de perte G'' est très inférieur au module de conservation ($G' \gg G''$). De ce fait, le gel peut être considéré comme purement élastique aux basses fréquences et le module de cisaillement statique peut être confondu avec le module de conservation qui est de l'ordre de 500 Pa.

De plus, la cinétique de polymérisation peut être ajustée à l'aide d'un modèle simplifié en bon accord avec les observations, même s'il ne peut pas prendre en compte tous les paramètres (les effets liés au rôle et aux quantités de catalyseur et d'inhibiteur par exemple). Cela permet d'extraire un temps caractéristiques de gélification τ , et d'extrapoler les données aux temps longs pour connaître le module de cisaillement final $G'_{final} = \mu$.

7.1.2 Effet de la température sur la polymérisation

La cinétique de la réaction de polymérisation du DMS par l'hydrure de silyle change fondamentalement avec la température : une polymérisation à température ambiante prend une semaine à 25 °C, une journée à 60°C et seulement quelques heures à 80°C.

Pour étudier les effets de la température sur la cinétique de polymérisation, le temps caractéristique de gélification τ est tracé en fonction de la température de polymérisation (fig. 7.3) : τ décroît de manière quasi exponentielle avec la température, passant de $\sim 2,5 \cdot 10^4$ s à 25°C, à seulement $\sim 5 \cdot 10^2$ s à 80°C. En revanche, entre 60°C et 80°C, nous observons que la valeur finale du module de cisaillement G'_{final} ne varie, quant à elle, que d'environ 5%.

Ainsi, en augmentant la température de polymérisation de 60°C à 80°C, le temps de polymérisation diminue sans pour autant modifier l'ordre de grandeur du module de cisaillement. Cependant, augmenter la température au-delà de 80°C présente un risque. En effet, les capteurs que nous produisons sont en solution aqueuse ; le risque d'évaporation de l'eau et de mouvement de convection déplaçant les capteurs contre les parois est trop important. C'est pourquoi nous avons opté pour une polymérisation à 80°C.

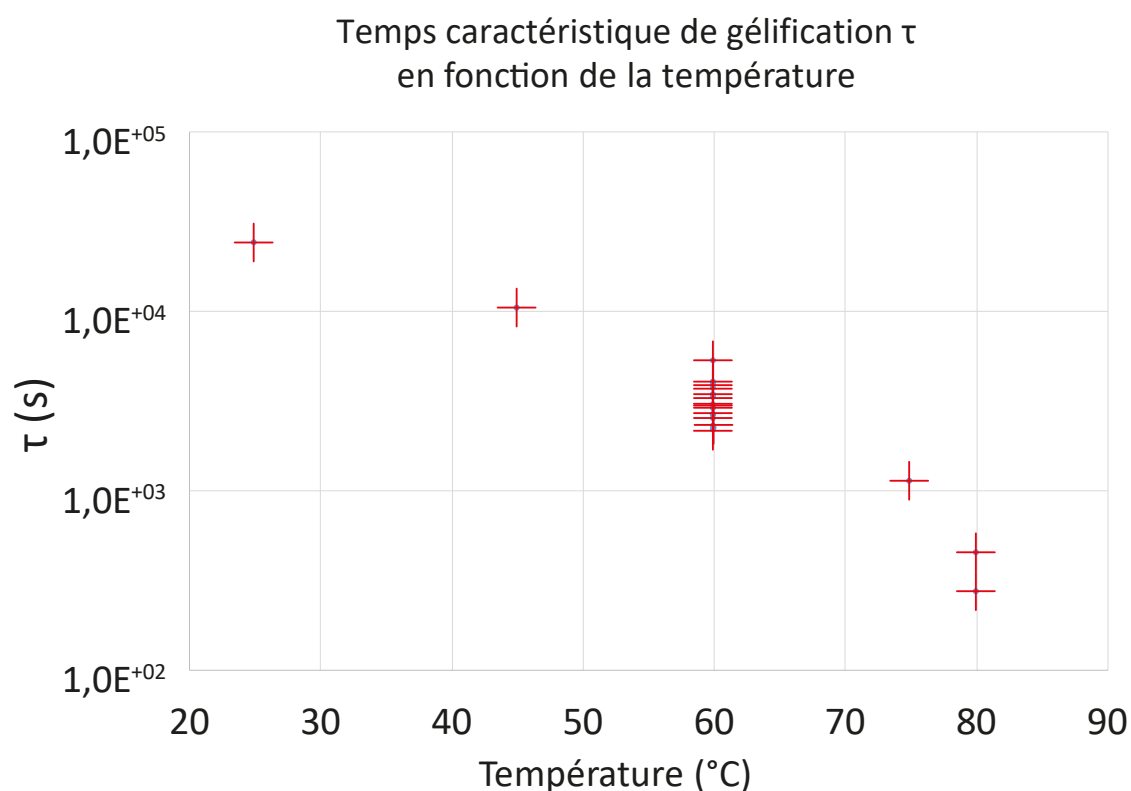


FIGURE 7.3 – Évolution du temps caractéristique de gélification τ en fonction de la température de polymérisation pour des gels de composition standard.

7.1.3 Effet de la composition du gel

L'état final du gel dépend de la proportion des différents composés du gel par rapport au DMS. Les proportions usuelles ont été présentées dans le chapitre 4.1.1. Les masses typiques à introduire pour un gel de 20 g de DMS sont :

- $m(\text{DMS-V22}) = 20 \text{ g}$
- $m_{\chi} = 320 \text{ mg}$
- $m_{\gamma} = 17,1 \text{ mg}$
- $m_{\text{pt}} = 85 \text{ mg}$

Ces masses à mesurer sont très petites pour certaines et il est difficile, même avec une balance de précision, de respecter rigoureusement les proportions cibles : l'écart peut aller jusqu'à 10%. C'est pourquoi il est essentiel de connaître l'effet de la variation de ces proportions sur l'état mécanique final du gel.

Le G'_{final} a été mesuré pour différents gels dont la proportion en inhibiteur ou catalyseur varie jusqu'à 10% par rapport à la proportion cible, la proportion en réticulant restant fixe : le G'_{final} varie d'environ ~ 5% seulement.

En revanche, la valeur de G'_{final} varie beaucoup avec la proportion du réticulant (fig. 7.4). La composition standard du gel est établie avec 1,6% en masse de réticulant, donnant un G'_{final} d'environ 500 Pa. Une modification absolue de ce pourcentage de 0,1% (c'est-à-dire une variation relative d'environ 5% sur la masse de réticulant introduite) multiplie ou divise par ~ 2 la valeur de G'_{final} . Il est également à noter que si la proportion de réticulant est trop faible (en dessous de 1,4% en masse), le mélange ne polymérise plus.

Cette forte dépendance permet d'ajuster facilement la valeur du module de cisaillement du gel à nos besoins. Néanmoins, la proportion voulue est difficile à respecter avec précision. C'est pourquoi, pour chaque gel utilisé dans les expériences, un contrôle de la valeur de G' est fait par rhéométrie.

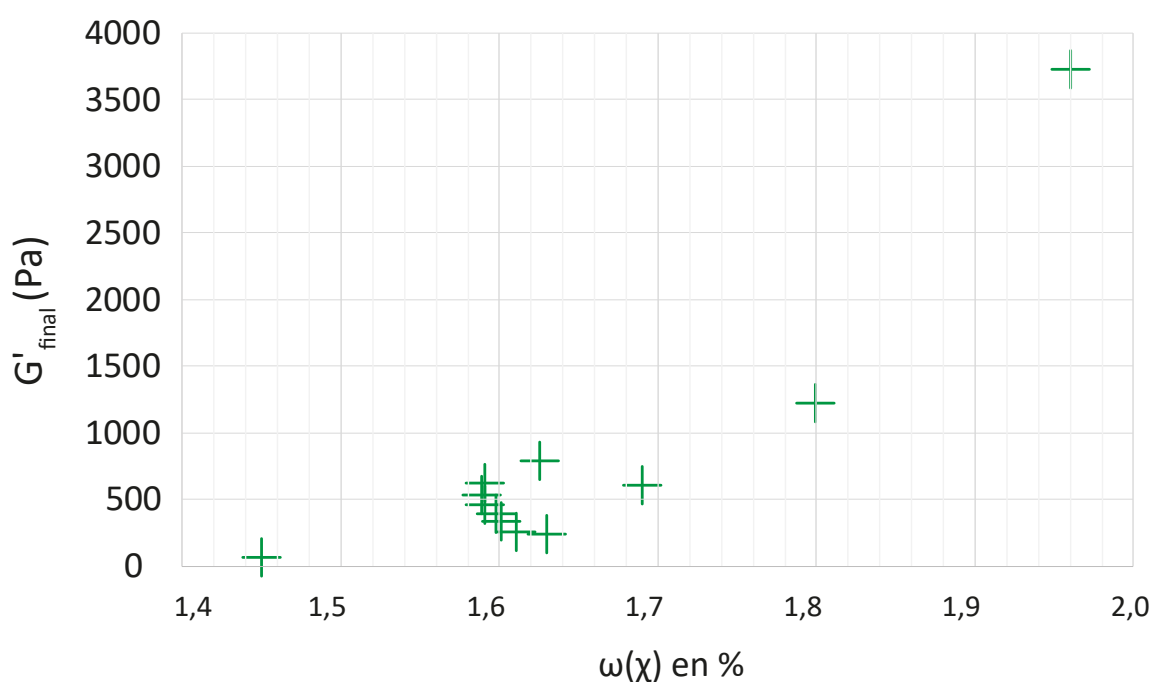


FIGURE 7.4 – Évolution du module de cisaillement final en fonction du pourcentage en masse de réticulant.

7.1.4 Effet du temps d'attente du mélange polymérisable à 5°C

Le mélange polymérisable est conservé au réfrigérateur à 5°C pendant quelques heures, et exceptionnellement quelques jours, en attendant d'être utilisé pour fabriquer les capteurs qui sont ensuite gélifiés à 80°C. Ce temps d'attente au réfrigérateur influe sur l'élasticité finale G'_{final} du gel. La figure 7.5 présente le rapport $\frac{G'_{final}(t)}{G'_{final}(t=0)}$ pour différents gels en fonction du temps d'attente.

Elle montre une diminution de 80 % de G'_{final} par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ au cours des deux premiers jours, puis une stabilisation. L'hypothèse émise permettant d'expliquer ce processus est la suivante :

- Le diallylmaléate (l'inhibiteur) inhibe la réaction entre le réticulant et le DMS (voir chap. 4.1.3)

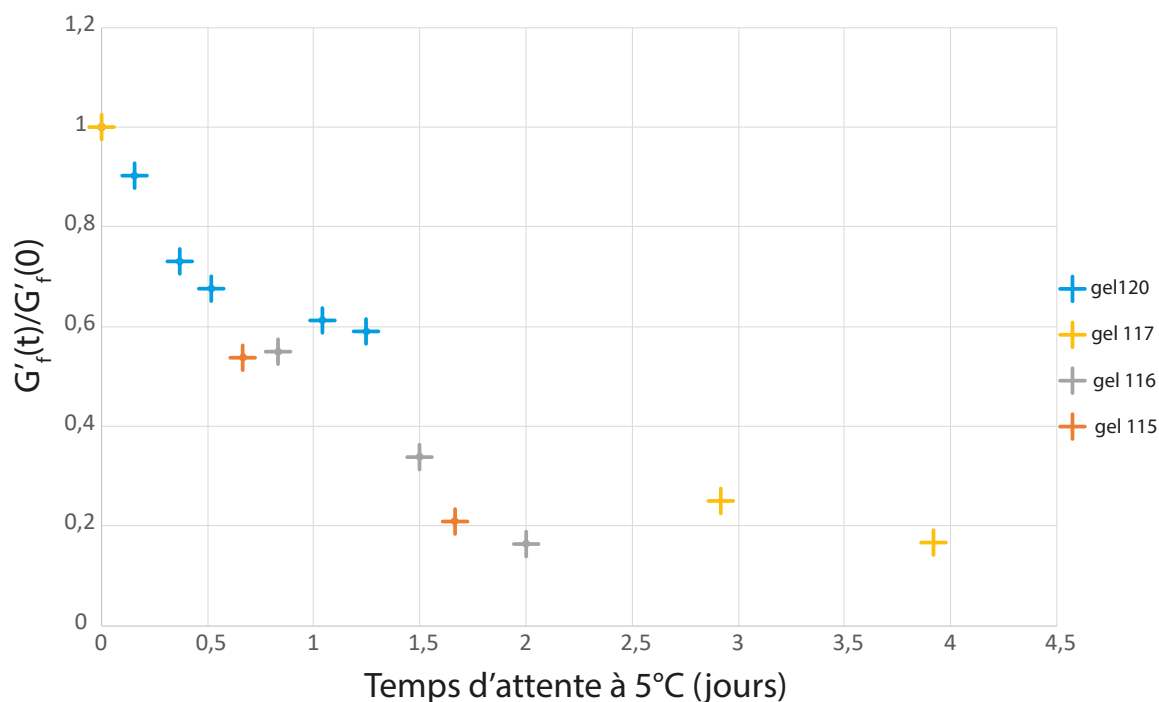


FIGURE 7.5 – Variation relative du module de cisaillement $\frac{G'_{final}(t_{attente})}{G'_{final}(t=0)}$ en fonction du temps d'attente à 5°C avant polymérisation, pour différents mélanges polymérisables.

en se conjuguant au catalyseur de façon transitoire. Cependant, cette conjugaison aboutit à une liaison covalente permanente entre l'inhibiteur et le réticulant. Bien que sa cinétique soit lente, elle se produit également à froid. Ainsi, le diallylmaléate réagit lentement avec le réticulant qui est consommé petit à petit, au moins en partie (il y a environ 10 fois plus de réticulant que d'inhibiteur). Le nombre de sites réactifs de ce dernier diminue progressivement : la réticulation finale du gel est moins importante, donc le G'_{final} diminue également.

- Après deux jours, la quantité d'inhibiteur a diminué et, puisque la réaction entre le DMS et le réticulant a eu partiellement lieu, la viscosité du mélange a augmenté. La diffusion des produits dans le mélange polymérisable est beaucoup plus lente. Les cinétiques sont si ralenties que les proportions entre inhibiteur et sites réactifs du réticulant se stabilisent : le module de cisaillement atteint un palier (à environ 20 % de celui du gel à $t=0$).

7.1.5 Effet de l'émulsification

Le relargage des différents fluorophores en dehors des capteurs a laissé supposer que ce phénomène pouvait également se produire pour les constituants du mélange polymérisable. Or, le relargage dans la solution aqueuse d'un des composés en modifie la proportion dans le mélange polymérisable, ce qui a pour conséquence de modifier le module de cisaillement du gel final. Cet effet peut être particulièrement gênant pendant la fabrication des capteurs, qui sont formés à partir de gouttelettes de mélange polymérisable, en suspension dans l'eau avant d'être gélifiées à chaud.

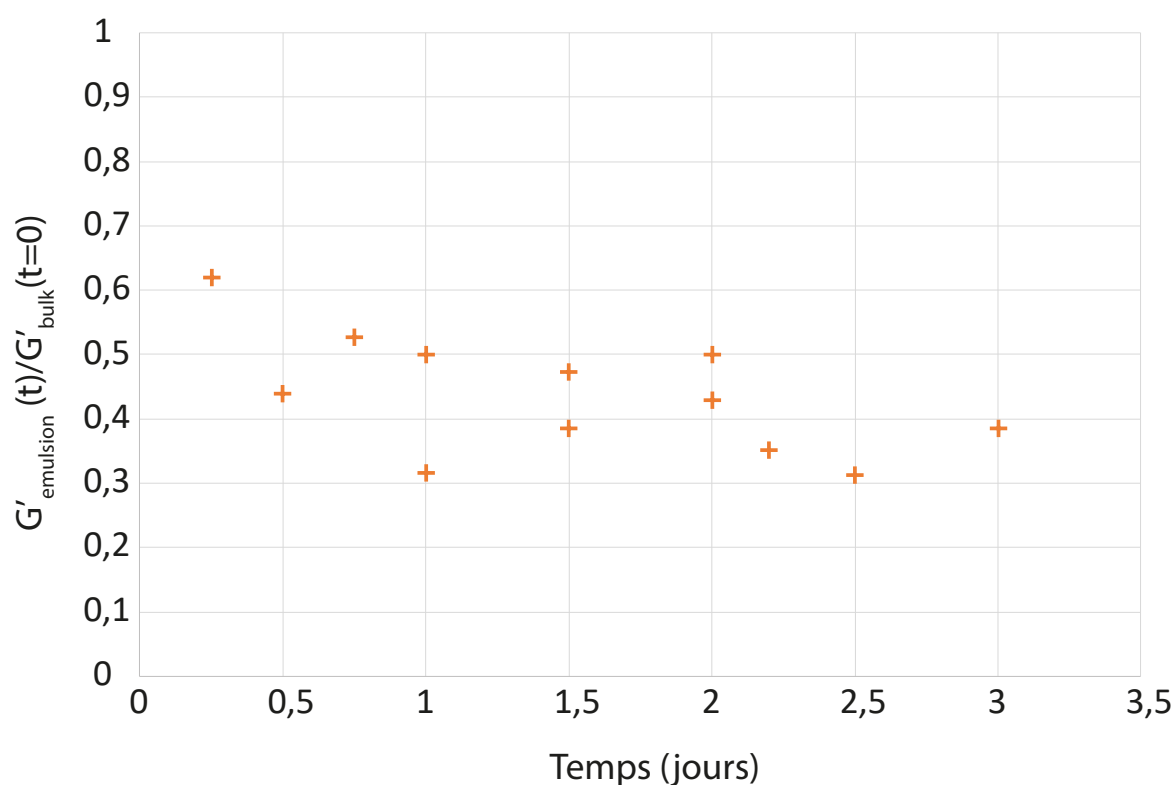


FIGURE 7.6 – Rapport $\frac{G'_{emul}(t)}{G'_{final}(t=0)}$ en fonction du temps d'attente à 5°C pour différents mélanges polymérisables.

Pour étudier cela, nous avons fabriqué par agitation mécanique des émulsions de mélange polymérisable dans de l'eau distillée. Ces émulsions sont maintenues au réfrigérateur à 5°C pendant une durée t , et laissées crêmer. Le surnageant récupéré, séparé de l'eau, est alors étudié au rhéomètre. La figure 7.6 présente l'évolution de $\frac{G'_{emul}(t)}{G'_{final}(t=0)}$ en fonction du temps d'attente t à 5°C. Ce rapport diminue rapidement et se stabilise au bout de quelques heures autour d'une valeur moyenne de 0,43 avec un d'écart type de 0,09 (pour nos conditions de formation des émulsions).

Cette expérience démontre que l'inhibiteur (le diallylmaléate), dont la solubilité dans l'eau est de 151 mg/l [162], est partiellement relargué dans l'eau lors de la production d'une émulsion. La proportion d'inhibiteur est donc plus faible dans les gouttes produites que dans le mélange en volume.

Cette diminution a deux conséquences. Premièrement, le nombre de sites du réticulant saturés par l'inhibiteur diminue. Cela permet ensuite une plus grande réticulation entre le DMS et le réticulant : le G' final est augmenté. Ensuite, puisque la quantité d'inhibiteur est moindre, la réaction entre le réticulant et le DMS est moins inhibée. La réticulation, qui se produit également à froid, est accélérée.

On constate en pratique (voir fig. 7.6) que le module de cisaillement se stabilise à une valeur de $0,43G'_{final}(t=0)$ après seulement 12 h de temps d'attente à froid. Dans notre cas, les émulsions sont toujours conservées entre 1 et 2 jours avant d'être polymérisées à 80°C. Nous pouvons donc considérer que la valeur finale du module de cisaillement vaut $G'_{emul} \simeq 0,43G'_{final}(t=0)$ Pa, donc $G'_{emul} = 300 \pm 50$ Pa pour la composition standard du mélange.

7.1.6 Conclusion

Une étude du gel à l'échelle macroscopique par rhéométrie à cisaillement imposé a permis de valider que la composition standard de mélange polymérisable utilisée (de proportions massiques $\omega(\chi) = 1,6 \cdot 10^{-2}$, $\omega(Pt) = 4,286 \cdot 10^{-3}$ et $\omega(\gamma) = 8,571 \cdot 10^{-4}$) répond aux critères mécaniques fixés au préalable, nécessaires pour la fabrication des capteurs :

- $G' \gg G''$ donc le gel peut être considéré comme purement élastique à basse fréquence, c'est-à-dire dans notre domaine d'étude
- $G'_{final} \approx 500$ Pa et donc $E \approx 1500$ Pa en l'absence de relarguage pour un gel en volume
- $G'_{emulsion} = \mu_{emul} = 0,43G'_{final}(t=0) \approx 300$ Pa (et donc $E_{capteur} \approx 900$ Pa).

Finalement, les capteurs ont un module de cisaillement de l'ordre de grandeur voulu.

Le gel est polymérisé à 80°C afin d'optimiser le temps de polymérisation tout en limitant les risques de perte des capteurs. Rappelons que le module de cisaillement du gel est particulièrement sensible à deux paramètres :

- La proportion du réticulant : une variation de 5% de la masse introduite dans le mélange polymérisable modifie d'un facteur deux la valeur finale du module de cisaillement.
- Le temps d'attente à 5°C du mélange polymérisable : le module de cisaillement G'_{final} diminue dans les deux premiers jours de conservation du mélange polymérisable à 5°C, avant de se stabiliser à environ 20% de sa valeur initiale.

Dans notre cas, l'effet du temps d'attente est en général négligeable car les capteurs sont le plus souvent fabriqués dans les heures qui suivent la formation du mélange polymérisable : le gel n'a pas le temps d'évoluer avant d'être émulsifié. En revanche, l'effet du relarguage de l'inhibiteur dans la solution aqueuse est important, ce qui fait que le module de cisaillement vaut environ $G'_{emulsion} = \mu_{emul} = 0,43 \cdot G'_{final}(t=0) \approx 215$ Pa.

7.2 Calibration *in situ* : compression uni-axiale

7.2.1 Expérience

Comme présenté dans la chapitre 5.2.2, à l'échelle des capteurs les effets de tension de surface entre le capteur et le tissu contribuent, comme l'élasticité, à la réponse mécanique du capteur. C'est pourquoi nous avons voulu comparer les résultats de la calibration mécanique macroscopique (voir section 7.1.6) à une calibration mécanique directe *in situ*, effectuée en comprimant le tissu de façon contrôlée.

Des agrégats cellulaires sphériques (sphéroïdes) de cellules CT26 sont utilisés pour cette calibration *in situ*. Ces sphéroïdes ont un diamètre compris entre 80 et 200 μm . Ils sont formés par agitation

en présence de capteurs en suspension, puis maturés entre un et trois jours. Le protocole de formation de ces agrégats est détaillé en annexe 10.7. Pour l'expérience, on sélectionne les agrégats qui contiennent un capteur en leur centre.

Un sphéroïde immergés dans un milieu de culture complet et thermalisé à 37°C est placé sur un banc de compression uni-axiale (fig. 7.7 t=0s) comme décrit dans le chapitre 5.2.2 [149]. Le dispositif a été conçu et mis en place par A. Asnacios. Pour rappel, cette méthode permet d'imposer une déformation constante à l'agrégat maintenu entre deux lames. Lors de l'application d'un échelon de déformation, on observe un saut de la force F exercée par l'agrégat sur les lames qui le contraignent. Puis cette force $F(t)$ relaxe lentement vers l'équilibre sous l'effet de réarrangements cellulaires. La lame souple, de raideur connue, est défléchie pour maintenir constante la déformation. Cette déflexion est enregistrée au cours du temps, permettant de calculer la force $F(t)$ appliquée par l'agrégat.

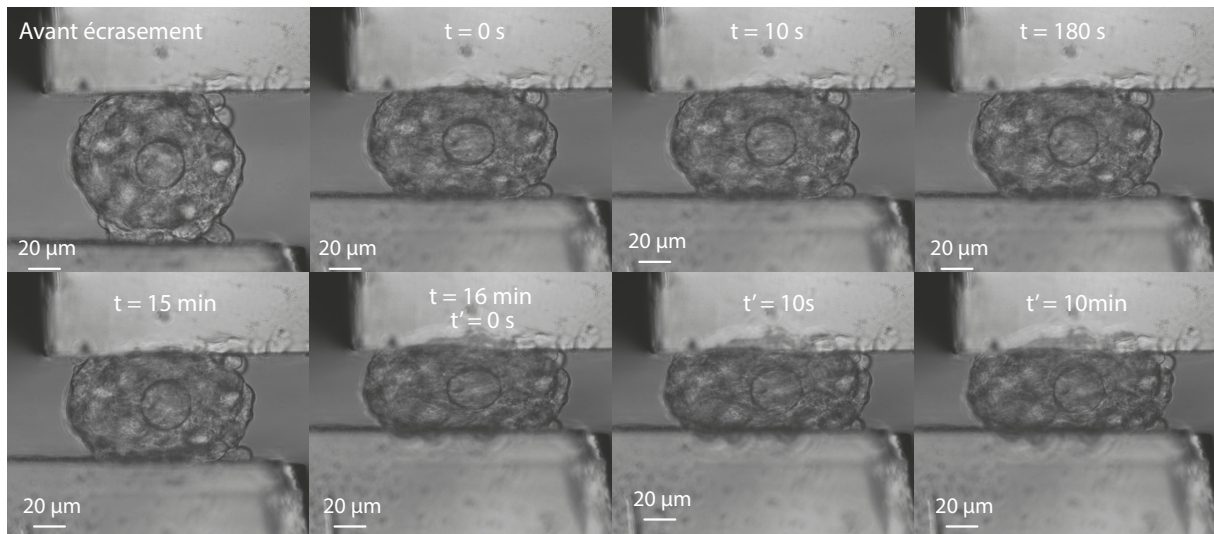


FIGURE 7.7 – Images de suivi de compression d'un agrégat sphéroïde de CT26 sauvages contenant un capteur au centre. L'agrégat est comprimé une première fois à $t = 0$ s. Une deuxième compression est opérée à $t = 16$ min. Un nouveau suivi de la relaxation est opéré, de la même manière. Les temps et les barres d'échelles sont indiquées sur les photos.

Lors de l'application de la déformation, le système est imagé en lumière blanche toutes les deux secondes pendant toute la relaxation, sur une durée de 15 à 30 minutes (fig. 7.7). Le dispositif utilisé ne permet pas une visualisation en fluorescence du capteur. Seul le plan médian de l'agrégat est imagé à chaque instant.. A défaut de pouvoir imagier le capteur en 3D, on suppose une symétrie de révolution selon l'axe orthogonal aux lames et passant par le centre de l'agrégat et du capteur.

Des déformations incrémentales sont appliquées successivement à l'agrégat. Lorsque la force exercée sur les plaques n'évolue plus, un nouvel échelon de déformation est appliqué, et on enregistre la nouvelle relaxation. Les relaxations successives sont alors analysées.

7.2.2 Extraction des données

La contrainte moyenne $\sigma_M(t)$ appliquée au capteur au temps t est définie comme le rapport $\frac{F(t)}{S(t)}$ de la force $F(t)$ exercée par l'agrégat par la surface équatoriale $S(t) = \pi R_1^2$, où R_1 est le rayon de l'agrégat

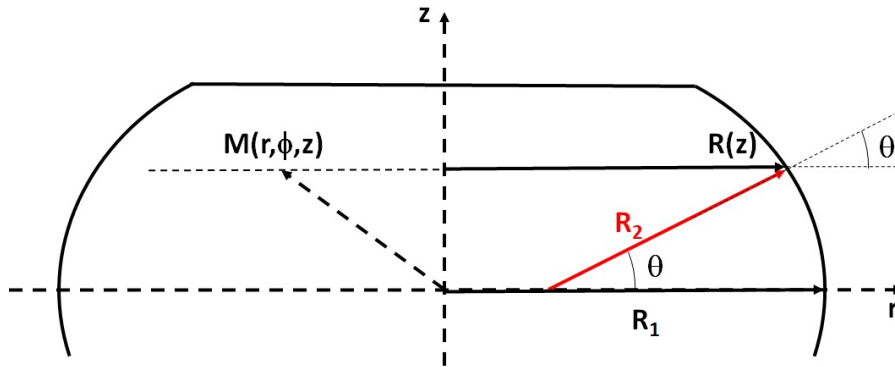


FIGURE 7.8 – Schéma d'un agrégat contraint.

à l'équateur au temps t (fig. 7.8). A chaque temps sont également mesurées les déformations $\epsilon_{rr}(t)$ et $\epsilon_{zz}(t)$ du capteur, respectivement selon l'axe radial Or et l'axe Oz (fig. 7.8).

La position des lames et donc la hauteur de l'agrégat sont maintenues fixes durant la relaxation. On considère que la forme, et donc les rayons de courbure R_1 et R_2 , sont constants au cours de la relaxation. Cette hypothèse se vérifie largement au cours des différentes expériences que nous avons menées (fig. 7.7).

La courbe de la contrainte moyenne σ_M en fonction des déformations ϵ_{rr} et ϵ_{zz} est ensuite tracée, puis ajustée selon le modèle développé par F. Gallet et détaillé en annexe 15.1. Ce modèle repose sur les hypothèses suivantes :

- L'agrégat et le capteur sont initialement sphériques
- Après la compression, la forme de l'agrégat n'évolue pas dans le temps : la relaxation des contraintes est due aux réarrangement cellulaires internes
- Le capteur et l'agrégat sont concentriques
- La contrainte σ_{zz} est supposée homogène dans tout de symétrie plan de l'agrégat passant par son milieu et orthogonal à Oz .

Sous ces hypothèses, les relations entre la contrainte moyenne au centre de l'agrégat et les déformations du capteur sont des relations affines qui s'écrivent :

$$\sigma_M = -\frac{3\mu_{eff}}{1 + \frac{R_1}{2R_2}}\epsilon_{zz} + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) \quad (7.2)$$

et

$$\sigma_M = \frac{3\mu_{eff}}{1 + \frac{R_1}{2R_2}}2\epsilon_{rr} + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) \quad (7.3)$$

où μ_{eff} est le module de cisaillement effectif du capteur, R_1 et R_2 sont les deux rayons de courbure principaux de l'agrégat à l'équateur (fig. 7.8), et γ_{ag} la tension de surface entre l'agrégat et le milieu de culture. Ainsi, l'ajustement des données obtenues par une fonction affine permet de déduire les valeurs du module de cisaillement μ_{eff} et de la tension de surface γ_{ag} .

7.2.3 Résultats

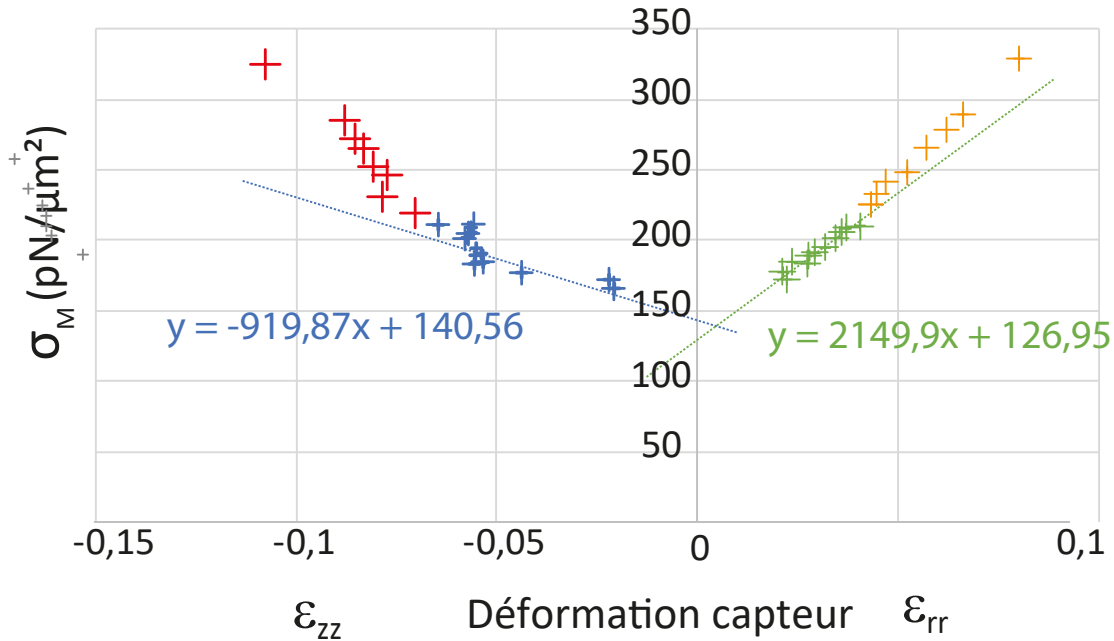


FIGURE 7.9 – Exemple d’évolution de la contrainte moyenne σ_M en fonction de la déformation ϵ_{zz} selon l’axe Oz et de la déformation ϵ_{rr} selon l’axe Or. En rouge et en jaune : première phase de relaxation (30 s). Durant cette phase, l’évolution des contraintes et des déformations est rapide. La contrainte n’est pas homogène dans le plan équatorial de l’agrégat. En bleu et vert : seconde phase de relaxation (15 min). Durant cette phase, l’évolution des contraintes et des déformations est plus lente, les contraintes peuvent être considérées homogènes dans le plan équatorial de l’agrégat et l’ajustement linéaire par les équations 7.2 et 7.3 est justifié.

La figure 7.9 présente la contrainte moyenne en fonction des déformations ϵ_{rr} et ϵ_{zz} pour une relaxation donnée. Sur le graphe, deux phases de relaxation sont à distinguer :

- La première phase, qui dure environ 30 secondes, correspond aux premiers instants de la relaxation (fig. 7.9 points rouges et jaunes). Au cours de cette phase, les contraintes relaxent très rapidement et les réarrangements cellulaires sont nombreux et rapides : l’hypothèse d’une contrainte homogène n’est pas respectée.
- Le deuxième régime (fig. 7.9 points bleus et verts) est celui de la relaxation à des temps plus longs (ici de 30 secondes à 15 minutes). Au cours de cette deuxième phase, les réarrangements cellulaires sont plus lents. On considère alors que l’hypothèse sur l’homogénéité de la contrainte est vérifiée pour pouvoir appliquer les relations 7.2 et 7.3.

On fait un ajustement linéaire sur la deuxième phase de la relaxation. Les coefficients directeurs des deux droites obtenues, selon Oz et selon Or, permettent de déterminer deux valeurs du module de cisaillement effectif μ_{eff} .

Dans la pratique, pour minimiser les erreurs liées à la mesure des déformations, on trace la contrainte moyenne σ_M en fonction de la déformation $\epsilon = \frac{2}{3}(\epsilon_{rr} - \epsilon_{zz})$ moyennée selon les deux axes

Oz et Or. (fig. 7.10). On retrouve un premier régime de relaxation rapide (points en rouge), puis un second régime, linéaire, lorsque la contrainte s'est suffisamment homogénéisée (points bleus).

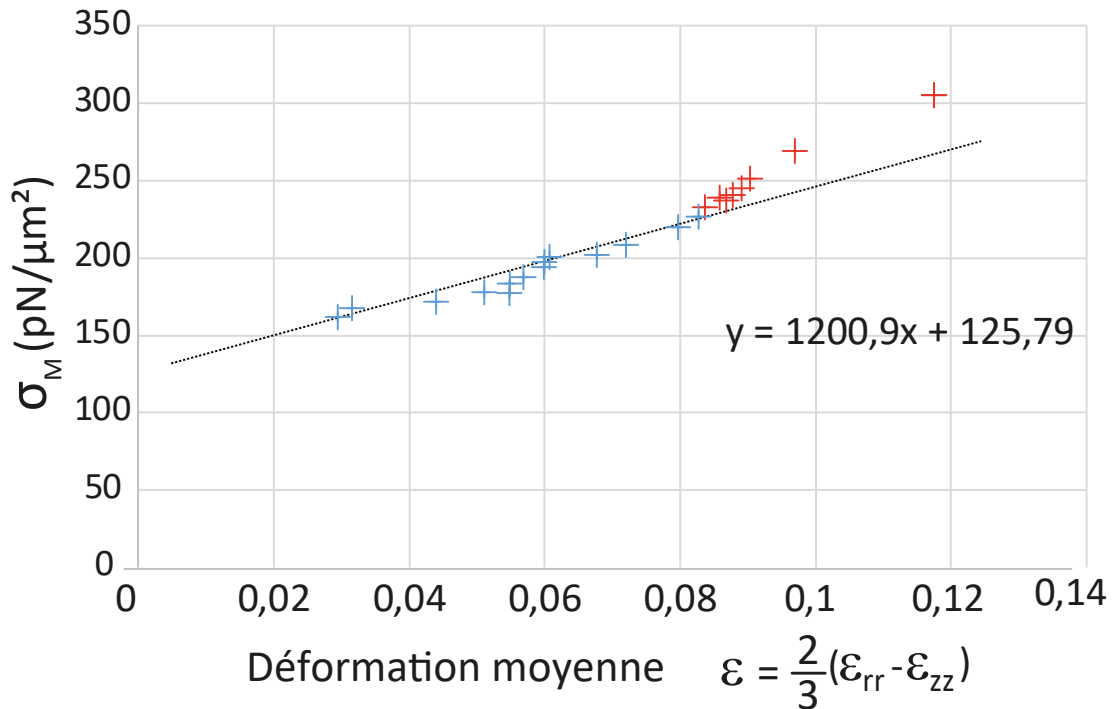


FIGURE 7.10 – Évolution de la contrainte moyenne σ_M en fonction de la déformation moyenne du capteur. En rouge : 30 premières secondes de la relaxation de l'agrégat. En bleu : relaxation plus lente de l'agrégat, de 30 secondes à 15 minutes.

Dans le cas présenté ici $R_1 = 66 \mu\text{m}$ et $R_2 = 34 \mu\text{m}$. Ainsi, le coefficient directeur de la droite d'ajustement donne $\mu_{eff} = 640 \text{ Pa}$. De même l'ordonnée à l'origine de la droite permet de calculer la tension de surface entre l'agrégat et le milieu de culture $\gamma_{ag} = 9,5 \text{ mN/m}$.

Résultats globaux Nous avons effectué des mesures sur des capteurs issus de deux gels différents (tableau 7.11). Pour les capteurs issus du premier gel, une série de 9 mesures a été réalisée :

- Le module de cisaillement moyen obtenu est $\bar{\mu}_{eff1} = 733 \text{ Pa}$ avec un écart type $\bar{\sigma}(\bar{\mu}_{eff1}) = 251 \text{ Pa}$.
- La tension superficielle moyenne entre les agrégats et le milieu de culture a pu être évaluée après une et après deux journées de maturation du même lot d'agrégats :
 - A J1 (trois mesures) : $\bar{\gamma}_{ag} = 5,3 \text{ mN/m}$; écart type $\bar{\sigma}(\bar{\gamma}_{ag}) = 4,3 \text{ mN/m}$
 - A J2 (6 mesures) : $\bar{\gamma}_{ag} = 7,4 \text{ mN/m}$; écart type $\bar{\sigma}(\bar{\gamma}_{ag}) = 2,5 \text{ mN/m}$

Pour les capteurs issus du deuxième gel, une série de 3 mesures a été réalisées :

- Le module de cisaillement moyen obtenu est $\bar{\mu}_{eff2} = 323 \text{ Pa}$ et l'écart type $\bar{\sigma}(\bar{\mu}_{eff2}) = 99 \text{ Pa}$.

- La tension superficielle moyenne entre les agrégats et le milieu de culture après une journée a été mesurée : $\bar{\gamma}_{ag} = 5,8$ mN/m et l'écart type $\sigma(\bar{\gamma}_{ag}) = 9,7$ mN/m. Cet écart type important est dû au fait que des mesures de tension superficielle négative ont pu être mesurées. En effet, les déformations étant difficiles à mesurer, certaines courbes ont une abscisse à l'origine négative. Ce résultat n'est cependant pas physique.

7.2.4 Comparaison avec les mesures rhéométriques macroscopiques

n°	$\bar{\mu}_{eff}$ (Pa)	$\bar{\mu}_{emul}$ (Pa)	γ_{ag} (J1) (mN/m)	γ_{ag} (J2) (mN/m)
Capteurs 1	733 ± 251	710 ± 150	$5,3 \pm 4,3$	$7,4 \pm 2,5$
Capteurs 2	323 ± 99	408 ± 70	$5,8 \pm 9,7$	/

FIGURE 7.11 – Tableau récapitulatif des modules de cisaillement obtenus par méthode de compression uniaxiale à l'échelle du capteur (μ_{eff}), et par méthode rhéologique classique (μ_{emul}). Le résultat obtenu pour les capteurs 1 est une moyenne sur 9 mesures, et celui sur les capteurs 2 est une moyenne sur 3 mesures. Dans ce tableau sont également présentées les tensions superficielles entre les agrégats et le milieu de culture (γ_{ag}) obtenues après 1 et 2 jours de maturation.

Module de cisaillement La comparaison entre le module de cisaillement effectif et le module de cisaillement à l'échelle macroscopique permet, en théorie, de déterminer la composante du module de cisaillement effectif due à la tension superficielle. En effet, nous avons vu dans le chapitre 5.2.2 que la tension superficielle γ de l'interface capteur/tissu contribue au module de cisaillement effectif selon un terme de l'ordre de $\frac{\gamma}{R}$ (où R est le rayon du capteur). On peut donc écrire $\mu_{eff} = \mu_{emul} + \mu_{\gamma}$ où μ_{emul} est le module de cisaillement du gel obtenu par la méthode de rhéométrie macroscopique, et μ_{γ} la contribution de la tension superficielle, évaluée du même ordre que μ_{emul} . Dans le tableau 7.11 sont reportés les modules de cisaillement μ_{emul} et μ_{eff} obtenu par les deux méthodes.

Les capteurs 1 ont un module de cisaillement effectif moyen $\bar{\mu}_{eff1} = 733 \pm 251$ Pa tandis que le module de cisaillement inféré par méthode macroscopique (§7.1.6) est $\mu_{emul} = 710 \pm 150$ Pa.

De même, pour les capteurs 2, le module de cisaillement effectif moyen est $\bar{\mu}_{eff2} = 323 \pm 99$ Pa tandis que le module de cisaillement inféré par méthode macroscopique (§7.1.6) est $\mu_{emul} = 408 \pm 80$ Pa.

Dans ces mesures, μ_{eff} et μ_{emul} ont l'ordre de grandeur attendu. De plus, aux incertitudes de mesures près, $\mu_{emul} \approx \mu_{eff}$: il ne nous est donc pas possible d'en extraire la composante du module effectif dû aux effets de tension superficielle, qui serait alors négligeable. Dans la suite, on négligera cette éventuelle contribution en première approximation.

Tension de surface γ_{ag} entre l'agrégat et le milieu En comparant les données au jour 1 et au jour 2, la tension de surface entre l'agrégat et le milieu semble augmenter avec le temps de maturation des agrégats. Cependant, les résultats obtenus sont très dispersés et le nombre de mesures est faible. Des expériences supplémentaires seraient nécessaire pour confirmer éventuellement cette tendance.

7.2.5 Incertitudes de mesure

L'impossibilité de mesurer ici la contribution de la tension superficielle dans le module de cisaillement des capteurs trouve son origine dans plusieurs incertitudes de mesure, aussi bien *in situ* que macroscopiquement. Une des sources d'incertitude de la calibration *in situ* vient des hypothèses faites sur la géométrie des agrégats. Certaines hypothèses sont raisonnables et en grande partie vérifiées, d'autres le sont moins dans certains cas. Notamment :

- Les agrégats sont supposés initialement sphériques. Plus les agrégats sont maturés plus ils adoptent une forme sphérique. Or, les agrégats qui ont été utilisés avaient maturés seulement un ou deux jours, ce qui n'est pas suffisant pour obtenir une parfaite sphéricité avec cette méthode. C'est pourquoi, si les agrégats de forme trop irrégulière ont été écartés, l'écart à la sphéricité reste importante dans certains cas. En effet, pour les agrégats non contraints étudiés, la dimension des agrégats selon l'axe optique est entre 10 et 50 % inférieure aux dimensions de l'agrégat dans le plan d'observation. On suppose que la contrainte s'applique sur un disque équatorial de rayon R_1 . En fait, cette surface est plus proche d'une ellipse, d'aire inférieure à l'aire du disque de rayon R_1 : par conséquent σ_M , la contrainte que nous évaluons est une borne inférieure de la contrainte réellement appliquée.

En plus de potentiellement mettre en défaut le modèle utilisé, cet écart est une source importante d'erreur sur la valeur de la tension de surface. Par exemple, sur un des agrégats on mesure $R_1 < R_2$. De ce fait, on obtient une valeur négative de la tension de surface γ_{ag} , résultat qui n'est pas physique.

- Lorsque les agrégats sont petits et n'ont maturé qu'une ou deux journées, ils présentent souvent des irrégularités de surface. Ces irrégularités rendent parfois difficile la mesure des rayons de courbures des agrégats.
- Le capteur est supposé au centre de l'agrégat. Là encore, bien que les agrégats aient été sélectionnés pour satisfaire au mieux cette condition, la distance radiale relative par rapport au centre de l'agrégat peut aller jusqu'à 20% du rayon moyen de l'agrégat
- Enfin, il est difficile de repérer avec précision le contour du capteur sur les images en lumière blanche, obtenues à travers le tissu cellulaire. La focalisation est initialement faite sur le plan médian du capteur, mais lorsque l'agrégat est écrasé, cette focalisation peut être modifiée, rendant les bords du capteur moins nets.

La seconde source d'incertitude qui ne permet pas de conclure quand à la contribution de la tension superficielle dans le module de cisaillement provient de l'incertitude sur la valeur du module de cisaillement macroscopique μ_{emul} . En effet, si la valeur moyenne du module de cisaillement en émulsion est de 0.43 fois la valeur du module de cisaillement macroscopique à $t = 0$, la dispersion de ces résultats est importante (0.43 ± 0.09 , voir chapitre 7.1.6). Ce travail n'explore pas les effets de la variation de la composition sur l'état final de l'élasticité du gel en émulsion. Finalement, le facteur 0.43 obtenu est une valeur moyenne qui ne prend pas en compte la composition réelle du gel étudié.

7.3 Conclusion sur la calibration mécanique

A travers deux études rhéologiques, l'une à l'échelle macroscopique et l'autre à l'échelle du capteur *in situ* dans des tissus biologiques, nous avons pu mesurer de façon indépendante le module de cisaillement du gel utilisé pour la fabrication des capteurs (μ_{emul}) et le module de cisaillement effectif (μ_{eff}) des capteurs *in situ*. Ces mesures sont en accord à la fois avec les données que nous obtenons sur le gel à l'échelle macroscopique (avant toute émulsification), mais également entre elles : les valeurs obtenues par les deux méthodes sont très similaires.

Cependant, étant donné l'incertitude importante sur les valeurs du module de cisaillement macroscopique μ_{emul} et μ_{eff} mesurées, les résultats présentés ici ne permettent pas de conclure quant à la contribution des effets de tension superficielle sur le module de cisaillement effectif des capteurs. Afin de quantifier au mieux ces derniers, de nouvelles expériences de calibration *in situ* doivent être réalisées. L'objectif est d'accumuler les résultats sur plusieurs jours de maturation, tout en contrôlant au maximum la forme sphérique des agrégats et la position des capteurs dans les agrégats. En parallèle, la calibration macroscopique des gels doit être affinée en précisant le couplage qui existe entre la composition du gel et l'effet de l'émulsification.

Néanmoins, les deux méthodes conduisent à des résultats compatibles pour le module de cisaillement des capteurs, indépendamment des effets de tension superficielle. C'est pourquoi, pour calculer les contraintes de cisaillement dans les tissus, à partir de la mesure des déformations du capteur, nous utiliserons par la suite la valeur du module de cisaillement $\mu_{eff} = \mu_{emul} = 0.43 \mu_{final}(t = 0)$.

Chapitre 8

Étude des contraintes de cisaillement dans des agrégats cellulaires

8.1 Contexte et méthode

L'agrégat cellulaire est un système modèle tumoral largement utilisé en biologie qui permet l'étude de comportements cellulaires *in vitro* [21]. La présence et le rôle des contraintes mécaniques qui se développent spontanément dans ces systèmes restent assez méconnues. L'insertion des capteurs de contraintes de cisaillement développés dans ce travail permettent une mesure de ces contraintes en différents points de ces agrégats.

Préparation d'agrégats Pour cette étude, les cellules utilisées sont issues d'une lignée CT26-WT transfectée Lifeact/GFP (protocole de transfection en annexe 10.2). Cette lignée cellulaire de carcinome colorectal murin a été marquée par la GFP sur la F-Actine. C'est une lignée cellulaire exprimant peu de cadhérines, mais qui permet la formation d'agrégats cohésifs. La présence d'intégrines et la faible présence de cadhérines justifie un traitement de surface des capteurs par fibronectine avant leur insertion dans l'agrégat (annexe 10.7). Les agrégats sont formés par agitation selon le protocole en annexe 10.7. Le diamètre des agrégats utilisés ici, compris entre 100 et 500 μm , est supérieur à celui des agrégats utilisés pour la calibration. Entre 1 et 5 capteurs peuvent être présents dans un même agrégat, à différentes positions.

Après deux jours de maturation, les agrégats sont déposés dans des boîtes de Petri traitées en surface par de la fibronectine. Après quelques heures, les agrégats sédimentent et adhèrent à la surface [163] [164]. Le projet initial, qui n'a pu être que partiellement réalisé, consistait à réaliser une carte spatiale et temporelle des contraintes pendant l'étalement de l'agrégat.

Les agrégats sont imagés sous un microscope deux photons de la plateforme d'imagerie de l'Institut Jacques Monod, régulé en température à 37°C. Les capteurs sont imagés juste après l'adhésion des agrégats au substrat, puis, lorsque cela est possible, ils sont suivis au cours de l'étalement des agrégats.

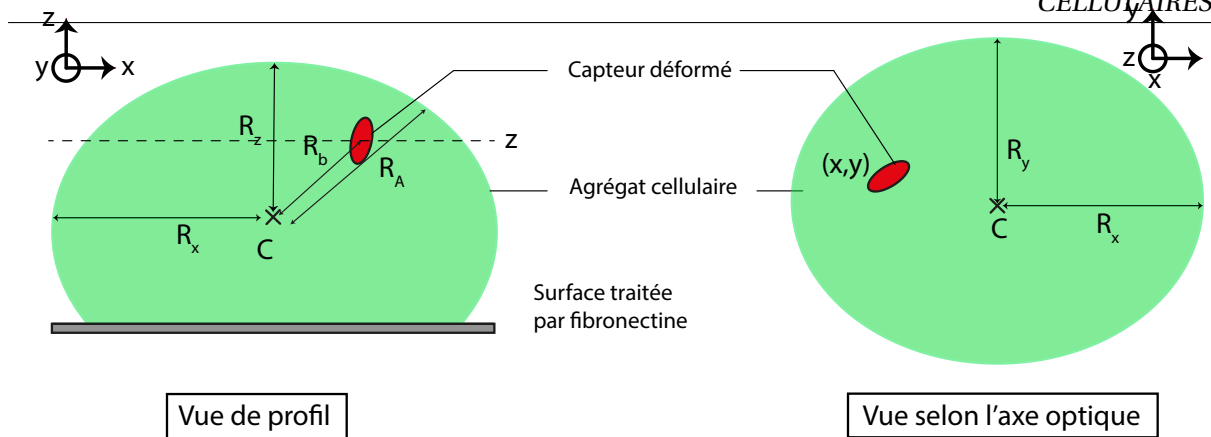


FIGURE 8.1 – Schéma de la position des capteurs (rouge) dans les agrégats (vert). Les capteurs sont repéré par leur trois coordonnées dans l'espace (x, y, z) . Le centre C de l'agrégat est défini comme le centre (C_x, C_y, C_z) de l'ellipse 2D de taille maximale dans un plan horizontal.

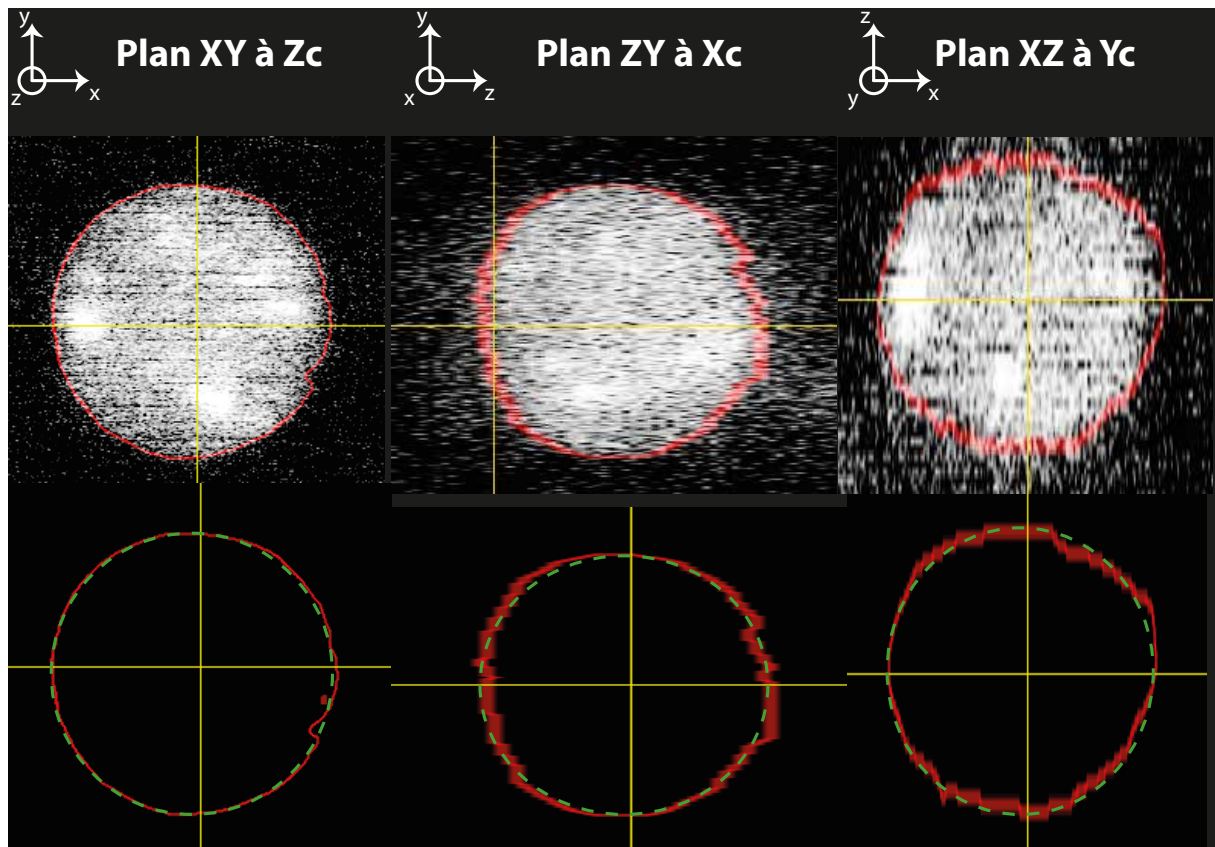


FIGURE 8.2 – Exemple de traitement d'un capteur (gris) imagé en microscopie 2-photons dont le contour (rouge) a été extrait et ajusté par un ellipsoïde (vert). L'ellipsoïde obtenu a trois demi-axes $R_x = 17,9 \mu\text{m}$, $R_y = 17,4 \mu\text{m}$ et $R_z = 20,3 \mu\text{m}$. La direction de ces axes sont donnés par la matrice de passage de la base propre (X, Y, Z) de l'ellipsoïde vers la base naturelle du microscope (x, y, z) .

Méthode d'analyse Les agrégats fabriqués ne sont pas parfaitement sphériques mais de forme ellipsoïdale. En mesurant les trois demi-axes de l'agrégat, on observe un écart moyen à la sphéricité de

15 ± 12 %. Cependant, puisque l'agrégat est en contact avec la surface, il est considéré comme un ellipsoïde tronqué au niveau de la surface de contact avec le substrat (fig. 8.1 (gauche)). L'intégralité du volume de l'agrégat est imagé grâce à la fluorescence des cellules. On mesure les demi-axes (R_x, R_y) selon les axes x et y au niveau du plan équatorial défini comme le plan horizontal où l'ellipse a une taille maximale. Les coordonnées du centre C de l'agrégat sont définies de la même manière : C est le centre de l'ellipse de demi-axes R_x et R_y (fig. 8.1 (droite)). Ainsi, le troisième demi-axe R_z selon l'axe z est défini comme la distance entre C et le haut de l'agrégat (fig. 8.1 (droite)).

Pour chaque capteur, on repère ses coordonnées d'espace. Ensuite, pour normaliser la position du capteur dans l'agrégat, on définit le rapport $r = \frac{R_b}{R_A}$ de la distance R_b entre le centre du capteur et le centre de l'agrégat sur la distance R_A entre le centre de l'agrégat et sa surface selon un rayon passant par le centre du capteur (fig. 8.1 (gauche)).

Les capteurs sont imagés par sections d'intervalle de $0,5 \mu\text{m}$. Le contour est ensuite détecté selon la méthode de contour actif décrite dans le chapitre 5.3 (code en annexe 17.1). De plus, afin de corriger l'aberration optique causée par le capteur, qui se comporte comme un dioptre sphérique réfractant la lumière, les dimensions du capteur dans la direction Oz sont multipliées par un facteur correctif de $0,935$ (voir annexe 16). A partir du contour obtenu, un ajustement à l'ellipsoïde le plus proche est réalisé : la déformation du capteur est alors intégralement caractérisée par la longueur et la direction de ses trois demi-axes (fig. 8.2).

8.2 Résultats et discussion

8.2.1 Répartition des contraintes dans l'espace

Résultats

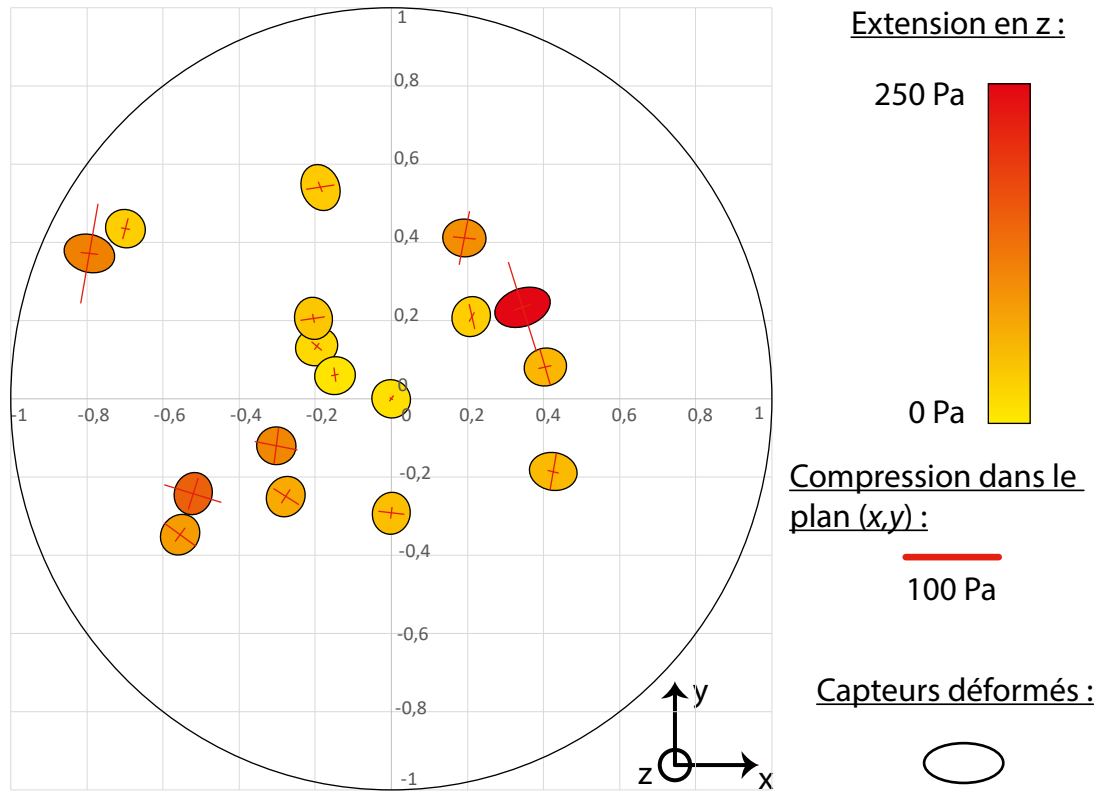


FIGURE 8.3 – Représentation des contraintes et des déformations pour 17 capteurs dans 13 agrégats distincts. La distance au centre a été normalisée par la distance entre le centre et la surface de l'agrégat. Les ellipses (noires) représentent la déformation relative des capteurs projetée sur le plan xy . La couleur de remplissage des ellipses représente la contrainte mesurée selon l'axe z . Les barres rouges représentent les contraintes principales de cisaillement dans le plan xy . Elles sont toujours négatives (compression) et la longueur de la barre est proportionnelle à leur amplitude.

La figure 8.3 illustre les résultats obtenus par l'analyse de 17 capteurs de module de cisaillement $\mu = 430$ Pa, imagés dans 13 agrégats distincts. Sur cette carte, la projection de la déformation relative des capteurs dans le plan xy est schématisée par des ellipses. Étant donné que les déformations des capteurs sont faibles (moins de 10%), le rapport des demi-axes des ellipses a été multiplié par un facteur 4 pour faciliter la visualisation. Les contraintes principales de cisaillement associées sont représentées par des barres rouges dont la longueur est proportionnelle à la contrainte. Dans

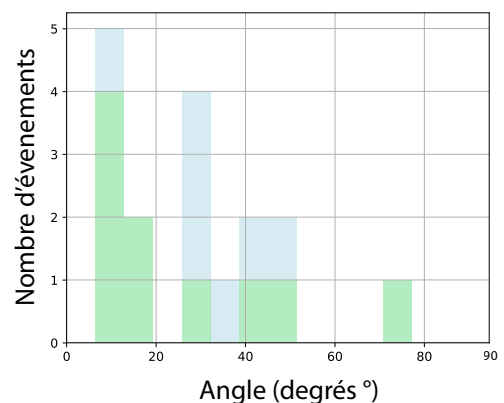


FIGURE 8.4 – Distribution des angles entre le demi-axe principale du capteur dans le plan (xy) et le rayon de l'agrégat. En bleu : sans seuil. En vert : avec seuil sur la déformation de $0,5 \mu\text{m}$.

presque toutes nos observations, on remarque que

l'un des demi-axes principaux est très voisin de l'axe z ($94 \pm 6 \%$), ce qui justifie une projection des deux autres demi-axes sur le plan xy .

A noter que, ici, les projections des contraintes principales dans le plan xy sont négatives, dirigées vers le centre du capteur (voir discussion). L'orientation des ellipses (et des contraintes associées) ne semble pas aléatoire. En effet, le plus grand demi-axe de ces ellipses semble majoritairement orienté dans la direction radiale de l'agrégat. L'histogramme de la figure 8.4 quantifie cette observation. Cet histogramme représente la répartition des angles entre le grand axe de l'ellipse des déformations et la direction radiale de l'agrégat (ramenée entre 0° et 90°). Les données confirment que la distribution n'est pas aléatoire, avec des angles plus proche de 0° que de 90° , et dont la valeur moyenne est de 28° avec un écart-type de 18° . Les déformations relatives du capteur sont supérieures dans la direction ortho-radiale par rapport à la direction radiale, et donc les axes principaux des contraintes de cisaillement exercées sur les capteurs dans le plan xy sont également majoritairement orientés selon les directions radiale et orthoradiale, l'amplitude des contraintes étant supérieure dans la direction orthoradiale.

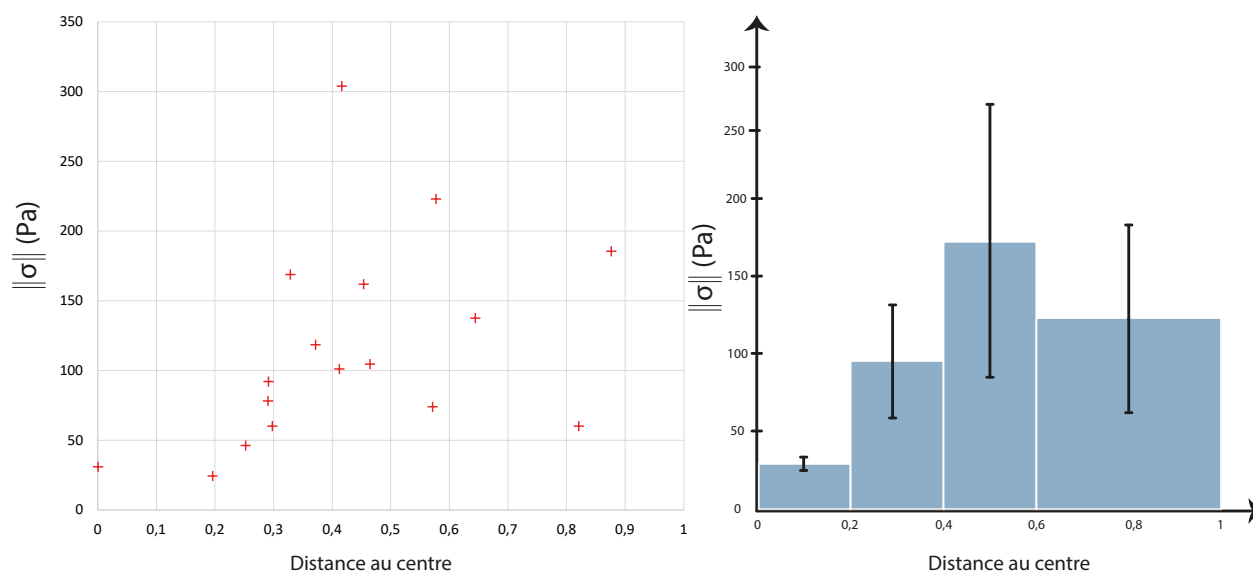


FIGURE 8.5 – (gauche) Distribution de la norme de la contrainte de cisaillement en fonction de la distance normalisée au centre de l'agrégat. (droite) Distribution de la norme de la contrainte de cisaillement par tranche de distance normalisée au centre de l'agrégat.

D'autre part, on observe sur la figure 8.3 que les contraintes de cisaillement sont globalement plus faibles lorsqu'on s'approche du centre de l'agrégat. On définit la "norme" de la contrainte de cisaillement totale $\|\sigma\|$ comme la racine de la somme des carrés des composantes de la contrainte de cisaillement : $\|\sigma\| = (\sigma_{xx}^2 + \sigma_{yy}^2 + \sigma_{zz}^2)^{\frac{1}{2}}$. Cette norme définit une amplitude des contraintes de cisaillement exercées sur le capteur. La figure 8.5 représente cette norme $\|\sigma\|$ en fonction de la distance normalisée au centre de l'agrégat (gauche). On observe que la répartition de $\|\sigma\|$ n'est pas uniforme. Elle tend à augmenter en s'éloignant du centre. L'histogramme de la figure 8.5 (droite) confirme cette

tendance bien que les barres d'erreurs soient importantes : la norme augmente et atteint un maximum à mi-distance du rayon de l'agrégat avant de diminuer à nouveau jusqu'à la surface. Toutefois, étant donné le faible nombre de mesures qui ont pu être réalisées au voisinage du bord des agrégats, la fiabilité de ces données doit être considérée avec beaucoup de précaution.

Discussion

Ces expériences, menées sur des agrégats libres (non soumis à des contraintes externes) et s'étalant spontanément, ont montré la fiabilité de la méthode utilisée en mettant en évidence des déformations des capteurs et par conséquent des contraintes de cisaillement développées spontanément dans l'agrégat. Les résultats présentés montrent une orientation privilégiée des contraintes de compression selon les directions radiale et ortho-radiale dans le plan xy des agrégats, et une augmentation de la norme de la contrainte de cisaillement totale $\|\sigma\|$ en s'éloignant du centre de l'agrégat.

D'autre part, nous constatons que tous les agrégats présentent un axe principal proche de l'axe Oz et selon lequel la contrainte est toujours de signe négatif (en extension), tandis qu'elle est systématiquement positive dans les deux autres directions (proches du plan xy). Aucune hypothèse vraisemblable pour expliquer une orientation préférentielle des contraintes de cisaillement dans l'agrégat selon l'axe Oz ne peut être proposée. A ce stade, il faut donc envisager un artefact lié à la méthode d'imagerie. En effet, certains capteurs sont situés à une grande profondeur dans le tissu ($> 100 \mu\text{m}$), et la qualité de l'image en pâtit : la diffusion de la lumière par le tissu peut modifier le contour apparent du capteur et rend sa détection plus difficile. Cependant, aucun lien entre la position du capteur de l'agrégat et son anisotropie selon l'axe optique Oz n'a pu être clairement établi.

Toutefois, cet éventuel artefact ne remet pas en cause l'existence de l'anisotropie de forme observée dans le plan xy , ni la réalité de l'anisotropie des contraintes radiales et ortho-radiales. De même, les variations de la norme totale de la contrainte de cisaillement ne sont pas remises en question par cet éventuel artefact, qui est a priori sans effet dans la direction radiale. Il n'influe donc pas sur l'évolution de la norme en fonction de la distance au centre.

A ce stade, il est intéressant de comparer nos mesures à celles effectuées par Lee et al. [99] avec des capteurs d'hydrogels mesurant la contrainte totale (isotrope et anisotrope) dans des agrégats sphériques (fig. 8.6). Dans leur article, les auteurs présentent les contraintes mesurées en fonction de la distance au bord de l'agrégat, dans les directions radiales et orthoradiales. Ces deux composantes sont d'amplitude comparable, de signe négatif, comprise entre -400 et -1500 Pa. Leur valeur moyenne correspond donc à la partie isotrope de la contrainte (pression). La précision de leur mesure ne permet pas d'en déduire l'anisotropie de cette contrainte, qui est la contrainte de cisaillement. Toutefois, d'après la figure 8.6, l'ordre de grandeur de la différence entre ces deux mesures ($\leq 100 \text{ Pa}$) serait compatible avec notre propre mesure des contraintes de cisaillement.

D'autre part, dans leur article, les composantes radiale et ortho-radiale de la contrainte totale sont tracées en fonction de la distance au bord de l'agrégat (fig. 8.6). Les deux composantes sont négatives et augmentent en amplitude avec la distance au bord de l'agrégat. Elles atteignent ensuite un maximum puis diminuent de nouveau en s'approchant du centre de l'agrégat. Bien que les deux expériences ne mesurent pas les mêmes quantités, ces résultats peuvent être mis en parallèle avec

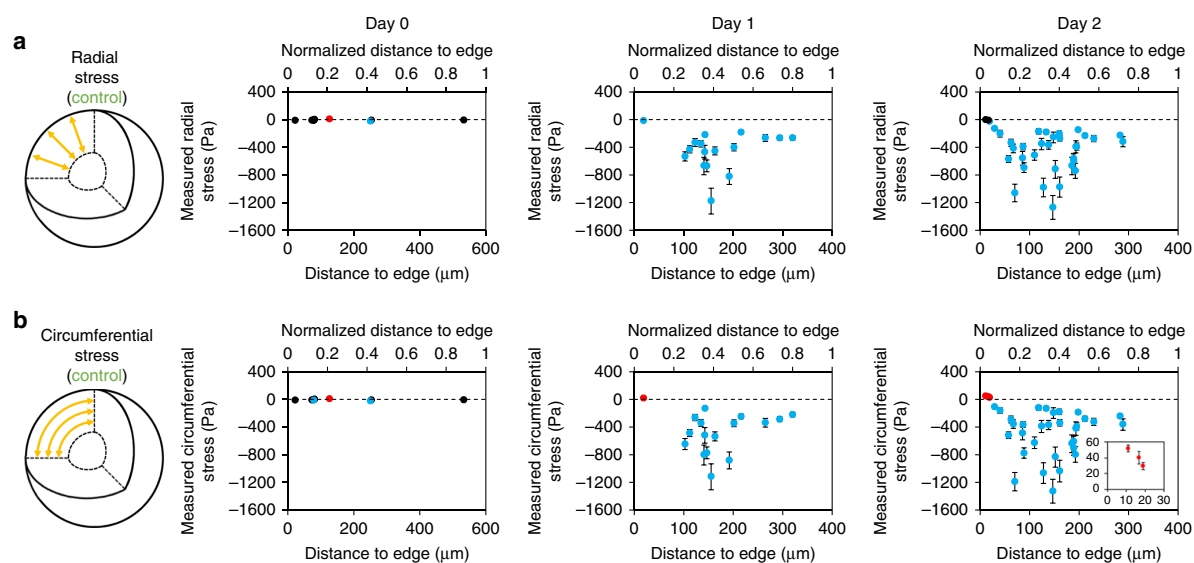


FIGURE 8.6 – Cartographie spatiale des contraintes générées par les cellules dans les cultures de sphéroïdes de fibroblastes 3D. Les contraintes tissulaires internes dans la direction (a) radiale et (b) ortho-radiale sont mesurées aux jours (n=9), 1 (n=17) et 2 (n=35) de culture. Au jour 2, les contraintes de compression dans les directions radiale et ortho-radiale aussi grandes que 1,3kPa sont mesurées dans la direction ortho-radiale à la surface externe du sphéroïde. Figure extraite de l'article de Lee et al. [99]

les nôtres : nous observons également une augmentation puis une diminution de l'amplitude de la contrainte de cisaillement totale, en partant du centre de l'agrégat. De plus, la dispersion observée par les deux méthodes met en évidence une grande variabilité des contraintes dans les agrégats.

En résumé, nous avons pu obtenir une première estimation de la répartition des contraintes dans les agrégats, ce qui valide la faisabilité de la technique que nous proposons. Cependant, la méthode doit être améliorée afin d'obtenir des résultats plus précis. Tout d'abord, la question de la présence d'un artefact de reconstruction de l'image selon l'axe optique Oz doit être élucidée. De plus, plusieurs paramètres n'ont pas pu être pris en compte dans l'analyse des capteurs (profondeur, taille des agrégats...). Seule une projection des contraintes sur le plan xy est présentée : la position du capteur selon l'axe optique peut jouer un rôle et doit être étudiée avec plus d'attention. De plus, les agrégats étudiés ont des tailles variant de 100 à 400 μm de diamètre : cette variation de taille peut, là aussi, jouer un rôle sur l'amplitude des contraintes développées. Enfin, la forme des agrégats est ellipsoïdale et non sphérique : là encore, la position exacte dans l'agrégat peut avoir une influence sur les contraintes subies par le capteur. Pour s'affranchir de cela, des expériences menées sur des agrégats sphériques et de tailles semblables doivent être réalisées.

8.2.2 Évolution dans le temps

Quelques heures après avoir été déposés, les agrégats s'étalent sur le substrat pendant une demie journée environ, jusqu'à étalement complet. Certains capteurs ont pu être imagés toutes les 15 minutes pendant une partie de cette phase d'étalement afin de suivre l'évolution des contraintes dans les agrégats.

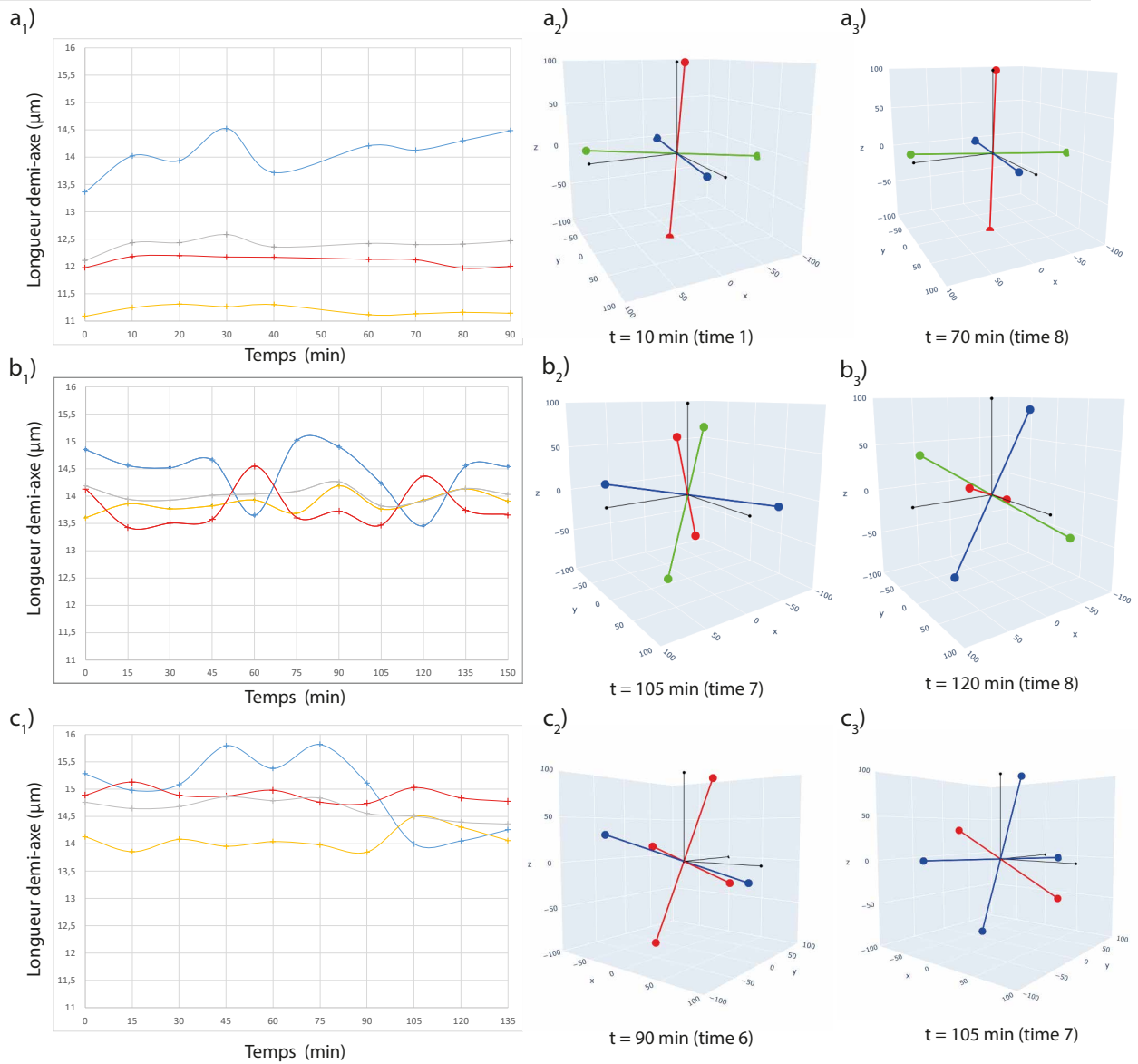


FIGURE 8.7 – Evolution des longueurs et des orientations des demi-axes des capteurs lors de l'étalement d'agrégats. (a_1, b_1, c_1) Évolution de la longueurs des trois demi-axes de différents capteurs suivis dans le temps. Courbe bleue : demi-axe R_z principalement orienté vers l'axe z . Courbe rouge : demi-axe R_x principalement orienté selon la direction de l'axe x . Courbe jaune : demi-axe R_y principalement orienté selon la direction de l'axe y . Courbe grise : rayon moyen de la sphère équivalente au volume de l'ellipsoïde de demi-axe R_x, R_y et R_z . (a_2, a_3) Représentation en 3D de l'orientation des axes principaux du capteur à deux temps différents associé au graphique a_1 . (b_2, b_3) Représentation en 3D de l'orientation des axes principaux du capteur à deux temps différents associé au graphique b_1 . (c_2, c_3) Représentation en 3D de l'orientation des axes principaux du capteur à deux temps différents associé au graphique c_1 . Code couleur : rouge, axe de longueur maximal; bleu, axe de longueur minimal; vert, axe de longueur intermédiaire. Si deux axes sont de même couleur, c'est que la différence de leurs longueurs est inférieure au seuil de détection que nous avons fixé à $0,5 \mu\text{m}$ (voir chap. 5.3.3).

A partir des longueurs des trois demi-axes, on calcule le rayon moyen $R_{\text{moy}} = (R_1 R_2 R_3)^{\frac{1}{3}}$ du capteur à chaque temps (fig. 8.7 a_1, b_1, c_1 courbes grises). On élimine les courbes pour lesquelles le rayon moyen (et donc le volume) varie de façon trop importante au cours du temps, car cela dénote une

imprécision de la méthode de détection du contour. L'orientation des axes est également étudiée et représentée en quatre dimensions (trois dimensions d'espace + animation temporelle).

Dans la majorité des cas étudiés, on constate que l'orientation des demi-axes principaux des capteurs ont des orientations et des longueurs stables dans le temps. La figure 8.7 a_1 présente une courbe d'évolution caractéristique de la longueur des demi-axes du capteur dans le temps : malgré une incertitude sur la longueur de l'axe principalement orienté selon l'axe optique z (courbe bleue), le rayon moyen (courbe grise) est stable. Ce graphique n'informe cependant pas sur l'orientation des axes qui doit alors être étudiée séparément. Les figures 8.7 a_2 et a_3 sont des représentations de l'orientation des axes du capteurs à deux temps différents (après 10 minutes et 70 minutes). La figure supplémentaire 1 est la représentation complète dans le temps de l'orientation de ces demi-axes dans l'espace. On observe ainsi que les orientations n'évoluent pas non plus dans le temps.

Il arrive cependant qu'on observe des événements ponctuels pour lesquels la longueur des axes et/ou leur orientation subit une variation. Une variation d'orientation est notamment observable sur les figures 8.7 b_1 , b_2 , b_3 . En effet, sur le graphique b_1 , plusieurs saut de longueurs sur deux des demi-axes principalement orientés selon z (courbe bleue) et selon x (courbe rouge) se produisent (à 60 et 120 minutes). Si une modification de la longueur des demi-axes principaux peut être envisagée, l'analyse de l'orientation des axes semble infirmer cette hypothèse. En effet, on observe que la longueur des demi-axes principaux n'évolue pas, ou peu, mais que l'orientation de ces axes est modifiée (fig. 8.7 b_3 et figure supplémentaire 2). Ainsi, le demi-axe principalement orienté selon l'axe z à 105 minutes (b_2) subit une rotation qui a pour effet de faire tourner sa composante principale de l'axe z à l'axe x . Il est alors orienté principalement selon l'axe x à 120 minutes (b_3) : sa longueur n'a pas évolué, mais son orientation a été modifiée. De la même manière, une nouvelle rotation ramène les courbes du graphique b_1 à l'état précédent (entre 120 minutes et 135 minutes).

Un second type d'événement est observé sur le graphique de la figure 8.7 c_1 . En effet, on observe une diminution importante de la longueur du demi-axe principalement orienté selon l'axe z (courbe bleue). Cette importante diminution est compensée par l'augmentation du demi-axe orienté principalement selon l'axe y (courbe jaune). A noter que le rayon moyen, pour sa part, est constant. En parallèle de ces variations de longueur, on observe que l'orientation des axes reste stable dans le temps (fig. 8.7 c_2 et c_3 et figure supplémentaire 3). Cette stabilité de l'orientation des demi-axes couplée à la variations de longueur des demi-axes indique que le phénomène observé est probablement celui d'une modification de l'amplitude des déformation subies par le capteur selon chaque axe, sans modification d'orientation.

Ces observations démontrent la capacité de la méthode employée à détecter *in situ* à la fois des contraintes développées dans les agrégats et leur variation au cours du temps, et également des variations d'orientation de ces contraintes.

Chapitre 9

Mesure des contraintes de cisaillement au cours du développement de l'embryon du poisson-zèbre

9.1 Contexte

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, lors de l'embryogenèse du poisson-zèbre, et plus précisément au cours de la gastrulation à partir de 50 % d'épibolie, la plaque pré-chordale (au front de migration) et la notochorde (en arrière du front) se développent et migrent entre la couche vitelline et le blastoderme. Tandis que le blastoderme croît vers le pôle végétal, la plaque pré-chordale et la notochorde croissent à contre sens, vers le pôle animal. Différentes études laissent penser que le moteur de la migration des cellules de la plaque pré-chordale serait la génération de contraintes mécaniques par la notochorde. Ces contraintes se répartissent dans le tissu de la plaque pré-chordale : le gradient de contrainte résulterait de la migration des cellules de la plaque pré-chordale. Pour explorer cette hypothèse nous avons, en collaboration avec Arthur Boutillon, doctorant de Nicolas David (CNRS) du laboratoire d'optique et des biosciences de l'Ecole Polytechnique, intégré des capteurs dans la plaque pré-chordale du poisson-zèbre au début de sa formation afin de mesurer la répartition des contraintes dans cet organe. .

9.2 Méthodes

Les poissons-zèbres Les poissons-zèbres sont élevés à l'animalerie de l'école polytechnique sur le plateau de Saclay. Les poissons-zèbres utilisés sont issus de la lignée transgénique $Tg(-1.8gsc : GFP)^{ml1}$ [165]. Ce gène constitue un marquage fluorescent qui s'exprime dans le mésendoderme présomptif de la plaque pré-chordale tout au long de la gastrulation. Bien qu'il ne soit pas spécifique à la plaque pré-chordale, celle-ci se distingue facilement par une analyse anatomique des tissus fluorescents dans l'embryon. La ponte et la fécondation des œufs du poisson-zèbre est faite en pleine eau. Les embryons se développent à 28°C. La baisse de température, jusqu'à 15°C, permet de ralentir le développement de l'embryon, sans l'altérer : l'éclosion d'un œuf se fait après 1 jour à 28°C et en 3

jours à 26°C.

Insertion des capteurs La suspension de capteurs est décongelée puis maintenue dans une solution de PBS. Les capteurs ne sont pas traités avec de la fibronectine car les cellules de la plaque pré-chordale expriment très peu d'intégrines. Un capteur est inséré à l'aide d'une micro-pipette en verre au sein de la plaque pré-chordale en cours de formation (c'est-à-dire au stade entre 50 et 60 % d'épibolie). Cette étape est délicate, car l'embryon est fragile : une manipulation trop brusque ou un contact avec l'air entraîne la destruction de l'embryon. Après l'injection des capteurs, les embryons sont incubés à 28°C.

Acquisition des images Afin d'imager la progression de la plaque pré-chordale, les embryons sont placés sous un microscope confocal (Leica Sp8) thermalisé à 28°C. A ce stade de développement, la plaque pré-chordale migre vers le pôle animal à une vitesse allant jusqu'à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$: le temps d'acquisition de l'image en 3D du capteur doit être inférieur à 15 secondes pour éviter une dérive de position entre le haut et le bas du capteur, déformant ainsi artificiellement le capteur. En-dessous de 15 secondes, la dérive du capteur est inférieure à 0,5 μm , ce qui se situe en dessous du seuil de détection que nous avons fixé pour la détection de contour (voir chap. 5.3.3). Les embryons sont imagés une première fois à intervalle régulier de trente secondes sur une dizaine de minutes, puis une seconde fois après un temps d'attente d'une demi-heure environ, à 28°, afin de se trouver à un stade plus avancé de l'épibolie, allant jusqu'à 80 %.

Analyse des images Lors de l'analyse des images, comme pour les agrégats, un facteur correctif $f = 0,935$ a été appliqué sur toutes les dimensions selon l'axe optique (coordonnée notée z dans la suite). Ce facteur correctif a été mesuré avec des capteurs sphériques de gel indéformable ($\mu = 15000 \text{ Pa}$) sur le même dispositif optique. Il permet de corriger l'aberration optique causée par le capteur qui se comporte comme un dioptre sphérique (voir annexe 16). Le contour des capteurs est ensuite détecté à l'aide de la méthode de contour actif détaillée dans le chapitre 5.3. L'orientation et les valeurs des demi-axes des ellipsoïdes sont analysées. Pour représenter les résultats, les capteurs sont resitués à la position qu'ils occupaient dans la plaque pré-chordale. Par commodité, cette dernière a été divisée spatialement en 3 zones (avant, milieu et arrière), elles-mêmes divisées en 3 sous-zones (gauche, centre et droit) (fig. 9.2).

9.3 Résultats

9.3.1 Suivi des contraintes exercées sur un capteur en fonction du temps

La figure 9.1 présente l'évolution de la longueur des demi-axes d'un capteur inséré dans la plaque pré-chordale, suivi dans le temps pendant 15 minutes. On observe que les demi-axes évoluent significativement au cours du temps. Le demi-axe R_z principalement orienté selon l'axe z (rouge) est, au début, le demi-axe le plus long de l'ellipsoïde ($R_z(t=0) = 17,2 \mu\text{m}$). Sa valeur diminue ensuite continuellement au cours du suivi. Sa variation sur 15 minutes est de $\Delta R_z \simeq -2 \mu\text{m}$, ce qui est largement

supérieur à la précision estimée de la méthode de détection du contour ($0,5 \mu\text{m}$). Le demi-axe R_y (en jaune), principalement orienté perpendiculairement à la direction de progression de la plaque pré-chordale, augmente mais sa variation ($\Delta R_y = +0,8 \mu\text{m}$) est bien inférieure à celle de R_z . Ce demi-axe devient l'axe de plus grande dimension de l'ellipsoïde après 15 minutes de suivi. Enfin, le troisième demi-axe R_x , principalement orienté dans la direction de progression de la plaque pré-chordale, est stable dans le temps ($\Delta R_x \approx 0 \mu\text{m}$). La courbe grise représente l'évolution du rayon équivalent d'une sphère de volume égal à celui du capteur à instant : $R_{moy} = (R_x R_y R_z)^{\frac{1}{3}}$. Cette courbe est donc représentative de l'évolution dans le temps de la mesure du volume du capteur. On observe que R_{moy} est relativement stable dans le temps ($\Delta R_{moy} \approx -0,3 \mu\text{m}$), ce qui est une validation des mesures effectuées.

Le capteur se trouve initialement dans un état d'extension selon l'axe Oz . Cette extension diminue au cours du temps, et après 10 minutes, les trois demi-axes sont quasiment égaux et leur orientation n'est pas bien définie : le capteur passe par une forme sphérique. Ensuite, le capteur reprend une forme ellipsoïdale, avec maintenant une compression selon l'axe z (fig. 9.1 courbe bleue (haut et bas) et figure supplémentaire n°4).

Les orientations des demi-axes de l'ellipsoïde ont été tracées en fonction du temps (voir figure supplémentaire). Dans un premier temps, on observe que l'extension selon l'axe z diminue, mais son orientation est stable. Dans le même temps, l'orientation des axes selon x et y fluctue légèrement (car les longueurs des demi-axes sont très voisines). A 10 minutes, on observe la transition pendant laquelle le capteur retrouve une forme sphérique : les demi-axes n'ont plus d'orientation spécifique. L'orientation est ensuite à nouveau marquée lorsque les demi-axes retrouvent des longueurs distinctes.

Cet exemple montre que les capteurs permettent de mesurer des contraintes de cisaillement. L'ordre de grandeur de ces contraintes est de quelques dizaines de Pa et le suivi dans le temps permet d'observer des évolutions de contraintes au sein du tissu.

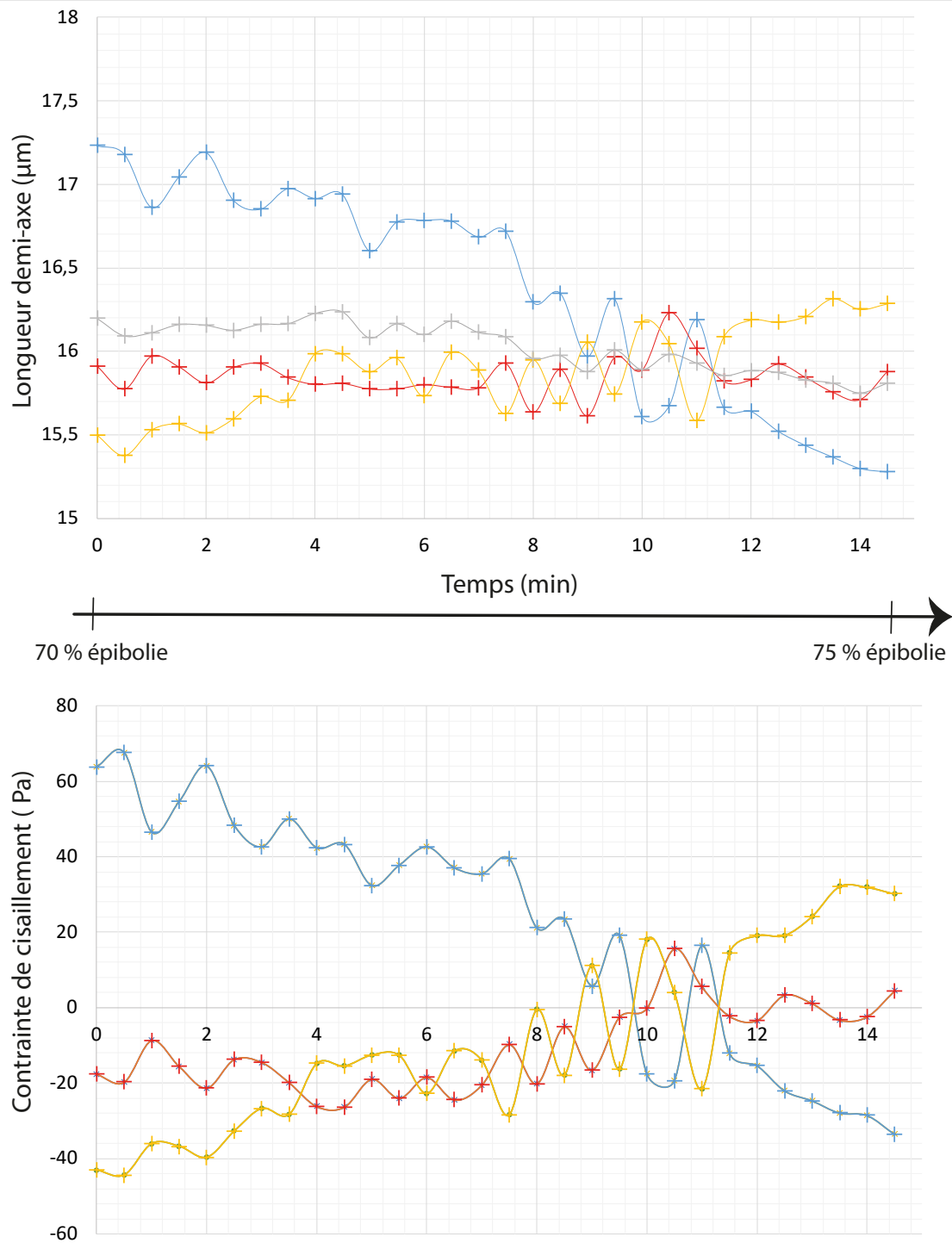


FIGURE 9.1 – Évolution de la longueur des trois demi-axes d'un capteur suivi dans le temps (haut) et des contraintes de cisaillement associées (bas). Courbe bleue : demi-axe R_z principalement orienté vers l'axe z . Courbe rouge : est le suivi du demi-axe R_x principalement orienté selon la direction de progression de la plaque pré-chordale. Courbe jaune : demi-axe R_y perpendiculaire à la direction de progression du tissu. Courbe grise (haut) : rayon de la sphère équivalente au volume de l'ellipsoïde de demi-axe R_x , R_y et R_z .

9.3.2 Cartographie des contraintes dans l'espace et le temps

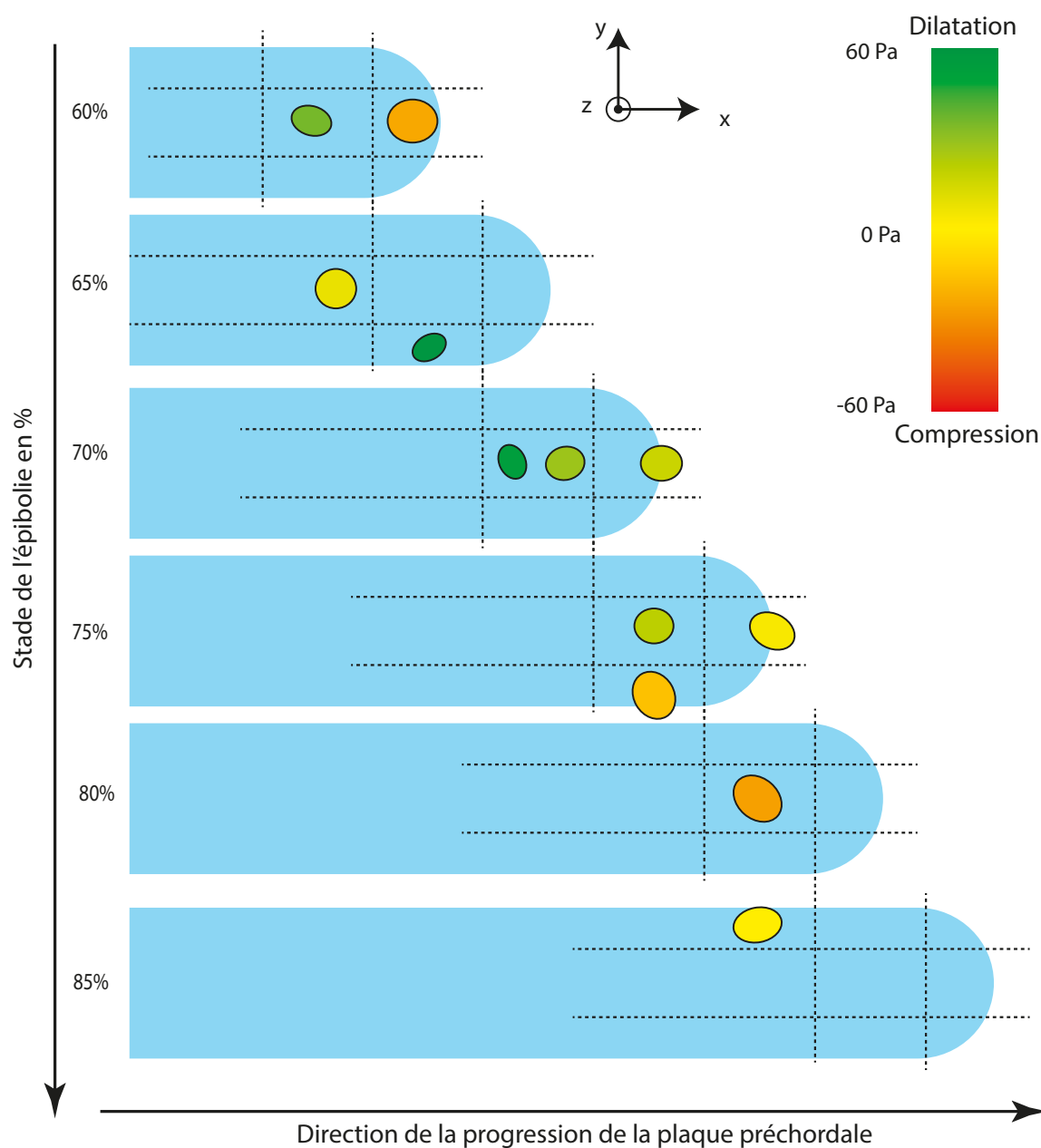


FIGURE 9.2 – Évolution des contraintes dans la plaque pré-chordale de l'embryon du poisson-zèbre en fonction du temps (en pourcentage d'épibolie) et de la position. La plaque pré-chordale est divisée en 3 zones (avant, milieu et arrière), elles-mêmes divisées en 3 zones (gauche, centre et droit). Les contraintes de cisaillement selon les trois axes de l'espace sont représentées. La couleur des ellipses représente la contrainte selon l'axe z , tandis que la déformation des ellipses est proportionnelle aux contraintes dans le plan (x, y) .

Huit capteurs de contraintes de cisaillement de même rigidité, chacun dans un embryon différent et à divers endroits de la plaque pré-chordale, ont été étudiés. Certains d'entre eux ont pu être analysés à plusieurs pas de temps, permettant à l'étude de totaliser 12 mesures. Le module de cisaillement des capteurs est $\mu = 430$ Pa. L'analyse des déformations des capteurs a ainsi permis d'éta-

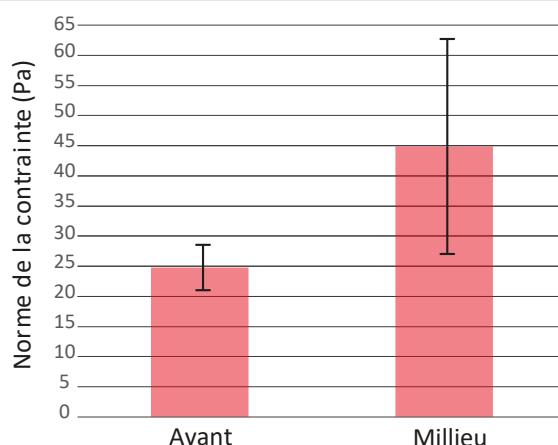


FIGURE 9.3 – Norme de la contrainte moyennée sur le temps, en fonction de la position dans la plaque pré-chordale.

blir une première cartographie des contraintes *in vivo* dans la plaque pré-chordale de l'embryon du poisson-zèbre, à différents stades de l'épibolie. Les capteurs ont été replacés dans l'une des 9 zones de la plaque pré-chordales définies.

Au vu de la figure 9.2, les tendances qui semblent se dessiner sont à prendre avec une grande précaution étant donnée le nombre faible de mesure effectuées. Il n'est pas exclu que la contrainte moyenne selon l'axe Oz dans la zone du milieu évolue et change de signe en fonction du temps, comme observé pour un capteur sur la figure 9.1. Cependant, en l'état actuel, les données ne permettent pas de déterminer s'il existe une orientation privilégiée des contraintes de cisaillement dans la plaque pré-chordale.

En revanche, au vu des formes allongées et des couleurs plus intenses des ellipses dans la zone du milieu, il semble que les contraintes de cisaillement développées soient de plus forte amplitude au milieu qu'à l'avant de la plaque. Pour quantifier cet effet, on définit de la même façon que pour les agrégats la norme de la contrainte de cisaillement totale $\|\sigma\| = (\sigma_{xx}^2 + \sigma_{yy}^2 + \sigma_{zz}^2)^{\frac{1}{2}}$. La figure 9.3 présente alors moyenne de cette norme, à l'avant et au milieu de la plaque pré-chordale. La moyenne est calculée dans le temps entre 60 et 80 % d'épibolie et sur l'ensemble des capteurs présents. On observe que la norme est plus importante au milieu de la plaque pré-chordale (7 mesures) qu'à l'avant (3 mesures). Bien que l'intervalle d'incertitude soit important, ce résultat semble confirmer les tendances observées sur la figure 9.2. Cela constitue une première indication que la distribution des contraintes varie en fonction de la position dans la plaque pré-chordale.

9.4 Discussion

L'analyse de capteurs insérés dans la plaque pré-chordale de l'embryon du poisson-zèbre a permis de mesurer les déformations de capteurs correspondants à des contraintes de cisaillement dans le tissu allant de -60 Pa à +60 Pa. En suivant les capteurs dans le temps, il est possible de mesurer l'évolution des contraintes et de détecter des événements d'inversion d'anisotropie locale des contraintes (fig. 9.1). De plus, la stabilité dans le temps du volume calculé de l'ellipsoïde conforte la fiabilité des

mesures.

L'ensemble des mesures effectuées a permis d'établir une première cartographie des contraintes de cisaillement dans la plaque pré-chordale de l'embryon du poisson-zèbre en fonction de son état de développement (en % d'épibolie, fig. 9.2). La norme de la contrainte de cisaillement totale moyennée sur le temps $\|\sigma\|$ indique que les contraintes développées au milieu de la plaque pré-chordale sont de plus forte amplitude qu'à l'avant. Ce résultat pourrait venir en appui de l'hypothèse de l'existence d'un gradient de contraintes dans la plaque pré-chordale qui serait moteur de la migration du tissu.

Cependant, ce résultat est à prendre avec précaution car il concerne un échantillon limité de cas. Si les expériences ont permis d'établir que la méthode est fonctionnelle dans ce système, il est nécessaire de multiplier les mesures pour obtenir des informations fiables sur la répartition des contraintes dans l'espace et le temps. Notamment, les mesures doivent être systématisées dans les 9 zones définies de la plaque pré-chordale, et à chaque stade de l'épibolie.

Il faut aussi remarquer que, au cours de ce travail, la position des capteurs n'a pas été relevée avec précision dans le temps. Si l'analyse de la forme des capteurs a pu être faite, la définition systématique et objective des zones de la plaque pré-chordale doit être affinée. Enfin, la plaque pré-chordale est un tissu migrant à contre sens d'autres tissus et son épaisseur est comprise entre 40 et 70 μm d'épaisseur. La hauteur du capteur dans le tissu peut jouer un rôle important, notamment s'il est placé à l'interface entre différents tissus. Cette position n'a pas été étudiée dans ce travail, et doit être intégrée dans les mesures futures.

La perspective offerte par ce travail permet d'envisager une cartographie complète des contraintes de cisaillement dans la plaque pré-chordale du poisson-zèbre. Les résultats préliminaires sont compatibles avec l'hypothèse de la présence d'un gradient de contrainte dans la plaque. Mais une étude approfondie est nécessaire pour permettre de préciser le rôle exact joué par les contraintes de cisaillement dans la migration de la plaque pré-chordale du poisson-zèbre.

Quatrième partie

Conclusion et perspectives

Ce travail présente la conception, la réalisation et l'utilisation de micro-capteurs déformables pour mesurer les contraintes de cisaillement dans les tissus vivants. Ces capteurs permettent de répondre à certaines limitations rencontrées dans l'utilisation de méthodes comparables à base de gouttes liquides ou d'hydrogels. Les difficultés inhérentes aux hydrogels nous ont poussé à nous concentrer uniquement sur la mesure tridimensionnelle des contraintes de cisaillement dans les tissus. La méthode présentée est complémentaire à celles existant pour les mesures de la contrainte isotrope.

L'élastomère utilisé pour fabriquer les micro-capteurs est un polymère incompressible réticulé à 80°C, dont la base est constituée du DiMéthylSiloxane et d'un hydrure de silyle. A cette base sont ajoutés un catalyseur et un inhibiteur afin de contrôler la cinétique. Les micro-capteurs sont produits à l'aide d'un système micro-fluidique à concentration de flux que nous avons conçu et réalisé afin de répondre aux exigences de dimension de nos capteurs : l'émulsion du mélange polymérisable permet des productions mono-disperses de micro-capteurs dont le rayon est d'environ 15 μm , c'est-à-dire de l'ordre de grandeur de la taille d'une cellule.

Afin d'optimiser l'insertion des capteurs dans les tissus, il est important de réaliser un traitement de surface par des protéines d'adhésion cellulaire. Un traitement par fibronectine a été réalisé mais son efficacité (par rapport à l'absence de traitement) n'a pas pu être démontrée dans cette étude. Un autre traitement de surface par des cadhérines a été envisagé. Pour cela, un pré-traitement de surface des capteurs permettant la fixation ultérieure des protéines a pu être effectué avec succès. Cependant, la difficulté à reconcentrer la suspension de capteurs après ce traitement ne nous a pas permis, pour l'instant, d'achever ce travail.

Pour pouvoir visualiser les capteurs, nous avons développé une méthode de marquage fluorescent de l'élastomère par la rhodamine-B isothiocyanate. Le fluorophore est d'abord conjugué à une molécule intermédiaire afin qu'il puisse se lier de façon covalente à l'élastomère selon la même réaction que celle de polymérisation. Nous avons pu vérifier que ce marquage est fonctionnel et stable dans le temps. Il permet la visualisation des capteurs dans des tissus biologiques, aussi bien en microscopie confocale qu'en microscopie à deux-photons. La méthode de marquage peut être utilisée avec d'autres fluorophores portant la fonction isothiocyanate, ce qui permet d'ajuster le fluorophore aux besoins. A notre connaissance, cette technique de marquage stable du PDMS par un fluorophore est inédite et pourrait servir dans de nombreuses autres applications. D'autre part, nous avons également testé un marquage du gel par des points quantiques. Cette technique prometteuse pourrait permettre un marquage avec un meilleur rendement et une plus grande flexibilité sur le choix des longueurs d'onde.

La détection du contour du capteur se fait à l'aide d'une méthode de contour actif. A partir de l'ajustement de ce contour à un ellipsoïde, la longueur et l'orientation dans l'espace des demi-axes principaux du capteur permettent de déterminer ses déformations dans une approximation de petites déformations. La comparaison des contours calculés avec les images brutes a permis de valider la méthode.

Nous avons également souligné quelques difficultés rencontrées pour obtenir une reconstruction précise de la forme des capteurs en trois dimensions, difficultés qui sont en général passées sous silence dans d'autres études. D'une part le capteur se comporte comme un dioptre sphérique, ce qui

modifie sa dimension apparente dans la direction de l'axe optique. D'autre part la qualité de l'image se dégrade avec la profondeur du capteur dans le tissu, ce qui complique la détection de contour. Le premier point a été pris en compte et corrigé, le deuxième nécessiterait une étude systématique approfondie.

Des déformations et de la connaissance du module de cisaillement du capteur, on déduit les contraintes de cisaillement développées dans le tissu. Pour cela, les propriétés mécaniques de l'élastomère doivent être caractérisées au préalable. Le module de cisaillement du gel a été mesuré à l'échelle macroscopique dans un rhéomètre. Lorsque le gel est dispersé en émulsion, nous avons remarqué que son module de cisaillement est plus faible, et nous avons pu le relier au module macroscopique. Enfin, afin d'évaluer la contribution de la tension superficielle sur le module de cisaillement effectif des capteurs, nous avons calibrés ceux-ci *in situ* dans des agrégats cellulaires soumis à une contrainte uniaxiale connue. Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par rhéométrie classique et confirment que le module effectif des capteurs est dans la gamme souhaitée, d'environ 500 Pa. Ils ne permettent pas d'isoler une contribution significative de la tension de surface du capteur. La calibration mécanique du gel pourrait être encore améliorée, d'une part en étudiant très systématiquement les effets des variations de composition, et d'autre part *in situ* en contrôlant très rigoureusement la géométrie du système agrégat + capteur dans l'expérience de compression uniaxiale des agrégats. Enfin, une étude en fonction du traitement de surface par des protéines de surfaces doit être réalisé de la même manière.

Finalement, la méthode a pu être mise en œuvre dans deux systèmes biologiques différents. Pour le premier, nous avons mesuré les contraintes de cisaillement dans des agrégats sphériques libres, au cours de leur étalement sur une surface plane. Cela nous a permis d'établir une première cartographie des contraintes dans ce système, avec deux résultats. D'une part les directions principales des contraintes de cisaillement sont voisines des directions radiale et ortho-radiale de l'agrégat. L'amplitude de la contrainte est maximale dans la direction ortho-radiale. D'autre part la norme de la contrainte de cisaillement, qui représente la somme des contributions sur les trois axes principaux, croît à mesure qu'on s'éloigne du centre de l'agrégat. L'étude doit être poursuivie pour accumuler plus de résultats.

Également, une première cartographie des contraintes de cisaillement dans la plaque pré-chordale de l'embryon du poisson-zèbre en fonction du pourcentage d'épibolie a pu être établie. Les résultats préliminaires confirment les hypothèses déjà exprimées et ont permis de démontrer la faisabilité et pertinence de la méthode qui peut être mise en œuvre dans d'autres systèmes *in vivo*.

A terme, les micro-capteurs présentés peuvent être un outil efficace et pertinent pour la cartographie spatiale et temporelle complète des contraintes de cisaillement dans différents systèmes biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Cinquième partie

Annexes

Chapitre 10

Culture des cellules

10.1 Milieu de culture

Les boîtes de culture utilisées sont les boîtes T75 (Nunc™EasYFlask™Cell Culture Flasks T25, filter). Le milieu de culture complet utilisé est composé de :

- 88,9% de D-MEM (1X) (liquid (High Glucose), avec Glutamax I, avec Sodium Pyruvate, 500ml)
- 10% FBS, (Foetal Bovine Serum, Origin : E.U. Approved (South American) 500 ml)
- 1% antibiotiques (Penicillin-Streptomycin, liquid 10 0ml)

Pour les cellules transfectées, on ajoute un antibiotique de stabilisation des lignées cellulaires transfectées :

- Concentration en 1/5000 en masse de GENETICIN Selective Antibiotic, liquide à 5 mg/ml

10.2 Transfection des cellules

Transfection du plasmide

- La transfection des F9 et des CT26 est faite à partir du plasmide F-Tractin (FT).
- Contrairement à l'utilisation du plasmide LifeAct, l'avantage de l'utilisation de la F-Tractin est que l'on modifie une peptide sans en ajouter. L'actine est fluorescente sans que les propriétés mécaniques de la cellule ne soient modifiées. Cependant, avec la F-Tractin, la transfection n'est pas stabilisée, et il est donc nécessaire d'utiliser ensuite un antibiotique de sélection.
- La transfection est effectuée dans plusieurs boîtes de Petri avec un fond en verre afin d'optimiser les chances de transfection.
- Les cellules doivent être à 70% de confluence pour débiter la transfection.
- Préparer un premier tube avec :
 - 100 µL d'Opti-ME™Gibco™, supplément GlutaMAX™.

- 2 µg D'ADN de transfectin (ADN à 1 µg/µL). Attention à ne pas cisailer, ni à toucher les bords du récipient pour éviter de détériorer le matériel génétique.

- Dans un second tube on ajoute :
 - 100 µL d'Opti-MEM™Gibco™, supplément GlutaMAX™.
 - 4 µg d'agent de transfection (DreamFect™Gold Transfection Reagent).

Pour optimiser les chances de réussites de la transfection, il est conseillé de préparer différentes dilutions allant de 4 à 8 µl d'agent de transfection qui seront testées dans différentes boîtes de Petri. En effet, les cellules F9 sont des cellules embryonnaires qu'il peut être difficile de transfecter et les concentrations sont cruciales pour la réussite de la transfection.

- Les solutions sont mélangées séparément par retournement : ne surtout pas cisailer.
- Mélanger ensuite les deux tubes. Puis, cette fois, cisailer pour optimiser le mélange.
- Incuber 20 minutes à 37°C.
- Dans des boîtes à 80% de confluence, changer le milieu et mettre du Opti-MEM™Gibco™.
- Laisser incuber 1 h à 37°C.
- Ajouter ensuite le mélange de transfection, puis le déposer goutte par goutte.
- Incuber 4 h à 37°C.
- A l'issue des 4 h, ajouter en proportion : 10% de FBS et 1% d'antibiotique PS.
- Après 24 h, changer le milieu de culture pour un milieu de culture complet. Une importante mort cellulaire est normale et n'est pas signe que la transfection a échoué.

Sélection des cellules transfectées

Après traitement par l'agent de transfection, lorsque les cellules sont à confluence :

- L'observation des cellules en fluorescence permet de déterminer le pourcentage de réussite de transfection. A partir d'environ 10% des cellules fluorescentes, la transfection est réussie.
- Effectuer un passage de cellule avec un milieu complet sans antibiotique de sélection G418.
- Après 1 h d'incubation à 37°C, ajouter l'antibiotique de sélection G418 à une concentration de 150 µg/µL de milieu.
- Si après plusieurs jours la proportion en cellules transfectées n'augmente pas, augmenter la concentration en antibiotique de sélection. Une fois toutes les cellules sélectionnées, revenir, pour la culture quotidienne, à une concentration de 150 µg/µL.

10.3 Congélation des cellules

Pour effectuer la congélation des cellules, utiliser une flasque T75 à confluence, ce qui permet d'avoir 7 ampoules de congélation remplies. Le milieu de congélation est composé de :

- 50% D-MEM GlutaMAX™Gibco™
- 40% FBS, (Foetal Bovine Serum)
- 10% DMSO

La procédure à suivre est la suivante :

- Retirer d'abord le milieu de culture des cellules et rincer avec du D-PBS (1X) (Gibco™14190250).
- Ajouter ensuite 5 mL de trypsine et incuber à 37°C pour quelques minutes, afin que les cellules se détachent du substrat.
- Lorsque les cellules sont en suspension, ajouter 10 mL de milieu de culture complet afin de bloquer l'action de la trypsine.
- La suspension est ensuite centrifugée pendant 3 minutes à 1200rpm.
- Après centrifugation, retirer le surnageant avant de resuspendre les cellules dans le milieu de congélation préalablement préparés.
- Remplir les ampoules avec 0,6 mL de suspension par ampoule.
- Placer les ampoules dans un bain de congélation qui est placé à -80°C pour 24 h, afin d'assurer une transition douce à la congélation.
- Ensuite, les ampoules peuvent être conservées dans l'azote liquide.

10.4 Décongélation des cellules

Les tubes de cellules congelées doivent être manipulés rapidement.

- Sous hotte, cisailier les cellules congelées avec 3 mL de milieu de culture complet à 37°. Une fois en suspension, les cellules sont placées dans une flasque T75 avec 10 mL de milieu.
- Incuber à 37° pour 6 h.
- Après 6 h, le milieu de culture doit être changé afin de retirer l'excédent de DMSO présent dans le milieu de congélation.
- Les cellules doivent être passées une première fois, après 3 jours, avant de pouvoir être utilisées pour des expériences.

10.5 Traitement de surface pour les F9

Pour que les cellules F9 se développent, il est nécessaire de traiter la surface sur laquelle elles vont être développées : une solution de gélatine (Merck™G1890) à 0,1% en masse dans du D-PBS (1X) (Gibco™14190250). Pour une flasque T75, on dépose 6 mL de la solution de gélatine et on incube à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, on rince avec du D-PBS (1X) avant de déposer le milieu de culture.

10.6 Passage des cellules

Afin d'effectuer un passage cellulaire (tous les 3 jours environ pour une flasque T75) :

- Retirer le milieu de culture.
- Ajouter 5 mL de PBS 1% afin de rincer les cellules mortes restées dans la boîte de culture.
- Retirer le PBS
- Ajouter 1.5 mL de trypsine pour une boîte T25, 5 mL pour une boîte T75.
- Incuber à 37°C pendant quelques minutes.
- Tapoter la boîte pour que les cellules finissent toutes de se détacher.
- Ajouter 10 mL de milieu complet (pour stopper l'action de la Trypsine).
- A l'aide d'une pipette, cisailier les cellules afin qu'elles soient individualisées en solution.
- Mettre 1 mL de cette solution dans des nouvelles boîte T75, avec 12 mL de milieu de culture.
- Incuber à 37°C.

10.7 Formation des agrégats par agitation

Afin de préparer des agrégats cellulaires sphérique, par agitation et de tailles allant de 100 à 500 µm de diamètre, et contenant des capteurs :

Préparation des boîtes de Petri

- Avant tout, préparer les boîtes dans lesquelles seront formés les agrégats. Des boîtes de cultures classiques ou des boîtes de Petri rondes peuvent être utilisées. La boîte de Petri ronde permet une meilleure agitation du milieu pendant la formation des agrégats.
- Ajouter 1 mL de PBS à 10 % pour 10 mL de suspension de capteurs.
- Dans chaque boîte de Petri, ajouter 5 mL de milieu de culture et 1 mL de suspension de capteurs.

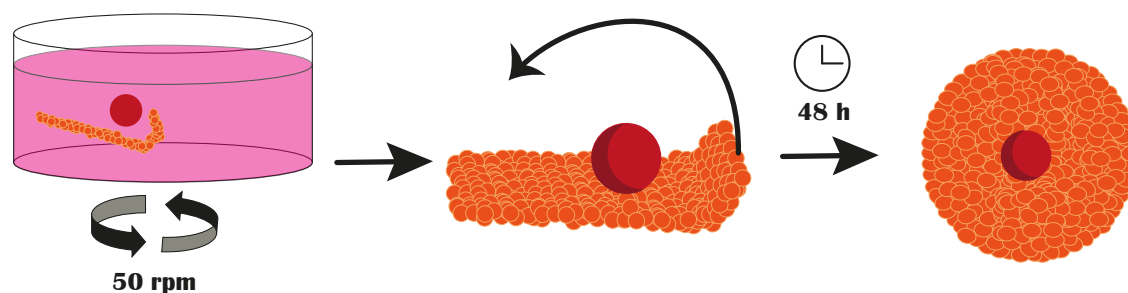


FIGURE 10.1 – Schéma de principe de formation des agrégats avec capteurs intégrés, par agitation. On place une boîte de Petri sur un agitateur orbitalaire. Les feuillets de cellules en suspension se referment progressivement sur eux-mêmes en piégeant des capteurs également en suspension. Après 48h les agrégats sont sphériques avec des capteurs en leur sein.

Préparation des cellules

- Au moment du passage des cellules, ne pas incuber les cellules à 37 °C trop longtemps. Après 1 minute environ, retirer les cellules de l'incubateur et tapoter la boîte afin de décoller les cellules par feuillets.
- Lorsque les feuillets sont décollés, ajouter 5 mL de milieu de culture complet. Attention : pour la formation des agrégats, il ne faut surtout pas cisailer! Il est important de conserver les feuillets au maximum. Plus les feuillets sont grands, plus les agrégats formés le seront également.

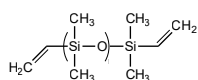
Incubation des agrégats

- Dans un incubateur à 37 °C, les boîtes de Petri sont placées sur un agitateur orbitalaire réglé à 50 tours par minute.
- Les agrégats peuvent être manipulés après 24 h mais les petits agrégats ne sont réellement sphériques qu'après 48 h d'agitation.
- Les agrégats sont viables jusqu'à 5 jours après leur formation.

Chapitre 11

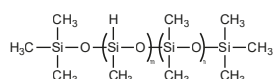
Préparation de l'élastomère

11.1 Liste des constituants utilisés



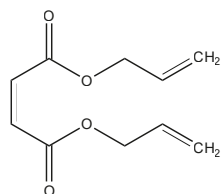
Molécule polymérisable :

Dimethyl siloxane V22
Masse molaire = 9400 g/mol
 $l \approx 127$



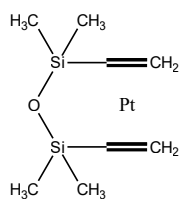
Agent réticulant :

(45-55% methylhydrosiloxane) –
Dimethylsiloxane copolymer,
trimethylsiloxane terminated
Masse molaire : 900 -1200 g/mol
 $m \approx n \approx 7$



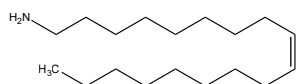
Inhibiteur :

Diallyl-maleate, 93% en masse
Masse molaire : 196,20 g/mol



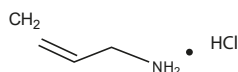
Catalyseur de Karstedt (platine) :

Masse molaire du platine : 195,084 g/mol



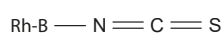
Molécule stabilisante des QDs :

Oleylamine
Masse molaire : 267,49 g/mol



Intermédiaire pour marquage fluorescent:

Allylamine hydrochloride
Masse molaire : 93,56 g/mol



Marqueur de fluorescent :

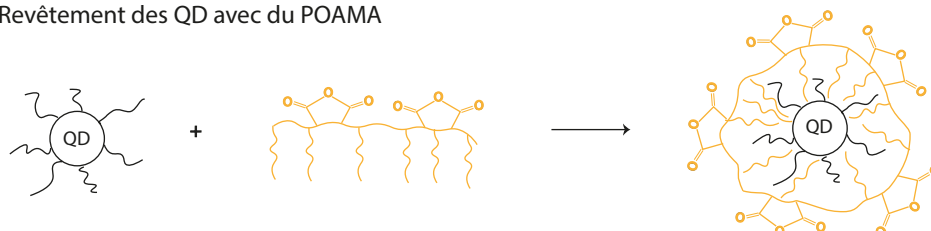
Rhodamine B Isothiocyanate
Masse molaire : 536,08 g/mol

FIGURE 11.1 – Formules chimiques et masses molaires des différents produits utilisés pour la formation de l'élastomère fonctionnalisé par fluorescence.

11.2 Traitement de surface des points quantiques (QD) par le POAMA

11.2.0.1 Préparation du POAMA (Poly (molécule anhydride-alt-1-octadécène))

1- Revêtement des QD avec du POAMA



2- Couplage des QD enrobés par le POAMA, avec un PDMS aminé réactif aux anhydrides

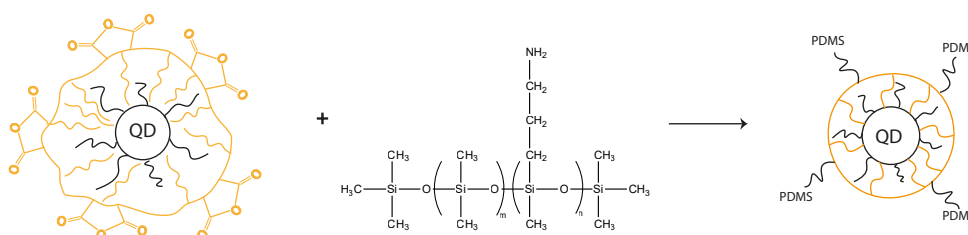


FIGURE 11.2 – Schéma de principe du traitement de surfaces des QDs par le POAMA. Le POAMA s'insère dans les chaînes aliphatiques présentes en surface des QDs. Les fonctions anhydrides du POAMA réagissent ensuite avec une amine présente sur un PDMS.

1. Dissoudre dans un Eppendorf avec précision 21 mg de POAMA dans 2 mL de chloroforme.
2. Passer le mélange au sonificateur, ou bain à ultrasons, pour homogénéiser.
3. Introduire 18 ml de chloroforme dans un ballon.
4. Transférer le POAMA dissous dans le ballon.
5. Ajouter ensuite 400 μ l de solution de QDs dans le ballon.
6. Passer le mélange au bain à ultrasons quelques minutes.
7. Placer une olive dans le ballon et un septum dessus. Attention à ne pas mettre la jupe du septum : le mélange va être agité toute la nuit et une surpression se forme. Il est préférable que le septum soit éjecté plutôt que de risquer un éclatement du ballon.
8. Disposer un papier aluminium sur le ballon pour éviter une trop importante exposition des QDs à la lumière.
9. Placer le ballon sous agitation pendant la nuit.

Le lendemain, vérifier sous UV que la solution est homogène.

11.2.0.2 Passage de la solution à l'évaporateur rotatif

Pour évaporer l'excès de chloroforme, le mélange POAMA-QD-Chloroforme est passé à l'évaporateur rotatif. Sur l'évaporateur rotatif :

- Régler la pression à 275 mbar
- Mettre le bain thermostaté à 30°C
- Régler la rotation du ballon à environ 1 tour par seconde.

Le bain permet d'homogénéiser la température de la paroi du ballon et d'éviter la re-condensation du chloroforme sur le ballon. Si le système bout, accélérer la rotation et affiner les réglages de l'évaporateur rotatif.

Cette extraction met du temps (quelques heures) et ne doit pas être accélérée. Pour que l'extraction démarre, il est possible d'augmenter la température en début d'extraction. Mais il est important de remettre la température à 30°C maximum ensuite pour que l'extraction ne soit pas trop rapide. En toute fin d'extraction, avant d'éteindre, mettre le système à 30 mbar de pression pendant 2 minutes pour extraire les dernières traces de chloroforme.

11.2.1 Réaction des anhydrides avec les amines (9-11% Aminopropylmethylsiloxane)-Dimethylsiloxane copolymer)

1. Mettre 20mL de chloroforme dans le ballon
2. Intégrer les amines en « large excès » par rapport aux anhydrides. Mettre 2 amines pour 1 site nucléophile.
3. Mettre à chauffer (50°C) avec réfrigérant pendant plusieurs heures.
4. Mettre sous agitation, avec septum, pendant plusieurs heures.

11.2.2 Dispersion dans le DMS

- Redisperser le mélange POAMA-QD-Amine dans du chloroforme.
- L'incorporer à une masse donnée de DMS.
- Mélanger vigoureusement. Pour favoriser la dispersion des particules, passer la solution au sonificateur pendant plusieurs minutes : placer le récipient dans un bain de glace pendant le passage au sonificateur pour éviter que le mélange DMS-QD ne chauffe trop et que les composés ne se dégradent.
- Disposer ensuite le mélange d'un cristalliseur et mettre sous agitation sous une hotte pour laisser l'excédant de chloroforme s'évaporer.
- Préparer le mélange polymérisable.

11.3 Traitement de la rhodamine-B isothiocyanate par l'allylamine

L'objectif est ici de coupler la rhodamine-B isothiocyanate (RhB-ITC) avec l'allylamine afin d'avoir une fonction vinyle sur le fluorophore, qui sera ensuite conjugué avec l'agent réticulant présent dans le mélange polymérisable. Les quantités indiquées sont prévues pour être ajoutées à 30 g de DMS-V22.

1. Peser 5 mg de RhB-ITC, puis les disperser dans 10 mL de chloroforme.
2. Peser 50 mg d'allylamine, puis les disperser dans 15 mL de chloroforme.
3. S'assurer que les deux produits sont bien dissouts.
4. Pour 30 g de DMS-V22, ajouter $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol de RhB-ITC et $3,3 \cdot 10^{-6}$ mol d'allylamine. L'allylamine est introduite en léger excès pour s'assurer que l'intégralité de la RhB-ITC a été transformée.
5. Introduire les volumes équivalents des solutions de RhB-ITC et d'allylamine dans un contenant en verre, et mettre sous agitation pendant plusieurs heures. Bien veiller à ce que le récipient soit bien fermé pour éviter l'évaporation du chloroforme. Il est également possible d'ajouter du chloroforme à ce mélange au cours de l'agitation.
6. Incorporer la solution de RhB-ITC-Allylamine aux 30 g de DMS-V22, et agiter vigoureusement pendant plusieurs minutes. Si le DMS-V22 est dans un Falcon 50 mL en plastique, il est possible de s'aider d'un vortex pour optimiser le mélange.
7. Sous hotte, passer le mélange sous sonificateur pendant plusieurs minutes. Attention, le sonificateur entraîne une montée en température importante du mélange. Pour éviter que des produits ne se dégradent, plonger le récipient dans un bain de glace le temps de la dispersion.
8. Afin d'éliminer l'excès de chloroforme, placer le mélange dans un cristalliseur et mettre sous agitation pendant 2 h.
9. Repasser le mélange au sonificateur.
10. Peser la quantités finale de mélange DMS-RhbITC-Alyllamine avant de faire le mélange polymérisable.

11.4 Formation du mélange polymérisable

Pour l'élaboration du mélange polymérisable standard ($G' \approx 500$ Pa), les proportions en quantité de matière du réticulant (l'hydruure de silyle, χ), du catalyseur (le platine, Pt) et de l'inhibiteur (Diallyl-maleate, Υ), par rapport au DMS-V22 sont les suivantes :

$$q(\chi) = \frac{n(\chi)}{n(\text{DMS})} = 1,37 \cdot 10^{-1} \quad (11.1)$$

$$q(\Upsilon) = \frac{n(\Upsilon)}{n(\text{DMS})} = 3,82 \cdot 10^{-2} \quad (11.2)$$

$$q(\text{Pt}) = \frac{n(\text{Pt})}{n(\text{DMS})} = 4,13 \cdot 10^{-3} \quad (11.3)$$

Les quantités à introduire sont très faibles, et pour cela, il est plus facile de travailler en masse. Ainsi, pour les produits référencés avec lesquels nous avons travaillé, les proportions massiques des différents composés sont :

$$\omega(\chi) = \frac{m(\chi)}{m(\text{DMS})} = 1,60 \cdot 10^{-2} \quad (11.4)$$

$$\omega(\Upsilon) = \frac{m(\Upsilon)}{m(\text{DMS})} = 8,571 \cdot 10^{-4} \quad (11.5)$$

$$\omega(\text{Pt-Complex}) = \frac{m(\text{Pt})}{m(\text{DMS})} = 4,286 \cdot 10^{-3} \quad (11.6)$$

Dans le cas où l'on souhaite fonctionnaliser les capteurs avec du PAA (voir section 14.4), il faut ajouter de la benzophénone au mélange polymérisable (0,25 % en masse). Diluer la benzophénone dans l'acétone puis mélanger vigoureusement la solution (utiliser le sonificateur pour une meilleure dispersion). Puis laisser évaporer l'acétone en agitant le mélange sous une hotte de chimie, selon le même procédé que pour le chloroforme.

Attention, lors de la formation du mélange polymérisable, certaines procédures doivent être respectées :

- Lors de la formation du mélange polymérisable, il est important d'introduire l'agent réticulant en dernier, pour éviter que la réaction ne s'amorce.
- Pour homogénéiser le mélange, après chaque ajout d'un composé, bien mélanger vigoureusement pendant plusieurs minutes.
- Lorsque le mélange est prêt, le mettre immédiatement à basse température, pour éviter tout début de polymérisation. Bien que la cinétique de réticulation soit très lente à basse température, le mélange n'est utilisable que pendant quelques jours, ensuite il se dégrade (voir chap. 7.1.4).
- Découper un cône de micro-pipette 1 ml afin d'agrandir l'embouchure. Avec ce cône, prélever 1 mL de préparation des cellules.
- Déposer les cellules dans les boîtes de Petri précédemment préparées.

Chapitre 12

Modélisation de la cinétique de gélification

12.1 Notations

- Le "monomère" est ici le DMS-V22 (Gelest DMS V22) de poids moléculaire d'environ $\sim 9400 \text{ g.mol}^{-1}$. Le DMS a en moyenne 127 unités (Me-SiO-Me) par molécule et deux sites réactifs par molécule, noté B (double liaison C = C). Les sites réactifs sont situés aux deux extrémités du DMS. On peut alors schématiser la molécule par : B-B. Soit $c_B(t) = \frac{N_B(t)}{V}$ la concentration de sites réactifs de type B au temps t .
- L'agent réticulant est l'hydrure de silyle. Sa chaîne composée à 45% de Méthylsiloxane et 55% de diméthylsiloxane. Sa masse molaire est comprise entre 900 et 1200 g.mol^{-1} : on prendra 1050 g.mol^{-1} pour nos calculs. Le site réactif de cet hydrure de silyle est noté χ tel que $\chi = \text{Si-H}$. On a en moyenne 6,62 ≈ 7 sites par molécule. On notera cette molécule notée " χ_7 " et on pose $c_\chi(t) = \frac{N_\chi(t)}{V}$ la concentration de sites réactifs de type A au temps t .
- Les réactions possibles durant la polymérisation sont :
 - $\chi_7 + \text{B-B} \rightarrow \chi_6-\chi-\text{B-B}$
 - $\chi_6-\chi-\text{B-B} + \text{B-B} \rightarrow \text{B-B}-\chi-\chi_5-\chi-\text{B-B} \dots$

avec de nombreuses possibilités de ramification.

12.2 Cinétique de polymérisation

La cinétique la plus simple est celle ne tenant pas compte de la présence du catalyseur et de l'inhibiteur. L'équation de cinétique s'écrit donc :

$$\frac{dc_\chi}{dt} = \frac{dc_B}{dt} = -Kc_\chi c_B \quad (12.1)$$

où K est la constante cinétique de la réaction.

Soit $p_\chi(t) = \frac{N_\chi^0 - N_\chi(t)}{N_\chi^0}$ la fraction de site χ qui a réagi au temps t .

De même $p_B(t) = \frac{N_B^0 - N_B(t)}{N_B^0}$ est la fraction de site B qui a réagi au temps t .

Puisque un site χ réagit avec un site B, on a : $N_\chi^0 - N_\chi(t) = N_B^0 - N_B(t)$,

d'où : $\frac{p_B}{p_\chi} = \frac{N_\chi^0}{N_B^0} = cste = r$.

Dans notre cas, si la fraction massique d'agent réticulant vaut 0.016, alors $r \simeq 0.475 < 1$.

On montre que $c_\chi = \frac{N_\chi}{V} = \frac{N_\chi^0}{V}(1 - p_\chi)$ et de même $c_B = \frac{N_B}{V} = \frac{N_B^0}{V}(1 - p_B) = \frac{N_B^0}{V}(1 - r p_\chi)$.

En injectant dans l'équation de la cinétique 12.1 et en résolvant l'équation différentielle pour p_χ , on trouve :

$$p_\chi = \frac{1 - \exp[-(1-r)t/\tau]}{1 - r \exp[-(1-r)t/\tau]} \quad (12.2)$$

où $\tau = \frac{1}{Kc_B^0}$ est le temps caractéristique de la cinétique.

12.3 Théorie de la gélification et élasticité du gel

Cette section s'appuie sur l'article de Flory *Molécule Size Distribution*(1941)[160]. Dans cet article Flory effectue un calcul statistique sur la configuration des chaînes à un stade donné p_χ de la réaction. Il montre qu'il existe un seuil d'apparition d'une chaîne infinie (appelé seuil de gélification), puis calcule la fraction de gel dans le mélange en fonction de p_χ .

En résumé, on a :

- Pour un polymère linéaire $\chi - B - \chi - B - \chi - B \dots$ la chaîne est infinie uniquement en fin de réaction, lorsque tous les monomères ont réagi.
- Pour un polymère branché, la chaîne infinie apparaît avant. C'est le cas ici puisque l'agent réticulant χ_7 possède en moyenne f_c liens de coordination, avec $f_c \simeq 6.62 \simeq 7$.
- Pour un maillon B-B dans une chaîne, soit α la probabilité pour qu'il soit accroché à un élément χ_7 (α dépend du degré d'avancement de la réaction). Flory montre qu'il existe une valeur critique α_c pour laquelle une chaîne infinie apparaît, donnée par : $\alpha_c(f_c - 1) = 1$.
- Ensuite il relie α au degré d'avancement de la réaction p_χ , et montre que dans notre cas :

$$\alpha = p_\chi p_B = r p_\chi^2. \quad (12.3)$$

- Soit x_g la fraction de gel qui se forme au cours de la réaction. Flory développe un calcul montrant que, au-delà du seuil de gélification :

$$x_g = 1 - Q_c^f \quad (12.4)$$

avec :

$$Q - 1 = \alpha(Q^{f_c - 1} - 1) \quad (12.5)$$

où Q représente la probabilité pour qu'un site χ ne soit pas connecté à la chaîne infinie.

L'équation 12.5 permet en principe de déterminer la fonction $Q(\alpha)$, puis ensuite de calculer x_g en fonction du temps en utilisant successivement les équations 12.4, 12.3 et 12.2. Les paramètres du modèle de cinétique de polymérisation sont donc f_c , r et τ .

Il n'existe pas d'expression analytique pour $Q(\alpha)$ mais il est possible de résoudre numériquement l'équation 12.5 via un programme Matlab, puis de construire une expression numérique approchée de la fonction $Q(\alpha)$, qui est valable dans notre gamme de paramètres f_c :

$$Q(\alpha) = 1 \text{ si } \alpha < \alpha_c \text{ ou } Q(\alpha) = \frac{1 - \alpha}{1 - C(1 - \alpha)^D} \text{ si } \alpha > \alpha_c \quad (12.6)$$

en prenant

$$C = \frac{2.249}{f_c - 0.7471} \quad (12.7)$$

$$D = 0.8417f_c - 1.494 \quad (12.8)$$

C'est cette expression 12.6 qui est utilisée pour calculer $Q(t)$ et par conséquent $x_g(t)$.

Quant au module d'élasticité G' du gel, plusieurs auteurs s'accordent à dire que, en première approximation, et faute de mieux, on peut le considérer comme proportionnel au produit de la fraction de gel x_g dans le mélange par le nombre de liens inter-connectés dans l'amas infini, lui même proportionnel à α .

$$G'(t) = G_0 \alpha(t) x_g(t) \quad (12.9)$$

On fait donc un ajustement de $G'(t)$ (mesuré au rhéomètre) par la fonction proposée ci-dessous.

$$G'(t) = G_0 r p_\chi^2(t) \left(1 - \min \left[1, \left(\frac{1 - r p_\chi^2(t)}{1 - C(1 - r p_\chi^2(t))^D} \right)^f \right] \right) \quad (12.10)$$

où :

$$p_\chi(t) = \frac{1 - \exp[-(1 - r)t/\tau]}{1 - r \exp[-(1 - r)t/\tau]} \quad (12.11)$$

Les seuls paramètres de l'ajustement sont f_c , r , τ et $G_{max} = rG_0$, valeur de G' à saturation (t infini).

Chapitre 13

Réalisation des circuits micro-fluidiques

13.1 Dessin du circuit

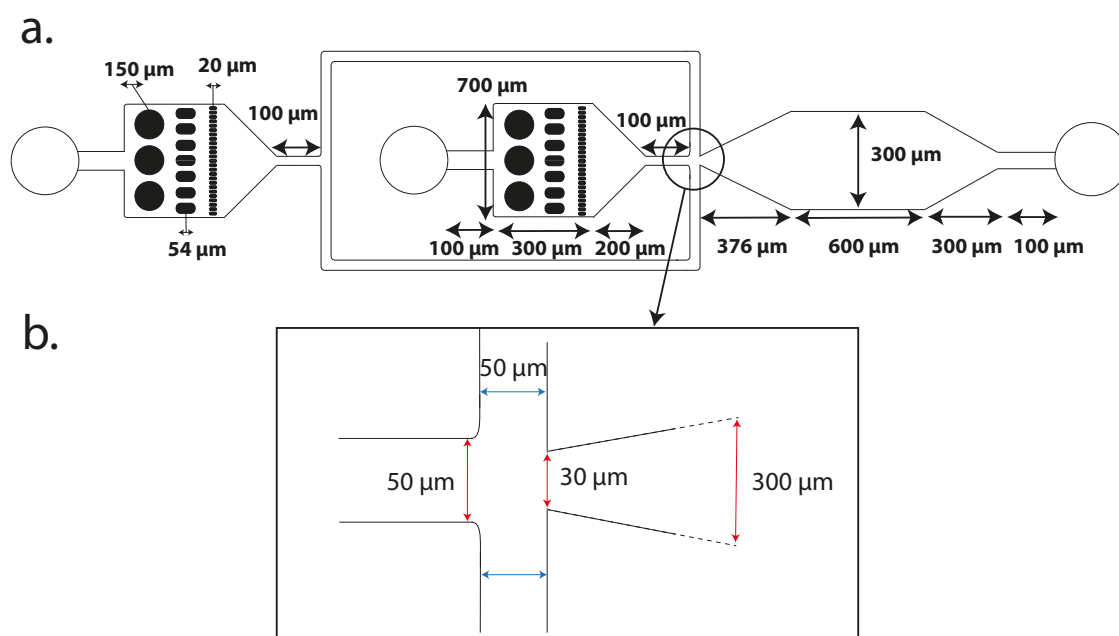


FIGURE 13.1 – Dessin du circuit micro-fluidique conçu pour la formation de l'émulsion de l'élastomère par focalisation de flux (flow-focusing). Les gouttes formées peuvent avoir un diamètre compris entre 10 et 40 μm . a. Dimension du circuit. b. Dimension de la constriction.

Le circuit utilisé (fig. 13.1) a été conçu sur la base de la littérature existante et des expériences préalables réalisées avec divers circuits déjà prêts, et avec le même gel polymérisable.

Les zones noires présente sur les dessins de la figure sont des colonnes dans le circuit micro-fluidique final : ces colonnes servent de filtres pour d'éventuelles impuretés, présente dans le fluide porteur ou dans la phase disperse qui , de boucher les zones de plus petites dimensions, notamment au niveau de la constriction.

Le dessin du circuit a été transféré sur masque optique en plastique par le service micro-fluidique de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes.

13.2 Préparation d'une galette de silicium

Le moule sur galette (wafer) de silicium a été réalisé, en salle blanche au laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), par photolithographie. La résine photosensible utilisée est la résine négative SU-8 2010. Cette résine permet que la constricton de petite dimension soit bien résolue.

1. Verser la résine au centre du wafer, sans pipette pour éviter les bulles d'aires.
2. Réaliser un cycle de rotation à 500 tr/min de 10 secondes, puis 1500 tr/min pendant 40 secondes pour obtenir une couche d'épaisseur 40 μm (cf table de données des résines SU-8).
3. Effectuer une pré-cuisson de la résine : 2 minutes à 65°C, puis 5 minutes à 95 °C.
4. Placer le masque et le wafer sous l'aligneur. Exposer 10 secondes aux UV à 12 mW. Ces valeurs peuvent varier selon l'aligneur et l'ampoule utilisée.
5. Tout de suite après l'exposition, effectuer une post-cuisson de 5 minutes à 95°C.
6. Placer le wafer dans un bain de SU-8 Developer disposé sur un agitateur orbital tournant à 120 tr/min pour enlever l'excédent de résine non polymérisée.
7. Réaliser une post-cuisson : 1 minute à 65°C puis 5 minutes à 200°C. Cette post-cuisson a pour but de diminuer les micro-défauts et d'évaporer les restes de solvant éventuels.
8. En cas de présence d'impuretés, laver le wafer à l'isopropanol.
9. Silaniser le wafer avant utilisation. Pour cela, mettre le wafer sous une cloche à vide avec un récipient contenant quelques gouttes de 3-Mercaptopropyltriméthoxysilane. Faire le vide et laisser le silane se condenser sur le wafer pendant plusieurs heures. Ce produit permet d'utiliser le wafer avec du PDMS sans risque de collage. Pour enlever l'excédent de silane, le wafer peut être rincé avec de l'alcool.

13.3 Fabrication du moule d'époxy

Pour former un moule d'époxy, plus solide que le wafer de silice, un premier répliqua en PDMS doit être préparé. Ce répliqua est formé avec le kit standard SYLGARD™170 (proportion de 1 pour 10 en masse d'adjuvants par rapport à l'élastomère). Pour une boîte de Petri standard :

1. Mélanger 33 g d'élastomère et 2,8g d'adjuvant. La dose d'adjuvant est légèrement inférieure à 1 pour 10 car l'adjuvant fait souvent défaut, or les propriétés mécaniques finales n'ont pas ici besoin d'être parfaitement connues.
2. Mélanger vigoureusement les deux composants. Bien racler les bords pour éviter les inhomogénéités locales de concentration en adjuvant.
3. Déposer le mélange sur le wafer dans une boîte de Petri.

4. Placer sous vide pendant une dizaine de minutes afin de retirer les bulles d'air formées pendant le mélange. S'il reste des bulles :
 - En surface, ou proche : souffler à l'aide d'une micro-pipette ou passer une flamme rapidement à la surface;
 - En profondeur : remettre sous vide, et/ou aspirer délicatement la bulle avec une micro-pipette.
5. Mettre la boîte de Petri à l'étuve, à 65°C pour 5 heures.
6. Après la cuisson, décoller délicatement le PDMS de la galette de silice. Attention, les wafers de silice sont très fragiles. Pour la suite, utiliser la puce de PDMS ainsi formée.
7. Silaniser le nouveau moule négatif de PDMS avec le 3-Mercaptopropyltriméthoxysilane.
8. Préparer l'époxy avec le kit SYLGARD™184 (proportion de 1 pour 5 en masse d'adjuvant par rapport à l'élastomère). De nouveau, pour une boîte de Petri, préparer environ 30 g de mélange. De la même manière que pour le PDMS : mélanger vigoureusement, déposer sur le moule de PDMS traité et mettre sous vide pour dégazer. La cuisson doit ensuite être faite à 65°C pendant 12 h.
9. Le moule peut ensuite être décollé.
10. Silaniser également le moule d'époxy avec le 3-Mercaptopropyltriméthoxysilane .

Le moule d'époxy est alors utilisable comme moule principal pour reproduire les circuits micro-fluidiques en PDMS.

13.4 Circuit micro-fluidique de PDMS

Préparer les circuits micro-fluidique en PDMS à l'aide du kit standard SYLGARD™170 (proportion de 1 pour 10 en masse d'adjuvant par rapport à l'élastomère), selon la même méthode que pour le répliqua. Pour une boîte de Petri standard :

1. Mélanger 33 g d'élastomère et 2,8 g d'adjuvant.
2. On mélange vigoureusement les deux composants. Bien racler les bords pour éviter les sur-concentrations locales en adjuvant.
3. Déposer le mélange sur le wafer dans une boîte de Petri.
4. Placer sous vide pendant une dizaine de minutes afin de retirer les bulles d'air formées pendant le mélange. S'il reste des bulles :
 - En surface, ou proche : souffler à l'aide d'une micro-pipette ou passer une flamme rapidement à la surface;

- En profondeur : remettre sous vide, et/ou aspirer délicatement la bulle avec une micro-pipette.

5. Mettre la boîte de Petri à l'étuve, à 65°C pour 5 heures.

6. Après la cuisson, décoller délicatement le PDMS du moule d'époxy.

Il est ensuite nécessaire de procéder au collage de la puce micro-fluidique sur une lame de verre Thermo Scientific-Menzel-Gläser SUPERFROST™.

7. Pour cela, la lame de verre et la puce micro-fluidique sont activées sous plasma, pendant 3 min 30 s. Immédiatement après, coller entre elles les surfaces exposées au plasma (la surface de la puce comprenant le microcircuit avec la surface de la lame exposée au plasma). Appliquer une légère pression pendant quelques minutes. Il est impératif que les deux surfaces soient très propres : une impureté empêche les liaisons covalentes de se former et peut entraîner le décollage de la puce.

Une fois la puce et la lame de verre collées, le système doit être utilisé le plus vite possible. En effet, le plasma rend hydrophile le verre et le PDMS, mais seulement temporairement : les surfaces retrouvent leur état initial hydrophobe en une heure environ dû à l'oxydation par l'oxygène de l'air. En plongeant les surfaces dans l'eau, le caractère hydrophile des surfaces ionisées peut être conservé quelques heures.

Le système est placée sous un microscope afin de pouvoir voir en temps réel la progression des liquides dans les canaux.

Chapitre 14

Production des capteurs

14.1 Injection dans la puce micro-fluidique et formation de l'émulsion

- Pour l'injection du mélange polymérisable et de l'eau, ainsi que pour la sortie des écoulements du circuit, nous avons utilisé des aiguilles Terumo Agani™ 21 G x 1.5 (0,8 x 38 mm) dont l'embout et la partie tranchante ont été retirés avec une scie circulaire. A l'aide d'une pince à bout rond, un angle de 90° à 1 cm du bord est formé avec le tube de l'aiguille.
- Ces mêmes aiguilles sont également utilisées pour les percer trous dans la puce micro-fluidique ("puncher"). Trois trous doivent être faits pour chaque microcircuits : un premier au niveau de l'entrée d'eau, un second pour l'entrée du mélange polymérisable et un troisième pour la sortie.
- Les tubes flexibles utilisés pour injecter les liquides et récupérer l'émulsion en sortie sont les tubes TYGON® Tubing AAD02103-CP ND-100-80 de diamètre interne de 0.020 pouces (0.508 mm).
- Afin d'éviter un temps de passage trop important dans les tuyaux, limiter au maximum la longueur entre la puce placée sous le microscope, et les réservoirs d'eau et de mélange polymérisable.
- Les réservoirs d'eau et mélange polymérisable sont placés dans un bain de glace afin de limiter la polymérisation à température ambiante, le temps de la production. En effet, bien qu'à température ambiante la polymérisation soit très lente, la viscosité évolue rapidement, ce qui modifie les pressions à imposer pour former les gouttes de taille fixe dans le système micro-fluidique.
- Les réservoirs sont connectés au contrôleur de pression Fluigent™ 2 bars. Les pressions sont régulées par le logiciel Fluigent™.
- Les valeurs typiques de pression à imposer pour former une production de gouttes de l'ordre de 15 gouttes par seconde, et ainsi avoir un bon rendement de production, sont de l'ordre de 150 mbar pour l'introduction du mélange polymérisable et 1 bar pour l'eau.

- Il est essentiel d’injecter le gel progressivement, sans qu’il dépasse la constriction et forme un jet continu. En effet, si cela se produit, le gel risque d’entrer irréversiblement en contact avec les parois du canal de sortie : l’instabilité de Rayleigh-Plateau ne peut plus être obtenue et le circuit devient inutilisable.
- La présence d’impuretés pouvant boucher les canaux doit être régulièrement vérifiée. Si un des canaux se bouche, partiellement ou complètement, la stabilité de la production est modifiée : la production est arrêtée ou n’est plus mono-disperse.
- En sortie du système micro-fluidique, l’émulsion est récupérée dans un becher contenant un peu d’eau pour éviter que l’émulsion ne sèche trop rapidement, et donc que les gouttes ne touchent les parois du récipient, ni ne soient collées entre elles.
- La suspension peut éventuellement être conservée au réfrigérateur pendant quelques heures avant que la polymérisation ne soit faite. Cependant, il est conseillé d’initier la polymérisation à chaud le plus rapidement, car la polymérisation se fait également très lentement à froid.

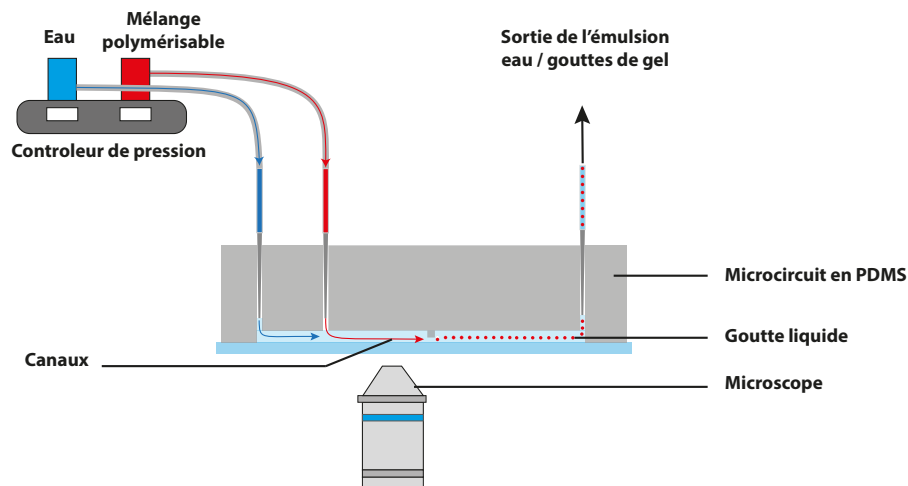


FIGURE 14.1 – Schéma du montage pour la production des gouttes avec puce micro-fluidique. Les injections de l’eau et du mélange polymérisable sont contrôlées par un contrôleur de pression Fluigent™. L’injection dans la puce microfluidique se fait à l’aide d’aiguilles découpées, et l’émulsion sort de la puce à l’aide d’une aiguille branchée sur un tuyau. Le système micro-fluidique est placée sur un microscope afin de pouvoir suivre l’évolution et la production de l’émulsion en temps réel.

14.2 Polymérisation à chaud

- Pour l’étape de polymérisation, la suspension de billes est mise à l’étuve à 80°C, sur un plateau rotatif tournant à environ 0.5 tr/s. Ceci permet aux gouttes en cours de polymérisation de ne pas entrer en contact avec les parois (fig. 14.2. En effet, le gel est de densité plus faible que l’eau, et la force centripète concentre les billes au centre de la surface libre de la suspension.

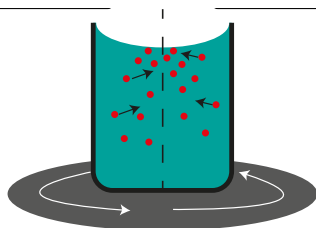


FIGURE 14.2 – L'émulsion de mélange polymérisable est mise sur un plateau tournant (50 rpm) afin de reconcentrer les gouttes (et les billes après polymérisation) au centre du récipient et ainsi éviter le contact avec les surfaces.

- La réticulation doit durer au minimum trois heures afin que la réaction de polymérisation soit complète dans les gouttes et qu'on obtienne des micro-billes de gel.
- Les capteurs peuvent alors être récupérés délicatement à l'aide d'une pipette large en verre. L'utilisation du verre est préconisée pour limiter au maximum les adhérences des capteurs sur la surface. Pour les mêmes raisons, il est préférable d'avoir une embouchure grande.

14.3 Silanisation des récipients

Pour minimiser la perte des capteurs par adhésion sur les parois, pendant et après leur polymérisation, les récipients sont traités en surfaces avec de l'OTS (octadecyltrichlorosilane) pour les rendre hydrophobes. La veille du traitement, les récipients doivent être lavés soigneusement selon la méthode suivante :

1. Remplir le récipient à silaniser avec de la potasse alcoolique (40g de KOH dissous directement dans 300 ml d'éthanol à 70 % (-solution à environ 2M).
2. Mettre à tremper pendant 1 h dans un bain à ultrasons.
3. Rincer trois fois à l'eau distillée.
4. Rincer à l'isopropanol puis une dernière fois à l'eau distillée.
5. Laisser sécher à l'étuve.
6. Passer les surfaces à traiter au plasma pendant environ 5 minutes.
7. Rincer de nouveau à l'isopropanol puis à l'eau distillée.
8. Laisser sécher à l'étuve sur une nuit.

Pour le traitement des surfaces, les surfaces doivent être parfaitement sèches. La solution de silane est composée comme suit :

- 80 % en volume de solvant lourd (toluène ou hexadécane idéalement)
- 19,9 % de chloroforme ou tétrachlorométhane

- 0,1 % d'OTS (160 μ l pour 200 ml de solution)

En l'absence d'héxadécane, nous avons utilisé de l'héxane avec du chloroforme. Les récipients sont remplis (ou les surfaces recouvertes) par la solution pendant 2h, puis rincés avec de l'éthanol. Les surfaces sont alors très hydrophobes et le traitement reste fonctionnel pendant plusieurs semaines.

14.4 Traitement de surface par le poly-acide acrylique (PAA)

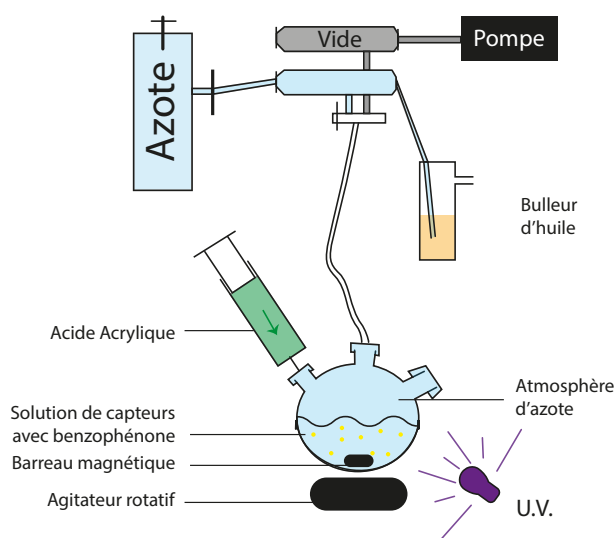


FIGURE 14.3 – Montage d'un ballon bicol relié à un atmosphère d'azote pour le traitement PAA des capteurs en suspension dans l'eau. Une solution d'acide acrylique est ajoutée à la suspension sous atmosphère d'azote. Un éclairage UV permet la polymérisation de l'acide acrylique sur les molécules de benzophénone dans les capteurs..

1. Dans un ballon bicol (fig. 14.3), introduire la suspension de capteurs polymérisés (5 mL de solution) avec un barreau aimanté pour l'agitation.
2. L'une des deux rampes est mise sous vide, l'autre est sous azote. Relier une entrée du ballon à la rampe à vide. Un robinet à trois voies permet de brancher alternativement le ballon sur l'azote ou sur le vide.
3. Sur le deuxième col, mettre un septum. On peut éventuellement prendre un ballon tricol et mettre un septum sur le troisième col également. En cas de sous-pression, on pourra ainsi plus facilement introduire une aiguille pour casser le vide.
4. Mettre le barreau aimanté sous agitation très lente (1 tr/s). La solution doit être agitée, mais les interactions entre les parois et les capteurs doivent être minimisées.
5. Faire le vide pendant 15 minutes.
6. Mettre sous atmosphère d'azote. Attention, la surpression formée peut laisser l'huile de reflux remonter dans la rampe à vide. Remplir donc le ballon d'azote avec précaution.

7. Ajouter avec une aiguille la quantité de solution d'acide acrylique voulue (100 μ l de solution d'acide pour 5 ml de suspension de capteur).
8. Exposer sous UV lointain (240 nm) immédiatement pendant 3 minutes environ.
9. Éteindre les UV et neutraliser l'excès d'acide avec de la soude à 2 M (1,45 ml de soude environ) jusqu'à obtenir une solution à pH neutre.

14.5 Couplage du PAA avec un fluorophore aminé

Solution n°1

D'abord préparer dans deux eppendorfs séparés les deux solutions suivantes :

- Eppendorfs 1**
- 200 μ l de DMSO (Diméthylsulfoxyde)
 - 26 mg de fluorescéinamine

- Eppendorfs 2**
- 232,5 mg de sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide)
 - 220 μ l d'HEPES
 - 50 ml d'H₂O

Mélanger ces deux solutions puis préparer la troisième solution :

Solution n°2

- 28,7 mg d'EDC (1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)
- 200 μ l d'HEPES
- 50 ml d'H₂O

Verser les deux solutions en équi-proportion sur la surface à marquer par fluorescence et laisser réagir quelques minutes. Rincer ensuite à l'eau. La fluorescence est ensuite testée par microscopie à fluorescence (confocale).

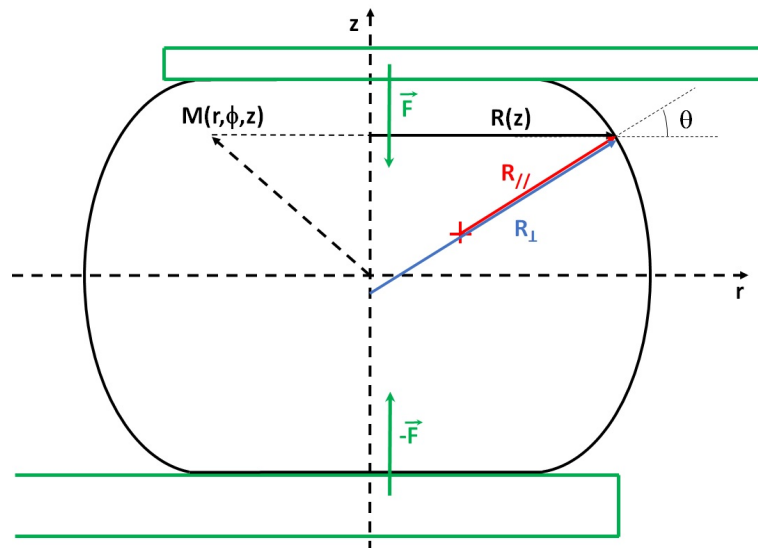
Chapitre 15

Calibration mécanique directe des capteurs *in situ*

15.1 Modélisation des contraintes dans un agrégat en compression uniaxiale

Objectif : calculer la distribution des contraintes en tout point d'un agrégat cellulaire de symétrie cylindrique soumis à une force de compression uniaxiale F . En déduire la déformation d'un capteur élastique inséré dans l'agrégat en fonction de F et de sa position.

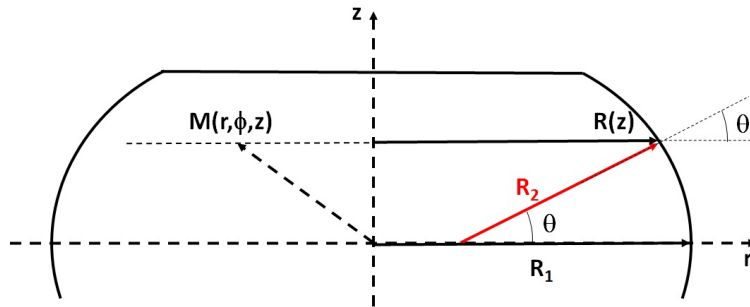
Cas général



- Coordonnées cylindriques $M(r, \phi, z)$ (ϕ est la longitude)
- Génératrice du cylindre $R(z)$

- Relations utiles : $\frac{dR}{dz} = -\tan\theta$; $dz = ds \cos\theta$; $dR = -ds \sin\theta$ où ds est l'élément de longueur le long de la génératrice.
- Rayons de courbure principaux : $\frac{1}{R_{\perp}} = \frac{\cos\theta}{R}$ et $\frac{1}{R_{//}} = \frac{d\theta}{ds} = \frac{\cos\theta d\theta}{dz} = -\frac{\sin\theta d\theta}{dR}$
- γ_{ag} tension de surface de l'interface agrégat/milieu de culture
- \vec{F} force exercée par la plaque supérieure sur l'agrégat ($F_z = -F$)

Cas particulier d'un profil circulaire



$$R_{//} = R_2 = cste$$

$$R(z) = R_1 - R_2 + R_2 \cos\theta \Leftrightarrow \cos\theta = \frac{R - R_1 + R_2}{R_2}$$

$$\frac{1}{R_{\perp}} = \frac{\cos\theta}{R} = \frac{1}{R_2} - \frac{1}{R} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right)$$

15.2 Condition d'équilibre mécanique

Tenseur des contraintes (matrice symétrique) $\vec{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{rr} & \sigma_{r\phi} & \sigma_{rz} \\ \sigma_{r\phi} & \sigma_{\phi\phi} & \sigma_{\phi z} \\ \sigma_{rz} & \sigma_{\phi z} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}$

Suivant la convention usuelle, les composantes σ_{ii} sont comptées positivement dans le cas d'un étirement (et donc négatives en compression).

Condition d'équilibre en l'absence de force de volume $d\vec{i}\nu(\vec{\sigma}) = \vec{0}$, soit en coordonnées cylindriques :

$$\frac{\partial\sigma_{rr}}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial\sigma_{r\phi}}{\partial\phi} + \frac{1}{r} (\sigma_{rr} - \sigma_{\phi\phi}) + \frac{\partial\sigma_{rz}}{\partial z} = 0$$

$$\frac{\partial\sigma_{r\phi}}{\partial r} + \frac{2}{r} \sigma_{r\phi} + \frac{1}{r} \frac{\partial\sigma_{\phi\phi}}{\partial\phi} + \frac{\partial\sigma_{\phi z}}{\partial z} = 0$$

$$\frac{\partial\sigma_{rz}}{\partial r} + \frac{1}{r} \sigma_{rz} + \frac{1}{r} \frac{\partial\sigma_{\phi z}}{\partial\phi} + \frac{\partial\sigma_{zz}}{\partial z} = 0$$

Symétrie cylindrique \Rightarrow rien ne dépend de $\phi \Rightarrow \frac{\partial}{\partial\phi} = 0$

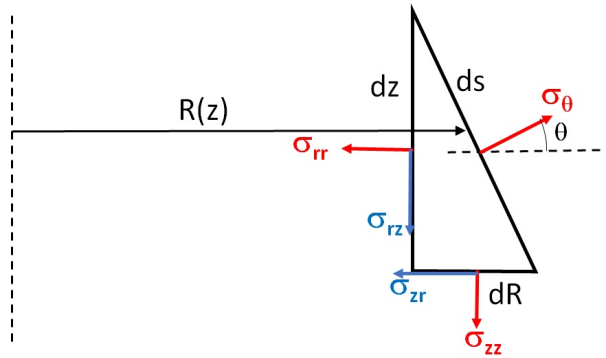
Et de plus $\sigma_{r\phi} = \sigma_{z\phi} = 0$ (pas de chiralité). En revanche $\sigma_{\phi\phi} \neq 0$

Les équations ci dessus se simplifient : la seconde est automatiquement vérifiée; il reste :

$$\frac{\partial \sigma_{rr}}{\partial r} + \frac{1}{r}(\sigma_{rr} - \sigma_{\phi\phi}) + \frac{\partial \sigma_{rz}}{\partial z} = 0 \quad (15.1)$$

$$\frac{\partial \sigma_{rz}}{\partial r} + \frac{1}{r}\sigma_{rz} + \frac{\partial \sigma_{zz}}{\partial z} = 0 \quad (15.2)$$

15.3 Conditions aux limites à la surface de l'agrégat



Equilibre du volume élémentaire prismatique ($dR, dz, Rd\phi$)

$$\sigma_{\theta} \cos \theta ds = \sigma_{rr} dz + \sigma_{zr} dR$$

$$\sigma_{\theta} \sin \theta ds = \sigma_{zz} dR + \sigma_{rz} dz$$

Avec $\sigma_{\theta} = -p = -p_a - \gamma_{ag}K$ car la contrainte en surface est une contrainte de pression, normale à la surface.

p_a pression en solution

$\gamma_{ag}K$ pression de Laplace ($K = \frac{1}{R_{\perp}} + \frac{1}{R_{//}}$ est la courbure moyenne)

Les conditions d'équilibre deviennent :

$$\sigma_{rr}(R, z) + \sigma_{zr}(R, z) \tan \theta = -p \quad (15.3)$$

$$\sigma_{zz}(R, z) + \frac{\sigma_{zr}(R, z)}{\tan \theta} = -p \quad (15.4)$$

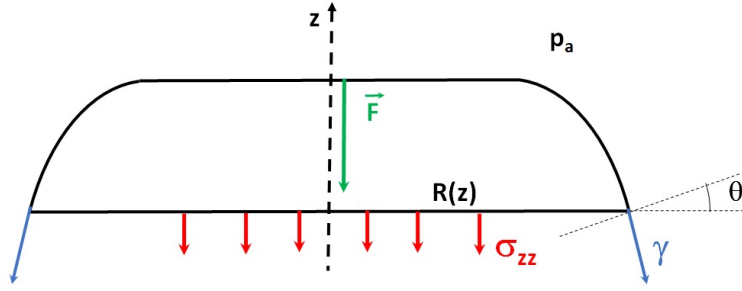
Et en combinant les deux :

$$\sigma_{rz}(R, z) = \frac{1}{2}(\tan 2\theta)(\sigma_{rr} - \sigma_{zz})(R, z) \quad (15.5)$$

15.4 Bilan de force global

Dans la direction verticale, à l'altitude z :

$$\int \sigma_{zz} 2\pi r dr + 2\pi \gamma_{ag} R(z) \cos \theta = -F - \pi R^2 p_a \quad (15.6)$$



15.5 Hypothèses sur l'expression de $\bar{\bar{\sigma}}(r, z)$

Un développement limité de σ_{zz} , σ_{rr} , $\sigma_{\phi\phi}$ en fonction de r s'écrit, en se limitant au second ordre :

$$\sigma_{zz} = -\sigma_0(z) + b_0(z)r^2 \quad (15.7)$$

$$\sigma_{rr} = -\sigma_1(z) + b_1(z)r^2 \quad (15.8)$$

$$\sigma_{\phi\phi} = -\sigma_2(z) + b_2(z)r^2 \quad (15.9)$$

Les fonctions $\sigma_i(z)$ sont positives dans le cas d'une compression.

Cette approximation est justifiée pour σ_{zz} , car par exemple dans le cas d'un contact de Hertz avec glissement on peut écrire à la surface de contact : $\sigma_{zz} = -\sigma_0\sqrt{1 - \frac{r^2}{a^2}}$. La forme (15.7) en est le DL à l'ordre r^2 . Les équations (15.1) à (15.6) doivent permettre de calculer explicitement les fonctions $\sigma_i(z)$ et $b_i(z)$ introduites dans (15.7), (15.8) et (15.9).

L'équation (15.2) permet d'exprimer σ_{rz} :

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial r}(r\sigma_{rz}) + r\frac{\partial\sigma_{zz}}{\partial z} &= 0 \\ \Rightarrow r\sigma_{rz} &= \frac{r^2}{2}\sigma'_0(z) - \frac{r^4}{4}b'_0(z) \end{aligned}$$

(' désigne la dérivée par rapport à z)

$$\Rightarrow \sigma_{rz} = \frac{r}{2}\sigma'_0(z) - \frac{r^3}{4}b'_0(z) \quad (15.10)$$

Ensuite en injectant σ_{rz} dans (15.1) :

$$2b_1(z)r + \frac{\sigma_2(z) - \sigma_1(z)}{r} + (b_1(z) - b_2(z))r + \frac{r}{2}\sigma''_0(z) - \frac{r^3}{4}b''_0(z) = 0 \quad (15.11)$$

$\Rightarrow \sigma_2(z) = \sigma_1(z) \forall z$ car σ ne peut pas avoir de divergence en $r = 0$ (résultat cohérent avec le fait que, le long de Oz, les contraintes dans le plan orthogonal à cet axe sont isotropes).

$$\Rightarrow 3b_1(z) - b_2(z) + \frac{\sigma''_0(z)}{2} - \frac{r^2}{4}b''_0(z) = 0$$

Si dans le développement limité on se limite aux termes en r^2 pour σ_{rr} et $\sigma_{\phi\phi}$, alors b_1 et b_2 ne peuvent pas dépendre de $r \Rightarrow b_0''(z) = 0 \Rightarrow b_0(z) = Az + B$, et on a aussi : $3b_1(z) - b_2(z) + \frac{\sigma_0''(z)}{2} = 0$.

D'autre part σ_{zz} doit être une fonction paire de z donc $A = 0$ et :

$$b_0(z) = B \quad (15.12)$$

où B est une constante indépendante de z (en revanche elle peut dépendre du temps si les contraintes relaxent dans l'agrégat).

A ce stade il n'est pas possible de calculer $b_1(z)$ et $b_2(z)$ indépendamment, et il est nécessaire de faire une hypothèse sur la relation entre $b_1(z)$ et $b_2(z)$. Dans la suite nous avons choisi d'écrire simplement $b_1(z) = b_2(z)$, ce qui se traduit par $\sigma_{rr}(r, z) = \sigma_{\phi\phi}(r, z)$ en tout point (contrainte isotrope dans un plan orthogonal à Oz). Cette hypothèse peut être partiellement justifiée par des arguments géométriques qu'on ne développera pas ici (incompressibilité du matériau). Mais d'autres hypothèses restent possibles : par exemple les calculs ont été menés à terme dans l'hypothèse $b_2(z) = 0$: cela change quelques facteurs numériques mais pas la teneur du résultat.

Si $b_1(z) = b_2(z)$, l'équation (15.11) se simplifie alors en :

$$b_1(z) = -\frac{\sigma_0''(z)}{4} \quad (15.13)$$

15.6 Calcul des contraintes

15.6.1 Agrégat de forme quelconque

En injectant la forme (15.7) dans (15.6) et en calculant l'intégrale on arrive à :

$$\sigma_0(z) = p_a + \frac{F}{\pi R^2(z)} + \frac{2\gamma_{ag} \cos \theta(z)}{R(z)} + \frac{1}{2} BR^2(z) \quad (15.14)$$

Par dérivation on en déduit $\sigma_0'(z)$:

$$\sigma_0'(z) = \left(\frac{2F}{\pi R^3} + \frac{2\gamma_{ag}}{R} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) - BR \right) \tan \theta \quad (15.15)$$

Et par suite $\sigma_0''(z)$:

$$\begin{aligned} \sigma_0''(z) = & \left(\frac{2F}{\pi R^3} + \frac{2\gamma_{ag}}{R} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) - BR \right) \frac{1}{\cos^2 \theta} \frac{d\theta}{dz} \dots \\ & \dots - \tan^2 \theta \left(-\frac{6F}{\pi R^4} - \frac{2\gamma_{ag}}{R^2} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) + \frac{2\gamma_{ag}}{R} \frac{d}{dR} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) - B \right) \end{aligned} \quad (15.16)$$

Expression de $\sigma_{zz}(r, z)$

En utilisant les expressions explicites de $\sigma_0(z)$ (15.14) et de $b_0(z) = B$, on a :

$$\sigma_{zz}(r, z) = -p_a - \frac{F}{\pi R^2(z)} - \frac{2\gamma_{ag} \cos \theta(z)}{R(z)} - \frac{1}{2} BR^2(z) + Br^2 \quad (15.17)$$

Expression de $\sigma_{zr}(r, z)$

D'après (15.10) :

$$\sigma_{zr}(r, z) = \frac{r}{2} \sigma'_0(z) = r \left(\frac{F}{\pi R^3} + \frac{\gamma_{ag}}{R} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) - \frac{BR}{2} \right) \tan \theta \quad (15.18)$$

En supposant que les développements limités de σ à l'ordre r^2 sont valables jusqu'au bord de l'agrégat ($r = R$), on vérifie que la condition de bord (15.4) est alors automatiquement vérifiée : le bilan de force global (15.6) contient (15.4).

Expression de $\sigma_{rr}(r, z) = \sigma_{\phi\phi}(r, z)$

Pour connaître l'expression de σ_{rr} il ne manque que l'expression de $\sigma_1(z)$, qu'on déduit de la condition au bord tirée de (15.3) :

$$\sigma_{rr}(R, z) = -\sigma_{zr}(R, z) \tan \theta - p = -\frac{R}{2} \sigma'_0(z) \tan \theta - p_a - \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_{\perp}} + \frac{1}{R_{//}} \right) \quad (15.19)$$

Avec d'autre part (15.8) :

$$\sigma_{rr}(R, z) = -\sigma_1(z) + b_1(z)R^2 \quad (15.20)$$

$$\Rightarrow \sigma_1(z) = R \left(\frac{F}{\pi R^3} + \frac{\gamma_{ag}}{R} \left(\frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} \right) - \frac{BR}{2} \right) \tan^2 \theta + p_a + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_{\perp}} + \frac{1}{R_{//}} \right) + b_1(z)R^2(z) \quad (15.21)$$

Par conséquent :

$$\sigma_{rr}(r, z) = -\sigma_1(z) + b_1(z)r^2 \quad (15.22)$$

Où les expressions de $\sigma_1(z)$ et $b_1(z) = -\frac{\sigma''_0(z)}{4}$ sont données par (15.21) et (15.16)

Ceci permet de calculer les contraintes partout dans l'agrégat si on connaît la constante B.

15.6.2 Agrégat de profil circulaire

On se limite par la suite au cas d'une génératrice circulaire, qui représente en général bien la forme de l'agrégat. Dans cette hypothèse $R_{//} = cste = R_2$, et $\frac{1}{R_{\perp}} = \frac{\cos \theta}{R} = \frac{1}{R_2} - \frac{1}{R} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right)$.

$$\Rightarrow \frac{1}{R_{\perp}} - \frac{1}{R_{//}} = -\frac{1}{R} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right)$$

L'expression (15.14) de σ_0 devient :

$$\sigma_0(z) = p_a + \frac{F}{\pi R^2} + 2\gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) \right) + \frac{1}{2} BR^2 \quad (15.23)$$

L'expression (15.15) de σ'_0 devient :

$$\sigma'_0(z) = \left(\frac{2F}{\pi R^3} - \frac{2\gamma_{ag}}{R^2} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) - BR \right) \tan \theta \quad (15.24)$$

En utilisant la relation $\frac{d\theta}{dz} = \frac{1}{R_2 \cos \theta}$, l'expression (15.16) de σ''_0 devient :

$$\sigma_0''(z) = \left(\frac{2F}{\pi R^3} - \frac{2\gamma_{ag}}{R^2} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) - BR \right) \frac{1}{R_2 \cos^3 \theta} + \tan^2 \theta \left(\frac{6F}{\pi R^4} - \frac{4\gamma_{ag}}{R^3} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) + B \right)$$

Cette expression de $\sigma_0''(z)$ et par conséquent de $b_1(z) = -\frac{\sigma_0''(z)}{4}$ s'écrit uniquement en fonction de $R(z)$ en remarquant que :

$$\tan^2 \theta = \left(\frac{1}{\cos^2 \theta} - 1 \right) \text{ et } \cos \theta = \frac{R - R_1 + R_2}{R_2}$$

$$\begin{aligned} \sigma_0''(z) = & \left(\frac{R_2}{R - R_1 + R_2} \right)^2 \left[\frac{2F}{\pi R^3} \left(\frac{3}{R} + \frac{1}{R - R_1 + R_2} \right) - \frac{2\gamma_{ag}}{R^2} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) \left(\frac{2}{R} + \frac{1}{R - R_1 + R_2} \right) \right] \dots \\ & \dots + \left(\frac{R_2}{R - R_1 + R_2} \right)^2 \left[B \left(1 - \frac{R}{R - R_1 + R_2} \right) \right] - \left(\frac{6F}{\pi R^4} - \frac{4\gamma_{ag}}{R^3} \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) + B \right) \end{aligned} \quad (15.25)$$

On en déduit $b_1(z) = -\frac{\sigma_0''(z)}{4}$ et $\sigma_1(z)$ (15.21), ce qui permet d'exprimer de façon explicite $\sigma_{rr}(r, z)$, $\sigma_{rz}(r, z)$ et $\sigma_{zz}(r, z)$ en tout point de l'agrégat.

15.7 Déformation d'un capteur inséré dans l'agrégat

Pour un capteur sphérique élastique, incompressible, supposé quasi ponctuel, de module d'Young (effectif) $E_{eff} = 3\mu_{eff}$, le tenseur des déformations $\bar{\epsilon}$ se réduit au tenseur des déformations de cisaillement, qui est donné par :

$$2\mu_{eff}\bar{\epsilon} = \bar{\sigma}^d = \bar{\sigma} - \frac{1}{3}tr(\bar{\sigma})\mathbf{I}$$

où $\bar{\sigma}^d$ désigne le tenseur des contraintes de cisaillement (déviateur).

En toute généralité, la connaissance de $\sigma_{rr}(r, z)$, $\sigma_{rz}(r, z)$ et $\sigma_{zz}(r, z)$ permet de déterminer les directions principales et les valeurs des contraintes principales (et donc les déformations de cisaillement induites sur le capteur) en tout point de l'agrégat.

En se limitant à un point du plan équatorial de l'agrégat $M(r, z = 0)$ pour lequel $R = R_1$, $\theta = 0$, $\sigma_{rz} = 0$ et donc les axes principaux sont \bar{e}_z , \bar{e}_r et \bar{e}_ϕ , on trouve après calculs :

$$\sigma_{zz}(r, 0) = -\sigma_0(0) + Br^2 = -p_a - \frac{F}{\pi R_1^2} - \frac{2\gamma_{ag}}{R_1} + \frac{1}{2}BR_1^2 - BR_1^2 \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right) \quad (15.26)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{rr}(r, 0) = \sigma_{\phi\phi}(r, 0) = & -\sigma_1(0) + b_1(0)r^2 = -p_a - \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \dots \\ & + \frac{R_1}{R_2} \left[\frac{F}{2\pi R_1^2} - \frac{\gamma_{ag}}{2} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) - \frac{BR_1^2}{4} \right] \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right) \end{aligned} \quad (15.27)$$

$$\sigma_z^d = \sigma_{zz} - \frac{1}{3} tr(\bar{\sigma}) = \left[-\frac{F}{3\pi R_1^2} + \frac{\gamma_{ag}}{3} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) \right] \left[2 + \frac{R_1}{R_2} \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right) \right] \dots \quad (15.28)$$

$$\dots + BR_1^2 \left[\frac{1}{3} + \left(-\frac{2}{3} + \frac{R_1}{6R_2} \right) \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right) \right]$$

(N.B. : dans le plan équatorial les axes principaux sont \vec{e}_z , \vec{e}_r et \vec{e}_ϕ , on omettra donc les doubles indices pour l'écriture des tenseurs)

En utilisant $2\mu_{eff}\epsilon_z = \sigma_z^d$, et en désignant par $\sigma_M = \frac{F}{\pi R_1^2}$ la contrainte moyenne exercée sur l'agrégat dans le plan équatorial, on aboutit à :

$$\sigma_M = -\frac{3\mu_{eff}\epsilon_z(r)}{1 + \frac{R_1}{2R_2} \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right)} + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) + \frac{BR_1^2}{2} \left[\frac{2R_2 + (R_1 - 4R_2) \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right)}{2R_2 + R_1 \left(1 - \frac{r^2}{R_1^2} \right)} \right] \quad (15.29)$$

On peut également écrire cette relation en fonction de $\epsilon_r = -\frac{\epsilon_z}{2}$

Points particuliers

- Centre de l'agrégat $r = 0$, $z = 0$

$$\sigma_M = -\frac{2R_2}{R_1 + 2R_2} 3\mu_{eff}\epsilon_z(r=0) + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) + \frac{BR_1^2}{2} \left(\frac{R_1 - 2R_2}{R_1 + 2R_2} \right) \quad (15.30)$$

- Bord de l'agrégat $r = R_1$, $z = 0$

$$\sigma_M = -\mu_{eff}\epsilon_z(r=R_1) + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) + \frac{BR_1^2}{2} \quad (15.31)$$

15.8 Hypothèse sur la valeur de B

Dans le modèle, B est supposé constant dans tout le volume du capteur, mais peut varier dans le temps. En effet, dans l'expérience on applique à $t = 0$ un échelon de déplacement à la lamelle supérieure, qui imprime une déformation globale à l'agrégat constante dans le temps. En revanche les contraintes dans l'agrégat évoluent avec le temps grâce aux mécanismes de réarrangements cellulaires internes. $B(t)$ est donc une fonction du temps qui tend vers zéro quand $t \rightarrow \infty$, car le tenseur $\bar{\sigma}$ doit être redevenu homogène en fin de relaxation.

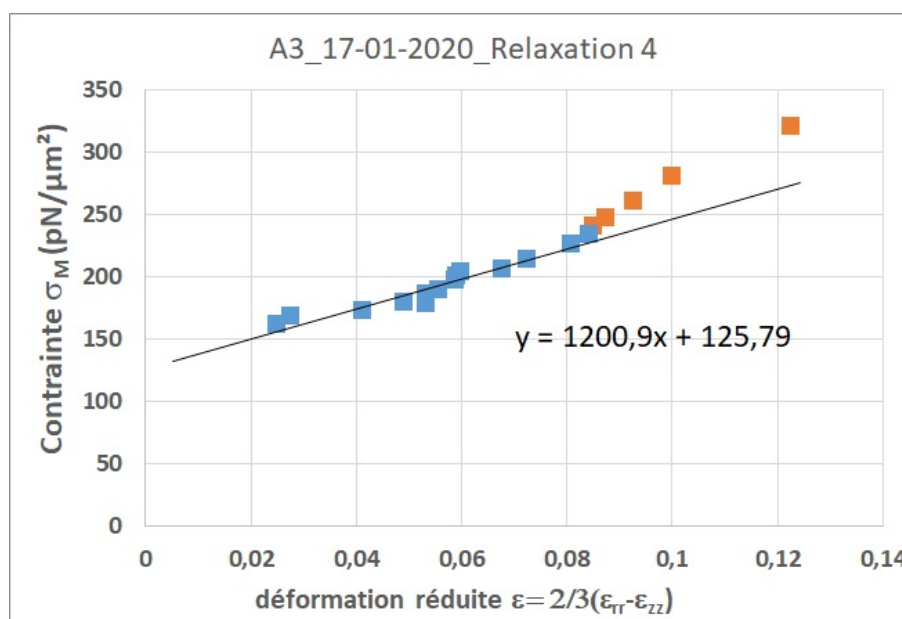
Par souci de simplification, nous nous plaçons dans la suite dans cette limite des temps longs, c'est à dire que nous faisons l'hypothèse $B = 0$. Cela implique qu'on ne prend pas en compte les premiers instants de la relaxation pour interpréter les courbes $\sigma(\epsilon)$. Dans cette hypothèse, au centre de l'agrégat ($r = 0$, $z = 0$), l'équation (15.30) devient :

$$\sigma_M = P\epsilon + \gamma_{ag} \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right) \quad (15.32)$$

CHAPITRE 15. CALIBRATION MÉCANIQUE DIRECTE DES CAPTEURS IN SITU

Dans cette équation $\epsilon = \frac{2}{3}(\epsilon_r - \epsilon_z)$ représente la déformation réduite du capteur, moyennée dans les deux directions r et z , et on a posé $P = \frac{\mu_{eff}}{1 + \frac{R_1}{2R_2}}$

On trouve donc que σ_M se comporte comme une fonction affine de ϵ . P désigne la pente de la droite correspondante. L'ordonnée à l'origine de la droite est liée à la tension de surface γ_{ag} entre l'agrégat et le milieu de culture, ainsi qu'aux rayons de courbure principaux R_1 et R_2 de l'agrégat à l'équateur. Un tel comportement est observé expérimentalement (figure ci dessous). L'équation de la droite obtenue permet de mesurer γ_{ag} et le module d'Young effectif μ_{eff} du capteur.



Remarque : un calcul plus général, ne faisant pas l'hypothèse simplificatrice $B = 0$, a été également réalisé. Étant donné que les résultats ne sont pas notablement différents, nous ne le détaillons pas ici.

Chapitre 16

Correction géométrique de l'image d'un capteur

16.1 Position du problème

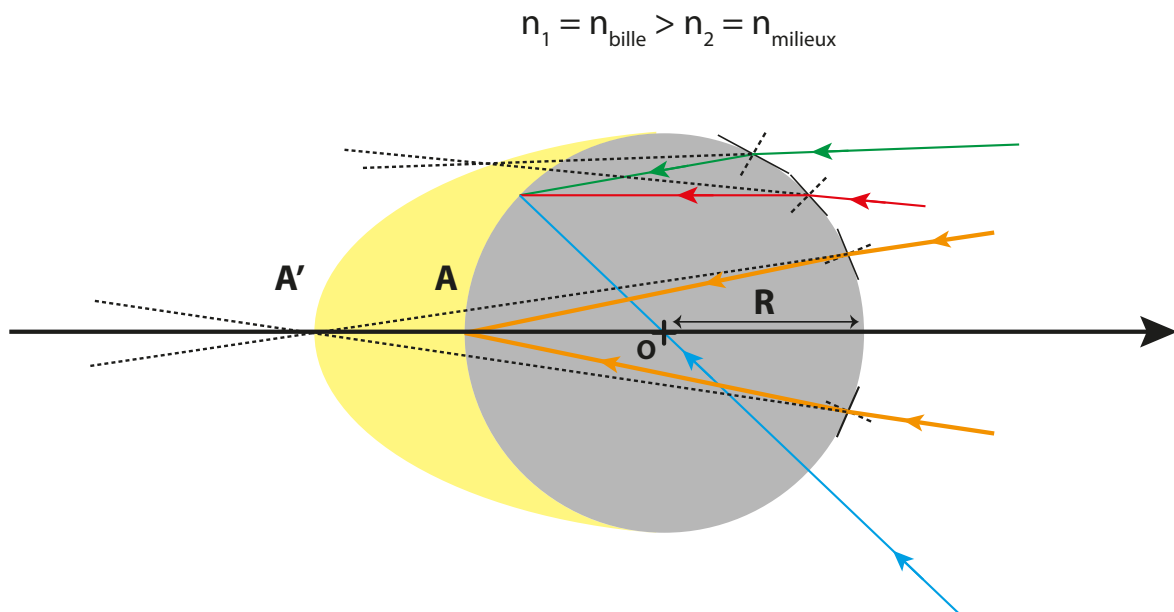


FIGURE 16.1 – Schéma de la déviation optique des rayons lumineux par un dioptré sphérique. L'image du capteur est allongé par rapport à l'objet, selon l'axe z.

Lors de la visualisation d'un capteur, l'interface tissu-capteur fait office de dioptré sphérique. Les rayons lumineux sont réfractés : l'image du capteur est modifiée. En se plaçant dans les conditions de Gauss, l'image A' du point A , vu à travers le dioptré sphérique, est telle que :

$$-\frac{n_2}{\overline{SA}} + \frac{n_1}{\overline{SA'}} = \frac{n_1 - n_2}{\overline{SO}} \quad (16.1)$$

où $\overline{SA} = 2R$ et $\overline{SO} = R$.

Donc :

$$-\frac{n_1}{SA'} = \frac{n_1 - n_2}{R} + \frac{n_2}{2R} = \frac{2n_1 - n_2}{2R} \quad (16.2)$$

Finalement, on a :

$$\frac{\overline{SA}}{\overline{SA'}} = -\frac{2n_1 - n_2}{n_1} \quad (16.3)$$

L'indice optique d'un tissu cellulaire est compris entre $1,35 < n_1 < 1,4$, et l'indice optique du DMS est $n_2 \simeq 1,44$. Donc finalement :

$$\frac{\overline{SA'}}{\overline{SA}} \simeq 1,05 \quad (16.4)$$

Finalement, il apparaît que dans un tissu, l'image du capteur est 1,05 fois plus allongée selon l'axe Oz que dans la réalité. Lors du traitement des images, un facteur correctif doit donc être mis en place. Les valeurs des indices optiques n'étant pas bien connues, nous avons décidé de mesurer ce facteur *in situ*.

16.2 Mesure du facteur correctif

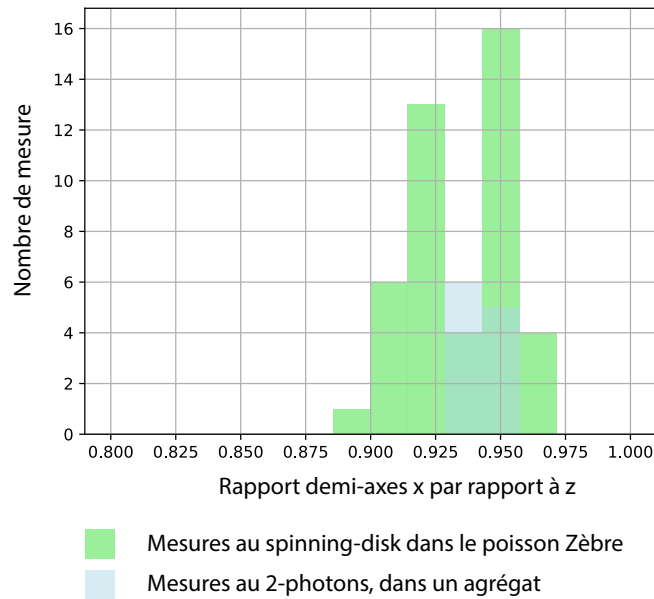


FIGURE 16.2 – Distribution du rapport des demi-axes mesurés selon x et y par rapport au demi-axe mesuré selon z.

Afin de mesurer le facteur correctif de la déformation optique selon l'axe Oz, on place dans un tissu vivant des capteurs dont le module de cisaillement est très élevé ($G' > 10 \cdot 10^3$ Pa). Ces capteurs ne sont donc pas déformables par les tissus. Lors de leur reconstitution en 3D, la forme obtenue doit donc être celle d'une sphère. On compare ensuite la valeur des demi-axes trouvés selon x et y par rapport à celle trouvée selon z.

Ces calibrations ont été effectuées séparément sur les deux systèmes de microscopie que nous avons utilisés :

- Dans l'embryon du poisson zèbre imagé avec un microscope confocal
- Dans des agrégats cellulaires de CT26 imagés avec un deux-photons

L'ajustement des volumes pour un ellipsoïde a permis d'obtenir les résultats suivants :

- 22 images de capteurs dans l'embryon du poisson zèbre ont été analysés : le rapport moyen des demi-axes x et y par rapport au demi-axe z est de 0,935 avec un écart type de 0,02 (voir fig. 16.2).
- 4 images ont été analysées dans les agrégats. La moyenne des rapports obtenus est de 0,943 avec un écart type de 0,01.

Nous utiliserons dans nos études ces facteurs optiques de correction. Le facteur correctif est, à priori, dépendant à la fois du microscope et du milieu dans lequel les capteurs sont placés. C'est pourquoi, cette calibration optique doit être faite pour chaque système étudié.

Chapitre 17

Code utilisé pour la détection de contour actif

17.1 Fonctions utilisées pour l'analyse d'image

```
1 import numpy as np
2 from math import *
3 import os
4 import matplotlib.pyplot as plt
5 from skimage import io
6 import skimage
7 from skimage.segmentation import circle_level_set, inverse_gaussian_gradient,
8     morphological_geodesic_active_contour
9 import glob
10 import re
11 import scipy
12 from scipy import ndimage
13 from pylab import diag, eig
14
15 def store_evolution_in(lst):
16     """Returns a callback function to store the evolution of the level sets in
17     the given list.
18     """
19     def _store(x):
20         lst.append(np.copy(x))
21
22     return _store
23
24
25 def image_contour(image) :
26     # =====
27     # Gradient par convolution
28     # =====
```


CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

29     contour_kernel_grad = np.zeros_like (image)
30
31     kernel_z = np.zeros ((3,3,3))
32     kernel_z [0,1,1] = -1
33     kernel_z [2,1,1] = 1
34
35     kernel_x = np.zeros ((3,3,3))
36     kernel_x [1,1,0] = -1
37     kernel_x [1,1,2] = 1
38
39     kernel_y = np.zeros ((3,3,3))
40     kernel_y [1,0,1] = -1
41     kernel_y [1,2,1] = 1
42
43     contour_kernel_grad = np.sqrt ((ndimage.filters.convolve (image, kernel_x, mode =
44     constant ))**2+((ndimage.filters.convolve (image, kernel_y,mode = constant ))**2)+(
45     ndimage.filters.convolve (image, kernel_z,mode = constant ))**2)
46
47     return np.array (contour_kernel_grad).astype (np.float32)
48
49 # =====
50 # Fit ellipsoide
51 # =====
52 def mldivide (a, b):
53     dimensions = a.shape
54     if dimensions [0] == dimensions [1]:
55         return scipy.linalg.solve (a, b)
56     else:
57         return scipy.linalg.lstsq (a, b) [0]
58
59 def fit_ellipsoide (XYZ, I):
60     # =====
61     # retrouver 1 ellipsoide
62     # On defini 1 ellipsoide par son equation : (A2/a2 + B2/b2 +C2/c2) = 1
63     # On utilise la methode des moindres carres : Somme((A2/a2 + B2/b2 +C2/c2 -1 ) min
64     # =====
65     N = XYZ.shape [0]
66     print (N)
67     var=np.zeros ((N,9));
68     square=np.zeros ((N,1)) ;
69     XYZ0=np.zeros ((N,3));
70     dist=np.zeros ((N,1)) ;
71     cut=np.zeros ((N,1)) ;
72     C_0 = np.zeros ((3,1))
73     A = I.copy ()
74     # definit le nombre d iterations
75     for i in range (0,10):

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

76 # =====
77 # On lance le programme
78 # =====
79 var[:,0] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0]**2 +XYZ[:,1]**2 -2*XYZ[:,2]**2)
80 var[:,1] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0]**2 -2*XYZ[:,1]**2 +XYZ[:,2]**2)
81 var[:,2] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0]*XYZ[:,1])
82 var[:,3] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0]*XYZ[:,2])
83 var[:,4] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,1]*XYZ[:,2])
84 var[:,5] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0])
85 var[:,6] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,1])
86 var[:,7] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,2])
87 var[:,8] = np.sqrt(A[:,0])*(1)
88 square[:,0] = np.sqrt(A[:,0])*(XYZ[:,0]**2 +XYZ[:,1]**2 +XYZ[:,2]**2)
89
90 # inversion de la relation matricielle
91 # v = ( var * var ) \ ( var * square ) ;
92 v,res,ra,s = scipy.linalg.lstsq(var,square)# least_squares_covariance(var,square,I)
93 ;# poids I_j sur chaque point
94 # calcul du vecteur u(A/k, B/k, C/k, D/k, E/k, F/k, G/k, H/k, K/k, L/k) (10
composantes)
95 # a partir de v(U, V, N, M, P, Q, R, S, T) (9 composantes),
96 # avec un facteur multiplicatif a determiner k = -(A+B+C)/3.
97 u = np.zeros((10,1))
98 u[0] = v[0] + v[1] - 1
99 u[1] = v[0] - 2 * v[1] - 1
100 u[2] = v[1] - 2 * v[0] - 1
101 u[3] = v[2]
102 u[4] = v[3]
103 u[5] = v[4]
104 u[6] = v[5]
105 u[7] = v[6]
106 u[8] = v[7]
107 u[9] = v[8]
108
109 # definition de la matrice rotation Sk = S/k (au facteur k pres)
110 # et calcul des coordonnees du centre de l ellipsoide C_0 (X_0, Y_0, Z_0)
111 Sk = np.array([[float(u[0]), float(u[3])/2, float(u[4])/2], [float(u[3])/2, float
(u[1]), float(u[5])/2], [float(u[4])/2, float(u[5])/2, float(u[2])]]);
112 TK= np.array([[float(u[6])], [float(u[7])], [float(u[8])]])
113 C_0 = - mldivide(Sk,TK)/2
114 # calcul de k et finalisation : vecteurs propres et valeurs propres de S
115 k = 1/(np.dot(np.dot(np.transpose(C_0),Sk),C_0) - float(u[9]))
116 S = Sk*float(k)
117 [val,direction] = np.linalg.eig(S)
118 demi_axes = [1/np.sqrt(val[0]), 1/np.sqrt(val[1]), 1/np.sqrt(val[2])]
119 # calcul d une distance caracteristique de l ecart a l ellipsoide,
120 # en operant sur les points experimentaux une translation pour les ramener
121 # au centre de l ellipsoide, puis une rotation pour faire coincider avec
# les axes principaux, et enfin une homothetie de facteurs (1/a, 1/b, 1/c) print(b

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

[0]*size_pix_x, b[1]*size_pix_y, b[2]*size_pix_z)
122     # pour pouvoir comparer avec la sphere centree de rayon 1. Delta est la
123     # racine carree (divisee par le nb de points) de la somme des carres des distances
124     # des points experimentaux modifiees a la sphere.
125     #
126     # translation au centre de l ellipsoide
127     XYZ0[:,0] = XYZ[:,0] - C_0[0]
128     XYZ0[:,1] = XYZ[:,1] - C_0[1]
129     XYZ0[:,2] = XYZ[:,2] - C_0[2]
130     # rotation vers les axes principaux puis homothetie vers la sphere de rayon 1
131     XYZ0=np.dot(XYZ0, direction);
132     XYZ0[:,0] = XYZ0[:,0] / demi_axes[0]
133     XYZ0[:,1] = XYZ0[:,1] / demi_axes[1]
134     XYZ0[:,2] = XYZ0[:,2] / demi_axes[2]
135     #calcul des distances de chaque point a la sphere et calcul de Delta
136     for j in range(0,N) :
137         dist[j] = abs(1-np.sqrt(XYZ0[j,0]**2+XYZ0[j,1]**2+XYZ0[j,2]**2))
138         cut[j] = ((0.1 - dist[j]) / abs(0.1 - dist[j]) + 1) / 2
139         A[j] = I[j] * cut[j]
140     return demi_axes, direction, C_0
141
142 def matrix_inertia (stack, barycentre_z, barycentre_x, barycentre_y, size_pix) :
143     """definition de la matrice d inertie de la bille. On diagonalise et defini
144     sa matrice de passage. """
145     size_pix_x, size_pix_y, size_pix_z = size_pix
146     xy=0;yz=0;xz=0;x2=0;y2=0;z2=0;N=0;
147     volume_voxel = (size_pix_x*size_pix_y*size_pix_z)
148     masse_bille = 0 ; densite = 1
149     for k in range(stack.shape[0]) :
150         for i in range(stack.shape[1]) :
151             for j in range(stack.shape[2]) :
152                 if stack[k, i, j]>0 :
153                     z = (k-barycentre_z)*size_pix_z
154                     x = (i-barycentre_x)*size_pix_x
155                     y = (j-barycentre_y)*size_pix_y
156                     x2=x2+x**2
157                     y2=y2+y**2
158                     z2=z2+z**2
159                     xy=xy+x*y
160                     xz=xz+x*z
161                     yz=yz+y*z
162                     N=N+1 # N est le nombre de volume elementaire composant la bille
163
164     x2_y2=(x2+y2) *volume_voxel
165     y2_z2=(y2+z2) *volume_voxel
166     x2_z2=(x2+z2) *volume_voxel
167
168     xy=-xy*volume_voxel
169     xz=-xz*volume_voxel

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

170     yz=-yz*volume_voxel
171     masse_bille = densite*N*volume_voxel #Densite * nombre de dV * dV
172     matrici = np.array([(x2_y2 ,xz ,yz) ,(xz ,y2_z2 ,xy) ,(yz ,xy ,x2_z2) ] , dtype = float)
173     P=eig(matrici)[1] # Matrice de passage de la base definie initialement a celle ou la
        matrici est diagonale
174     D=diag(eig(matrici)[0]) # matrici diagonale de matrici
175     return (D, P, masse_bille) #a,b et c sont les elements diagonaux de la matrici d
        intertie et les autres termes

176
177 def ellipsoide_parametres(D,masse_bille):
178     a = 0; b = 0; c = 0; d1 =0; d2 = 0; d3 = 0;
179     d1 = (5/(2*masse_bille))*D[0][0]
180     d2 = (5/(2*masse_bille))*D[1][1]
181     d3 = (5/(2*masse_bille))*D[2][2]
182     a = np.sqrt(-d1+d2+d3)
183     b = np.sqrt(d1-d2+d3)
184     c = np.sqrt(d1+d2-d3)
185     volume = (4/3)*np.pi*a*b*c
186
187     return (a,b,c,volume)
188
189 def generate_ellipsoide(a,b,c,Z0,X0,Y0,theta ,psi ,phi ,shape) :
190     #a , b, c sont les demis axes de l ellipsoide
191     # x0, y0, z0 centre de l ellipsoide
192     # angles d Euler (en degres) definissant les axes de l ellipsoide
193     c1 = np.cos(psi*np.pi/180);
194     s1 = np.sin(psi*np.pi/180);
195     c2 = np.cos(theta*np.pi/180);
196     s2 = np.sin(theta*np.pi/180);
197     c3 = np.cos(phi*np.pi/180);
198     s3 = np.sin(phi*np.pi/180);
199
200     R= np.zeros((3,3))
201     R[0,:] = [s1*s2 , c1*c3-s1*s3*c2 , -c1*s3-s1*c3*c2 ]
202     R[1,:] = [-c1*s2 , s1*c3+c1*c2*s3 , -s1*s3+c1*c2*c3 ]
203     R[2,:] = [ c2 , s2*s3 , s2*c3 ]
204
205     xyz = np.zeros((79600,3))
206     for i in range(1,200) :
207         for j in range(1,401) :
208             k=(i-1)*400+j;
209             k=k-1
210             if k <0 : continue;
211             xyz[k,0]=a*np.sin(np.pi*i/200)*np.cos(np.pi*j/200);
212             xyz[k,1]=b*np.sin(np.pi*i/200)*np.sin(np.pi*j/200);
213             xyz[k,2]=c*np.cos(np.pi*i/200);
214     RXYZ = np.zeros((79600,3))
215     for k in range(0,79600) :
216         for n in range(0,3) :

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

217         RXYZ[k,n] = R[n,0]*xyz[k,0] + R[n,1]*xyz[k,1] + R[n,2]*xyz[k,2]
218
219     ellipsoide_generee_3D = np.zeros(shape)
220     for k in range(0,79600) :
221         if int(RXYZ[k,0]+Z0) < 0 : z = 0 ;
222         elif int(RXYZ[k,0]+Z0) >= shape[0] : z = shape[0]-1; #x = shape[1]
223         else : z = int(RXYZ[k,0]+Z0)
224
225         if int(RXYZ[k,1]+X0) < 0 : x = 0;
226         elif int(RXYZ[k,1]+X0) >= shape[1] : x = shape[1]-1# y = shape[2]
227         else : x = int(RXYZ[k,1]+X0)
228
229         if int(RXYZ[k,2]+Y0) < 0 : y = 0;
230         elif int(RXYZ[k,2]+Y0) >= shape[2] : y = shape[2]-1;#z = shape[0]
231         else : y = int(RXYZ[k,2]+Y0)
232         ellipsoide_generee_3D[z,x,y] = 1
233
234     return ellipsoide_generee_3D
235
236
237 def axes3d_plot(za, xa, ya, zb, xb, yb, zc, xc, yc, a, b, c) :
238     ap=plt.axes(projection= 3d )
239     ordre = sorted([a,b,c])
240     Z0=0
241     Y0=0
242     X0=0
243     # =====
244     # Nouveaux axes
245     # =====
246     z1=np.linspace(za,0,10)+Z0
247     x1=np.linspace(xa,0,10)+X0
248     y1= np.linspace(ya,0,10 )+Y0
249
250     z2=np.linspace(zb,0,10)+Z0
251     x2=np.linspace(xb,0,10)+X0
252     y2= np.linspace(yb,0,10)+Y0
253
254     z3=np.linspace(zc,0,10)+Z0
255     x3=np.linspace(xc,0,10)+X0
256     y3=np.linspace(yc,0,10)+Y0
257
258     if ordre.index(a) == 2 :
259         color_a = red
260     if ordre.index(a) == 1 :
261         color_a= green
262     if ordre.index(a) == 0:
263         color_a = yellow
264
265     if ordre.index(b) == 2 :

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

266     color_b = red
267     if ordre.index(b) == 1 :
268         color_b = green
269     if ordre.index(b) == 0:
270         color_b= yellow
271
272     if ordre.index(c)== 2 :
273         color_c = red
274     if ordre.index(c) == 1 :
275         color_c= green
276     if ordre.index(c) == 0:
277         color_c = yellow
278     # =====
279     # =====
280     ap.plot3D(x1,y1,z1,color_a)
281     ap.plot3D(x2,y2,z2,color_b)
282     ap.plot3D(x3,y3,z3,color_c)
283
284     ap.plot3D(X0+np.linspace(0,100,10),Y0+np.array((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)),Z0+np.array
285     ((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)), 1.0 )
286     ap.plot3D(X0+np.array((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)),Y0+np.linspace(0,100,10),Z0+np.array
287     ((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)), 0.5 )
288     ap.plot3D(X0+np.array((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)),Y0+np.array((0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)),Z0+np.
289     linspace(0,100,10), 0.0 )
290     print("rouge est le plus grand axe, vert pour le deuxieme, et jaune pour le plus petit"
291     )
292     print("noir = z, gris = x, blanc = y")
293
294     return
295
296 def angle(P):
297     # on choisi arbitrairement teta positif
298     teta = np.arccos(P[2][0])
299     if teta < 0 :
300         teta = -teta
301     # on a donc :
302     sin_psi = P[0,0]/np.sin(teta)
303     cos_psi = -P[1,0]/np.sin(teta)
304     psi = np.sign(sin_psi)*np.arccos(cos_psi)
305
306     sin_phi = P[2,1]/np.sin(teta)
307     cos_phi = P[2,2]/np.sin(teta)
308     phi = np.sign(sin_phi)*np.arccos(cos_phi)
309
310     a = np.cos(psi)*np.cos(phi)-np.sin(psi)*np.cos(teta)*np.sin(phi)
311     b = np.sin(psi)*np.cos(phi)+np.cos(psi)*np.cos(teta)*np.sin(phi)
312     c = np.sin(teta)*np.sin(phi)
313     if round(a,3) != round(P[0,1],3) and round(b,3) != round(P[1,1],3) and round(c,3) !=
314     round(P[2,1],3) :

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

310     print("Ne marche pas...")
311
312
313     teta = teta *180/np.pi
314     psi = psi *180/np.pi
315     phi = phi*180/np.pi
316     return(teta , psi ,phi ,P)
317
318 def matrice_passage (a_cont,b_cont,c_cont,P_cont):
319     P= np.zeros_like (P_cont)
320     a,b,c = 0,0,0
321     if max(list(abs(P_cont[0,:]))) == abs(P_cont[0,0]):
322         P[:,1] = P_cont[:,0]
323         b = a_cont
324     if max(list(abs(P_cont[0,:]))) == abs(P_cont[0,1]):
325         P[:,1] = P_cont[:,1]
326         b = b_cont
327     if max(list(abs(P_cont[0,:]))) == abs(P_cont[0,2]):
328         P[:,1] = P_cont[:,2]
329         b = c_cont
330
331     if max(list(abs(P_cont[1,:]))) == abs(P_cont[1,0]):
332         P[:,2] = P_cont[:,0]
333         c = a_cont
334     if max(list(abs(P_cont[1,:]))) == abs(P_cont[1,1]):
335         P[:,2] = P_cont[:,1]
336         c = b_cont
337     if max(list(abs(P_cont[1,:]))) == abs(P_cont[1,2]):
338         P[:,2] = P_cont[:,2]
339         c = c_cont
340
341     if max(list(abs(P_cont[2,:]))) == abs(P_cont[2,0]):
342         P[:,0] = P_cont[:,0]
343         a = a_cont
344     if max(list(abs(P_cont[2,:]))) == abs(P_cont[2,1]):
345         P[:,0] = P_cont[:,1]
346         a = b_cont
347     if max(list(abs(P_cont[2,:]))) == abs(P_cont[2,2]):
348         P[:,0] = P_cont[:,2]
349         a = c_cont
350
351     if P[0,0]== P[0,1] or P[0,0] == P[0,2] or P[0,1]==P[0,2]:
352         P = P_cont
353         a = a_cont ; b = b_cont ; c = c_cont
354         etat = "impossible a trier"
355     else : etat = "tout est ok"
356     # test sur le repere orthonorme
357
358     if round(P[1,1]*P[2,2]-P[1,2]*P[2,1],3) != round(P[0,0],3) :

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```
359     P[:,0] = -P[:,0]
360     if P[2,0] < 0 :
361         P[:,0] = -P[:,0]
362         P[:,1] = -P[:,1]
363     if round(P[1,1]*P[2,2]-P[1,2]*P[2,1],3) == round(P[0,0],3) :
364         print("Le repere est definitivement direct!")
365         etat = etat + " et le repere est direct!"
366     else : etat = etat + " et on a pas reussi a le mettre direct..."
367
368     return a,b,c,P,etat
```

17.2 Coeur du programme : détermination du contour

```
1 # =====
2 # Main : Coeur du programme :
3 # =====
4 for element in liste_element :
5     image = io.imread(element)
6     if len(image.shape)>3 :
7         try :
8             from skimage.color import rgb2gray
9             image = rgb2gray(image)
10        except ImportError:
11            raise ImportError("Image au mauvais format")
12    if len(image.shape)<3 :
13        raise ImportError("Image au mauvais format : manque de stack")
14
15 # =====
16 # constantes fixees
17 # =====
18 size_pix_x = 0.0812479
19 size_pix_y = 0.0812479
20 size_pix_z_ini = 1.5001310
21 radius_circle = 5
22 sigmas = (2,4,4)
23 median = (2,3,3)
24 # parametres de pretraitement
25 nbr_iteration = 200; tresh = auto ; smooth = 1; balloonn = 1; alphas = 150;
26 # pretraitement de l'image
27 if median is None :
28     image2 = skimage.exposure.rescale_intensity(image)
29     image2 = skimage.exposure.equalize_hist(image2)
30     io.imsave( image_histo_egalise.tif , np.array(image2).astype(np.float32))
31 else :
32     image2 = ndimage.filters.median_filter(image, size = None, footprint = np.ones(
33         median), mode = nearest )
34     image2 = skimage.exposure.rescale_intensity(image)
```



```

34     image2 = skimage.exposure.equalize_hist(image2)
35     io.imsave( image_histo_egalise_median.tif , np.array(image2).astype(np.float32))
36
37     # definition de l'energie de l'image
38     gimage = inverse_gaussian_gradient(image2, alpha = alphas, sigma = sigmas)
39     io.imsave( gimage.tif , np.array(gimage).astype(np.float32))
40     # definition du centre d etude
41     # On garde seulement les 2 des points les plus intenses pour obtenir un
42     # centre approximatif. On se contente de cette approximation pour le pretraitement
43     thresh = np.percentile(image2,98)
44     mask = (image2>thresh)*image2
45     zc,xc,yc = ndimage.measurements.center_of_mass(mask)
46     if np.isnan(zc):
47         zc= image2.shape[0]/2 ; xc= image2.shape[1]/2 ; yc= image2.shape[2]/2
48
49     # definition de la sphere initiale (surface initiale)
50     initi_ls = circle_level_set(image.shape, center=(zc,xc,yc), radius=radius_circle)
51     # programme pour trouver l ellipsoide
52     evolution = []
53     callback = store_evolution_in(evolution)
54     ls = morphological_geodesic_active_contour(gimage, nbr_iteration, initi_ls,
55                                               smoothing = smooth, balloon= balloonn,
56                                               threshold= tresh , iter_callback =
57     callback)#Balloon = gonfle si positif , degonfle si negatif
58
59     # =====
60     # # Enregistrement des donnees
61     # =====
62     io.imsave("volume_{name}_{median}_{sigmas}.tif".format(name,median,sigmas), np.array(evolution[
63     nbr_iteration]).astype(np.float32))
64     # determination exacte du contour et enregistrement du volume determine
65     contour = image_contour(evolution[nbr_iteration])
66     io.imsave("contour_{name}_{median}_{sigmas}.tif".format(name,median,sigmas), contour)
67     stack_volume = np.array(evolution[nbr_iteration]).astype(np.float32)

```

17.3 Coeur du programme : ajustement du contour à un ellipsoïde

```

1     size_pix = (size_pix_z, size_pix_x, size_pix_y)
2     # =====
3     # Mise en forme des donnees pour fit d un ellipsoide
4     # =====
5     Z,X,Y = np.where(contour>0)
6     I = np.array([contour[np.where(contour>0)]]).T
7     if np.NaN in I :
8         os.chdir(dossier_serie)
9         continue;
10    if np.inf in I :

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

11         os.chdir(dossier_serie)
12         continue;
13     if len(I) == 0 :
14         os.chdir(dossier_serie)
15         continue ;
16     arr = np.zeros((X.shape[0],3))
17     arr[:,0] = Z*size_pix_z
18     arr[:,1] = X*size_pix_x
19     arr[:,2] = Y*size_pix_y
20     if len(arr) == 0 :
21         os.chdir(dossier_serie)
22         continue;
23     # =====
24     # Fit d un ellipsoid par rapport au contour
25     # =====
26     (a_cont,b_cont,c_cont),P_cont, C_0 = fit_ellipsoide(arr,I)
27
28     # Definition du centre de masse et calcul de la matrice d inertie
29     centre_masse_z,centre_masse_x,centre_masse_y = ndimage.measurements.center_of_mass(
30     stack_volume)
31     D_vol,P_vol,masse_bille = matrix_inertia(stack_volume,centre_masse_z,centre_masse_x
32     ,centre_masse_y,(size_pix_x,size_pix_y,size_pix_z))
33
34     # =====
35     # Fitting d un ellipsoide avec volume
36     # =====
37
38     a_vol, b_vol, c_vol, volume_vol = ellipsoide_parametres(D_vol, masse_bille)
39
40     # =====
41     # calculs et generation de l ellipsoide fitte avec la methode en contour
42     # =====
43     ac, bc, cc, Pcont, etat_cont = matrice_passage(a_cont,b_cont,c_cont,P_cont)
44     tetac, psic, phic,Pcont = angle(Pcont)
45     centre = (centre_masse_x,centre_masse_y,centre_masse_z*size_pix_z/size_pix_x)
46     ellipsoide_generee_3D = generate_ellipsoide(ac/size_pix_x,bc/size_pix_x,cc/
47     size_pix_x,centre_masse_z*size_pix_z/size_pix_x,centre_masse_x,centre_masse_y,psic,
48     tetac,phic,(int(image.shape[0]*size_pix_z_ini/size_pix_y),image.shape[1],image.shape
49     [2]))
50     ellipsoide_genere_shape_image = np.zeros_like(image)
51     i=0
52     for k in range(0,ellipsoide_generee_3D.shape[0],ceil(size_pix_z_ini/size_pix_x)):
53         ellipsoide_genere_shape_image[i,:,:] = ellipsoide_generee_3D[k,:,:]
54         i=i+1
55     io.imsave("ellipsoide_contour_{}_{}_{}_{}.tif".format(name,median,sigmas,factor),
56     np.array(ellipsoide_genere_shape_image).astype(np.float32))
57
58     # =====
59     # calculs et generation de l ellipsoide fitte avec la methode en volume

```

```

54 # =====
55     av, bv, cv, Pvol, etat_vol = matrice_passage(a_vol, b_vol, c_vol, P_vol)
56     tetav, psiv, phiv, Pvol = angle(Pvol)
57     centre = (centre_masse_x, centre_masse_y, centre_masse_z*size_pix_z/size_pix_x)
58     ellipsoide_generee_3D = generate_ellipsoide(av/size_pix_x, bv/size_pix_x, cv/
size_pix_x, centre_masse_z*size_pix_z/size_pix_x, centre_masse_x, centre_masse_y, psiv,
tetav, phiv, (int(image.shape[0]*size_pix_z_ini/size_pix_y), image.shape[1], image.shape
[2]))
59     ellipsoide_genere_shape_image = np.zeros_like(image)
60     i=0
61     for k in range(0, ellipsoide_generee_3D.shape[0], ceil(size_pix_z_ini/size_pix_x)):
62         ellipsoide_genere_shape_image[i, :, :] = ellipsoide_generee_3D[k, :, :]
63         i=i+1
64     io.imsave("ellipsoide_volume_{ }_{ }_{ }_{ }.tif".format(name, median, sigmas, factor), np
.array(ellipsoide_genere_shape_image).astype(np.float32))

```

17.4 Représentation 3D des axes principaux

```

1 import plotly.graph_objs as go
2 import numpy as np
3 import xlrd
4
5 def get_frame_data(s, value):
6     q1, q2, q3 = value[s]
7     a = q1[0]
8     b = q2[0]
9     c = q3[0]
10
11     q1_vect = q1[1]
12     q2_vect = q2[1]
13     q3_vect = q3[1]
14 # =====
15 # Red = biggest = "rgb(0,0,255)"
16 # Yellow = middle one = "rgb(0,255,0)"
17 # Blue : small one = "rgb(255,0,0)"
18 # =====
19 if abs(a-c) < 0.5 : color_a = color_b = color_c = "rgb(0,0,255)"
20 elif abs(a-b) < 0.5 and abs(b-c) > 0.5 :
21     color_a = color_b = "rgb(0,0,255)"
22     color_c = "rgb(255,0,0)"
23 elif abs(b-c) < 0.5 and abs(a-b) > 0.5 :
24     color_b = color_c = "rgb(255,0,0)"
25     color_a = "rgb(0,0,255)"
26 else :
27     color_a = "rgb(0,0,255)"
28     color_b = "rgb(0,255,0)"
29     color_c = "rgb(255,0,0)"

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```

30
31     base_a = go.Scatter3d(
32         z = [-q1_vect[0][0], q1_vect[0][0]],
33         y = [-q1_vect[1][0], q1_vect[1][0]],
34         x = [-q1_vect[2][0], q1_vect[2][0]],
35         line = dict( color = color_a , width = 5),
36         name="a")
37     base_b = go.Scatter3d(
38         z = [-q2_vect[0][0], q2_vect[0][0]],
39         y = [-q2_vect[1][0], q2_vect[1][0]],
40         x = [-q2_vect[2][0], q2_vect[2][0]],
41         line = dict( color = color_b , width = 5),
42         name="b")
43     base_c = go.Scatter3d(
44         z = [-q3_vect[0][0], q3_vect[0][0]],
45         y = [-q3_vect[1][0], q3_vect[1][0]],
46         x = [-q3_vect[2][0], q3_vect[2][0]],
47         line = dict( color = color_c , width = 5),
48         name="c")
49
50     return [base_a,base_b,base_c]
51
52     # =====
53     # Main – extracting datas from
54     # =====
55     #Main – extracting datas from
56     workbook = xlrd.open_workbook( '2020_06_19_serie16_0.935.xlsx' )
57     SheetNameList = workbook.sheet_names()
58     worksheet = workbook.sheet_by_name(SheetNameList[0])
59     val1 = [];val2 = [];val3 = [];value= []
60     semi_axis = [];
61     for i in range(0,10):
62         a,b,c = worksheet.cell_value(2, 1+i*4) , worksheet.cell_value(2, 2+i*4) , worksheet.
63             cell_value(2, 3+i*4)
64         p1 = np.zeros((3,1))
65         p2 = np.zeros((3,1))
66         p3 = np.zeros((3,1))
67
68         p1[0,0] = worksheet.cell_value(6, 1+i*4)*100
69         p1[1,0] = worksheet.cell_value(7, 1+i*4)*100
70         p1[2,0] = worksheet.cell_value(8, 1+i*4)*100
71
72         p2[0] = worksheet.cell_value(6, 2+i*4)*100
73         p2[1] = worksheet.cell_value(7, 2+i*4)*100
74         p2[2] = worksheet.cell_value(8, 2+i*4)*100
75
76         p3[0] = worksheet.cell_value(6, 3+i*4)*100
77         p3[1] = worksheet.cell_value(7, 3+i*4)*100
78         p3[2] = worksheet.cell_value(8, 3+i*4)*100

```

```

78     val1= (a,p1);val2 = (b,p2);val3 = (c,p3);
79     val = val1 ,val2 ,val3
80
81     value.append(sorted(val,key = lambda tri: tri[0]))
82     # =====
83     time_frame = np.array(range(len(value)))
84     # =====
85     # AJOUT DE LA DIRECTION DE LA PPL (ou du tissu)
86     # =====
87     vector_cell = go.Scatter3d( x = [0,-93.969], y = [0,34.202], z = [0,0], marker = dict(
88         size = 5,color = "rgb(255,255,0)",name="Direction of cells",line = dict( color = "rgb
89         (255,255,0)", width = 5))
90
91     #layout = go.Layout(margin = dict( l = 0,
92     #
93     #             r = 0,
94     #             b = 0,
95     #             t = 0),
96     #
97     #             title=go.layout.Title(text="3d base")
98     #
99     )
100     fig = go.Figure(data = get_frame_data(0,value))#, layout = layout)
101
102     vector = go.Scatter3d( x = [100,0], y = [0,0], z = [0,0], marker = dict( size = 3,color =
103     "rgb(0,0,0)",name="x",line = dict( color = "rgb(0,0,0)", width = 2))
104     vector2 = go.Scatter3d( x = [0,0], y = [100,0], z = [0,0], marker = dict( size = 3,color =
105     "rgb(0,0,0)",name="y",line = dict( color = "rgb(0,0,0)", width = 2))
106     vector3 = go.Scatter3d( x = [0,0], y = [0,0], z = [100,0], marker = dict( size = 3,color =
107     "rgb(0,0,0)",name="z",line = dict( color = "rgb(0,0,0)", width = 2))
108
109     fig.add_traces(vector) #axes x
110     fig.add_traces(vector2) #axe y
111     fig.add_traces(vector3) #axe z
112     fig.add_traces(vector_cell)
113
114     fig.update_scenes(
115         xaxis_autorange=False ,yaxis_autorange=False ,zaxis_autorange=False ,
116         xaxis_range=[-100, 100],yaxis_range=[-100, 100],zaxis_range=[-100, 100],
117         camera_eye=dict(x=1.2, y=1.2, z=0.8),
118         # camera position # camera_projection_type= orthographic # thedefault
119         projection is perspective
120     )
121     fig.update_layout(width=800, height=800);
122     frames = []
123     for k, t in enumerate(time_frame):
124         frames.append(go.Frame(data = get_frame_data(t, value),
125             name = f time{k} ,
126             traces=[0,1,2]))
127     fig.update(frames=frames);
128     # =====
129     # Slider button
130     # =====
131     # Create and add slider

```

CHAPITRE 17. CODE UTILISÉ POUR LA DÉTECTION DE CONTOUR ACTIF

```
121 sliders = [dict(steps= [dict(method= animate ,
122                               args= [ [ f time{k} ] , #this steps refers to
    the frame of name f fr{k}
123                               dict(mode= immediate ,frame= dict( duration
    =100, redraw= True ) ,
124                               fromcurrent=True,transition=dict(
    duration= 0))],
125                               label=f"time {k}") for k, time_frame in
    enumerate(range(len(value)))] , #this is the step label on the slider
126                               minorticklen=0,x=0, len=1)]
127 fig.update_layout(sliders=sliders)
128 fig.write_html( 'nom.html' , auto_open=True)
```

= 2R

Sixième partie

Bibliographie

Bibliographie

- [1] W. His. *Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung*. F. C. W. Vogel, Leipzig, 1874. 5
- [2] J.C. Dupont. Wilhelm His and mechanistic approaches to development at the time of Entwicklungsmechanik. *Hist. Philos. Life Sci.*, 39 :21, 2017. 5
- [3] D.W. Thompson. *On Growth and Form*. Cambridge Univ. Press, 1917. 5
- [4] L. LeGoff, H. Rouault, and T. Lecuit. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing drosophila wing disc. *Development*, 140 :4051–4059, 2013. 5, 8
- [5] R.M. Herrera-Perez and K. Karen. Biophysical control of the cell rearrangements and cell shape changes that build epithelial tissues. *Current Opinion in Genetics and Development*, 51 :88–95, 2018. 5, 8
- [6] E. Donà, J.D. Barry, G. Valentin, C. Quirin, A. Khmelinskii, A. Kunze, and D. Gilmour. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature*, 503(7475) :285–289, 2013. 5
- [7] P.L. Bardet, B. Guirao, C. Paoletti, F. Serma, V. Léopol, F. Bosveld, and Y. Bellaïche. Pten controls junction lengthening and stability during cell rearrangement in epithelial tissue. *Developmental Cell*, 25(5) :534–546, 2013. 5
- [8] N. Desprat, W. Supatto, P.-A. Pouille, E. Beaurepaire, and E. Farge. Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in drosophila embryos. *Developmental Cell*, 15(3) :470–477, 2008. 5, 7
- [9] N. Resnick, T. Collins, W. Atkinson, D. T. Bonthron, C. F. Dewey, and M. A. Gimbrone. Platelet-derived growth factor b chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10) :4591–4595, 1993. 6
- [10] T. Lecuit and L. LeGoff. Orchestrating size and shape during morphogenesis. *Nature*, 450(7167) :189–192, 2007. 7
- [11] Y. Sawada, M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz. Force sensing by mechanical extension of the src family kinase substrate p130cas. *Cell*, 127(5) :1015–1026, 2006. 7

-
- [12] J. Whitehead, D. Vignjevic, E. Fütterer, C. and Beaurepaire, S. Robine, and E. Farge. Mechanical factors activate beta catenin-dependent oncogene expression in *apc1638n/+* mouse colon. *HFSP Journal*, 2(5) :286–294, 2008. 7
- [13] A.J. Engler, S. Sen, H. Lee Sweeney, and D.E Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126 :677–689, 2006. 7
- [14] D.E. Discher, P. Janmey, and Y.-L. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310 :1139–1143, 2005. 7
- [15] J.G. Dumortier, S. Martin, D. Meyer, F.M. Rosa, and N.B. David. Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42) :16945–16950, 2012. 7, 45
- [16] R.G. Wells. Tissue mechanics and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta : Molecular Basis of Disease*, 1832(7) :884–890, 2013. 8
- [17] E. T. Roussos, J. S. Condeelis, and A. Patsialou. Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8) :573–587, 2011. 8
- [18] S. Angeli and T. Stylianopoulos. Biphasic modeling of brain tumor biomechanics and response to radiation treatment. *Journal of Biomechanics*, 49(6) :1524–1531, 2016. 8
- [19] R. K. Jain, J. D. Martin, and T. Stylianopoulos. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16(1) :321–346, 2014. 8
- [20] K. Mori, F. Takeuchi, M. Ishikawa, H. Handa, M. Toyama, and T. Yamaki. Occlusive arteriopathy and brain tumor. *Journal of Neurosurgery*, 49(1) :22–35, 1978. 8
- [21] R.M. Sutherland. Cell and environment interactions in tumor microregions : the multicell spheroid model. *Science*, 240 :177–184, 1988. 8, 39, 101
- [22] 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 :1821–1828, 2014. 8, 39
- [23] C.P. Heisenberg and Y. Bellaïche. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell*, (153) :948–962, 2013. 8
- [24] M. Krieg, Y. Arboleda-Estudillo, P.-H. Puech, J. Käfer, F. Graner, D.J. Müller, and C.-P. Heisenberg. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nature Cell biology*, 10(4) :429–436, 2008. 8
- [25] H. Hamada. Role of physical forces in embryonic development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 47-48 :88–91, 2015. 8

BIBLIOGRAPHIE

- [26] R. Hiramatsu, T. Matsuoka, C. Kimura-Yoshida, S.-W. Han, K. Mochida, T. Adachi, and I. Matsuo. External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. *Developmental Cell*, 27(2) :131–144, 2013. 9
- [27] K. Hayashi. Tensile properties and local stiffness of cells. *Mechanics of Biological Tissue Basis of Disease*, page 137–152, 2006. 9
- [28] B. Martinac. Mechanosensitive ion channels : molecules of mechanotransduction. *Journal of Cell Science*, 117 :2449–2460, 2004. 9
- [29] P.L. Townes and J. Holtfreter. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *Journal of Experimental Zoology*, 128(1) :53–120, 1955. 12
- [30] K. Sugimura, P.-F. Lenne, and F. Graner. Measuring forces and stresses in living tissues. *Development*, 143(2) :186–196, 2016. 16, 23, 24
- [31] P. Roca-Cusachs, V. Conte, and X. Trepat. Quantifying forces in cell biology. *Nature Cell Biology*, 19(7) :742–751, 2017. 16
- [32] O. Campàs. A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 55 :119–130, 2016. 16
- [33] L.V. Beloussov, J.G. Dorfman, and V.G. Cherdantzev. Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34 :559–574, 1975. 17
- [34] X. Ma, H.E. Lynch, P.C. Scully, and M.S. Hutson. Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling. *Physical Biology*, 6(3), 2009. 17
- [35] M. Rauzi, P. Verant, T. Lecuit, and P.-F. Lenne. Nature and anisotropy of cortical forces orienting drosophila tissue morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 10(12) :1401–1410, 2008. 17
- [36] S. Porazinski, H. Wang, Y. Asaoka, M. Behrndt, T. Miyamoto, H. Morita, and M. Furutani-Seiki. Yap is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3d body shape. *Nature*, 521(7551) :217–221, 2015. 17
- [37] I. Bonnet, P. Marcq, F. Bosveld, L. Fetler, Y. Bellaiche, and F. Graner. Mechanical state, material properties and continuous description of an epithelial tissue. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(75) :2614–2623, 2012. 17
- [38] A. Saha, Nishikawa, M. M., Behrndt, C.-P. Heisenberg, F. Jülicher, and S. W. Grill. Determining physical properties of the cell cortex. *Biophysical Journal*, 110(6) :1421–1429, 2016. 17, 18
- [39] M. Behrndt, G. Salbreux, P. Campinho, R. Hauschild, F. Oswald, J. Roensch, and C.-P. Heisenberg. Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation. *Science*, 338(6104) :257–260, 2012. 18
- [40] R.M. Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 44(1) :15–22, 2000. 18, 19

-
- [41] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, and E. Paluch. Role of cortical tension in bleb growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44) :18581–18586, 2009. 18, 19
- [42] J.M. Mitchison and M.M. Swann. The mechanical properties of the cell surface i.the cell elastimeter. *J. Exp. Biol.*, 1954. 18
- [43] A. Chaigne, C. Campillo, N.S. Gov, R. Voituriez, J. Azoury, C. Umana-Diaz, and M.-E. Terret. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nature Cell Biology*, 15(8) :958–966, 2013. 19
- [44] K. Guevorkian, M.-J. Colbert, M. Durth, S. Dufour, and F. Brochard-Wyart. Aspiration of biological viscoelastic drops. *Physical Review Letters*, 104(21), 2010. 18, 19
- [45] M. Von Dassow, J. A. Strother, and L. A. Davidson. Surprisingly simple mechanical behavior of a complex embryonic tissue. *PLoS ONE*, 5(12) :958–966, 2010. 19
- [46] A. Marmottant, P.and Mgharbel, J. Kafer, B. Audren, J.-P. Rieu, J.-C. Vial, 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. 19, 20
- [47] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios. Creep function of a single living cell. *Biophysical Journal*, 88(3) :2224–2233, 2005. 19
- [48] D. Mitrossilis, J. Fouchard, A. Guirouy, N. Desprat, N. Rodriguez, B. Fabry, and A. Asnacios. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43) :18243–18248, 2009. 19
- [49] R.A. Foty, G. Forgacs, C.M. Pflieger, and M.S. Steinberg. Liquid properties of embryonic tissues : Measurement of interfacial tensions. *Physical Review Letters*, 72(14) :2298–2301, 1994. 19
- [50] A. Mgharbel, H. Delanoë-Ayari, and J. Rieu. Measuring accurately liquid and tissue surface tension with a compression plate tensiometer. *HFSP Journal*, 3(3) :213–221, 2009. 19
- [51] E. Schötz, R.D. Burdine, F. Jülicher, M.S. Steinberg, C. Heisenberg, and R.A. Foty. Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP Journal*, 2(1) :42–56, 2008. 19
- [52] H. Colin-York, C. Eggeling, and M. Fritzsche. Dissection of mechanical force in living cells by super-resolved traction force microscopy. *Nature Protocols*, 12(4) :783–796, 2017. 20
- [53] B. Sabass, C. M. Gardel, M. L.and Waterman, and U. S. Schwarz. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophysical Journal*, 94(1) :207–220, 2008. 20
- [54] M. Dembo and Y.-L. Wang. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical Journal*, 76(4) :2307–2316, 1999. 20

BIBLIOGRAPHIE

- [55] J.A. Schaefer and R.T. Tranquillo. Tissue contraction force microscopy for optimization of engineered cardiac tissue. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 22(1) :46–83, 2016. 20
- [56] H. Colin-York and M. Fritzsche. The future of traction force microscopy. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 5 :1–5, 2018. 21
- [57] O. Du Roure, A. Saez, A. Buguin, R.H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7) :2390–2395, 2005. 21
- [58] J.H. Wen, L.G. Vincent, A. Fuhrmann, Y.S. Choi, K.C. Hribar, H. Taylor-Weiner, and A. J. Engler. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nature Materials*, 13(10) :979–987, 2014. 20
- [59] J. Zhou, S. Pal, S. Maiti, and L.A. Davidson. Force production and mechanical accommodation during convergent extension. *Development*, 142(4) :692–701, 2015. 20
- [60] V. Nier, S. Jain, C.-T. Lim, S. Ishihara, B. Ladoux, and P. Marcq. Inference of internal stress in a cell monolayer. *Biophysical Journal*, 110(7) :1625–1635, 2069. 20
- [61] Y. Huang, C. Schell, T.B. Huber, A.N. Şimşek, N. Hersch, R. Merkel, and B. Sabass. Traction force microscopy with optimized regularization and automated bayesian parameter selection for comparing cells. *Scientific Reports*, 9(1), 2019. 20
- [62] M. Gupta, L. Kocgozlu, B.R. Sarangi, F. Margadant, M. Ashraf, and B. Ladoux. Micropillar substrates : A tool for studying cell mechanobiology. *Biophysical Methods in Cell Biology*, 107(7) :289–308, 2015. 21
- [63] S.M. Trier and L.A. Davidson. Quantitative microscopy and imaging tools for the mechanical analysis of morphogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(5) :664–670, 2011. 22
- [64] M. Krieg, Y. Arboleda-Estudillo, P.-H. Puech, J. Käfer, F. Graner, D. J. Müller, and C.-P. Heisenberg. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nature Cell Biology*, 10(4) :429–436, 2008. 22
- [65] H.-J. Butt, B. Cappella, and M. Kappl. Force measurements with the atomic force microscope : Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, 59(1-6) :1–152, 2005. 22
- [66] Y. Xiong, A.C. Lee, D.M. Suter, and G.U Lee. Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 96(12) :5060–5072, 2009. 22
- [67] A.F. Christ, K. Franze, H. Gautier, P. Moshayedi, J. Fawcett, R.J.M. Franklin, and J. Guck. Mechanical difference between white and gray matter in the rat cerebellum measured by scanning force microscopy. *Journal of Biomechanics*, 43(15) :2986–2992, 2010. 22

-
- [68] K. Franze. Atomic force microscopy and its contribution to understanding the development of the nervous system. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(5) :530–537, 2011. 22
- [69] V. Lulevich, C.C. Zimmer, H.-s. Hong, L.-w. Jin, and G.-y. Liu. Single-cell mechanics provides a sensitive and quantitative means for probing amyloid-peptide and neuronal cell interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31) :13872–13877, 2010. 22
- [70] B.S. Elkin, E.U. Azeloglu, K.D. Costa, and B. Morrison III. Mechanical heterogeneity of the rat hippocampus measured by atomic force microscope indentation. *Journal of Neurotrauma*, 24(5) :812–822, 2007. 22
- [71] K. Lau, H. Tao, H. Liu, J. Wen, K. Sturgeon, N. Sorfazlian, and S. Hopyan. Anisotropic stress orients remodelling of mammalian limb bud ectoderm. *Nature Cell Biology*, 17(5) :569–579, 2015. 22
- [72] A. Miyawaki. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1) :357–373, 2011. 22
- [73] F. Meng, T.M. Suchyna, and F. Sachs. A fluorescence energy transfer-based mechanical stress sensor for specific proteins in situ. *FEBS Journal*, 275(12) :3072–3087, 2008. 22
- [74] Y.-C. Poh, S.P. Shevtsov, F. Chowdhury, D.C. Wu, S. Na, M. Dundr, and N. Wang. Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nature Communications*, 3(1), 2012. 22
- [75] D. Cai, S.-C. Chen, M. Prasad, L. He, X. Wang, V. Choesmel-Cadamuro, and D.J. Montell. Mechanical feedback through e-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157(5) :1146–1159, 2014. 23
- [76] N. Borghi, M. Sorokina, O.G. Shcherbakova, W.I. Weis, B.L. Pruitt, W.J. Nelson, and A.R. Dunn. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31) :12568–12573, 2012. 23
- [77] C. Grashoff, B.D. Hoffman, M.D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M.T. Yang, and M.A. Schwartz. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303) :263–266, 2010. 23
- [78] C. Grashoff, B.D. Hoffman, M.D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M.T. Yang, and M.A. Schwartz. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303) :263–266, 2010. 23
- [79] K.K. Chiou, L. Hufnagel, and B.I. Shraiman. Mechanical stress inference for two dimensional cell arrays. *PLoS Computational Biology*, 8(5), 2012. 24
- [80] G.W. Brodland, J.H. Veldhuis, S. Kim, M. Perrone, D. Mashburn, and M. S. Hutson. Cellfit : A cellular force-inference toolkit using curvilinear cell boundaries. *PLoS ONE*, 9(6), 2014. 24

BIBLIOGRAPHIE

- [81] C. Roffay, C.-J. Chan, B. Guirao, T. Hiragi, and F. Graner. Inferring cell junction tension and pressure from cell geometry. *Development*, 9(6), 2020. 24, 25
- [82] M. B. Stein and R. Gordon. Epithelia as bubble rafts : A new method for analysis of cell shape and intercellular adhesion in embryonic and other epithelia. *Journal of Theoretical Biology*, 94(4) :625–639, 1982. 24
- [83] S. Ishihara, K. Sugimura, S.J. Cox, I. Bonnet, Y. Bellaïche, and F. Graner. Comparative study of non-invasive force and stress inference methods in tissue. *The European Physical Journal E*, 36(4), 2013. 24, 25
- [84] S. Ishihara and K. Sugimura. Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 313 :201–211, 2012. 24
- [85] C. Bielmeier, S. Alt, V. Weichselberger, M. La Fortezza, H. Harz, F. Jülicher, and A.-K. Classen. Interface contractility between differently fated cells drives cell elimination and cyst formation. *Current Biology*, 26(5) :563–574, 2016. 25
- [86] N. Harmand. *Pertinence et limites des tensions de surface et de ligne pour rendre compte des formes des cellules épithéliales*. PhD thesis, Université de Paris, 2019. 25
- [87] K. Svoboda and S.M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 23 :247–285, 1994. 25
- [88] K. C. Neuman and A. Nagy. Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*, 5(6) :491–505, 2008. 25, 26
- [89] K. Bambardekar, R. Clément, O. Blanc, C. Chardès, and P.-F. Lenne. Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5) :1416–1421, 2015. 25, 26
- [90] M. Tanase, N. Biais, and M. Sheetz. Magnetic tweezers in cell biology. *Cell Mechanics*, 22(1) :473–493, 2007. 26
- [91] G.F. Weber, M. A. Bjerke, and D.W. DeSimone. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Developmental Cell*, 22(1) :104–115, 2012. 26
- [92] B. G. Hosu, K. Jakab, P. Bánki, F. I. Tóth, and G. Forgacs. Magnetic tweezers for intracellular applications. *Review of Scientific Instruments*, 74(9) :4158–4163, 2003. 26
- [93] F. Mazuel, M. Reffay, V. Du, J.-C. Bacri, J.-P. Rieu, and C. Wilhelm. Magnetic flattening of stem-cell spheroids indicates a size-dependent elastocapillary transition. *Physical Review Letters*, 114(9) :1416–1421, 2015. 26
- [94] M. E. Fernández-Sánchez, S. Barbier, J. Whitehead, G. Béalle, A. Michel, H. Latorre-Ossa, and E. Farge. Mechanical induction of the tumorigenic beta-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature*, 523(7558) :92–95, 2015. 26

- [95] O. Campàs, T. Mammoto, S. Hasso, R.A. Sperling, D. O'Connell, A.G. Bischof, and D.E. Ingber. Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nature Methods*, 11(2) :183–189, 2013. 28, 29
- [96] A. Mongera, P. Rowghanian, H.J. Gustafson, E. Shelton, D.A. Kealhofer, E. K. Carn, and O. Campàs. A fluid-to-solid jamming transition underlies vertebrate body axis elongation. *Nature*, 2018. 28, 29
- [97] F. Serwane, A. Mongera, P. Rowghanian, D.A. Kealhofer, A.A. Lucio, Z.M. Hockenbery, and O. Campàs. In vivo quantification of spatially varying mechanical properties in developing tissues. *Nature Methods*, 14(2) :181–186, 2016. 29
- [98] M.E. 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(4), 2017. 29, 30, 31
- [99] W. Lee, N. Kalashnikov, S. Mok, R. Halaoui, E. Kuzmin, A.J. Putnam, and C. Moraes. Dispersible hydrogel force sensors reveal patterns of solid mechanical stress in multicellular spheroid cultures. *Soft Matter*, 13(23) :4210–4213, 2017. 29, 30, 31, 106, 107
- [100] D. Buenger, F. Topuz, and J. Groll. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 37(12) :1678–1719, 2012. 29
- [101] G.C. Le Goff, R.L. Srinivas, W.A. Hill, and P.S. Doyle. Hydrogel microparticles for biosensing. *European Polymer Journal*, 72 :386–412, 2015. 29
- [102] M. Akhmanova, E. Osidak, S. Domogatsky, S. Rodin, and A. Domogatskaya. Physical, spatial, and molecular aspect of extracellular matrix of in vivo niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research. *Stem Cells International*, 2015. 29
- [103] S. Monnier, M. Delarue, B. Brunel, M.E. Dolega, A. Delon, and G. Cappello. Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates. *Methods*, 94 :114–119, 2016. 29, 30
- [104] E. Mohagheghian, J. Luo, J. Chen, G. Chaudhary, J. Chen, J. Sun, and N. Wang. Quantifying compressive forces between living cell layers and within tissues using elastic round microgels. *Nature Communications*, 9(1), 2018. 29, 30
- [105] T. Boudoua, J. Ohayona, C. Picart, R.I. Pettigrew, and P. Tracqui. Nonlinear elastic properties of polyacrylamide gels : Implications for quantification of cellular forces. *Biorheology*, 46 :191–205, 2009. 30, 31
- [106] N. Träber, K. Uhlmann, S. Girardo, G. Kesavan, K. Wagner, and J. Friedrichs, J. and Guck. Polyacrylamide bead sensors for in vivo quantification of cell-scale stress in zebrafish development. *Scientific Reports*, 9(1), 2019. 31
- [107] R.J. Phillips. A hydrodynamic model for hindered diffusion of proteins and micelles in hydrogels. *Biophysical Journal*, 79(6) :3350–3353, 2000. 31

BIBLIOGRAPHIE

- [108] M. Behrndt, G. Salbreux, P. Campinho, R. Hauschild, and F. Oswald. Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation. *Science*, 338 :257–260, 2012. 34
- [109] J.H. Hoh and C.A. Schoenenberger. Surface morphology and mechanical properties of mdck monolayers by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science*, 107(5) :1105–1114, 1994. 38
- [110] J.D. Dukes, P. Whitley, and A.D. Chalmers. The mdck variety pack : choosing the right strain. *BMC Cell Biology*, 12(43) :181–186, 2011. 38
- [111] J.W. Haycock. 3d cell culture : A review of current approaches and techniques. *3D Cell Culture*, pages 1–15, 2010. 39
- [112] R.-Z. Lin and H.-Y. Chang. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10) :1172–1184, 2008. 39
- [113] J. Sprague. The zebrafish information network : the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research*, 34(1), 2006. 41, 42
- [114] K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, and L. Matthews. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446) :498–503, 2013. 41
- [115] J.F. Amatruada, J.L. Shepard, H.M. Stern, and L.I. Zon. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 1(3) :229–231, 2002. 41
- [116] R. White, K. Rose, and L. Zon. Zebrafish cancer : the state of the art and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 13(39) :624–636, 2013. 41
- [117] G. Kawahara, J.A. Karpf, J.A. Myers, M.S. Alexander, J. R. Guyon, and L.M. Kunkel. Drug screening in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10(13) :5331–5336, 2011. 41
- [118] P. Haffter, M. Granato, M. Brand, M.C. Mullins, M. Hammerschmidt, D.A. Kane, J. Odenthal, F.J. van Eeden, Y.J. Jiang, C.P. Heisenberg, R.N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian, and C. Nusslein-Volhard. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, danio rerio. *Development*, 123(1) :1–36, 1996. 42
- [119] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, and T.F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3) :253–310, 1995. 42
- [120] J.-A. Montero, L. Carvalho, M. Wilsch-Bräuninger, B. Kilian, C. Mustafa, and C.-P. Heisenberg. Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. *Development*, 132(6) :1187–1198, 2005. 43
- [121] M. Smutny, Z. Ákos, S. Grigolon, S. Shamipour, V. Ruprecht, D. Čapek, and C.-P. Heisenberg. Friction forces position the neural anlage. *Nature Cell Biology*, 19(4) :306–317, 2017. 44, 45

- [122] G.F. Weber, M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Developmental Cell*, 22(1) :104–115, 2012. 45
- [123] Y. Nakajima and S. Shimada. Hydrosilylation reaction of olefins : recent advances and perspectives. *RSC Adv*, 5 :20603–20616, 2015. 49, 50
- [124] L-N. Lewis, J. Stein, Y. Gao, R-E. Colborn, and G. Hutchins. Platinum catalysts used in the silicones industry. *Platinum Metals Rev*, P41(2) :66–75, 1997. 50
- [125] J. Stein, L.N. Lewis, Y Gao, and R-A. Scott. In situ determination of the active catalyst in hydrosilylation reactions using highly reactive pt(0) catalyst precursors. *Platinum Metals Rev*, 121(15) :3693–3703, 1999. 50
- [126] Shriver and Atkins. Inorganic chemistry. *Oxford University Press*, 2010. 50
- [127] K. Haejune. Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow-focusing microfluidic device. *Appl. Phys. Lett.*, 91(13) :211–218, 2007. 52
- [128] G.G Chen, J. H Wu, and G.S Luo. Shear force induced monodisperse droplet formation in a microfluidic device by controlling wetting properties. *Lab Chip*, 6 :131–136, 2006. 52
- [129] O. Amyot and F. Plouraboué. Capillary pinching in a pinched microchannel. *Physics of Fluids*, 19(3) :033101, 2007. 52
- [130] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, and H.A. Stone. Microfluidic flow focusing : Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, 26(19) :211–218, 2005. 53
- [131] X-Z. Zhao, L. Peng, S-S Guo, and W. Liu. The effect of interfacial tension on droplet formation in flow-focusing microfluidic device. *Lab Chip*, 13 :559–564, 2011. 53
- [132] <https://www.formx.fr/additifs/additifs-pu/cryptolyte-additif-uv-luminescent/index.php>. 54, 55
- [133] J. Jasieniak, L. Smith, J. Van-Embden, P. Mulvaney, and M. Califano. Reexamination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J. Phys. Chem. C*, 113(45) :19468–19474, 2009. 57
- [134] I. MallekZouari. Propriétés quantiques de la fluorescence de nanocristaux CdSeCdS déposés sur des nanostructures métalliques. 2011. 57
- [135] R. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A-L. Rogach, S. Keller, J. Radler, G. Natile, and W. Parak. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell : A general route to water soluble nanocrystals. *ACS Nano Publications*, 4(4) :703–707, 2004. 57

BIBLIOGRAPHIE

- [136] A. Rhoulane, S. Makki, J. Millet, and Ph. Humbert. La microscopie confocale : intérêt pour l'analyse du relief cutané. un outil d'évaluation dermo cosmétique. *J. Phys. Chem. C*, 24(6) :349–356, 2002. 60, 62
- [137] R. Graf, J. Rietdorf, and T. Zimmermann. Live cell spinning disk microscopy. *Microscopy Techniques. Advances in Biochemical Engineering*, 95 :57–75, 2005. 60, 62
- [138] C. Demeautis. Développement de nouvelles méthodes pour dépasser les limitations rencontrées dans le suivi de biosenseur FRET par microscopie de fluorescence quantitative. *Thèse*, 2018. 61, 62
- [139] E. Ruoslahti. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.*, 57 :375–413, 1988. 63
- [140] A.J. Zollinger and M.L. Smith. Fibronectin : the extracellular glue. *Matrix Biology Review*, 60-61 :27–37, 2017. 63
- [141] S. HowMingWong, C. MunFang, L.H Chuah, C.O. Leong, and S.C. Ngai. E-cadherin : Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Criti Rev Oncol Hematol*, 121 :11–22, 2018. 64
- [142] A. VaePriest, O. Shafraz, and S. Sivasankar. Biophysical basis of cadherin mediated cell-cell adhesion. *Experimental Cell Research*, 358(1) :10–13, 2017. 64
- [143] M.H. Schneider, Y. Tran, and P. Tabeling. Benzophenone absorption and diffusion in poly(dimethylsiloxane) and its role in graft photo-polymerization for surface modification. *Langmuir*, 27(3) :1232–1240, 2011. 64
- [144] M. Schneider. *Comportement physico-chimique des ions uranyle, vanadyle et pervanadyle en présence de ligands aminocarboxyliques*. PhD thesis, Strasbourg 1, 1996. 64
- [145] K. Kubo and T. Tatsuma. Photocatalytic remote oxidation with various photocatalysts and enhancement of its activity. *J. Mater. Chem*, 15(3) :3104–3108, 2005. 64
- [146] L.D. Landau, E.M. Lifshitz, A.M. Kosevich, and L.P. Pitaevskii. *Theory of Elasticity : course of theoretical physic*, volume 7. 1986. 68, 69
- [147] N. El-Kissi, S. Nigen, and F. Pignon. Glissement et rhéométrie. *Rhéologie*, 10 :13–39, 2006. 71
- [148] N. Belmiloud. Microrhéomètre sur silicium pour chimie haut débit. 2008. 72
- [149] N. Desprat, A. Guiroy, and A. Asnacios. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Reviex of scientifc intruments*, 77(055111) :1–8, 2006. 74, 94
- [150] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos. Snakes : Active contour models. *International : journal of computer vision*, pages 321–331, 1987. 75
- [151] D.J. Burr. Elastic matching of line drawing. *Developmental Dynamics*, PAMI-3(6) :708–713, 1981. 75

- [152] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L Alvarez. A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 36(1) :2–17, 2014. 75
- [153] V. Caselles, F. Catte, B. Coll, and F. Dibos. A geometric model for edge detection. *Num. Mathematik*, 66(1) :1–31, 1993. 75, 78
- [154] A. Monda and K. Ghosh. State-of-the-art fuzzy active contour models for image segmentation. *Soft Comput*, 24(2) :14411–14427, 2020. 75
- [155] M. Bendaoud. *Développement de méthodes d'extraction de contours sur des images à niveaux de gris*. PhD thesis, 2017. 75
- [156] J.J. Rousselle. *Les contours actifs, une méthode de segmentation*. PhD thesis, 2003. 75
- [157] S. Kichenassamy, A. Kumar, P. Olver, A. Tannenbaum, and A. Yezzi. Gradient flows and geometric active contour models. *Proceed. IEEE Int. Conf. Comput. Vis.*, (1) :810–815, 1995. 76
- [158] V. Caselles, R. Kimmel, and G. Sapiro. Geodesic active contours. *Int. Jo. Comput. Vis.*, 66(1) :61–79, 1997. 77, 78
- [159] L.D. Cohen. On active contour models and balloons. *CVGIP : Image Understanding*, 53(2) :211–218, 1991. 77
- [160] P.J. Flory. *Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers*, volume 63. I. Gelation, 1941. 86, 138
- [161] R. Rubinstein, M. Colby. *Polymer Physics*. Oxford University Press, 2003. 86
- [162] *Chemical ook DaillylMaleate Properties*. 2002. 92
- [163] G. Beaune, T. Stirbat, N. Khalifat, O. Cochet-Escartin, S. Garcia, V.-V. Gurchenkov, M.P. Murrell, S. Dufour, D. Cuvelier, and F. Brochard-Wyart. Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates. *PNAS*, 108(18) :7315–7320, 2011. 101
- [164] S. Douezan, K. Guevorkian, R. Naouar, S. Dufour, D. Cuvelier, and F. Brochard-Wyart. How cells flow in the spreading of cellular aggregates. *PNAS*, 111(22) :8055–8060, 2014. 101
- [165] M. Doitsidoua, M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Köprunner, J. Dorries, D. Meyer, C.V. Esguerra, T. Leung, and E. Raz. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine sdf-1. *Cell*, 11(5) :647–659, 2002. 111