



**HAL**  
open science

# Étude de la rhéologie de tissus biologiques 3D et développement d'une technologie microfluidique

Sylvain Landiech

► **To cite this version:**

Sylvain Landiech. Étude de la rhéologie de tissus biologiques 3D et développement d'une technologie microfluidique. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. UPS Toulouse, 2024. Français. NNT : . tel-04890473

**HAL Id: tel-04890473**

**<https://laas.hal.science/tel-04890473v1>**

Submitted on 16 Jan 2025

**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.

# Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

---

Étude de la rhéologie de tissus biologiques 3D et  
développement d'une technologie microfluidique

---

Thèse présentée et soutenue, le 16 décembre 2024 par  
**Sylvain LANDIECH**

## École doctorale

GEETS - Génie Electrique Electronique, Télécommunications et Santé : du système au nanosystème

## Spécialité

Ingénierie pour la santé et pour le vivant

## Unité de recherche

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

## Thèse dirigée par

Pierre JOSEPH

## Composition du jury

M. David GONZALEZ-RODRIGUEZ, Rapporteur, Université de Lorraine

Mme Karine GUEVORKIAN, Rapporteuse, Institut Curie

M. Aurélien ROUX, Examineur, Université de Genève

Mme Sham TLILI, Examinatrice, Turing Centre for Living Systems (CENTURI)

M. Nicolas DESTAINVILLE, Examineur, Université Paul Sabatier

M. Pierre JOSEPH, Directeur de thèse, CNRS

## Membres invités

M. Jean Cacheux, LAAS-CNRS

M. Clément ROUX, Université Paul Sabatier



# Remerciements

Ce travail est le fruit de plusieurs années de recherche, d'échanges et de collaborations. Il n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien et l'accompagnement de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier chaleureusement.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Pierre Joseph et Clément Roux, pour avoir rendu ce travail possible. Pierre, je te remercie pour ton accompagnement et ton aide précieuse chaque fois que j'en ai eu besoin. Ta confiance et la liberté que tu m'as accordées tout au long de ce parcours ont été des moteurs essentiels pour moi. Clément, un immense merci pour m'avoir laissé explorer des questions très éloignées du projet initial et de tes thématiques de recherche. Tu m'as permis de travailler sur des sujets qui me passionnent, alors qu'il aurait été tout à fait légitime d'exiger que je me concentre sur d'autres aspects. Tu t'es également intéressé à ces nouvelles thématiques et tu as apporté un regard extérieur toujours constructif et enrichissant. Un immense merci à vous deux pour votre bienveillance et votre soutien tout au long de ces années.

Je souhaite également remercier Aurélien Bancaud, sans qui ce travail n'aurait jamais atteint cette ampleur. Aurélien, tu t'es passionné pour mon sujet et tu y as énormément contribué scientifiquement. Nos discussions ont été une source immense de motivation pour moi. Tu es un scientifique inspirant et passionné, qui continue à faire des manips et qui consacre énormément de temps à ses étudiants et aux membres de l'équipe. Au-delà de la science, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, j'ai adoré échanger et débattre sur une multitude de sujets. J'espère sincèrement avoir l'occasion de retravailler avec toi à l'avenir.

Ensuite, Morgan Delarue, tu as joué un rôle essentiel dans ce travail. Tu as suivi toute ma thèse, et à chacune de nos interactions, tu as toujours su poser les bonnes questions et soulever des points essentiels. J'ai toujours été impressionné par l'étendue de tes connaissances et de ta compréhension sur des sujets très variés. En plus d'être un scientifique brillant, tu es une personne avec de bonnes valeurs, et je suis heureux d'avoir noué une amitié avec toi au-delà du cadre professionnel. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de nous revoir pour collaborer ou simplement boire des coups.

---

Un grand merci à Jean Cacheux, dont la contribution à ce travail a été décisive. Jean, c'est toi qui as en grande partie introduit la poroélasticité dans ma thèse et permis de développer cet aspect fondamental. Tu as passé des dizaines d'heures à réaliser des simulations sur COMSOL et à m'expliquer son fonctionnement, ce qui a considérablement enrichi mes recherches. Ton investissement a fait une énorme différence, et je te suis profondément reconnaissant.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes formidables du LAAS qui assurent la gestion des plateformes du laboratoire. Un immense merci à Charline Blatche pour ses formations en biologie et son incroyable investissement dans la plateforme, et désolé de t'avoir dérangée le week-end ! Merci également à Sandrine Assie-Souleille ainsi que Julien Roux pour leur formation et leur aide. Enfin, un grand merci à l'équipe TEAM et tout particulièrement Fabien Mesnilgrente et David Bourrier pour leur aide précieuse en salle blanche.

Un immense merci également à tous mes collègues et amis du labo, qui ont rendu ces années encore plus belles. Tout d'abord, Ianis et Ophélie, mes compagnons les plus proches dans cette aventure, avec qui j'ai partagé de nombreux moments mémorables au labo et en soirée. Je tiens également à remercier Zack, Paul, Tiphaine, Lucas, Michael, Inga, Lucie, Céline, Julien, et toutes les personnes de l'équipe MILE, pour leur aide précieuse et tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Enfin, je veux remercier ma famille et mes amis pour leur soutien constant tout au long de cette aventure. Une mention toute particulière pour Lila, ma compagne : merci de m'avoir soutenu, épaulé, et déchargé de tant de poids pendant les périodes intenses de rédaction et de préparation de la soutenance. Merci infiniment à toi.

# Table des matières

<b>Introduction Générale</b>	<b>8</b>
<b>1 Contexte : Les propriétés mécaniques des tissus et leurs caractérisations</b>	<b>11</b>
1.1 Introduction aux propriétés mécaniques des tissus et à leur rôle dans le vivant	12
1.1.1 Le comportement mécanique des tissus biologiques . . . . .	12
1.1.2 Propriétés élastiques des tissus et mécanotransduction . . . . .	15
1.1.3 La fluidité des tissus et son rôle dans certains processus biologiques .	18
1.2 Modélisation phénoménologique du comportement viscoélastique des tissus .	24
1.2.1 Introduction à la rhéologie . . . . .	24
1.2.2 Les diagrammes rhéologiques . . . . .	26
1.2.3 Application aux tissus biologiques . . . . .	30
1.3 Les différents constituants et leurs rôles dans la mécanique des tissus . . . .	32
1.3.1 Élasticité et viscoélasticité, son origine à l'échelle moléculaire . . . . .	32
1.3.2 Émergence d'un comportement fluide à l'échelle du tissu . . . . .	39
1.3.3 Rôle de l'eau : Porosité, Poroélasticité et Compressibilité des Tissus .	44
1.4 Techniques expérimentales de mesure des propriétés mécaniques des tissus et de leurs composants . . . . .	46
1.4.1 Méthodes expérimentales de caractérisation mécanique à l'échelle sub- cellulaire et cellulaire . . . . .	46
1.4.2 Modèles in vitro de tissus 3D . . . . .	53
1.4.3 Techniques pour caractériser les tissus 3D . . . . .	56
1.5 Positionnement de l'étude et objectifs . . . . .	63
<b>2 Viscoélasticité des tissus : dispositif expérimental et réponse à un échelon de pression</b>	<b>77</b>
2.1 Développement et utilisation d'une micropipette sur puce . . . . .	78
2.1.1 Une puce composée de deux éléments . . . . .	78
2.1.2 Assemblage et fonctionnement de la puce microfluidique . . . . .	87
2.1.3 Mesure et automatisation . . . . .	90
2.2 Fabrication des sphéroïdes . . . . .	94

2.3	Mesure des propriétés mécaniques de sphéroïdes par application d'échelon de pression . . . . .	96
2.3.1	Réponse à un échelon de pression et lien avec les propriétés rhéologiques de l'agrégat . . . . .	96
2.3.2	Modèle viscoélastique . . . . .	103
2.3.3	Premiers résultats et validation du dispositif sur une lignée déjà caractérisée . . . . .	116
2.4	Amélioration des mesures d'élasticité et simulation . . . . .	123
2.4.1	Construction du modèle numérique COMSOL . . . . .	123
2.4.2	Simulation d'une aspiration par micropipette (AMP) . . . . .	126
2.4.3	Résultats des simulations et établissement d'une loi empirique . . . . .	128
2.5	Étude des liens entre constituants et propriétés mécaniques des tissus . . . . .	135
2.5.1	Perturbation bio chimique . . . . .	135
2.5.2	Visualisation des différents constituants lors de l'AMP . . . . .	141
2.6	Application à des tissus plus complexes . . . . .	147
2.6.1	Comparaison des propriétés mécaniques d'organoïdes de cortex pré-frontal entre différentes espèces de mammifères . . . . .	147
2.6.2	Étude des tissus postérieurs de l'embryon de caille . . . . .	148
<b>3</b>	<b>Poroélasticité d'agrégats cellulaires couplée à leur viscoélasticité : réponse à une pression oscillante</b>	<b>155</b>
3.1	Aspiration en régime sinusoïdal forcé . . . . .	156
3.1.1	Mise en place expérimentale . . . . .	156
3.1.2	Validation du dispositif expérimental . . . . .	160
3.2	Construction d'un modèle poroviscoélastique . . . . .	163
3.2.1	Confrontation avec le modèle viscoélastique : un déphasage non prédit	163
3.2.2	Introduction à la poroélasticité . . . . .	165
3.2.3	Modélisation de l'AMP par 2 sous-systèmes . . . . .	166
3.2.4	Construction d'un modèle poroélastique 1D de l'AMP . . . . .	168
3.2.5	Modèle complet de poroviscoélasticité . . . . .	182
3.3	Simulations numériques et validation du modèle analytique . . . . .	189
3.4	Analyse des données expérimentales . . . . .	195
3.4.1	Mesure de la perméabilité des tissus biologiques . . . . .	195
3.4.2	Analyse de la partie poroélastique . . . . .	199
<b>4</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>205</b>
4.1	Conclusion . . . . .	206
4.2	Perspectives . . . . .	208
4.2.1	Perspectives technologiques . . . . .	208

## TABLE DES MATIÈRES

---

4.2.2	Perspectives expérimentales . . . . .	209
4.2.3	Perspectives théoriques et conceptuelles . . . . .	210
<b>A</b>	<b>Annexes</b>	<b>211</b>
A.1	Dispositif pour contrôle de l'environnement . . . . .	211
A.2	Dispositif pour cellule unique . . . . .	214
A.3	Mesure AFM sur Sphéroïde . . . . .	215
A.4	Pression d'aspiration triangulaire et analyse de Fourier . . . . .	217
A.5	Fluorescence des tiges . . . . .	219
A.6	Formation de sphéroïdes grâce à un tampon imprimé en 3D . . . . .	220
A.7	Dispositif pour l'insertion précise des tiges . . . . .	222
A.8	Mesure de tension de surface . . . . .	223

# Introduction Générale

Les tissus biologiques sont des structures complexes et dynamiques, composées de cellules et de matrice extracellulaire, qui interagissent pour accomplir des fonctions essentielles. Au fil des ans, la recherche a révélé la diversité de leur comportement mécanique, qui peut être élastique, plastique, viscoélastique, voire fluide dans certaines conditions. Ces propriétés mécaniques jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques fondamentaux, comme la morphogenèse, la cicatrisation et la dissémination métastatique.

La caractérisation précise de ces propriétés mécaniques représente un défi majeur, et a poussé au développement de techniques expérimentales adaptées à différentes échelles spatiales et temporelles. Parmi les nombreuses méthodes existantes, l'**aspiration par micropipette (AMP)** s'est imposée comme une technique de choix pour mesurer les propriétés viscoélastiques des tissus, mais cette technique présente quelques limitations, notamment en termes de débit expérimental.

Dans ce contexte, notre travail vise à améliorer la caractérisation mécanique des tissus biologiques en exploitant les avantages offerts par la **microfluidique**. Nous avons en effet développé une puce microfluidique innovante capable de réaliser plusieurs AMP simultanément. Cette approche permet non seulement d'augmenter le débit expérimental, en réalisant des mesures en parallèle, mais offre également un contrôle précis de leur environnement.

L'utilisation de cette nouvelle méthodologie nous a conduits à réévaluer certains aspects de la mécanique des tissus, en particulier l'importance de la **poroélasticité**. En prenant en compte la perméabilité des tissus et le couplage entre la déformation de la matrice solide et le mouvement du fluide interstitiel, nous avons développé des modèles théoriques permettant une interprétation plus précise des données expérimentales. Cette approche contribue en particulier à affiner la description des propriétés mécaniques des tissus et ouvre de nouvelles perspectives.

Ce travail s'inscrit dans une démarche visant à surmonter les limitations des techniques existantes pour mieux appréhender la complexité des tissus biologiques. En combinant les

avantages de l'aspiration par micropipette et de la microfluidique, nous espérons apporter une contribution significative à la compréhension des mécanismes mécaniques fondamentaux qui régissent les tissus et ouvrir de nouvelles voies pour la recherche biomédicale et l'ingénierie tissulaire.



# Chapitre 1

Contexte : Les propriétés mécaniques des  
tissus et leurs caractérisations

## 1.1 Introduction aux propriétés mécaniques des tissus et à leur rôle dans le vivant

### 1.1.1 Le comportement mécanique des tissus biologiques

Un tissu biologique peut être défini comme une structure organisée composée de cellules et de matrice extracellulaire qui interagissent de manière coordonnée afin d'accomplir des fonctions spécifiques au sein de l'organe. Ce terme désigne le niveau d'organisation intermédiaire entre les cellules individuelles et les organes.

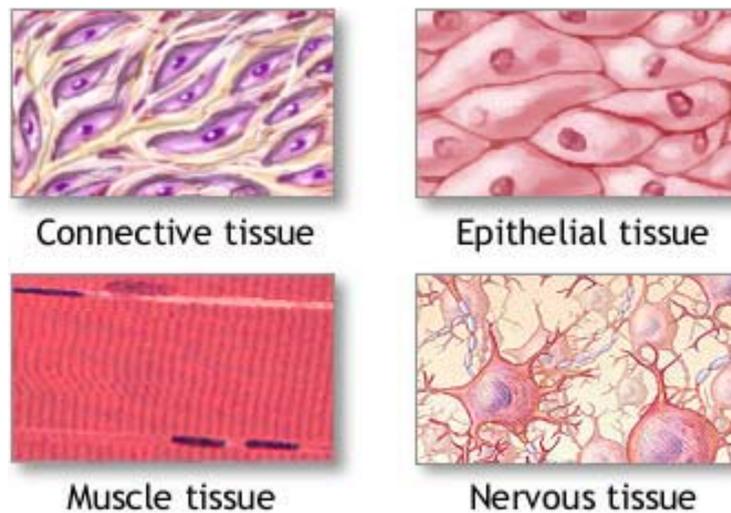


FIGURE 1.1 – Illustration de la structure des différents grands types de tissus

On retrouve une très grande variété de tissus dans le corps humain et la plupart peuvent être classés en 4 grandes catégories :

- **Les tissus conjonctifs**, comme les os, les tendons ou le cartilage, sont majoritairement composés de matrice extracellulaire qui leur donne des propriétés mécaniques particulières. Ils fournissent généralement un soutien mécanique et une connexion entre les autres tissus.
- **Les tissus épithéliaux** recouvrent les surfaces du corps et des organes, telles que la peau. Ils jouent un rôle protecteur en formant des barrières, mais peuvent également être spécialisés dans la sécrétion ou l'absorption de substances biochimiques.

## 1.1. Introduction aux propriétés mécaniques des tissus et à leur rôle dans le vivant

- **Les tissus musculaires** sont spécialisés dans la contraction et permettent de produire de la force et de provoquer des mouvements au sein de l'organisme.
- **Les tissus nerveux** sont responsables de la transmission des signaux électrochimiques dans le corps.

La composition biochimique de ces tissus varie largement, influençant leurs propriétés mécaniques. Par exemple, les tissus conjonctifs riches en collagène, comme les tendons, seront plus rigides, tandis que les tissus adipeux, constitués principalement de cellules graisseuses (adipocytes), présentent une faible rigidité mécanique. Cette diversité de composition engendre une grande variabilité dans leurs propriétés mécaniques. On peut voir un exemple de cette variabilité sur la figure 1.2, où sont classés les différents tissus en fonction de leur rigidité.

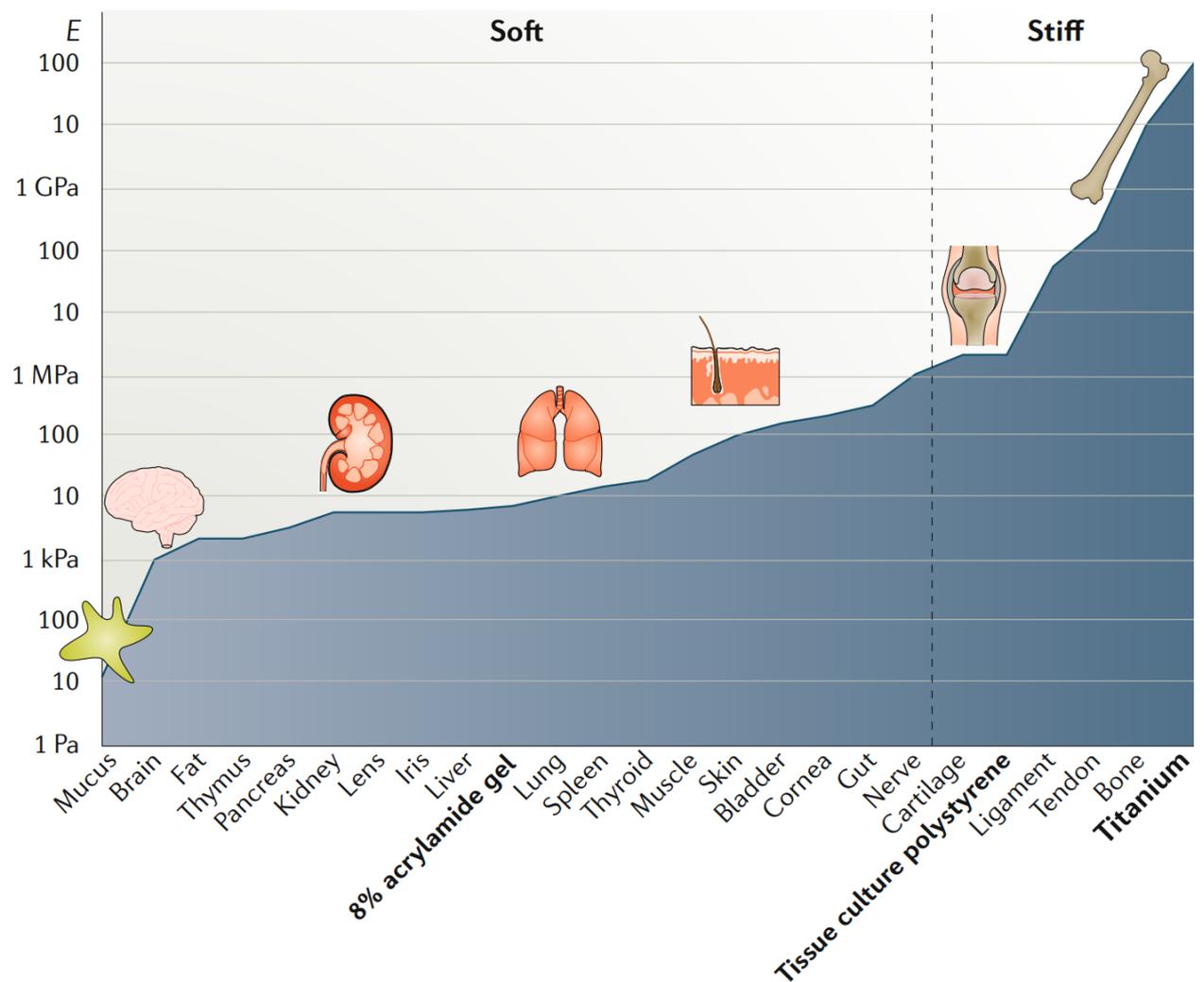


FIGURE 1.2 – Élasticité des tissus composant différents organes du corps humain [1]

Comme on peut le voir sur ce graphique, il est usuel de classer les tissus en deux grandes catégories mécaniques : les tissus rigides et les tissus mous (avec un seuil arbitraire à 1 MPa). Les tissus rigides, comme les os, tendent à se comporter mécaniquement comme des matériaux classiques inanimés, en adoptant un comportement de solide élastique linéaire. Cela signifie que leur déformation est directement proportionnelle à la force appliquée, et qu'ils retrouvent leur forme initiale dès que cette force est relâchée. En revanche, les tissus mous, tels que la peau, les muscles et les organes internes, présentent une mécanique plus complexe, pouvant combiner élasticité non linéaire, plasticité<sup>1</sup> et viscoélasticité. [2][3]

Le comportement viscoélastique des tissus se traduit par une réponse mécanique qui varie en fonction de la durée d'application de la contrainte [4] [2]. Sur de courtes périodes, les tissus se comportent comme des solides élastiques, caractérisés par un module de Young  $E$ , et retrouvent leur forme initiale après la suppression de la charge.

En revanche, lorsqu'une contrainte est appliquée pendant une période prolongée, on peut observer une déformation progressive du tissu, suivie d'une incapacité à retrouver complètement sa forme initiale une fois la contrainte relâchée. On peut d'ailleurs expérimenter cela au quotidien, lorsque des forces sont appliquées de manière prolongée sur notre peau (comme la pression d'un vêtement serré ou les plis d'un drap), on observe une déformation qui persiste pendant quelque temps. À l'inverse, pour des contraintes brèves, la peau reprend immédiatement sa forme sans laisser de trace visible.

En réalité, ce comportement est commun à la plupart des matériaux si l'on élargit suffisamment la fenêtre de temps d'observation. Par exemple, un glacier, qui semble solide, coule lentement sur des périodes de plusieurs mois, montrant un comportement visqueux sur de longues durées. À l'inverse, un liquide, généralement perçu comme fluide, peut présenter une réponse élastique lorsqu'il est soumis à des chocs extrêmement soudains.

Pour certains tissus, comme les tissus embryonnaires ou les tissus présents dans une zone de cicatrisation, ce comportement peut même aller, sur des temps relativement courts ( $\sim$  min), jusqu'à être semblable à celui d'un fluide visqueux, caractérisé par une viscosité dynamique  $\eta$ , avec des réarrangements cellulaires et donc des déformations totalement irréversibles.

D'une manière générale, on peut définir un temps caractéristique  $\tau = \eta/E$ , qui est un indicateur clé pour déterminer à partir de quel moment un tissu viscoélastique passe d'un

---

1. Pour certains tissus, il est nécessaire de dépasser un certain seuil de contrainte pour induire un comportement visqueux.

comportement solide à un comportement fluide. Ces deux comportements jouent des rôles majeurs dans de nombreux processus biologiques, influençant la manière dont les tissus réagissent aux forces mécaniques et à leur environnement. Ce temps caractéristique peut varier de plusieurs ordres de grandeur selon les différents types de tissus. C'est pourquoi, dans la suite, nous parlerons de temps courts (comportement solide) et de temps longs (comportement fluide) sans quantifier ces durées, afin de décrire les tissus de manière générale.

### 1.1.2 Propriétés élastiques des tissus et mécanotransduction

Les propriétés élastiques des tissus jouent un rôle prépondérant dans le soutien et les connexions mécaniques au sein de l'organisme, mais il a également été démontré qu'elles sont impliquées dans des processus biologiques essentiels. Historiquement, on considérait que les signaux biochimiques étaient les principaux facteurs influençant le comportement cellulaire. Cependant, il est désormais établi que les propriétés mécaniques des tissus, notamment leur rigidité, sont tout aussi cruciales [5]. Ces propriétés mécaniques influencent des fonctions aussi variées que la prolifération, la migration, et surtout la différenciation cellulaire.

Denis Discher et ses collègues ont par exemple montré que l'élasticité de l'environnement cellulaire joue un rôle clé dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses [6]. En particulier, ils ont démontré que des substrats mous, imitant la faible rigidité du cerveau, favorisent la différenciation des cellules en neurones, tandis que des substrats plus rigides, reproduisant la rigidité des muscles ou des os, favorisent respectivement la différenciation en cellules musculaires (myogenèse) et en cellules osseuses (ostéogenèse) (cf. figure 1.3). Cela souligne l'importance des propriétés mécaniques de l'environnement qui entoure une cellule dans son destin cellulaire.

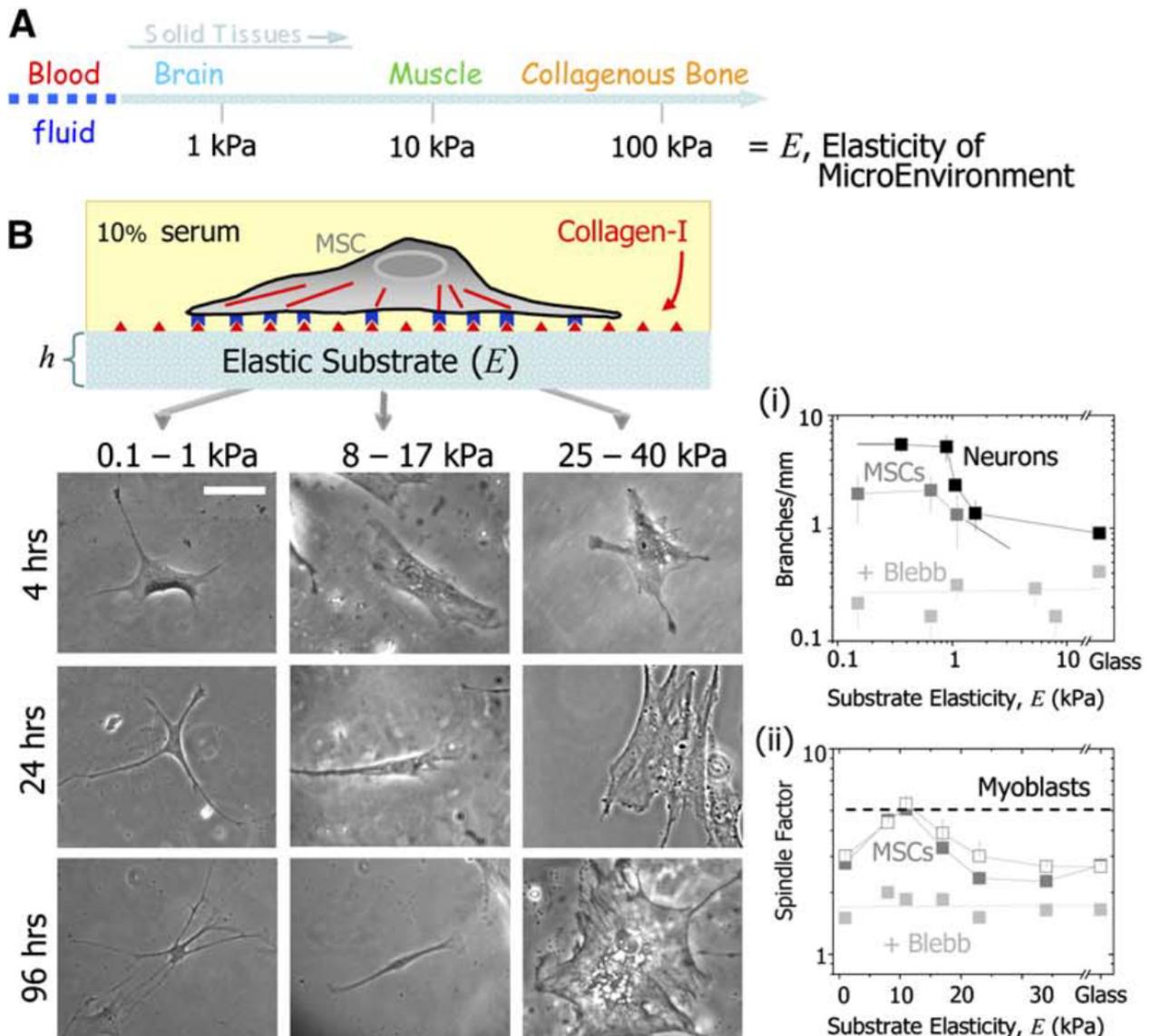


FIGURE 1.3 – Différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sur des gels de collagène présentant différentes rigidités, contrôlés via le taux de réticulation. Le destin de ces cellules pluripotentes est fortement influencé par la rigidité du substrat sur lequel elles sont cultivées. En fonction de cette rigidité, les MSC se différencient en types cellulaires spécifiques : cellules neuronales sur des substrats mous, cellules musculaires sur des substrats intermédiaires et cellules osseuses sur des substrats rigides. En revanche, lorsque les MSC sont traitées à la blebbistatine, un inhibiteur de l'activité contractile du cytosquelette d'actine, la différenciation n'est plus influencée par la rigidité de l'environnement. [6]

Cette étude a également montré que la perturbation de l'activité cytosquelettique, par l'inhibition de la myosine non musculaire II, bloque la différenciation des cellules souches dirigée par la rigidité du substrat. En d'autres termes, en enlevant aux cellules leur capacité à contracter leur cytosquelette, on observe que la rigidité de leur environnement n'a plus d'influence sur leur destin cellulaire. Cela a permis de mettre en évidence le rôle crucial du cytosquelette dans la capacité des cellules à "percevoir" et à répondre aux propriétés méca-

niques de leur environnement. Le cytosquelette d'actine est directement impliqué dans cette "mécanosensation", car il permet aux cellules de ressentir les variations de rigidité de la matrice extracellulaire via des structures appelées adhésions focales. Ces adhésions permettent aux cellules de s'attacher à la matrice extracellulaire et de transmettre les forces mécaniques entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule [7].

Un modèle appelé "molecular clutch model" [8] permet notamment d'expliquer comment les cellules "ressentent" la rigidité de leur environnement. Dans ce modèle, les forces sont transmises par un "embrayage moléculaire" formé par des protéines qui lient le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire. Ce modèle repose sur l'interaction dynamique entre le cytosquelette d'actine et l'environnement de la cellule via des complexes protéiques tels que le complexe intégrine/taline/vinculine. La configuration et l'engagement de ces complexes varient en fonction de la rigidité du substrat, modulant ainsi l'activation de certaines voies de signalisation et influençant directement le comportement cellulaire [9].

La rigidité des tissus ne se limite donc pas à un rôle purement structurel dans les organismes. Elle est également un acteur clé de la mécanotransduction [10] [11] (processus par lesquels les cellules transforment les signaux mécaniques en réponses biochimiques). La reconnaissance de ces phénomènes est relativement récente, mais il est probable qu'ils jouent un rôle majeur dans de nombreux contextes comme la morphogenèse (en influençant la différenciation des cellules souches et progénitrices ou en guidant la migration [12]). Ces mécanismes sont également impliqués dans des processus pathologiques, où des dérèglements de la rigidité peuvent entraîner des réponses cellulaires anormales.

On peut également citer l'importance croissante de l'étude des rigidités tissulaires anormales dans des phénomènes tels que le vieillissement ou certaines maladies. Par exemple, l'élasticité du cartilage diminue avec l'âge, ce qui peut entraîner des troubles tels que l'arthrite. Cette dégradation progressive de l'élasticité peut compromettre la capacité des tissus à absorber les chocs, rendant les articulations plus vulnérables aux blessures et à la douleur [13]. De même, la capacité de régénération du collagène dans les tendons et les ligaments diminue avec l'âge, rendant les tissus plus susceptibles aux déformations permanentes. En termes pathologiques, dans le cas des tumeurs, la rigidification des tissus environnants est associée à la progression tumorale, ce qui rend le microenvironnement plus propice à l'invasion et à la métastase [14] [15]. Cela montre que la rigidité excessive ou insuffisante des tissus peut être un facteur clé dans le développement et la progression de nombreuses maladies.

Une meilleure compréhension des propriétés élastiques des tissus et de leurs conséquences est également cruciale pour le développement de l'ingénierie tissulaire [16]. Dans ce domaine,

L'objectif est de créer des tissus artificiels capables de reproduire non seulement les fonctions biologiques, mais aussi les propriétés mécaniques des tissus naturels. Dans ce domaine en pleine expansion, la manipulation précise de la rigidité des matrices et des environnements cellulaires est essentielle pour orienter la régénération tissulaire et permettre la création de tissus artificiels fonctionnels [17]. Ces avancées offrent des perspectives prometteuses pour le remplacement de tissus endommagés, l'amélioration des greffes et la mise au point de modèles de tissus plus fidèles aux conditions physiologiques, ouvrant ainsi de nouvelles voies en médecine régénérative [18].

Que ce soit pour le développement de nouvelles technologies, le traitement des maladies ou la compréhension de certains phénomènes biologiques, l'étude approfondie de la rigidité des tissus et de leurs composants est devenue essentielle et reste encore assez mal caractérisée. Ce champ de recherche ouvre donc de nombreuses perspectives.

Avant de discuter du comportement fluide que les tissus adoptent sur de longues périodes, il est essentiel de souligner que sur des échelles de temps intermédiaires, ils adoptent un comportement viscoélastique. L'article d'Alberto Elosegui-Artola *et al.* [19] met en évidence l'importance de ces propriétés en utilisant des substrats d'alginate aux caractéristiques élastiques et visqueuses contrôlées. Les auteurs montrent que les cellules ne réagissent pas uniquement à la rigidité immédiate, mais elles sont également sensibles au temps de relaxation viscoélastique de ces substrats. Ces propriétés jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, les ruptures de symétrie, et l'initiation des processus d'invasion. En percevant et en réagissant aux mécanismes de relaxation de la matrice, les cellules ajustent leur comportement en fonction de ce temps de relaxation.

### 1.1.3 La fluidité des tissus et son rôle dans certains processus biologiques

Comme mentionné précédemment, à des échelles de temps plus longues et/ou sous des contraintes suffisantes, le comportement mécanique de certains tissus tend à se rapprocher de celui d'un fluide visqueux. Ce comportement fluide émerge lorsque les forces appliquées sur le tissu provoquent des réarrangements cellulaires ou des modifications dans la matrice extracellulaire, similaires aux réorganisations moléculaires observées dans les fluides. Dans un fluide, le caractère visqueux résulte des interactions et des réarrangements moléculaires. De manière similaire, dans les tissus biologiques, c'est la nature dynamique et réorganisable des interactions cellulaires qui confère au tissu cette propriété. Cette caractéristique peut

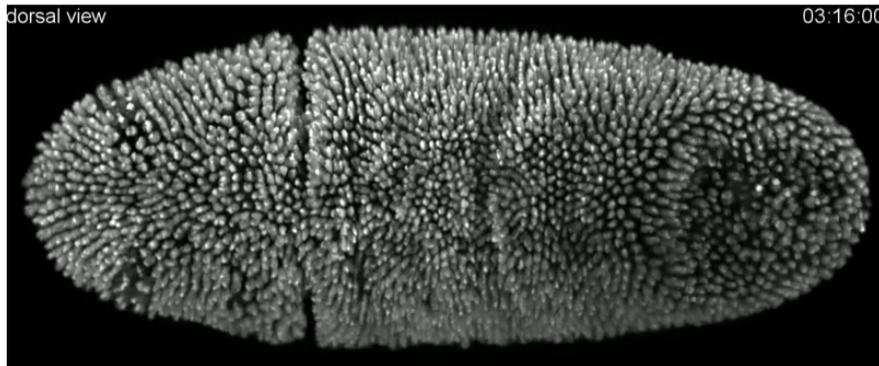
être quantifiée, tout comme dans les fluides, par une viscosité dynamique,  $\eta$  [20].

C'est Phillips et Steinberg qui, en 1978 [21], ont proposé cette analogie entre les tissus biologiques et liquides. Ils ont observé que, après dissection, les explants embryonnaires de forme cubique se remodelaient spontanément pour adopter une forme sphérique, de manière similaire à une goutte de fluide sous l'effet de la tension de surface. Cette découverte a considérablement enrichi notre compréhension de phénomènes tels que la morphogenèse.

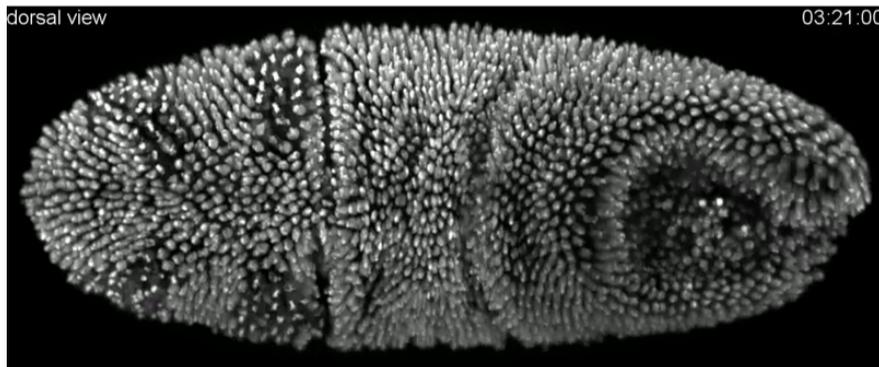
Pour la majorité des tissus, leur comportement visco-plastique implique qu'ils nécessitent un certain seuil de contrainte pour provoquer des réarrangements structuraux. Cependant, sous des forces physiologiques normales, ces contraintes restent souvent en deçà de ce seuil, ce qui signifie que les tissus se comportent davantage comme des solides élastiques, et les réarrangements cellulaires sont limités. Toutefois, dans certains processus biologiques spécifiques, tels que la morphogenèse, la cicatrisation des plaies, ou la dissémination métastatique, ces propriétés de fluidité deviennent essentielles pour permettre des mouvements cellulaires coordonnés et des réarrangements structuraux à grande échelle [22] [23].

Par exemple, durant la morphogenèse, le développement embryonnaire implique d'importantes réorganisations cellulaires qui façonnent les organes et structures de l'embryon. Les forces mécaniques exercées par les cellules et la croissance génèrent des contraintes internes, auxquelles le tissu réagit en fonction de ses propriétés visqueuses. Ce comportement visqueux permet un réarrangement des cellules, tout en permettant des mouvements coordonnés nécessaires à la formation des tissus et organes. Cette réponse mécanique oriente les mouvements collectifs des cellules et assure une coordination précise du remodelage tissulaire [24]. Dans ce cadre, la viscosité permet un équilibre entre fluidité et structure, garantissant que les tissus puissent se déformer sans se désintégrer. De même, lors de la cicatrisation, les cellules doivent migrer collectivement vers la zone lésée, impliquant des réarrangements au sein des tissus environnants pour refermer la plaie.

T = 0 min



T = 5 min



T = 15 min

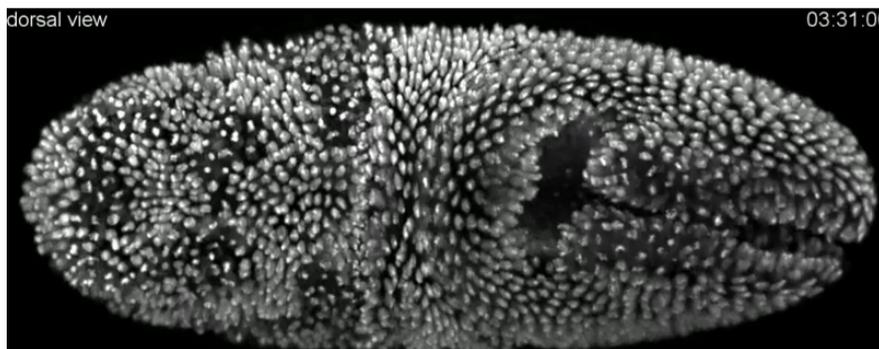


FIGURE 1.4 – Image de microscopie à feuille de lumière tirée de [25], illustrant les noyaux cellulaires au cours du développement précoce d'un embryon de larve de *Drosophile*. Ces images permettent de montrer le comportement "fluide" des tissus embryonnaires. La taille de la larve est de l'ordre du millimètre

Un exemple illustratif de ce phénomène est présenté dans la figure 1.4, qui montre la réorganisation cellulaire au cours de la morphogenèse d'un embryon de drosophile. Durant cette phase critique du développement, la croissance et la migration des cellules génèrent des mouvements collectifs qui s'apparentent à des courants dans un fluide. Ces flux cellulaires coordonnés sont essentiels à la formation des structures complexes nécessaires au bon développement de l'embryon. La régulation des déformations tissulaires est assurée par les

différentes viscosités des tissus qui composent les diverses régions de l'embryon. Cette hétérogénéité mécanique permet à toutes les régions de se développer vers la bonne "géométrie", contribuant ainsi à l'élaboration correcte de la morphologie finale.

Un exemple bien connu d'hétérogénéité dans les propriétés viscoélastiques des tissus est observé le long de l'axe antéro-postérieur des embryons de vertébrés [26]. Au cours des étapes tardives du développement embryonnaire, une transition fluide-solide se produit progressivement le long de cet axe. Dans la zone postérieure, là où se trouvent les cellules souches mésodermiques et neuromésodermiques, les tissus se comportent de manière très fluide. Cette région, appelée la zone des progéniteurs mésodermiques (MPZ), se caractérise par un fort mouvement cellulaire, permettant la migration et la prolifération des cellules qui contribuent à l'extension de l'embryon. À mesure que les cellules se déplacent vers l'avant, elles s'incorporent dans le mésoderme présomitique (PSM), une région plus rigide où la motilité cellulaire diminue considérablement et où les tissus adoptent un comportement solide.

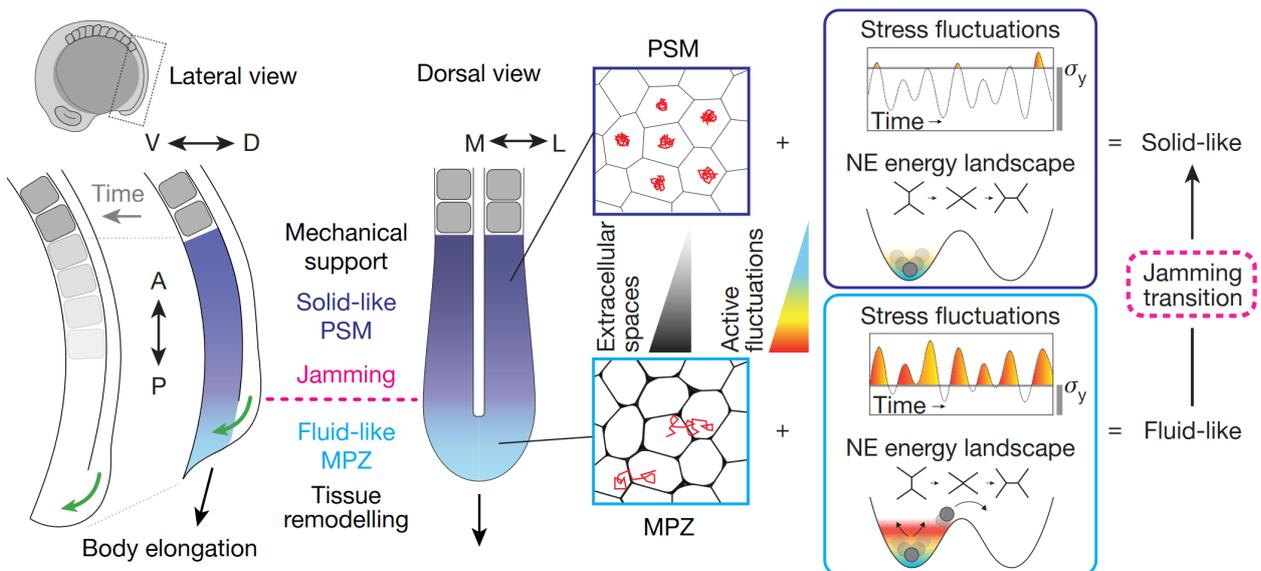


FIGURE 1.5 – Illustration du rôle de la transition entre fluidité et rigidité le long de l'axe antéro-postérieur chez les vertébrés. Du côté postérieur, les grandes fluctuations des contacts intercellulaires (température effective élevée) dans un environnement moins contraint, avec davantage d'espaces extracellulaires, favorisent le réarrangement et le mélange des cellules, générant un état tissulaire "fluide". À l'inverse, du côté antérieur, la réduction des espaces extracellulaires et la diminution des fluctuations de contact entre les cellules (température effective basse) conduisent à une rigidification progressive du tissu, lui conférant un comportement "solide". Cette structure rigide sert de support mécanique qui oriente l'expansion tissulaire vers le côté postérieur, favorisant ainsi l'allongement de l'axe corporel au fur et à mesure du développement embryonnaire.[26]

Cette transition de la fluidité à la rigidité porte le nom de "transition de blocage" (ou

"jamming transition") [27] et elle est essentielle pour la morphogenèse, car elle permet aux tissus postérieurs de s'étendre tout en maintenant l'intégrité mécanique de la structure embryonnaire. Ce phénomène est comparable à celui observé dans des matériaux granulaires, où le passage d'un état fluide à un état rigide est dicté par la densité, les interactions ou "l'agitation" des grains (température effective). [28].

La "jamming transition" est un phénomène clé dans le comportement mécanique des tissus multicellulaires, où un ensemble de cellules passe d'un état fluide, capable de se réorganiser et de migrer, à un état solide où les mouvements cellulaires sont fortement restreints. Ce processus est largement influencé par la densité cellulaire, la mobilité cellulaire et les interactions cellule-cellule [29]. Dans des tissus embryonnaires ou en développement, comme mentionné dans le contexte de la morphogenèse, les cellules peuvent librement migrer et se réarranger à faible densité, conférant au tissu un comportement proche de celui d'un fluide visqueux. Cependant, à mesure que la densité cellulaire augmente ou que les interactions mécaniques s'intensifient, les cellules deviennent de plus en plus "confinées", réduisant leur capacité à se déplacer indépendamment. Cette transition progressive vers un comportement rigide est cruciale pour maintenir la cohésion du tissu en fin de morphogenèse, garantissant la stabilité des structures nouvellement formées. Ce changement de comportement mécanique est ce qu'on appelle la "jamming transition". À partir de ce point, le tissu se comporte davantage comme un solide, avec une rigidité accrue et une capacité réduite à se déformer ou à migrer. Cette transition est cruciale dans des processus biologiques tels que la gastrulation ou la cicatrisation des plaies, où la capacité des cellules à passer d'un état fluide à un état plus rigide doit être finement régulée pour assurer la bonne organisation des tissus.

Comme nous venons de le voir, les propriétés visqueuses que présentent les tissus sur des échelles de temps longues varient considérablement en fonction du contexte biologique. Ces mêmes propriétés mécaniques semblent également avoir une influence majeure dans le développement de certaines pathologies, comme le cancer [30] [31]. En effet, lors de la transition vers un état métastatique, l'adhésion intercellulaire diminue, tandis que la motilité des cellules cancéreuses augmente, entraînant probablement une chute de la viscosité du tissu tumoral. Cette diminution de viscosité facilite la migration des cellules tumorales et leur dissémination à travers l'organisme, leur permettant d'envahir de nouveaux tissus. Ainsi, les propriétés viscoélastiques des tissus, qu'elles soient en contexte physiologique, normal ou pathologique, sont des régulateurs essentiels qu'il est nécessaire d'étudier et de caractériser.

Entre les comportements de solide élastique à court terme et de fluide à long terme, les tissus adoptent un comportement viscoélastique à des échelles de temps intermédiaires. L'article d'Alberto Elosegui-Artola et al. [19] souligne l'importance de ces propriétés en utilisant

des substrats d'alginate dont les caractéristiques élastiques et visqueuses sont contrôlées. Les cellules ne réagissent pas uniquement à la rigidité immédiate, mais elles sont également sensibles au temps de relaxation viscoélastique de ces substrats. Ces propriétés jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, les ruptures de symétrie, et l'initiation des processus d'invasion. En percevant et en réagissant aux mécanismes de relaxation de la matrice, les cellules ajustent leur comportement en fonction de ce temps de relaxation.

## 1.2 Modélisation phénoménologique du comportement viscoélastique des tissus

Les tissus biologiques sont des matériaux aux propriétés mécaniques complexes, à la frontière entre solide et fluide. Nous allons ici voir un formalisme permettant de décrire quantitativement ce type de comportement qualifié de **viscoélastique**.

### 1.2.1 Introduction à la rhéologie

Si l'on prend le cas simplifié d'une déformation unidimensionnelle d'un matériau, la modélisation du comportement mécanique de ce matériau a pour but de relier la contrainte,  $\sigma$  qui s'applique sur ce matériau, à sa déformation,  $\epsilon$ . Au 17ème siècle, c'est Hooke et Newton qui ont respectivement proposé de telles descriptions mathématiques pour le comportement d'un solide et d'un fluide. En se basant sur des observations expérimentales, ils ont proposé les modèles phénoménologiques suivants :

- Un solide de Hooke est défini par :  $\sigma = E\epsilon$  avec  $E$  le module de Young en Pa
- Un fluide Newtonien est défini par :  $\sigma = \eta\dot{\epsilon}$  avec  $\eta$  la viscosité dynamique et  $\dot{\epsilon}$  la dérivée temporelle de la déformation.

À partir du 19ème siècle, les scientifiques constatent que cette modélisation ne suffit plus pour décrire tous les matériaux. C'est notamment Wilhelm Weber qui a observé, en 1835, que les fils de soie possèdent à la fois des propriétés élastiques et visqueuses lorsqu'on les sollicite sur de longues durées. C'est alors qu'une nouvelle discipline, à la frontière entre la mécanique des solides et la mécanique des fluides, a été créée : **la rhéologie** [32].

L'expérience de base en rhéologie, consiste à appliquer des contraintes oscillantes (représentées en notation complexe par  $\tilde{\sigma} = \sigma_0 e^{j\omega t}$ ) et à mesurer les réponses en déformation ( $\tilde{\epsilon} = \epsilon_0 e^{j\omega t + \phi}$ ) du matériau pour une large gamme de fréquences. On voit avec les définitions données précédemment, qu'un solide de Hooke satisfait la relation :  $\tilde{\sigma} = E\tilde{\epsilon}$  (en phase) ; alors qu'un fluide newtonien satisfait :  $\tilde{\sigma} = j\omega\eta\tilde{\epsilon}$  (en quadrature de phase). On voit qu'entre ces deux cas limites, le rapport  $\tilde{\sigma}/\tilde{\epsilon}$  passe d'une grandeur réelle dans le cas d'un solide, à une grandeur purement imaginaire dans le cas d'un fluide. Cependant, pour des matériaux viscoélastiques plus complexes, ce rapport possède à la fois une partie réelle et imaginaire, traduisant un comportement intermédiaire entre le solide élastique et le fluide visqueux.

L'analyse de la réponse du matériau à ces sollicitations permet de définir deux grandeurs fondamentales : le module de stockage  $G'$  et le module de perte  $G''$ , définis par  $\tilde{\sigma}/\tilde{\epsilon} = (G' + jG'')$ . Le module de stockage,  $G'$  est une mesure de l'énergie élastique stockée dans le matériau lors de cette déformation oscillante. Il reflète la rigidité élastique du matériau. Plus  $G'$  est élevé, plus le matériau est capable de stocker l'énergie élastique et donc de reprendre sa forme initiale après la déformation. Si  $G' \gg G''$ , le matériau peut être considéré comme un solide purement élastique. Le module de perte,  $G''$ , quant à lui, représente l'énergie dissipée dans le matériau pendant la déformation oscillante. Il est associé à la composante visqueuse du matériau. Un  $G''$  élevé indique que le matériau dissipe une quantité importante d'énergie. Si  $G' \ll G''$  le comportement du matériau est proche de celui d'un fluide visqueux.

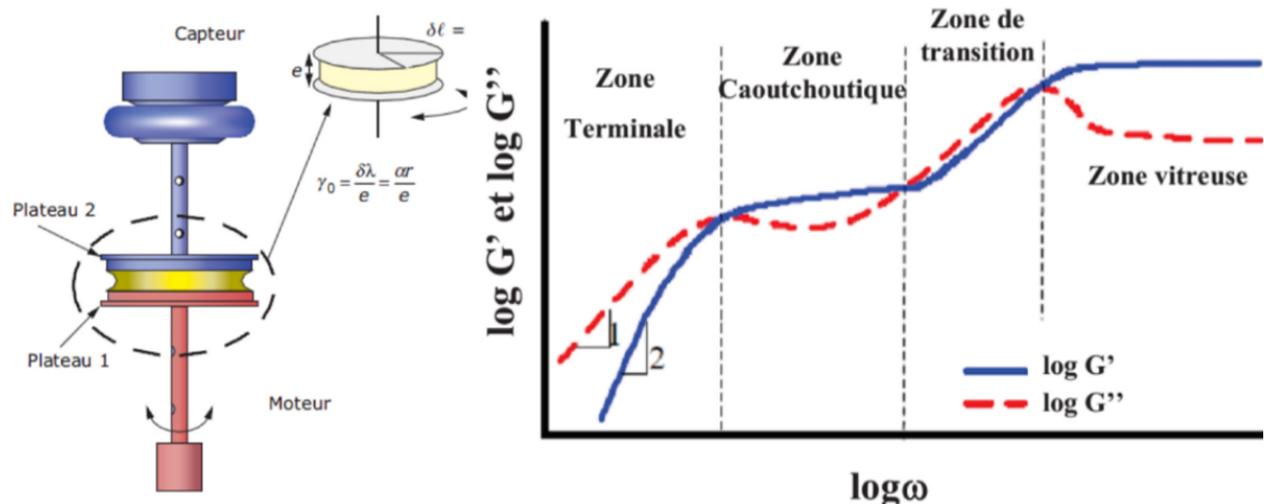


FIGURE 1.6 – Schéma et principe de fonctionnement d'un rhéomètre. Courbe typique de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la pulsation  $\omega$  pour un fondu de polymère.

On peut voir sur la figure 1.6 les courbes typiques de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la pulsation  $\omega$ , pour une solution de polymères classique. Conformément à ce que nous avons vu sur les matériaux viscoélastiques, nous constatons que pour des oscillations lentes, on observe un comportement davantage visqueux ( $G' \ll G''$ ), tandis que pour des oscillations rapides, le matériau montre une réponse plus élastique ( $G' \gg G''$ ).

Afin de modéliser mathématiquement ces comportements complexes observés expérimentalement, il existe un outil puissant permettant de reproduire la plupart de ces comportements : les **diagrammes rhéologiques**.

### 1.2.2 Les diagrammes rhéologiques

Un diagramme rhéologique est une représentation graphique utilisée pour modéliser, de manière simplifiée, le comportement mécanique complexe des matériaux viscoélastiques. En combinant en série et/ou en parallèle des éléments mécaniques de base tels que des ressorts (pour représenter l'élasticité) et des amortisseurs (pour représenter la viscosité), ces diagrammes permettent de reproduire la plupart des comportements observables.

Une utilisation simplifiée de ces diagrammes permet de reproduire des déformations macroscopiques unidimensionnelles observées lors d'une expérience. Ils ne permettent donc pas, en première approche, une description mécanique générale des matériaux, contrairement au formalisme de la mécanique des milieux continus. Cependant, il est possible de faire le lien entre ces deux approches afin de lier les paramètres mécaniques effectifs de ces diagrammes aux vraies constantes mécaniques qui décrivent un matériau (isotrope) localement, comme son module de Young, son coefficient de Poisson ou sa viscosité dynamique.

*Remarque : Il est possible de générer à partir de tels diagrammes une loi rhéologique locale, utilisable avec le formalisme des milieux continus et qui permet donc de retranscrire ce type de comportement au travers d'une équation constitutive liant le tenseur des contraintes au tenseur des déformations [33] [34].*

#### **Le ressort : Modélisation de l'élasticité linéaire**

La modélisation du comportement élastique dans ces diagrammes se fait au travers des ressorts. Sa loi de comportement est celle d'un solide élastique. C'est-à-dire qu'il obéit à la loi de Hooke, où la déformation  $\epsilon$  est proportionnelle à la contrainte  $\sigma$  qui s'applique sur cet élément :

$$\epsilon = \frac{\sigma}{E} \tag{1.1}$$

avec  $E$  le module d'élasticité associé à cet élément. Le ressort modélise donc la partie réversible des déformations pour lesquelles aucune dissipation d'énergie n'a lieu. Il est également possible d'utiliser des lois de comportement non linéaires pour reproduire l'élasticité non linéaire d'un matériau.

### L'amortisseur : Modélisation des dissipations visqueuses

La modélisation du comportement visqueux dans ces diagrammes se fait au travers des amortisseurs. Leur loi de comportement est celle d'un fluide newtonien, où c'est le taux de déformation,  $\dot{\epsilon} = \frac{d\epsilon}{dt}$ , qui est proportionnel à la contrainte  $\sigma$  qui s'applique sur cet élément :

$$\dot{\epsilon} = \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.2)$$

avec  $\eta$  la viscosité associée à cet élément. L'amortisseur permet de représenter la partie visqueuse d'un matériau qui dissipe de l'énergie au cours de sa déformation et qui permet de modéliser les déformations irréversibles que le matériau subit. Il est également possible d'utiliser des lois plus complexes pour traduire des viscosités non newtoniennes.

Ces deux éléments constituent la base des diagrammes rhéologiques, mais d'autres éléments peuvent être intégrés pour tenir compte d'effets non linéaires, tels que des seuils pour modéliser la plasticité (avec un élément équivalent à une diode en électricité). Il existe d'ailleurs une correspondance parfaite entre ces diagrammes et les circuits électriques, avec  $\dot{\epsilon}$  qui est l'équivalent du courant  $I$  et  $\sigma$  de la tension  $U$ . Le ressort est alors l'équivalent du condensateur et l'amortisseur de la résistance.

### Modèle de Maxwell : Modélisation d'un fluide viscoélastique

On peut alors combiner ces éléments de base pour créer des modèles viscoélastiques. En combinant un ressort et un amortisseur en série, on obtient le modèle de Maxwell (cf. figure 1.8) qui permet de décrire un fluide viscoélastique. Un matériau qui se comporte comme un solide élastique à court terme, mais qui s'écoule comme un fluide à long terme. Pour obtenir la loi de comportement qui découle de ce modèle, on divise la déformation totale  $\epsilon$  en une partie ressort  $\epsilon_1$  et une partie amortisseur  $\epsilon_2$ . On a alors :

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2, \quad \epsilon_1 = \frac{\sigma}{E}, \quad \dot{\epsilon}_2 = \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.3)$$

Ce qui nous permet d'obtenir la loi de comportement du modèle de Maxwell :

$$\dot{\epsilon} = \frac{\sigma}{\eta} + \frac{\dot{\sigma}}{E} \quad (1.4)$$

On peut voir dans la figure 1.8 la réponse de ce système à un échelon de contrainte. Le matériau se déforme initialement comme un solide élastique, mais continue de se déformer au fil du temps, tant que la contrainte est appliquée. Puis, lorsque la contrainte s'arrête, le matériau récupère la partie élastique de sa déformation, mais ne revient pas dans sa forme initiale. Cela permet de décrire le comportement de fluides, qui sur des temps courts, présentent un comportement élastique. C'est notamment ce modèle qui permet de retranscrire le comportement des solutions de polymères que l'on a vues sur la figure 1.6. En effet, à partir de cet élément de Maxwell, on peut reproduire l'évolution des modules de stockage  $G'$  et de perte,  $G''$  observés à basses fréquences pour les polymères, comme le montre la figure 1.7.

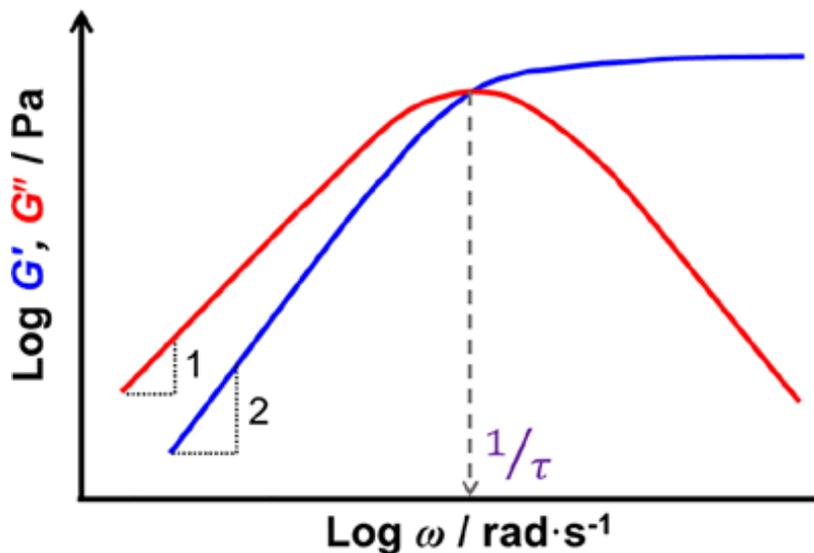


FIGURE 1.7 – Évolution des modules de stockage  $G'$  et de perte,  $G''$ , pour un modèle de Maxwell (amortisseur  $\eta$  et ressort  $E$  en série), avec  $\tau = \eta/E$ . Figure extraite de [35]

### Modèle de Kelvin-Voigt : Modélisation d'un solide viscoélastique

Un autre modèle populaire est le modèle de Kelvin-Voigt qui combine un ressort et un amortisseur disposés en parallèle. Ce modèle est utilisé pour décrire des solides viscoélastiques, c'est-à-dire des matériaux qui se comportent principalement comme des solides, mais avec une composante visqueuse qui introduit un effet retardé dans la déformation. La contrainte  $\sigma$  qui s'applique sur cet élément se répartit entre la branche ressort  $\sigma_1$  et la branche amortisseur  $\sigma_2$ , ce qui conduit à l'équation constitutive :

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2, \quad \sigma_1 = E\epsilon, \quad \sigma_2 = \eta\dot{\epsilon}$$

$$E\epsilon + \eta\dot{\epsilon} = \sigma \tag{1.5}$$

Dans ce modèle, lorsque l'on applique une contrainte, la déformation est progressive jusqu'à atteindre une valeur maximale. Puis, une fois la contrainte supprimée, le matériau revient progressivement à sa forme initiale, mais cette récupération est également retardée par la dissipation visqueuse. Le modèle de Kelvin-Voigt est particulièrement adapté pour modéliser des matériaux qui se comportent comme des solides viscoélastiques, où la composante élastique prédomine, mais où il existe un certain degré de dissipation d'énergie.

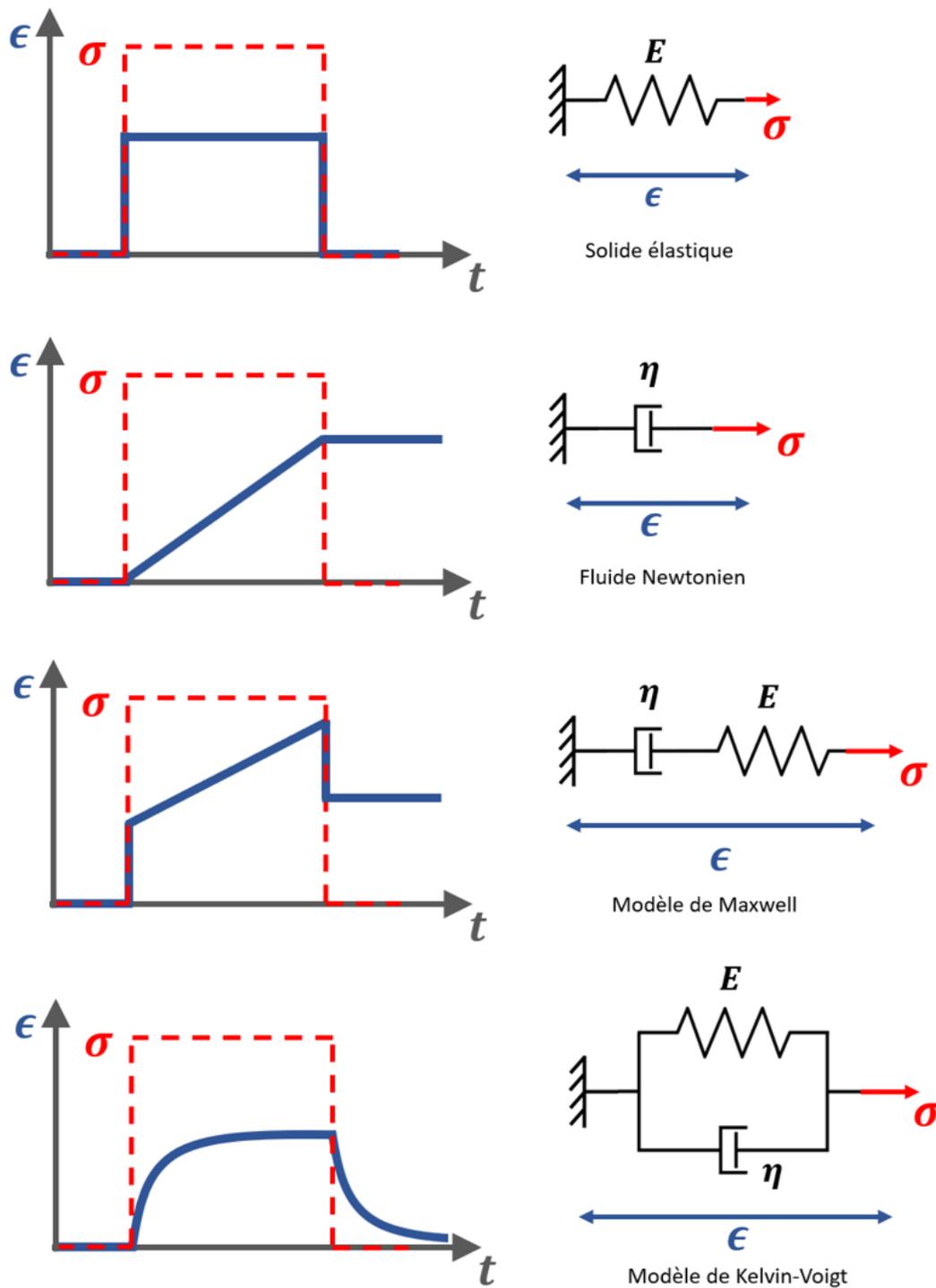


FIGURE 1.8 – Illustration de la réponse à un échelon de pression pour les éléments de base des diagrammes rhéologiques, ainsi que pour les modèles de Maxwell et de Kelvin-Voigt.

### 1.2.3 Application aux tissus biologiques

Comme nous l'avons dit, en première approche, ces modèles permettent de décrire des comportements macroscopiques au travers de grandeurs effectives d'élasticité et de viscosité.

Utilisés de cette manière, ils peuvent paraître assez artificiels et assez éloignés de l'origine de la viscoélasticité des matériaux. Cependant, dans le cas de matériaux complexes tels que les tissus, qui sont composés de plusieurs constituants aux propriétés mécaniques variées et dans lesquels des phénomènes comme les réarrangements, la croissance, la division ou la mort cellulaire peuvent avoir un impact sur les propriétés mécaniques, leur utilisation peut être intéressante. En effet, en utilisant des diagrammes rhéologiques, il est possible de construire des modèles de manière simple et modulable, en sélectionnant les éléments représentatifs des phénomènes ou constituants que l'on souhaite prendre en compte. Chaque élément du diagramme peut être associé à un constituant spécifique ou à un phénomène au sein du tissu, permettant ainsi de décomposer la réponse globale du tissu en contributions élastiques, visqueuses, plastiques ou actives distinctes.

Sham Tlili et ses collègues ont notamment développé une méthodologie systématique pour de telles approches [34]. L'idée générale est de décomposer ces diagrammes en 2 parties : Une partie de ce diagramme est associée aux réarrangements cellulaires qui surviennent à l'échelle du tissu. Comme nous l'avons vu, ces réarrangements sont des phénomènes visqueux qui traduisent la capacité des cellules à changer de position relative, entraînant une relaxation progressive des contraintes dans le tissu. Cela peut être modélisé par un amortisseur ou un système plus complexe permettant de tenir compte de la plasticité. L'autre partie peut être associée aux éléments viscoélastiques qui composent le tissu comme les cellules ou la matrice extracellulaire avec des modèles type Kelvin-Voigt ou plus complexes pour être représentatifs de leur comportement intrinsèque.

Ainsi, les diagrammes rhéologiques constituent un outil pour la compréhension et la modélisation du comportement des tissus. En intégrant les processus intra et intercellulaires, la génération de forces actives et la plasticité, les modèles rhéologiques offrent un cadre pour prédire et analyser le comportement des tissus sous diverses conditions mécaniques.

## 1.3 Les différents constituants et leurs rôles dans la mécanique des tissus

Comme nous venons de le voir, les propriétés de viscoélasticité des tissus biologiques se traduisent par des comportements mécaniques qui dépendent de l'échelle temporelle considérée. Chacune de ces dynamiques est liée à des déformations provenant de différentes échelles spatiales. À très court terme, le comportement élastique domine. Ce comportement est principalement dicté par la rigidité et l'interconnexion des réseaux de protéines fibreuses qui composent le cytosquelette des cellules ou de la matrice extracellulaire [36]. À des échelles temporelles plus longues, de l'ordre de la minute, le comportement viscoélastique des cellules devient prédominant. Ce comportement reflète les réarrangements dynamiques de ces mêmes réseaux à l'échelle de la cellule [37]. Enfin, sur des périodes de plusieurs minutes ou heures, la viscosité qui émerge à l'échelle du tissu peut prendre le dessus. À ce niveau, le tissu se comporte de manière fluide, les cellules se déplacent, migrent et réarrangent leur position au sein du tissu, ce qui induit un comportement mécanique similaire à celui d'un fluide visqueux [20].

### 1.3.1 Élasticité et viscoélasticité, son origine à l'échelle moléculaire

Sur des échelles de temps courtes et sous des contraintes modérées, les tissus présentent un comportement élastique (avec une élasticité pouvant être plus ou moins linéaire). Cette réponse mécanique "immédiate" provient principalement des réseaux de protéines fibreuses qui composent le cytosquelette des cellules et la matrice extracellulaire (MEC). Ces réseaux structurés de protéines fibreuses se comportent mécaniquement comme des réseaux de polymères et ce sont eux qui confèrent aux tissus leur rigidité. Les principaux composants de ces structures sont les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires pour le cytosquelette des cellules, ainsi que des protéines fibreuses comme le collagène et l'élastine pour la MEC [3].

### Généralités sur la physique des réseaux de polymères

Dans une solution de polymères, les chaînes s'entrecroisent entre elles à une distance caractéristique qui dépend des propriétés intrinsèques des chaînes et de leur concentration [38]. Si ces points de croisement entre les chaînes correspondent à des liaisons chimiques, le réseau polymère est dit réticulé et forme un élastomère qui se comporte de manière pure-

ment élastique. En revanche, si les points de croisement sont liés à des interactions physiques, comme l'auto-évitement, le réseau présentera des propriétés viscoélastiques. Un tel réseau se comporte comme un solide à court terme, car les chaînes n'ont pas le temps de se déplacer les unes par rapport aux autres, mais il présente des propriétés visqueuses à long terme, car les chaînes peuvent se déplacer et "s'écouler" sous l'effet de contraintes prolongées. Ce comportement est décrit par le modèle de reptation proposé par De Gennes [39], où les chaînes polymères se déplacent comme des serpents à travers le réseau en raison des contraintes topologiques imposées par les autres chaînes. Il est à noter que les systèmes actifs vivants autorisent des régimes hybrides entre réticulé et auto-évitant par l'action de protéines du cytosquelette, en déplaçant des contacts ou en relâchant des contraintes d'évitement.

Dans le cas des réseaux réticulés, l'élasticité peut avoir deux origines physiques différentes, selon la relation entre la longueur de persistance,  $l_p$ , des chaînes, et la distance moyenne entre les points d'ancrage (ou points de réticulation)<sup>2</sup>.

- **Réseaux entropiques**[40] : Si la longueur de persistance  $l_p$  est faible par rapport à la distance entre les points d'ancrage, les segments de chaîne entre les réticulations se comportent comme des chaînes flexibles. Lorsqu'on étire le réseau, on allonge ces segments, ce qui réduit le nombre de configurations possibles pour les chaînes et diminue leur entropie. La résistance à la déformation est donc principalement d'origine entropique : le réseau oppose une force pour retrouver son état de plus haute entropie. Ce régime permet des déformations élastiques importantes, comme on peut l'observer dans des matériaux hautement déformables tels que le caoutchouc, où la souplesse des chaînes moléculaires permet une extensibilité remarquable.
- **Réseaux enthalpiques**[41] : À l'inverse, lorsque la longueur de persistance est supérieure à la distance entre les points d'ancrage, les segments de chaîne se comportent comme des tiges rigides. Dans ce cas, la déformation du réseau implique la flexion ou le flambage de ces segments rigides et s'accompagne donc d'un coût énergétique d'origine enthalpique. Ici, l'élasticité découle donc directement des propriétés intrinsèques des filaments. Ces réseaux sont plus résistants aux déformations, mais leur plage de déformation élastique est beaucoup plus restreinte.

---

2. La longueur de persistance est une mesure de la rigidité des chaînes polymères, représentant la longueur sur laquelle la chaîne conserve une direction donnée avant de se courber significativement sous l'agitation thermique.

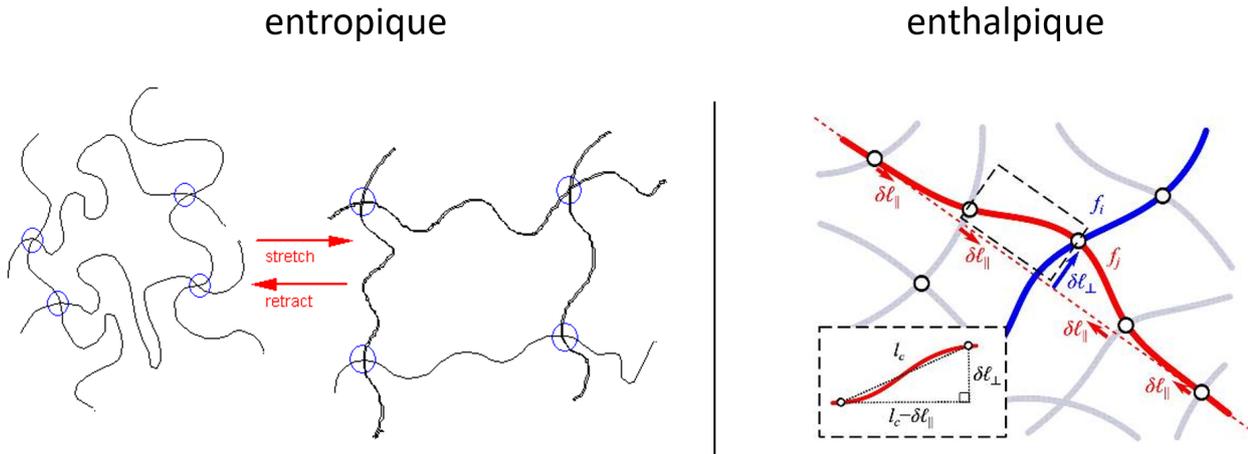


FIGURE 1.9 – Illustration des modèles entropique et enthalpique d'un réseau de polymères. Dans le modèle entropique, l'élasticité résulte de la diminution des fluctuations thermiques des polymères induite par la déformation, limitant le nombre de microétats disponibles pour chaque filament. Ce mécanisme fait émerger une élasticité. En revanche, dans le modèle enthalpique, l'élasticité provient directement de la rigidité intrinsèque des filaments. Sous déformation, ces polymères rigides se courbent et s'étirent, générant une réponse élastique.

Ainsi, les réseaux entropiques sont capables de se déformer de manière importante tout en revenant à leur état initial une fois la force retirée. Cela est notamment le cas des filaments intermédiaires du fait de leur structure souple et de leur faible longueur de persistance par rapport à la distance entre les points d'ancrage.

En revanche, les réseaux enthalpiques, comme ceux formés par les filaments d'actine, sont beaucoup plus rigides, mais ne peuvent pas beaucoup se déformer sans rompre. Ce sont donc leurs contributions qui vont dominer la plupart du temps dans l'élasticité des cellules.

Ces deux mécanismes, entropique et enthalpique, conduisent à des comportements mécaniques non linéaires, particulièrement visibles dans la dissymétrie entre les réponses à la compression et à l'étirement [42]. Sous étirement, les réseaux entropiques montrent un renforcement progressif à mesure que les fluctuations thermiques sont supprimées, tandis que les réseaux enthalpiques résistent directement aux déformations mécaniques. Néanmoins, sur certaines plages étendues de contraintes, ces réseaux peuvent être approximés par un modèle d'élasticité linéaire, dans lequel la réponse mécanique reste proportionnelle aux forces appliquées.

Sur des durées de sollicitation plus longues, si le réseau n'est pas réticulé, on peut définir une viscosité en considérant des modèles de réorganisation du polymère élémentaire dans le réseau [43]. Dans le cas de gel de collagène, il a été établi que des liaisons de fortes énergies coexistaient avec d'autres de faibles énergies, autorisant des réorganisations microscopiques.

Plus irréversible encore, il est possible d'envisager le glissement des chaînes les unes par rapport aux autres ou la rupture de certains points d'ancrage conduisant à une déformation viscoélastique qui s'accompagne d'une dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Ce comportement viscoélastique est responsable d'une partie des propriétés visqueuses des tissus.

## Le cytosquelette

Le cytosquelette, qui constitue le principal contributeur à la mécanique cellulaire [37], est formé de trois classes de filaments protéiques : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Chacun de ces filaments joue un rôle spécifique dans la régulation des propriétés mécaniques de la cellule, et leur contribution à l'élasticité varie en fonction de leurs propriétés intrinsèques de flexibilité et de l'interconnexion dans les réseaux qu'ils forment. Leur rigidité est souvent quantifiée via leur longueur de persistance  $l_p$ .

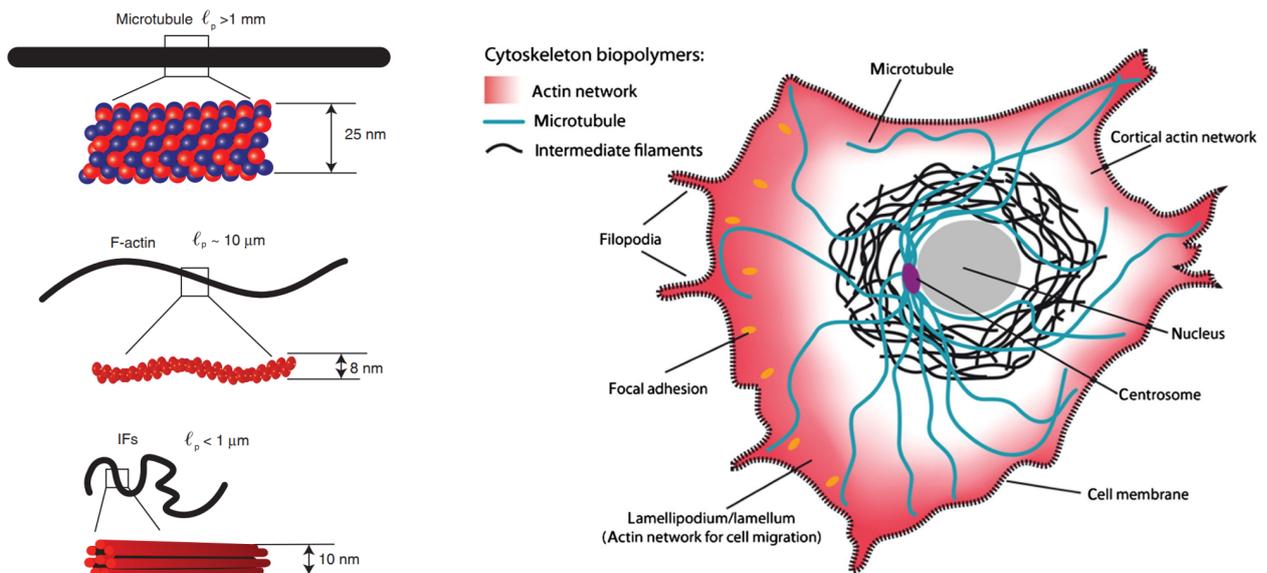


FIGURE 1.10 – Rigidité et structure des différents filaments du cytosquelette : les microtubules (MTs), les filaments d'actine (F-actine) et les filaments intermédiaires (IFs) [44] [45]

### - LES FILAMENTS D'ACTINES (F-ACTIN)

Les filaments d'actine sont des polymères semi-flexibles, avec une longueur de persistance de quelques microns ( $l_p \approx 10\mu\text{m}$ ). Ils jouent un rôle prépondérant dans la mécanique cellulaire, contribuant de manière significative à l'élasticité et à la contractilité de la cellule [3]. Les filaments d'actine forment des réseaux très interconnectés par des protéines de liaison telles que la filamine, l'alpha-actinine et la spectrine, et sont associés à des moteurs moléculaires

comme la myosine II, qui génèrent des forces contractiles [37]. L'élasticité du réseau d'actine est donc le plus souvent d'origine enthalpique, résultant de la flexion et de l'étirement des filaments semi-rigides.

Cependant, l'élasticité des cellules ne résulte pas uniquement des propriétés mécaniques individuelles des filaments d'actine, mais aussi de la manière dont ces filaments sont organisés en réseaux tridimensionnels complexes (cf. figure 1.11). Ces réseaux peuvent adopter différentes architectures, telles que les faisceaux parallèles dans les microvillosités, les réseaux en gel isotrope dans le cortex cellulaire ou les réseaux dendritiques dans les lamellipodes, permettant à la cellule de résister à divers types de stress mécaniques [37].

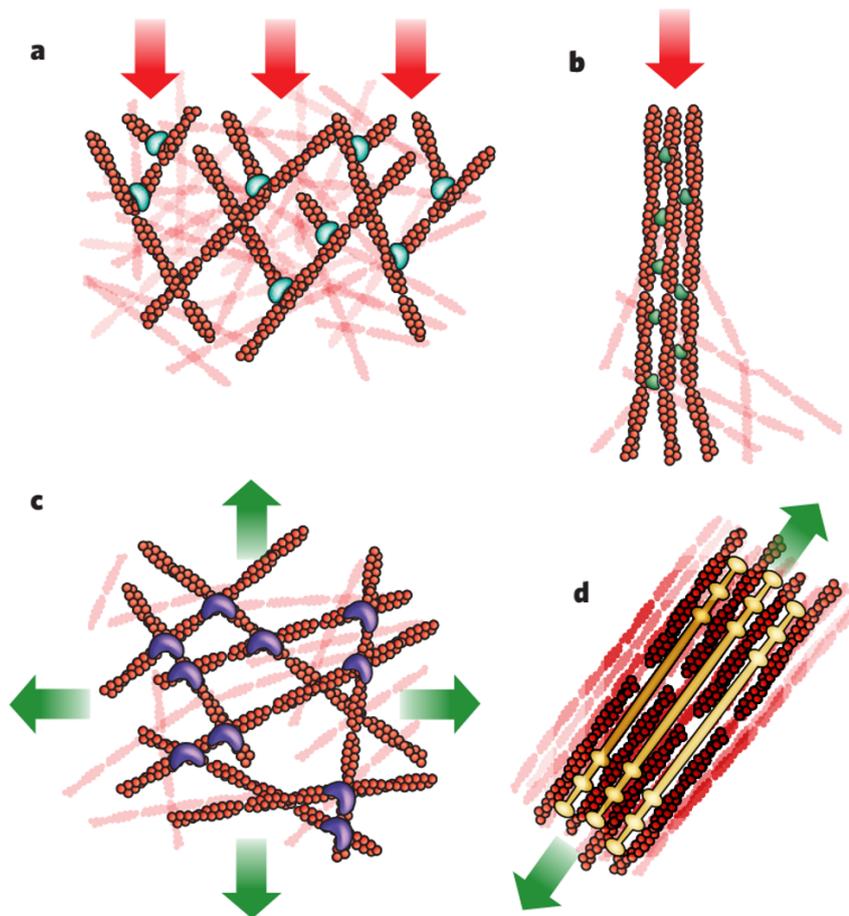


FIGURE 1.11 – Illustration de différentes structures du réseau d'actine. Le cytosquelette adopte des architectures variées pour mieux résister à différents types de stress auxquels ces structures sont soumises. (flèches rouges : compression ; flèches vertes : tension) [37]

Sous des forces prolongées, les réseaux de fibres d'actine réorganisent leur structure, contribuant ainsi à un relâchement visqueux. Ces réorganisations peuvent venir de plusieurs phénomènes dynamiques. La rupture et la reformation des points d'ancrage, la polymérisation et la dépolymérisation des filaments, les glissements et frottements des fibres entre elles,

sont autant de phénomènes qui, sous une charge constante, participent à une déformation qui évolue dans le temps et donc à une viscoélasticité. Par exemple, les protéines de liaison dynamiques, comme la filamine ou l'alpha-actinine, peuvent se détacher et se rattacher en réponse à des forces appliquées, ce qui permet au réseau de se remodeler et d'adopter de nouvelles configurations sous tension. Ce comportement induit une dissipation d'énergie et une réponse retardée aux déformations, caractéristiques d'un matériau viscoélastique.

#### LES MICROTUBULES

Les microtubules sont les plus rigides des trois filaments, avec une longueur de persistance ( $l_p$ ) de l'ordre du millimètre. Cependant, leur contribution directe à l'élasticité globale de la cellule est relativement limitée, car ils ne forment pas des réseaux aussi interconnectés que les autres filaments. Dans les cellules, les microtubules sont souvent associés à la résistance aux forces de traction internes, au maintien de la forme cellulaire et participent également activement à des processus comme la division cellulaire [46].

#### LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES (IFs)

Les filaments intermédiaires (FI), tels que la vimentine, les kératines ou la desmine, constituent la dernière des trois principales classes de filaments du cytosquelette. Ils ont une longueur de persistance de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, ce qui les rend plus flexibles que les microtubules ou les filaments d'actine [47]. Cette flexibilité exceptionnelle leur permet de résister à de grandes déformations sans rupture, les rendant particulièrement adaptés à de fortes déformations des cellules. Par exemple, des études récentes ont montré que le réseau de vimentine autour du noyau agit comme une cage mécanique qui amortit les forces extérieures et protège le noyau contre les déformations irréversibles, notamment lors de la migration cellulaire à travers des espaces confinés [48].

Les IFs forment des réseaux tridimensionnels dynamiques qui s'adaptent aux besoins mécaniques de la cellule. Ce réseau est particulièrement résistant à la déformation. En effet, de récents travaux ont montré que les filaments intermédiaires peuvent s'étirer jusqu'à 300 % de leur longueur initiale sans rupture [49].

Contrairement aux réseaux de filaments d'actine, qui présentent une élasticité élevée mais une capacité limitée d'étirement avant rupture, les réseaux de FI ont une élasticité relativement faible mais peuvent absorber de grandes déformations mécaniques de manière élastique. Cela explique pourquoi les filaments intermédiaires, comme la vimentine, sont particulièrement adaptés pour protéger les cellules contre des forces mécaniques importantes,

en amortissant les chocs et en permettant à la cellule de se déformer sans subir de dommages permanents. Cette flexibilité est essentielle dans les tissus soumis à des contraintes prolongées ou à des déformations importantes, comme dans le cas des cellules migrantes ou de celles soumises à des forces de cisaillement [48].

Ainsi, les filaments intermédiaires jouent un rôle crucial dans la mécanique cellulaire en conférant aux cellules une résistance mécanique et une flexibilité indispensables pour leur survie et leur fonction dans des environnements mécaniquement exigeants.

## La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe et dynamique de macromolécules sécrétées par les cellules, qui fournit un support structural essentiel et joue un rôle clé dans les propriétés viscoélastiques des tissus [50]. Elle est constituée principalement de protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine, ainsi que de glycosaminoglycanes (GAGs) et de protéoglycanes. Ces composants interagissent pour conférer aux tissus leurs caractéristiques mécaniques uniques, notamment en termes d'élasticité et de résistance aux forces mécaniques externes.

### LE COLLAGÈNE

Le collagène est la protéine la plus abondante de la MEC et représente l'un des principaux ingrédients de la résistance mécanique des tissus conjonctifs. Il forme des fibrilles rigides qui apportent une grande résistance aux forces de traction [51]. Il existe au moins 28 types de collagène différents [52], mais le collagène de type I est le plus courant dans les tissus conjonctifs tels que la peau, les os, les tendons et les ligaments. Les fibrilles de collagène s'assemblent en fibres plus grandes [53] lesquelles établissent des réseaux stabilisés par des liaisons covalentes. Ces liaisons croisées, comme mentionné précédemment, renforcent la rigidité du réseau. Leur nombre augmente avec l'âge, ce qui peut provoquer une rigidification des tissus [54].

### L'ÉLASTINE

L'élastine est une protéine qui confère à certains tissus la capacité de récupérer leur forme initiale après déformation intense. Elle est particulièrement abondante dans les tissus qui subissent d'importantes déformations répétées, comme les poumons, les vaisseaux sanguins et la peau [55]. Les fibres d'élastine peuvent s'étirer jusqu'à 150 % de leur longueur au repos et revenir à leur état initial, conférant aux tissus une élasticité remarquable.

En résumé, les propriétés viscoélastiques des tissus biologiques résultent de ces différents composants (tant intracellulaires qu'extracellulaires) et de leurs interactions.

#### 1.3.2 Émergence d'un comportement fluide à l'échelle du tissu

L'élasticité et une partie de la viscoélasticité des tissus biologiques trouvent leur origine directement dans les propriétés des cellules et la matrice extracellulaire. Cependant, sur des périodes encore plus prolongées, certains tissus présentent des comportements plus singuliers, comparables à celui d'un fluide, marqué par des réarrangements cellulaires. Ce comportement mécanique est essentiel dans de nombreux processus biologiques, et son origine est multifactorielle.

##### Comportement fluide et origine de la viscosité

Dans les fluides, les réarrangements spatiaux des molécules sous l'effet d'une contrainte se traduisent par une réorganisation microscopique et un écoulement à l'échelle macroscopique. De manière similaire, ce sont les réarrangements des cellules à l'intérieur d'un tissu qui lui confèrent des propriétés fluides. La viscosité se définit comme la constante de proportionnalité reliant la contrainte appliquée au taux de déformation observé. Ainsi, plus les interactions microscopiques sont fortes, plus la déformation du fluide est faible et plus la viscosité est importante. Le modèle classique permettant de relier la viscosité à ces interactions microscopiques est plutôt relié à la barrière d'activation nécessaire à casser la liaison entre deux molécules en interaction dans le fluide. Il a été développé par Eyring et prédit une dépendance exponentielle selon cette énergie d'activation (et inversement proportionnelle en température, selon une loi de type Arrhenius [56]). L'agitation thermique tend à abaisser les barrières d'activation à la réorganisation du fluide, et donc plus la température augmente, plus les réarrangements moléculaires sont facilités et la viscosité diminue.

La transposition de cette proposition à un tissu suppose de définir l'origine des interactions entre les cellules, qui correspond à l'adhérence cellule/cellule ou cellule/matrice. Cependant, les cellules ne sont pas des objets à l'équilibre thermodynamique, et la dynamique d'association/dissociation des interactions est un phénomène impliquant la réponse du cytosquelette. Il n'existe d'ailleurs pas, à notre connaissance, de modèle permettant de relier les propriétés microscopiques d'interactions à l'échelle de la cellule à la viscosité macroscopique du tissu.

Quoi qu'il en soit, il existe plusieurs mécanismes d'adhésion entre cellules. La principale de ces interactions est la jonction adhérente, qui met en jeu des protéines transmembranaires, telles que les cadhérines. Les cadhérines forment des complexes moléculaires qui lient les membranes cellulaires adjacentes, jouant un rôle fondamental dans la cohésion tissulaire. Il existe également d'autres types de jonctions pouvant jouer sur cette cohésion, comme illustré dans la figure 1.12.

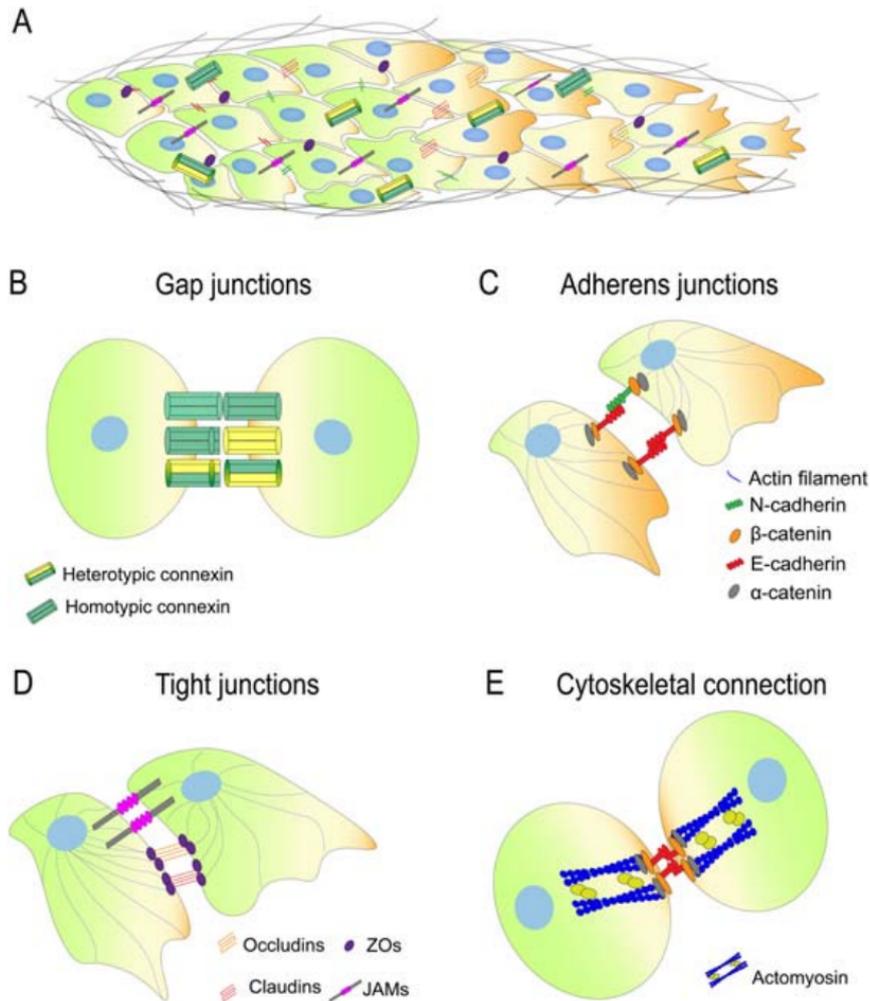


FIGURE 1.12 – Illustration des différents types de jonctions entre cellules et leurs composants. Figure issue de [57]

Dans un tissu biologique, l'agitation ou l'activité des cellules pourrait être considérée comme une sorte de "température effective". Cette activité cellulaire, de migration, de contraction, de croissance, de division ou de mort, agirait sur les réarrangements cellulaires à la manière dont l'agitation thermique agit sur les molécules dans un fluide.

C'est une des idées qu'il y a derrière la transition de blocage évoquée précédemment. Ce

concept, emprunté à la physique des matériaux granulaires et des verres, décrit la transition d'un système désordonné d'un état fluide à un état solide lorsque certains paramètres critiques sont atteints, tels que la densité ou les interactions entre les constituants.

Dans le contexte des tissus biologiques, la transition de blocage se produit lorsque les cellules, initialement capables de se réarranger et de se déplacer librement les unes par rapport aux autres, deviennent bloquées dans une configuration où les mouvements individuels sont restreints. Cette transition est gouvernée par plusieurs paramètres comme la densité cellulaire, l'adhésion intercellulaire et l'activité cellulaire [29].

#### **Tension de surface des tissus**

À l'instar des liquides, les tissus possèdent également une tension de surface. Ce concept a été introduit pour la première fois par Malcolm Steinberg dans les années 1960. Il a observé qu'après une dissection, les tissus se remodelaient spontanément pour adopter une forme sphérique, de manière similaire à un fluide sous l'effet de sa tension de surface [58].

Steinberg a démontré que, tout comme l'affinité entre les molécules d'un fluide conduit à l'apparition de la tension de surface, c'est l'affinité entre les cellules qui génère à l'échelle du tissu une tension de surface. Il a pu vérifier ceci en mesurant cette tension sur des agrégats cellulaires grâce à un tensiomètre à faces parallèles (nous expliquons son fonctionnement dans la section 1.4.3). En réalisant des modifications génétiques sur des cellules afin qu'elles expriment différents niveaux de cadhérines (principales protéines impliquées dans les jonctions cellulaires), il a observé que la tension de surface était directement proportionnelle à la densité de cadhérines présentes sur les membranes des cellules. Ces résultats sont illustrés sur la figure 1.13.

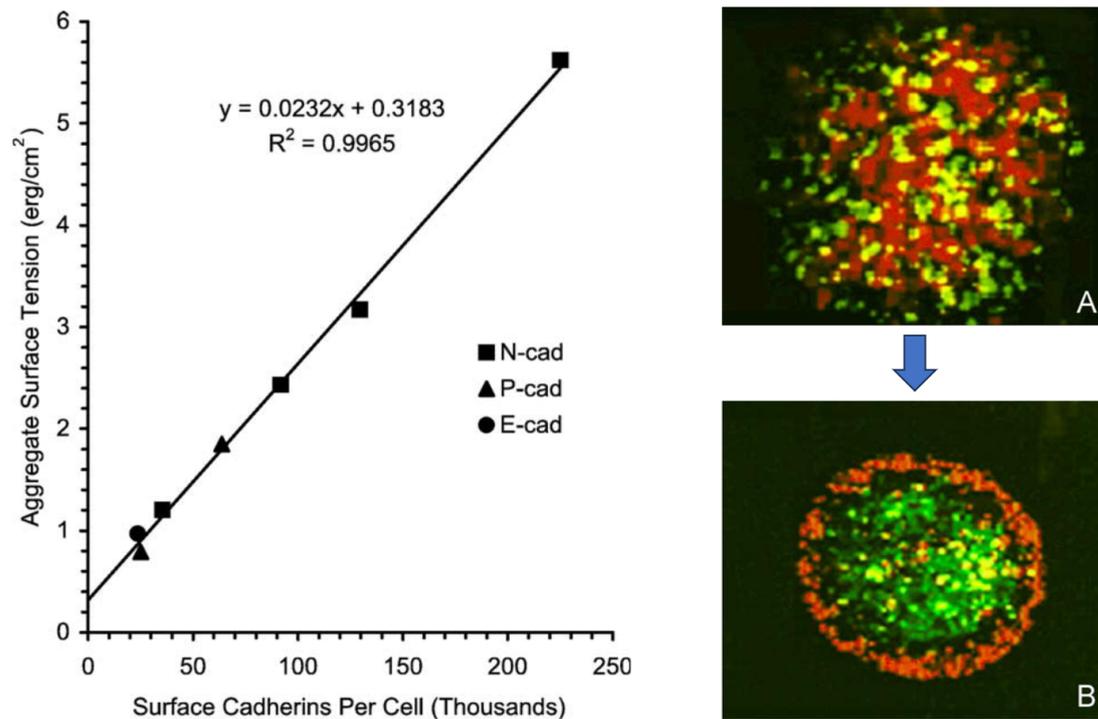


FIGURE 1.13 – Relation entre le niveau d'expression des cadhérines (chez des lignées cellulaires génétiquement modifiées à cet effet) et la tension de surface des agrégats. Images de microscopie confocale d'un agrégat formé à partir de deux lignées cellulaires exprimant les cadhérines à des niveaux différents (ratio de 2,4 :1). (A) Image après 4 heures d'incubation, montrant le mélange initial des cellules. (B) Image après 24 heures d'incubation. Comme le prévoit le modèle de l'adhésion différentielle (DAH), la lignée cellulaire exprimant un niveau plus faible de cadhérines (en rouge) enveloppe la lignée exprimant une plus grande quantité de cadhérines (en vert). Figure adaptée de [59]

Ces résultats l'ont amené à développer l'hypothèse d'adhésion différentielle (Differential Adhesion Hypothesis, DAH) [59], qui permet d'expliquer comment les cellules s'organisent et interagissent dans un tissu en fonction de leurs propriétés d'adhésion. Notamment, il a montré que dans un agrégat cellulaire composé de deux types cellulaires différents, les cellules avec des énergies d'adhésion plus fortes forment des structures plus cohésives et tendent à se regrouper au centre de l'agrégat, tandis que les cellules ayant des énergies d'adhésion plus faibles migrent vers la surface.

Cependant, l'hypothèse de Steinberg a suscité des débats et a conduit à l'émergence d'autres théories. L'hypothèse de contraction différentielle de la surface (Differential Surface Contraction Hypothesis, DSCH) propose que la tension de surface est principalement due à la contractilité du cortex cellulaire, générée par l'action de l'actomyosine dans la couche corticale sous la membrane plasmique [60]. Selon cette hypothèse, les cellules avec une plus grande contractilité minimisent leur surface exposée, influençant ainsi la tension de surface du tissu.

Pour concilier ces points de vue, l'hypothèse de tension interfaciale différentielle (DITH) combine les effets de l'adhésion cellulaire et de la contractilité corticale [61]. Dans ce cadre, des modèles théoriques tels que le modèle de Lisa Manning (à base de vertex) ont été développés pour décrire quantitativement le lien entre la tension de surface, l'adhésion cellulaire et la tension corticale [62].

Puisque les tissus se comportent comme des fluides possédant une tension de surface, il est possible de retrouver certains résultats de matière molle sur le mouillage. De telles expériences ont été menées, montrant que les agrégats cellulaires se comportent de manière similaire aux gouttes liquides sur des surfaces. Lorsqu'un agrégat cellulaire est déposé sur un substrat, son étalement dépend de l'équilibre entre l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-substrat, analogue au mouillage d'un liquide sur une surface solide [63].

Si l'adhésion cellule-substrat est supérieure à l'adhésion cellule-cellule, l'agrégat s'étale sur le substrat, illustrant un mouillage complet. Inversement, si l'adhésion cellule-cellule prédomine, l'agrégat conserve une forme sphérique, démontrant un mouillage partiel avec un angle de contact défini.

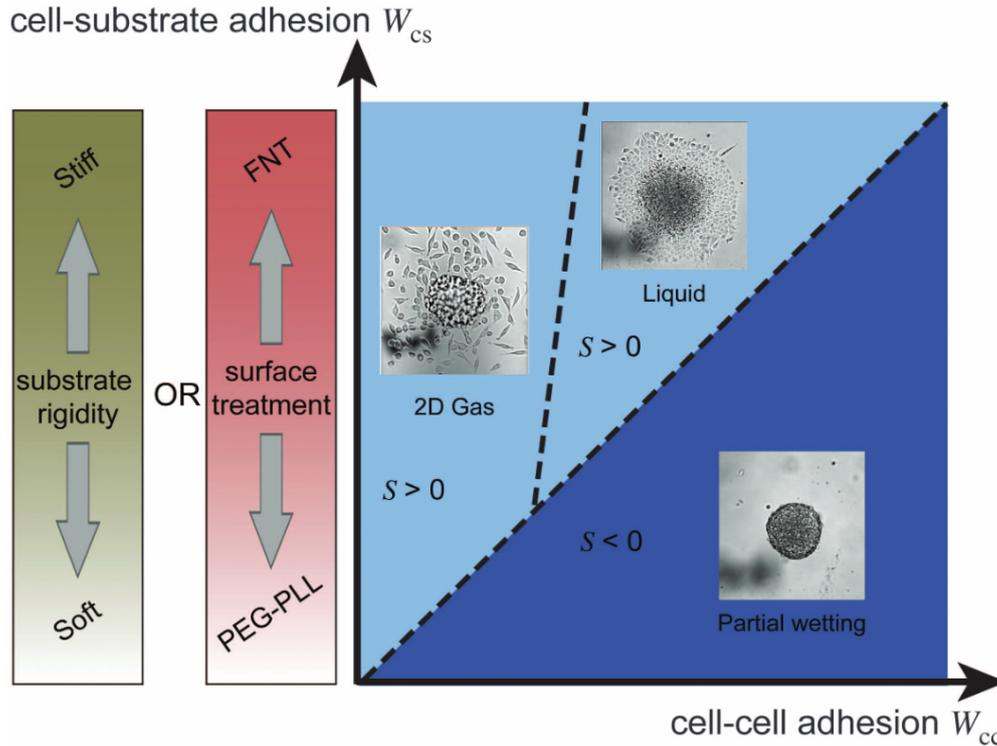


FIGURE 1.14 – Diagramme de phase issu d’expérience de mouillage de sphéroïde sur des surface plus ou moins affines avec les cellules. Le comportement de l’agrégat est déterminé par la compétition entre l’énergie d’adhésion cellule-substrat et l’énergie d’adhésion cellule-cellule. Figure adaptée de [64]

Cette compréhension est essentielle pour expliquer des phénomènes biologiques tels que la morphogenèse embryonnaire, où les différences de tension de surface dirigent le mouvement et l’organisation des cellules, ou encore la progression tumorale, où des modifications de l’adhésion et de la contractilité cellulaires peuvent faciliter l’invasion des tissus environnants.

### 1.3.3 Rôle de l’eau : Porosité, Poroélasticité et Compressibilité des Tissus

Nous avons précédemment examiné les différents constituants responsables du comportement viscoélastique des tissus, mettant en évidence la complexité de leur composition et de leurs propriétés mécaniques. Cependant, un élément majeur reste à considérer : **l’eau**. En effet, l’eau est le principal composant du vivant, et les tissus en contiennent généralement plus de 75 %.

La présence de cette grande quantité d’eau, libre de circuler dans les espaces intercellulaires et à travers les membranes cellulaires, joue un rôle crucial dans les propriétés méca-

niques des tissus. En effet, les tissus sont des matériaux poreux saturés de fluide et, de ce fait, ils peuvent présenter des comportements de type **poroélastique**.

La **poroélasticité** décrit le couplage entre la déformation de la matrice solide du tissu et le mouvement du fluide interstitiel à travers ses pores. Nous reviendrons en détail sur cette notion, qui est au cœur du chapitre 3, mais lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée, la résistance au flux du fluide à travers le réseau poreux influence la réponse mécanique du tissu. Un exemple typique de tissu poroélastique est le **cartilage**, principalement composé de matrice saturée en eau [65]. La compression du squelette mécanique du tissu diminue l'espace accessible à l'eau, ce qui va se traduire par son évacuation selon une cinétique lente définie par les propriétés poreuses du tissu. La poroélasticité joue alors un rôle essentiel dans l'amortissement des chocs et la distribution des charges dans les articulations. La caractérisation de la poroélasticité des tissus est donc cruciale pour comprendre leur comportement mécanique, mais encore peu d'études ont été menées sur ce sujet [66]. On peut même faire l'hypothèse que négliger les effets poroélastiques peut induire des biais dans l'interprétation des résultats d'expérience de manipulation mécanique où on agit sur un tissu avec la pression, comme nous le ferons avec l'AMP.

Par ailleurs, la porosité des tissus est étroitement liée à une autre propriété mécanique que nous n'avons pas encore discutée : la **compressibilité**. En effet, la capacité des pores à se remplir ou se vider d'eau confère aux tissus des propriétés compressibles. Dans le cadre de l'élasticité linéaire, la compressibilité est reliée au **coefficient de Poisson**, qui exprime le rapport entre les déformations transversales et longitudinales sous une contrainte uniaxiale. Pour un matériau parfaitement incompressible, en supposant invariance du volume, on déduit que le coefficient vaut  $1/2$ . L'hypothèse que les tissus biologiques sont incompressibles est souvent avancée sans aucune justification préalable ; elle est pourtant souvent fautive car les tissus biologiques présentent des coefficients de Poisson inférieurs, reflétant ainsi leur compressibilité intrinsèque [67].

## 1.4 Techniques expérimentales de mesure des propriétés mécaniques des tissus et de leurs composants

Il existe un large spectre de techniques permettant de sonder les propriétés mécaniques des tissus et de leurs constituants. Chaque technique offre un accès spécifique à certains paramètres viscoélastiques en fonction du type de contrainte appliquée et de la dynamique du système. Cependant, on peut tout de même différencier ces techniques selon plusieurs grands critères :

- **L'échelle sollicitée** : Ces méthodes permettent des mesures allant de la molécule unique sur des fibres du cytosquelette ou de la matrice, jusqu'à des mesures globales sur des échantillons macroscopique comme des organes entiers.
- **La gamme de rigidité mesurable** : Chaque méthode a une fenêtre de rigidité qu'elle permet de sonder. Pour être efficace, la contrainte appliquée doit être de l'ordre de grandeur du module de Young de l'échantillon. La génération de contraintes élevées est donc nécessaire pour les échantillons rigides, mais cela s'accompagne généralement d'une faible sensibilité qui impacte les mesures sur des échantillons plus mous.
- **Le caractère invasif ou non invasif** : Certaines méthodes peuvent être qualifiées de non invasives, car elles permettent de mesurer des propriétés mécaniques, sans perturber ni détruire significativement l'échantillon. Ceci permet de réaliser des mesures sur des échantillons vivants au fil du temps, sans affecter leur comportement cellulaire ou tissulaire.

### 1.4.1 Méthodes expérimentales de caractérisation mécanique à l'échelle subcellulaire et cellulaire

La caractérisation des propriétés mécaniques à l'échelle subcellulaire et cellulaire est essentielle pour comprendre les mécanismes fondamentaux qui gouvernent le comportement des cellules et de leurs structures internes. De nombreuses techniques ont été développées afin de mesurer ces propriétés sur des objets biologiques à ces échelles.

## Les pinces optiques

Les pinces optiques (ou « optical tweezers ») sont un outil puissant permettant de manipuler et d'exercer des forces sur des objets microscopiques en utilisant la lumière. Le principe de base repose sur le fait que les photons qui composent un rayon lumineux possèdent une certaine quantité de mouvement. De manière simplifiée, lorsqu'un faisceau laser est concentré sur un objet sphérique qui réfracte la lumière, il crée un "piège lumineux". Si cette particule s'éloigne légèrement du centre du faisceau, la lumière subit une réfraction en passant à travers elle comme illustré sur la figure 1.15. Cette réfraction génère une force de rappel la ramenant au foyer, permettant une manipulation tridimensionnelle précise [68].

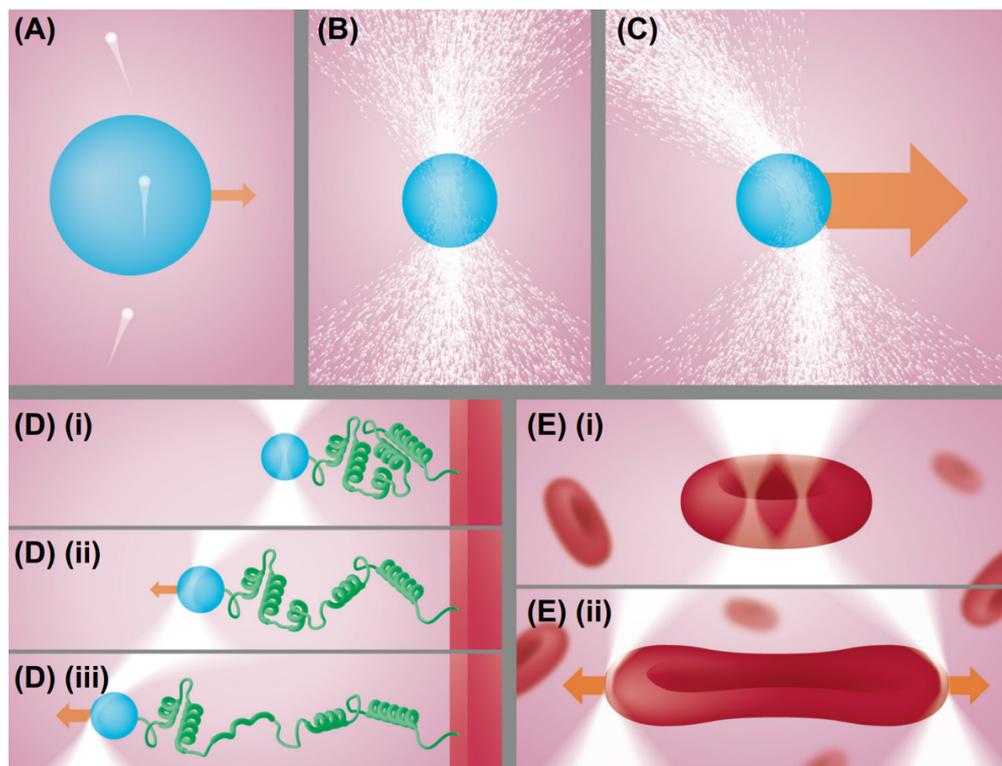


FIGURE 1.15 – (A-C) Schéma montrant des photons (blanc) traversant une particule sphérique (bleue). En entrant et en sortant de la particule, la direction et la quantité de mouvement du photon changent. La différence de quantité de mouvement est transférée à la particule, générant ainsi une force  $F$  (flèche orange). (D) Schéma d'une protéine attachée à une particule contrôlée par une pince optique. La force croissante des pinces optiques provoque un dépliement de la protéine. (E) Schéma de deux pièges optiques maintenant et étirant un globule rouge et permettant une mesure de sa viscoélasticité. Figure issue de [69]

Ces pinces peuvent générer des forces de l'ordre du piconewton, idéales pour manipuler des molécules biologiques telles que des protéines ou de l'ADN, mais également des cellules. Elles ont révolutionné la biophysique en permettant l'étude en temps réel de processus

mécaniques à l'échelle moléculaire, comme le dépliement des protéines, les interactions ADN-protéines et les mouvements des moteurs moléculaires [70] [71]. Il est également possible de réaliser un double piège optique pour étirer des cellules [72]. Cette technique permet d'évaluer les propriétés viscoélastiques des cellules individuelles sans contact mécanique direct.

Cette technique possède l'avantage d'être très précise, avec une résolution nanométrique et des forces de l'ordre du piconewton. Elle permet une manipulation "sans contact" et peut être combinée avec d'autres techniques, notamment de microscopie.

Au-delà de sa complexité et de son coût important, cette technique souffre de limitations, notamment sur les forces qu'elle peut générer :  $\sim 100$  pN, insuffisantes pour certaines applications. De plus, elle peut générer des dommages (phototoxicité ou thermiques) empêchant son utilisation sur certains échantillons sensibles.

### **Les pinces magnétiques**

Les pinces magnétiques utilisent non pas la lumière, mais un champ magnétique pour appliquer des forces sur des particules magnétiques fixées à des biomolécules ou structures cellulaires. Grâce à des aimants, il est possible de contrôler non seulement la position, mais aussi l'orientation de ces microbilles [73]. Ceci permet notamment d'appliquer des contraintes de torsion à des objets biologiques.

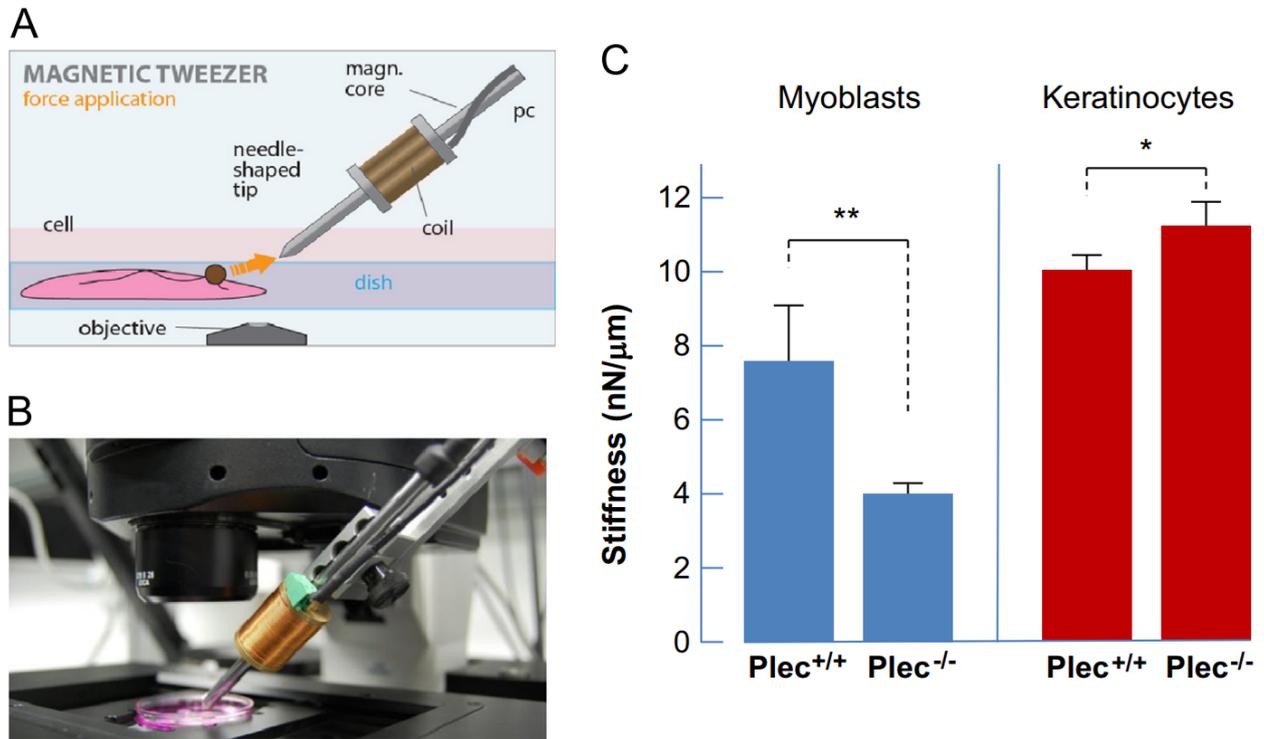


FIGURE 1.16 – Schéma (A) et image (B) du dispositif de pinces magnétiques. Un gradient de champ magnétique est généré par un solénoïde en forme d'aiguille fixé à un micromanipulateur. La force de gradient produite par les pinces magnétiques agit sur des billes paramagnétiques recouvertes de fibronectine. (C) Mesure de la rigidité cellulaire de myoblastes et de kératinocytes et influence de la plectine (protéine qui sert de lien entre les trois principaux composants du cytosquelette : actines, microtubules et filaments intermédiaires). Figure issue de [74].

Elles peuvent générer des forces élevées, jusqu'à **plusieurs nanonewtons**, ce qui les rend particulièrement adaptées à l'étude de phénomènes nécessitant des forces importantes comme sonder la rigidité des cellules ou de la matrice extracellulaire[74][75]. Par exemple, elles ont été utilisées pour appliquer des torsions à une molécule individuelle d'ADN, permettant d'étudier les superenroulements et les transitions de structure de l'ADN [76].

Les pinces magnétiques offrent l'avantage d'être moins coûteuses et moins complexes à mettre en place que les pinces optiques, mais également à éviter les dommages photo-induits sur des échantillons sensibles. Cependant, elles offrent une résolution spatiale et temporelle inférieure à celle des pinces optiques.

## Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de microscopie à sonde locale qui permet de sonder la surface des échantillons avec une résolution nanométrique [77]. Elle utilise une pointe fine montée sur un levier flexible (cantilever) pour interagir avec la surface de l'échantillon. Initialement développée pour la cartographie de surface à très haute résolution, l'AFM permet également de réaliser des expériences d'indentation. Son développement et son utilisation en biologie ont connu une très forte croissance depuis sa création et ses applications sont très variées [78]. En mode de nano-indentation, l'AFM applique une force contrôlée sur la surface de la cellule ou du tissu en enfonçant la pointe dans l'échantillon, ce qui permet de mesurer la rigidité locale et les propriétés viscoélastiques [79].

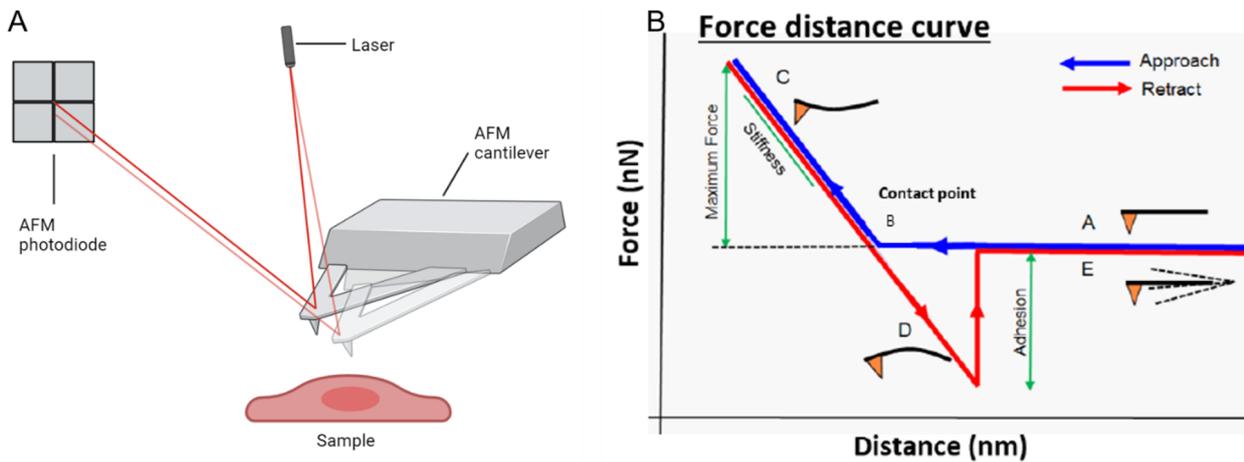


FIGURE 1.17 – Schéma et principe du microscope à force atomique. (A) Le laser est réfléchi sur l'arrière du cantilever et renvoyé sur une photodiode. Lorsque le levier est attiré ou repoussé par l'échantillon, il se déforme dans une direction ou une autre, modifiant ainsi la position du laser sur la photodiode. (B) Exemple d'une courbe typique force-distance. La courbe bleue représente la phase d'approche, tandis que la courbe rouge représente la phase de rétractation. La pointe se rapproche de la surface de l'échantillon (A), entre en contact avec l'échantillon (B) jusqu'à atteindre la force définie par l'utilisateur (C), fournissant des informations sur la rigidité de l'échantillon. Ensuite, la pointe se rétracte de l'échantillon jusqu'à se détacher complètement (D), ce qui donne des informations sur la force d'adhésion de l'échantillon. Enfin, la pointe retourne à sa hauteur initiale (E).

L'AFM peut détecter des forces allant de **quelques piconewtons à des nanonewtons**, ce qui la rend adaptée à l'étude de structures biologiques à différentes échelles. Elle a été utilisée pour caractériser la rigidité de la membrane plasmique, les propriétés mécaniques du cytosquelette et la viscoélasticité des cellules. Cross et al. ont notamment montré que les cellules cancéreuses ont tendance à être plus souples que les cellules saines [80].

Cependant, l'AFM présente certaines limitations. Tout d'abord, sa capacité de sonde est principalement limitée à la surface de l'échantillon, restreignant ainsi son utilisation pour l'analyse des structures internes des cellules. De plus, les interactions entre la pointe et l'échantillon peuvent introduire des artefacts, en particulier lorsque la pointe endommage ou modifie la surface de l'échantillon, ce qui peut affecter la précision des mesures. L'AFM est sensible aux vibrations et aux conditions environnementales pouvant perturber les mesures et réduire la reproductibilité des résultats.

### Micropipette et techniques microfluidiques

Nous reviendrons plus en détail sur la microfluidique et l'aspiration par micropipette qui sont au cœur de ma thèse, mais nous évoquons ici leur application sur la mesure des propriétés mécaniques de cellules uniques.

Les expériences d'aspiration par micropipette (AMP) sur des cellules uniques sont une technique classique pour mesurer les propriétés mécaniques comme la tension corticale et les propriétés viscoélastiques [81]. Dans cette méthode, une cellule est partiellement aspirée dans une micropipette en appliquant une pression négative contrôlée. La déformation de la cellule en fonction de la pression appliquée et du temps permet de déduire des paramètres mécaniques tels que la tension de surface et la viscosité des cellules.

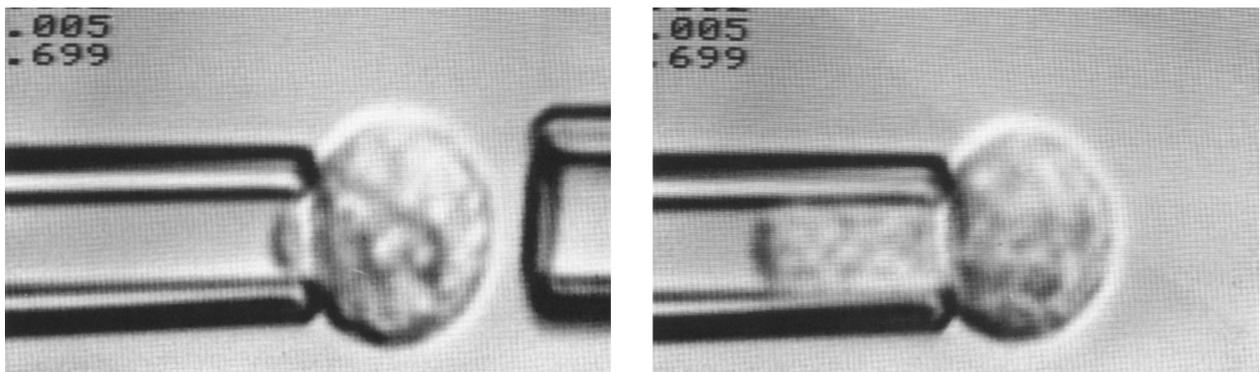


FIGURE 1.18 – Image d'un granulocyte sanguin aspiré dans une micropipette de  $3,5 \mu\text{m}$  de diamètre. En dessous de la pression critique due à la tension corticale, on observe une calotte hémisphérique, sans écoulement supplémentaire. Au-dessus de cette pression, on observe un écoulement de la cellule permettant de quantifier sa viscoélasticité. Figure issue de [81].

Ce type de contrainte et de déformation peut être reproduit à l'aide de dispositifs microfluidiques. La microfluidique exploite la manipulation de fluides à l'échelle micrométrique. Cette technologie offre des moyens d'étudier les propriétés mécaniques des cellules et des

structures subcellulaires tout en proposant un contrôle très fin de l'environnement physico-chimique des échantillons. Cette technique offre la possibilité de manipuler des cellules individuelles et d'étudier leurs propriétés mécaniques en leur appliquant des stress hydrodynamiques ou mécaniques via des canaux de dimensions contrôlées. Il existe un très grand nombre de techniques basées sur la microfluidique qui permettent de mesurer les propriétés mécaniques des cellules.

Un des grands avantages que propose ces dispositifs est d'offrir une analyse à haut débit sur un grand nombre de cellules. On peut citer les travaux de Jochen Guck [82] ou de Lydia Sohn [83] qui ont développé des dispositifs qui mesurent la déformabilité de plusieurs centaines de cellules par seconde grâce au temps de transit des cellules à travers des constriction microscopiques. Ces techniques, bien que moins quantitatives pour l'évaluation des propriétés mécaniques absolues, permettent de distinguer différentes populations cellulaires, comme les cellules cancéreuses et normales, en se basant sur leurs comportements mécaniques.

### **Autres techniques et limitation de l'étude de cellule unique**

Il existe également des techniques basées sur la microrhéologie passive, qui permettent d'étudier les propriétés mécaniques des cellules et de leur environnement sans appliquer de force externe. Cette méthode repose sur l'observation des mouvements browniens de particules sondes introduites dans l'échantillon. L'analyse de la fonction de déplacement quadratique moyen (Mean Square Displacement, MSD) de ces particules permet de caractériser la viscosité, l'élasticité et l'activité locales du milieu [84]. La microrhéologie passive est particulièrement avantageuse pour son caractère non invasif, sa haute résolution spatiale, et son application à des systèmes biologiques complexes tels que les cellules vivantes.

Cette liste de techniques est non exhaustive et d'autres techniques existent, permettant de mesurer des propriétés mécaniques à ces échelles. Parmi celles-ci, on peut citer la spectroscopie de force acoustique, qui utilise des ondes acoustiques pour exercer des forces sur des cellules ou des biomolécules [85] [86]. Il existe également des techniques permettant de quantifier les forces exercées par les cellules sur leur environnement comme la microscopie de force de traction (Traction Force Microscopy, TFM) [87] ou les matrices de micropiliers (Micropost arrays) [88].

Toutes ces techniques permettent de mesurer, de manière isolée, le comportement mécanique des constituants de base des cellules et des tissus. Ces études fournissent des informations précieuses et indispensables pour comprendre les propriétés mécaniques des éléments

constitutifs des tissus biologiques. Cependant, la complexité mécanique qui émerge à l'échelle des tissus diffère de celle observée à l'échelle cellulaire. Par exemple, l'élasticité d'une cellule individuelle peut être très différente de celle du tissu qu'elle compose, en raison des interactions collectives et des réarrangements cellulaires dynamiques qui confèrent au tissu des propriétés mécaniques uniques, telles que le comportement fluide ou viscoélastique. Par conséquent, d'autres techniques ont été développées pour sonder spécifiquement le comportement mécanique à l'échelle des tissus, afin de mieux comprendre ces phénomènes émergents.

De plus, ces études permettent de dépasser certaines limites inhérentes aux techniques précédemment mentionnées. En effet, dans ces approches, les cellules ou les structures sub-cellulaires sont souvent manipulées dans des conditions éloignées de leur environnement physiologique. Si l'on prend l'exemple de l'AMP sur cellule unique, hormis pour des cellules de tissus liquides comme le sang ou la lymphe, leur état en suspension est assez éloigné de leur état *in-vivo*. Cette perturbation peut être à l'origine de forts changements entre leurs propriétés mécaniques mesurées dans ces conditions et leurs propriétés *in vivo*.

Ainsi, comme nous allons le voir par la suite, il existe également des techniques capables de sonder les propriétés rhéologiques de tissus issus de véritables organismes ou sur des modèles *in vitro* plus proches des réalités physiologiques.

### 1.4.2 Modèles *in vitro* de tissus 3D

Que ce soit pour l'étude des tissus 2D ou 3D, il est nécessaire de développer des modèles *in vitro* qui se rapprochent davantage de la complexité physiologique des tissus réels. En effet, des modèles plus complexes, par rapport aux cultures cellulaires classiques, permettent de mieux reproduire les conditions biologiques réelles. Pour les tissus tridimensionnels, des modèles comme les sphéroïdes sont particulièrement intéressants, car ils reproduisent plus fidèlement l'architecture volumique et les interactions cellulaires. De la même manière, les modèles 2D, notamment pour les épithéliums, jouent un rôle essentiel dans l'étude des interfaces tissulaires, avec des avantages spécifiques pour certaines applications. Ainsi, la création de modèles *in vitro* adaptés à la structure du tissu étudié présente un grand avantage pour étudier leurs propriétés mécaniques de manière plus pertinente.

Les sphéroïdes sont des agrégats cellulaires sphériques formés par auto-assemblage de cellules en culture. Ils constituent l'un des modèles 3D les plus simples et les plus utilisés pour étudier les propriétés mécaniques des tissus [89]. Les sphéroïdes offrent un modèle plus fidèle des interactions cellule-cellule et cellule-matrice, permettant ainsi d'étudier les propriétés

mécaniques dans un contexte plus pertinent. Ils peuvent être cultivés à partir de nombreuses lignées cellulaires différentes, notamment des cellules cancéreuses.

Il existe de nombreuses méthodes permettant de fabriquer ce type d'objet, comme on peut le voir sur la figure 1.19.

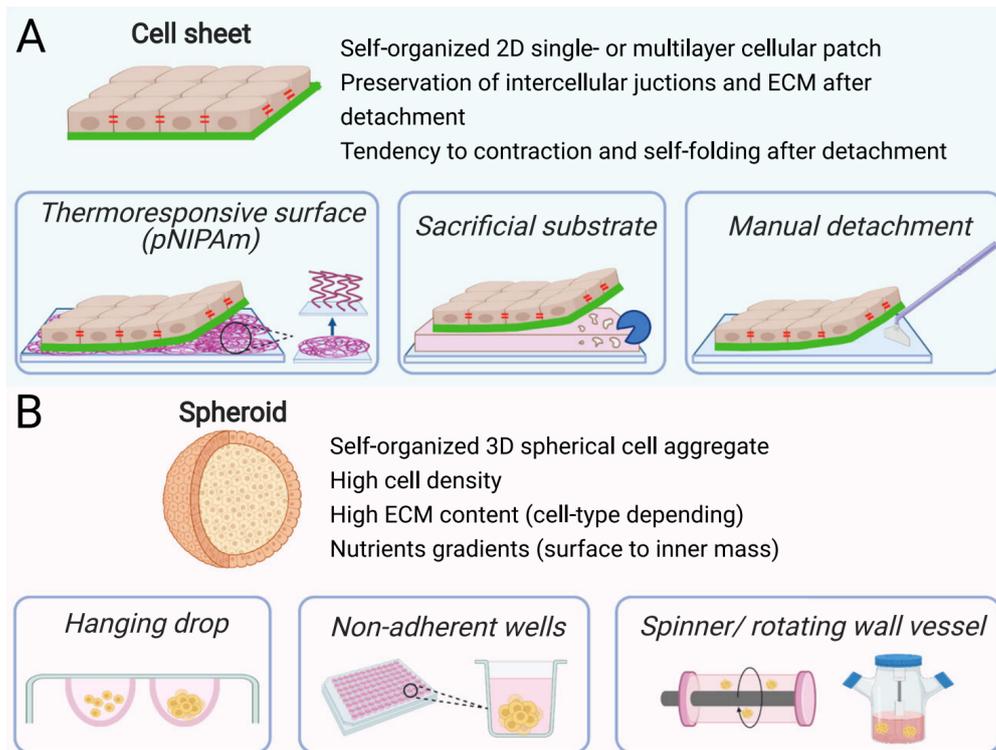


FIGURE 1.19 – Illustration des techniques couramment utilisées pour générer des feuillets cellulaires (A) et des sphéroïdes (B). Dans la technique de la goutte pendante et des puits à faible adhérence, les cellules s'agrègent entre elles sous l'effet de la gravité. Figure issue de [90]

Cependant, les sphéroïdes présentent aussi certaines limitations inhérentes à leur structure tridimensionnelle. Un des principaux inconvénients réside dans la formation de gradients de nutriments, notamment d'oxygène, entre la périphérie et le centre. En raison de la diffusion limitée de l'oxygène à travers le sphéroïde, seules les cellules en périphérie reçoivent une quantité suffisante de nutriments pour maintenir leur division et leur activité métabolique. Au-delà d'une certaine taille, généralement de 100 à 200 microns, le cœur du sphéroïde devient hypoxique, ce qui conduit à la mort cellulaire et à la formation d'un noyau nécrotique. L'évolution de ces différents paramètres physiologiques est résumée sur la figure 1.20.

Ce phénomène de nécrose centrale peut être une limite pour l'étude de certains processus biologiques, car il ne reflète pas toujours les conditions physiologiques réelles des tissus bien

vascularisés, où l'apport en oxygène est mieux régulé.

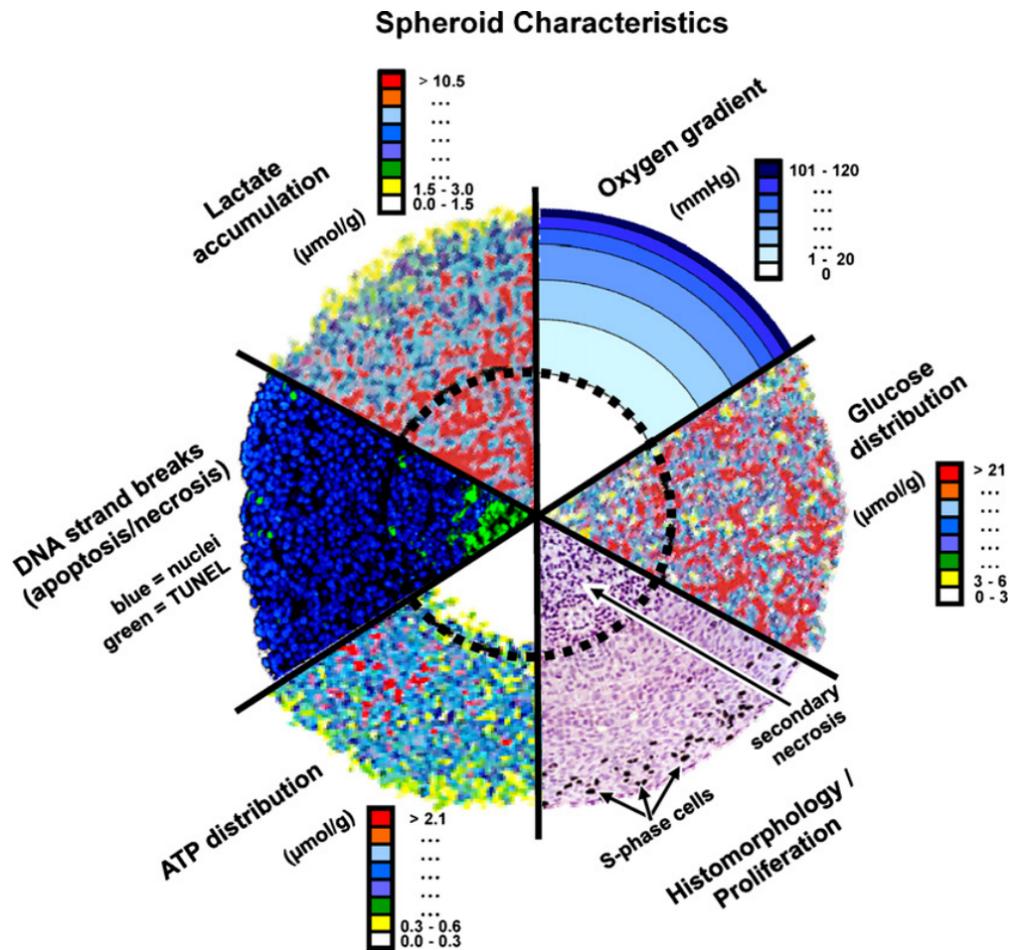


FIGURE 1.20 – Illustration de l'évolution de l'environnement cellulaire à l'intérieur d'un sphéroïde. Figure issue de [91]

En conséquence, bien que les sphéroïdes soient utiles pour modéliser un tissu 3D, il faut être vigilant à travailler avec des objets de taille appropriée. En effet, à mesure que les sphéroïdes grossissent, leur hétérogénéité interne augmente en raison des gradients de nutriments et d'oxygène. Cette hétérogénéité peut conduire à des mesures mécaniques biaisées, car les propriétés mécaniques à la périphérie, où les cellules sont en pleine prolifération, diffèrent de celles au centre, où les cellules peuvent être en état d'hypoxie ou nécrosées. Il est donc crucial de tenir compte de ces limitations pour obtenir des résultats mécaniques pertinents et représentatifs des tissus vivants.

### 1.4.3 Techniques pour caractériser les tissus 3D

Il existe de nombreuses méthodes permettant de caractériser les propriétés mécaniques des tissus 3D, notamment sur les modèles décrits précédemment, tels que les sphéroïdes. Certaines de ces techniques sont communes à celles évoquées précédemment pour l'échelle cellulaire, comme la microscopie à force atomique (AFM) ou l'aspiration par micropipette. La figure 1.21 illustre quelques-unes de ces méthodes. Dans cette section, nous présenterons une sélection non exhaustive des techniques les plus couramment utilisées, en soulignant leurs avantages et leurs inconvénients pour l'étude des propriétés mécaniques des tissus tridimensionnels.

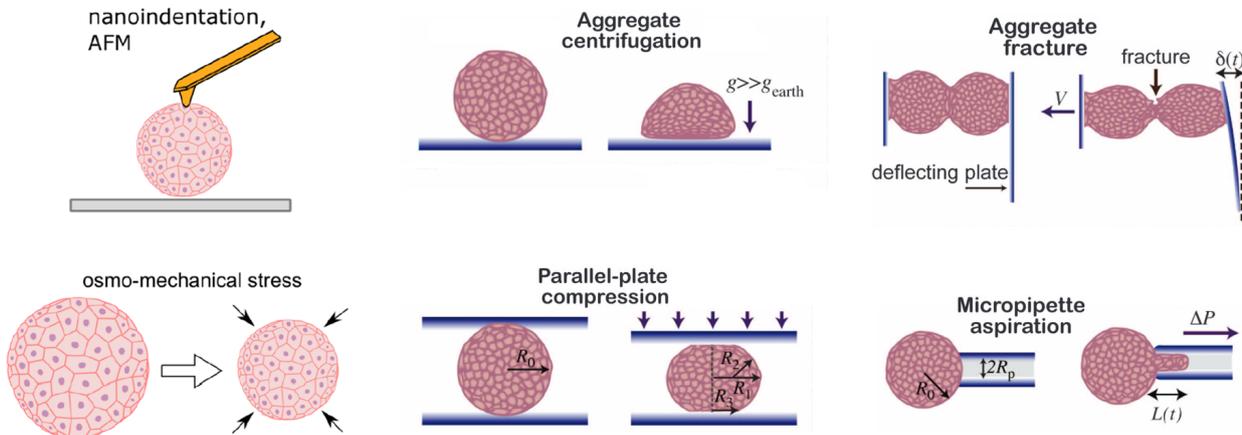


FIGURE 1.21 – Illustration de différentes techniques de mesure biomécanique sur des sphéroïdes [64] [90]

#### Compression par choc osmotique

La compression par choc osmotique repose sur l'application d'une pression, générée par l'ajout d'un osmolyte dans le milieu environnant, à l'échelle du sphéroïde entier, avec des dextrans qui ne pénètrent pas dans le sphéroïde (150 kDa). Cette pression provoque une compression de la structure 3D, notamment en comprimant la matrice extracellulaire [92]. Grâce à cette technique, il est possible de mesurer la réponse mécanique du sphéroïde en fonction de la pression appliquée et de déterminer des paramètres tels que le module de compression [93].

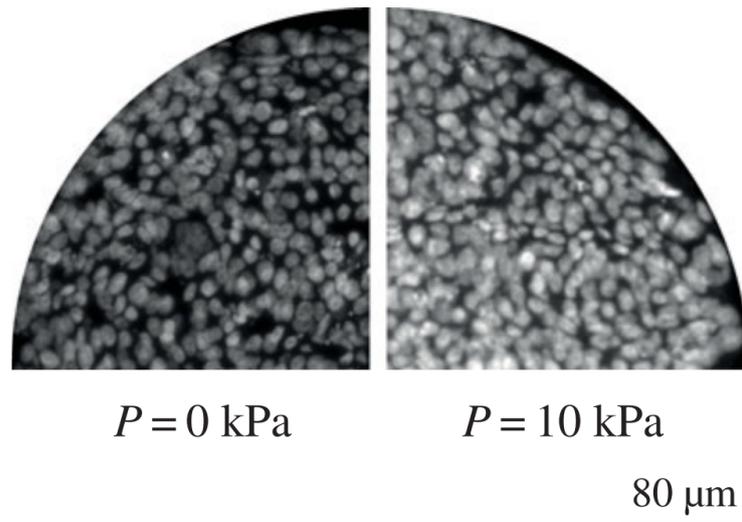


FIGURE 1.22 – Image de coupes transversales de sphéroïdes montrant les noyaux cellulaires, sans pression externe (à gauche) et sous pression osmotique de 10 kPa (à droite). On remarque l’augmentation de la densité cellulaire due à cette compression. Figure adaptée de [93].

La technique du choc osmotique permet d’appliquer des stress allant de quelques centaines de pascals à plusieurs dizaines de kilopascals, selon la concentration d’osmolyte. Cette méthode met en évidence la compressibilité des tissus en mesurant les variations de volume sous pression (cf. figure 1.22), permettant ainsi de déterminer des paramètres mécaniques clés, tels que le module de compression.

### Compression entre plaques parallèles

La compression par plaques parallèles, initialement développée par Steinberg *et al.* [94], pour mesurer la tension de surface des agrégats cellulaires, consiste à placer des sphéroïdes ou tissus entre deux plaques rigides et à appliquer une force de compression contrôlée. En mesurant les angles de contact et la forme de l’agrégat à l’équilibre (comme illustré sur la figure 1.23), il est possible de déterminer la tension de surface du tissu. Cette méthode a permis des mesures précises de la tension de surface sur une grande variété de tissus, révélant une hétérogénéité notable, avec des valeurs allant de 1 mN/m à plus de 100 mN/m pour certains tissus, tels que les tissus musculaires. La compression par plaques parallèles repose sur l’analogie entre les tissus biologiques et les liquides, où la tension de surface gouverne la forme et la stabilité des agrégats sous contrainte.

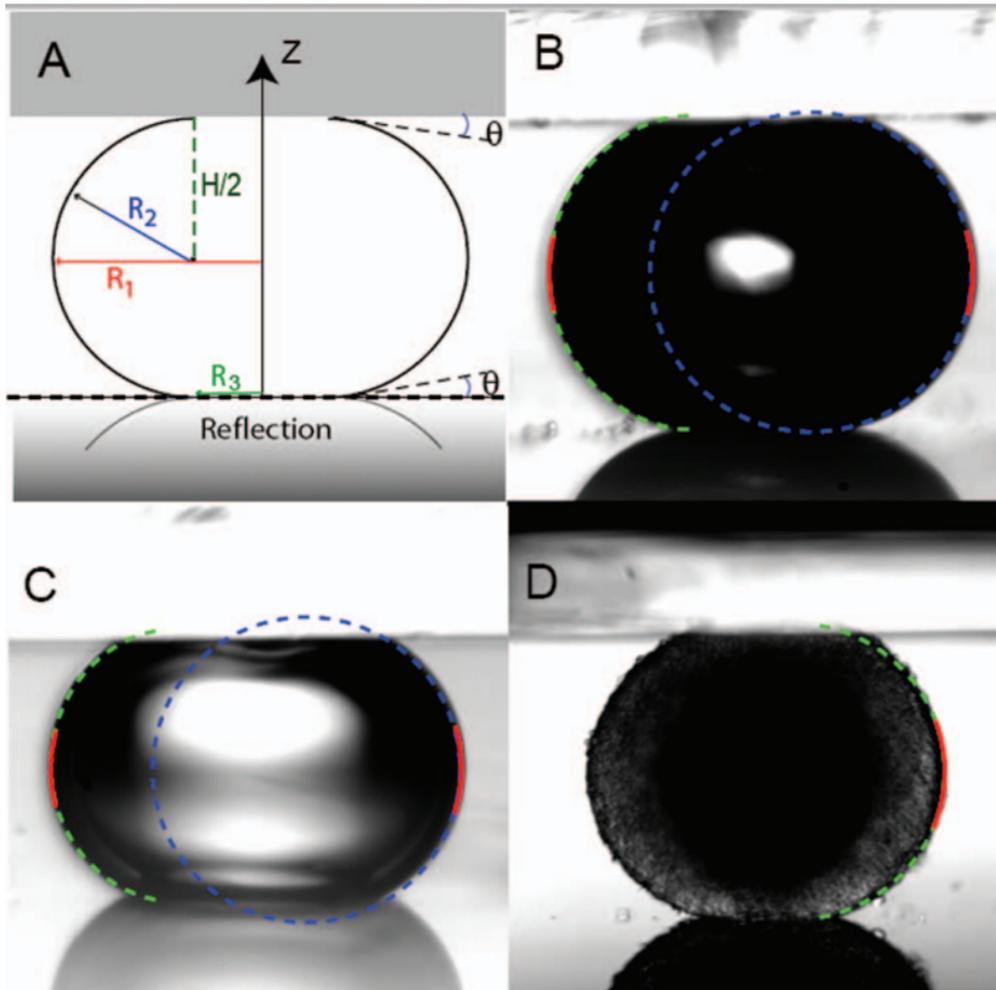


FIGURE 1.23 – (A) Schéma d'une goutte liquide comprimée entre deux plaques parallèles avec un angle de contact. (B) Bulle d'air dans un milieu de culture, (C) gouttelette d'eau dans de l'huile minérale, et (D) agrégat de cellules embryonnaires de souris dans un milieu de culture. Figure adaptée de [95].

La technique permet également d'évaluer les propriétés viscoélastiques des sphéroïdes. Sous compression soudaine, la déformation transitoire jusqu'à l'état d'équilibre permet de sonder les propriétés viscoélastiques de l'agrégat. En termes de plage de contraintes, cette technique permet d'appliquer des stress mécaniques allant de 100 Pa à plusieurs kPa. La principale difficulté de la compression par plaques parallèles réside dans la quantification précise de la forme du sphéroïde à l'équilibre, notamment la mesure exacte de l'angle de contact. De plus, il est essentiel de s'assurer que les cellules n'adhèrent pas aux plaques de compression, afin de maintenir des conditions "non-mouillage".

### Centrifugation et déformation par champs magnétiques

La technique de centrifugation consiste à soumettre des agrégats cellulaires à une force centrifuge [21] [96]. En variant la vitesse de rotation, il est possible d'appliquer des contraintes plus ou moins importantes. En analysant la forme finale de l'agrégat après un temps donné, on peut remonter à la tension de surface des agrégats et à certaines propriétés viscoélastiques. L'avantage principal de cette technique est sa simplicité de mise en œuvre ainsi que la possibilité de sonder simultanément plusieurs échantillons. Elle permet des mesures relativement précises avec une large gamme de forces appliquées. Cependant, il est complexe de quantifier précisément la forme finale du sphéroïde.

La technique de déformation par champs magnétiques est similaire à la centrifugation en termes de contraintes subies par les agrégats. En utilisant des nanoparticules magnétiques incorporées dans les cellules [97], cette méthode permet d'appliquer une contrainte semblable à celle induite par une gravité intense via un gradient de champ magnétique [98]. Cette approche offre l'avantage d'un contrôle dynamique de la contrainte, grâce à l'utilisation d'électroaimants, et constitue un outil puissant pour l'étude des propriétés viscoélastiques à différentes échelles temporelles [99].

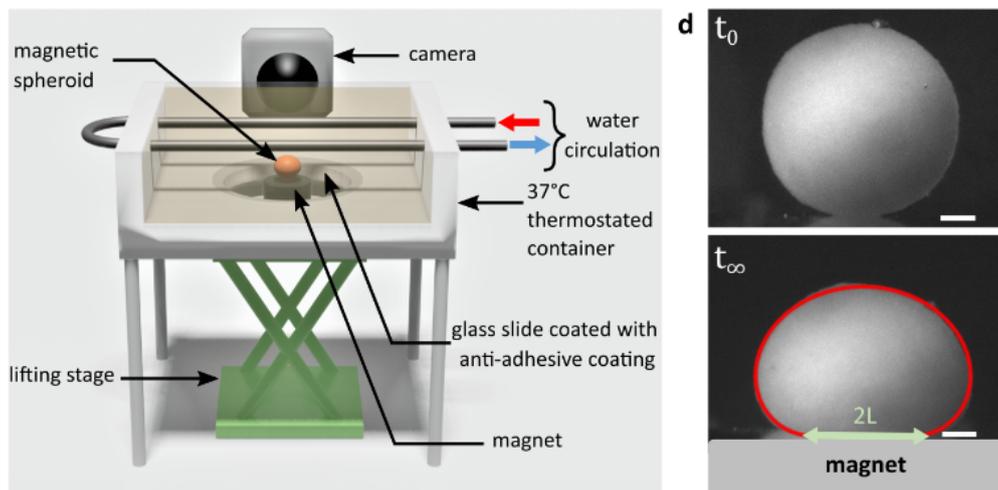


FIGURE 1.24 – Schéma du dispositif du tensiomètre à force magnétique. Images représentatives des profils de sphéroïdes avant l'approche de l'aimant et sous aplatissement magnétique une fois que la forme d'équilibre est atteinte. Figure adaptée de [98].

### Coalescence de sphéroïdes

De la même manière que deux gouttes de liquide fusionnent sous l'effet de leur tension de surface, deux agrégats cellulaires, lorsqu'ils sont mis en contact, coalescent jusqu'à n'en

former plus qu'un [100]. En étudiant la dynamique de cette fusion, il est possible de déduire le rapport entre la tension de surface et la viscosité des agrégats [101].

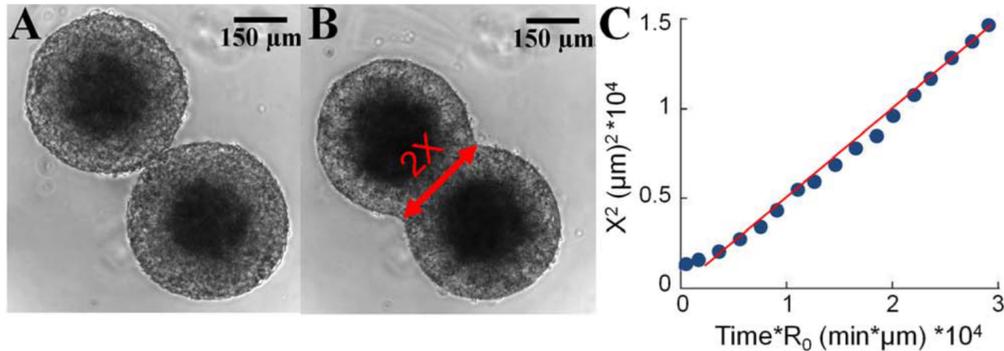


FIGURE 1.25 – Images de deux agrégats cellulaires en cours de fusion. La grandeur  $X^2$  (en rouge) évolue de manière linéaire en fonction du temps au début de la fusion, et cette pente permet d'accéder au rapport entre la tension de surface et la viscosité du tissu. Figure adaptée de [102]

Cette technique est simple à mettre en œuvre, mais elle ne permet d'accéder qu'à ce rapport, sans pouvoir discriminer les deux paramètres individuellement.

### Microscopie Brillouin

La microscopie Brillouin est une technique optique non invasive qui permet de sonder les propriétés mécaniques des tissus biologiques à l'échelle microscopique. Elle repose sur l'interaction de la lumière avec des ondes acoustiques présentes dans le matériau. Cette interaction entraîne un déplacement spectral de la lumière qui dépend des propriétés élastiques du matériau [103].

Cette méthode offre une résolution tridimensionnelle micrométrique et ne nécessite aucun contact physique avec l'échantillon, ce qui la rend particulièrement adaptée à l'étude des tissus vivants et sensibles. La microscopie Brillouin a été appliquée avec succès pour cartographier les variations de rigidité mécanique à l'échelle de la cellule ou du tissu [104] [105].

Cependant, l'interprétation quantitative des mesures Brillouin peut être complexe en raison de la dépendance aux propriétés optiques du tissu et de la nécessité de modèles théoriques appropriés. De plus, la technique nécessite un équipement assez complexe.

## Méthodes d'évaluation des propriétés mécaniques à l'échelle des organes

L'élastographie par résonance magnétique (ERM) est une technique d'imagerie non invasive qui permet de mesurer de manière semi-quantitative la rigidité des tissus en visualisant la propagation d'ondes de cisaillement mécaniques à travers le tissu [106]. En synchronisant l'application de vibrations mécaniques à basse fréquence avec l'acquisition d'images par résonance magnétique, il est possible de reconstruire des cartes élastographiques qui représentent les propriétés mécaniques locales. L'ERM est largement utilisée en clinique pour diagnostiquer des pathologies associées à des modifications de la rigidité tissulaire, comme les maladies hépatiques, les tumeurs ou les atteintes musculaires. Elle permet de sonder des tissus internes inaccessibles par d'autres techniques, mais sa résolution spatiale est de l'ordre du millimètre.

Une autre méthode pour mesurer les propriétés mécaniques à l'échelle des organes est l'élastographie ultrasonore [107]. Cette technique utilise des ondes ultrasonores pour évaluer la rigidité des tissus en mesurant leurs déformations, offrant une méthode non invasive adaptée à l'analyse des tissus mous.

### Aspiration par micropipette (AMP)

De la même manière qu'à l'échelle cellulaire, l'aspiration par micropipette permet de caractériser les propriétés mécaniques des tissus [108]. C'est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour étudier les propriétés viscoélastiques des sphéroïdes, en raison de sa simplicité de mise en œuvre et de sa capacité à mesurer un large éventail de paramètres mécaniques. Cette méthode est au cœur de nos travaux, et sa présentation détaillée sera faite dans le chapitre suivant. En résumé, elle consiste à appliquer une succion contrôlée avec une micropipette et à mesurer les déformations qui en résultent, comme illustré sur la figure 1.26.

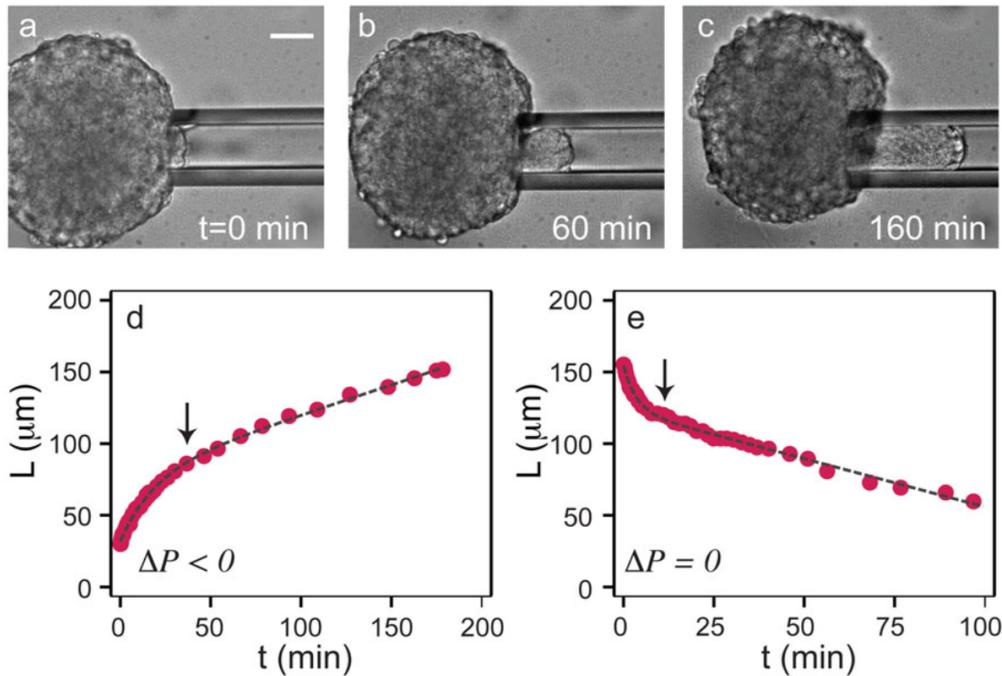


FIGURE 1.26 – Aspiration par micropipette d’agrégats cellulaires sphériques. Figure adaptée de [108]

La force de l’aspiration par micropipette réside dans la simplicité avec laquelle elle permet de mesurer les déformations, en comparaison avec des techniques plus complexes comme la compression entre plaques parallèles ou la centrifugation. Cette simplicité permet d’explorer différentes échelles temporelles de déformation, ce qui facilite la caractérisation complète des paramètres viscoélastiques des tissus étudiés. Grâce à la précision des systèmes de contrôle de pression et d’imagerie, cette méthode se révèle extrêmement sensible, permettant une caractérisation de la plupart des types de tissus (100 Pa jusqu’à plus de 10 kPa).

## 1.5 Positionnement de l'étude et objectifs

Dans ce premier chapitre, nous avons mis en évidence la complexité des propriétés mécaniques des tissus biologiques et leurs rôles fondamentaux dans un grand nombre de processus biologiques. L'étude de ces propriétés et de leurs implications est un défi essentiel pour la compréhension de certaines pathologies et pour le développement de l'ingénierie tissulaire.

Nous avons également passé en revue un grand nombre de techniques expérimentales utilisées pour caractériser le comportement mécanique des tissus et de leurs constituants. Cependant, étant donné la diversité des propriétés à étudier—qu'il s'agisse des propriétés élastiques, viscoélastiques, fluides, de la tension de surface ou de la poroélasticité des tissus—it est très complexe de caractériser l'ensemble des aspects mécaniques d'un tissu à l'aide d'une seule méthode.

Parmi les techniques de caractérisation existantes, l'**aspiration par micropipette** se distingue par sa capacité à mesurer de manière assez complète les propriétés viscoélastiques et la tension de surface des tissus, tout en étant relativement simple à mettre en œuvre. Cependant, malgré ses avantages, l'AMP traditionnelle présente certaines limitations. Elle est généralement réalisée sur un échantillon à la fois, ce qui limite le débit expérimental et rend difficile l'obtention de données statistiques robustes, indispensables au vu de l'hétérogénéité intrinsèque des objets biologiques. De plus, le contrôle de l'environnement expérimental et la manipulation d'objets biologiques peuvent s'avérer complexes en pratique.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons cherché à améliorer cette méthode en exploitant les possibilités offertes par la **microfluidique**. La microfluidique permet un contrôle précis de l'environnement expérimental à l'échelle micrométrique, s'adapte particulièrement bien à la manipulation d'objets biologiques de petite taille et offre la possibilité de réaliser des mesures en parallèle. Notre objectif était donc de développer une puce microfluidique capable de réaliser plusieurs AMP simultanément, afin d'augmenter la reproductibilité et le débit expérimental de cette méthode.

D'autres travaux récents se sont concentrés sur la reproduction de l'AMP dans des systèmes microfluidiques [109] montrant l'intérêt important de tels dispositifs. Cependant, ces systèmes montrent quelques inconvénients liés aux contraintes imposées par les méthodes de fabrication traditionnelles des puces microfluidiques (pipettes à section carrée, défaut d'alignement).

L'objectif de nos travaux a donc été de développer une puce microfluidique, basée sur une approche originale, permettant de paralléliser un grand nombre d'AMP simultanément. Cela nous a permis de tirer pleinement parti des avantages de la microfluidique, notamment un contrôle dynamique précis de la pression d'aspiration. Grâce à cela, nous avons pu développer de nouvelles méthodes pour explorer plus finement les propriétés viscoélastiques des tissus. Cette étude nous a conduits à réévaluer certains aspects de la mécanique des tissus. En particulier, nous avons constaté l'importance de la **poroélasticité** dans les mesures réalisées par AMP. Le mouvement du fluide interstitiel à travers les pores du tissu peut influencer la réponse mécanique observée lors de l'aspiration et doit donc être pris en compte pour une interprétation précise des données. La prise en compte de la poroélasticité nous a permis d'affiner les modèles théoriques décrivant le comportement mécanique des tissus et de mettre en place une méthode permettant de sonder plus de paramètres mécaniques sur les objets biologiques.

La suite de ce manuscrit est organisée comme suit :

- Dans le **chapitre 2**, nous présentons la fabrication et le fonctionnement de cette nouvelle puce microfluidique permettant l'aspiration simultanée de plusieurs sphéroïdes. Cette puce est basée sur l'intégration d'un élément spécifique dans une puce en PDMS. Nous décrirons les différentes étapes de conception, le fonctionnement, ainsi que les performances de ce dispositif. Cette innovation nous a permis de réaliser un grand nombre d'expériences, conduisant à des propositions d'améliorations méthodologiques de l'AMP. Nous avons également utilisé le dispositif pour étudier les liens entre les constituants soupçonnés de jouer un rôle sur les propriétés mécaniques des tissus et les propriétés macroscopiques effectivement mesurées. Enfin, nous verrons l'application de ce dispositif à l'étude de tissus plus complexes (embryon, organoïdes). Certains de ces résultats visent à répondre à des questions fondamentales en biologie du développement.
- Le **chapitre 3** est consacré à la mise en place d'une méthodologie d'aspiration fréquentielle, visant à permettre une meilleure analyse des propriétés viscoélastiques en étudiant séparément chaque dynamique. Cette approche nous a amenés à nous interroger sur le rôle potentiel de la porosité dans cette expérience, et nous avons développé un modèle poroviscoélastique pour les tissus, afin de décrire l'intégralité de nos observations.
- Enfin, nous dresserons le bilan de cette étude et nous explorerons les **perspectives** offertes par notre dispositif.

## Bibliographie

- [1] Carlos F. Guimarães, Luca Gasperini, Alexandra P. Marques, and Rui L. Reis. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(5) :351–370, February 2020.
- [2] Yuan-Cheng Fung. *Biomechanics*. Springer New York, New York, NY, 1993.
- [3] J.D. Humphrey. Review Paper : Continuum biomechanics of soft biological tissues. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 459(2029) :3–46, January 2003.
- [4] Roderic Lakes. *Viscoelastic Materials*. Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
- [5] Dennis E. Discher, Paul Janmey, and Yu-li Wang. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 310(5751) :1139–1143, November 2005.
- [6] Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4) :677–689, August 2006.
- [7] Benjamin Geiger, Joachim P. Spatz, and Alexander D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1) :21–33, January 2009.
- [8] Alberto Elosegui-Artola, Xavier Trepats, and Pere Roca-Cusachs. Control of Mechano-transduction by Molecular Clutch Dynamics. *Trends in Cell Biology*, 28(5) :356–367, May 2018.
- [9] Zhiqi Sun, Shengzhen S. Guo, and Reinhard Fässler. Integrin-mediated mechanotransduction. *Journal of Cell Biology*, 215(4) :445–456, November 2016.
- [10] Diana E. Jaalouk and Jan Lammerding. Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1) :63–73, January 2009.
- [11] Ewa K. Paluch, Celeste M. Nelson, Nicolas Biais, Ben Fabry, Jens Moeller, Beth L. Pruitt, Carina Wollnik, Galina Kudryasheva, Florian Rehfeldt, and Walter Federle. Mechanotransduction : use the force(s). *BMC Biology*, 13(1) :47, December 2015.
- [12] Elias H. Barriga, Kristian Franze, Guillaume Charras, and Roberto Mayor. Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature*, 554(7693) :523–527, February 2018.
- [13] Kenneth P. H. Pritzker and Harpal K. Gahunia. Articular Cartilage : Homeostasis, Aging and Degeneration. In Harpal K. Gahunia, Allan E. Gross, Kenneth P.H. Pritzker,

- Paul S. Babyn, and Lucas Murnaghan, editors, *Articular Cartilage of the Knee : Health, Disease and Therapy*, pages 99–122. Springer, New York, NY, 2020.
- [14] Darci T. Butcher, Tamara Alliston, and Valerie M. Weaver. A tense situation : forcing tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 9(2) :108–122, February 2009.
- [15] Kandice R. Levental, Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, Katalin Csiszar, Amato Giaccia, Wolfgang Weninger, Mitsuo Yamauchi, David L. Gasser, and Valerie M. Weaver. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, 139(5) :891–906, November 2009.
- [16] Michael Liebschner, Brandon Bucklen, and Matthew Wettergreen. Mechanical Aspects of Tissue Engineering. *Seminars in Plastic Surgery*, 19(03) :217–228, August 2005.
- [17] William L. Murphy, Todd C. McDevitt, and Adam J. Engler. Materials as stem cell regulators. *Nature Materials*, 13(6) :547–557, June 2014.
- [18] Jonathon M. Muncie and Valerie M. Weaver. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. *Current topics in developmental biology*, 130 :1–37, 2018.
- [19] Alberto Elosegui-Artola, Anupam Gupta, Alexander J. Najibi, Bo Ri Seo, Ryan Garry, Christina M. Tringides, Irene de Lázaro, Max Darnell, Wei Gu, Qiao Zhou, David A. Weitz, L. Mahadevan, and David J. Mooney. Matrix viscoelasticity controls spatiotemporal tissue organization. *Nature Materials*, 22(1) :117–127, January 2023. Publisher : Nature Publishing Group.
- [20] Gabor Forgacs, Ramsey A. Foty, Yinon Shafrir, and Malcolm S. Steinberg. Viscoelastic Properties of Living Embryonic Tissues : a Quantitative Study. *Biophysical Journal*, 74(5) :2227–2234, May 1998.
- [21] H. M. Phillips and M. S. Steinberg. Embryonic tissues as elasticoviscous liquids. I. Rapid and slow shape changes in centrifuged cell aggregates. *Journal of Cell Science*, 30 :1–20, April 1978.
- [22] Carl-Philipp Heisenberg and Yohanns Bellaïche. Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning. *Cell*, 153(5) :948–962, May 2013.
- [23] Virginie Lecaudey and Darren Gilmour. Organizing moving groups during morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(1) :102–107, February 2006.

- [24] Jerome Solon, Aynur Kaya-Çopur, Julien Colombelli, and Damian Brunner. Pulsed Forces Timed by a Ratchet-like Mechanism Drive Directed Tissue Movement during Dorsal Closure. *Cell*, 137(7) :1331–1342, June 2009.
- [25] Raju Tomer, Khaled Khairy, Fernando Amat, and Philipp J Keller. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 9(7) :755–763, July 2012.
- [26] Alessandro Mongera, Payam Rowghanian, Hannah J. Gustafson, Elijah Shelton, David A. Kealhofer, Emmet K. Carn, Friedhelm Serwane, Adam A. Lucio, James Giammona, and Otger Campàs. A fluid-to-solid jamming transition underlies vertebrate body axis elongation. *Nature*, 561(7723) :401–405, September 2018.
- [27] Monirosadat Sadati, Nader Taheri Qazvini, Ramaswamy Krishnan, Chan Young Park, and Jeffrey J. Fredberg. Collective migration and cell jamming. *Differentiation*, 86(3) :121–125, October 2013.
- [28] Andrea J. Liu and Sidney R. Nagel. Jamming is not just cool any more. *Nature*, 396(6706) :21–22, November 1998.
- [29] Dapeng Bi, J. H. Lopez, J. M. Schwarz, and M. Lisa Manning. A density-independent rigidity transition in biological tissues. *Nature Physics*, 11(12) :1074–1079, December 2015.
- [30] Peter Friedl and Darren Gilmour. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7) :445–457, July 2009.
- [31] S Suresh. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomaterialia*, 3(4) :413–438, July 2007.
- [32] R. P. Chhabra and J. F. Richardson. *Non-Newtonian Flow and Applied Rheology : Engineering Applications*. Butterworth-Heinemann, April 2011. Google-Books-ID : \_6nnoh9PtF0C.
- [33] Dao-Long Chen, Ping-Feng Yang, and Yi-Shao Lai. A review of three-dimensional viscoelastic models with an application to viscoelasticity characterization using nanoindentation. *Microelectronics Reliability*, 52(3) :541–558, March 2012.
- [34] Sham Tlili, Cyprien Gay, François Graner, Philippe Marcq, François Molino, and Pierre Saramito. Colloquium : Mechanical formalisms for tissue dynamics. *The European Physical Journal E*, 38(5) :33, May 2015. Number : 5.

- 
- [35] Hairunnisa Ramli, Nurul Fatahah Asyqin Zainal, Michael Hess, and Chin Han Chan. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chemistry Teacher International*, 4(4) :307–326, December 2022.
- [36] Ivana Pajic-Lijakovic and Milan Milivojevic. Viscoelasticity of multicellular systems caused by collective cell migration : dynamics at the biointerface. *European Biophysics Journal*, 49(3-4) :253–265, May 2020.
- [37] Daniel A. Fletcher and R. Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280) :485–492, January 2010.
- [38] P. G. De Gennes. Dynamics of Entangled Polymer Solutions. I. The Rouse Model. *Macromolecules*, 9(4) :587–593, July 1976.
- [39] P. G. de Gennes. Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles. *The Journal of Chemical Physics*, 55(2) :572–579, July 1971.
- [40] Paul J. Flory and John Rehner. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics*, 11(11) :521–526, November 1943.
- [41] F. C. MacKintosh, J. Käs, and P. A. Janmey. Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks. *Physical Review Letters*, 75(24) :4425–4428, December 1995.
- [42] C. P. Broedersz and F. C. MacKintosh. Modeling semiflexible polymer networks. *Reviews of Modern Physics*, 86(3) :995–1036, July 2014.
- [43] Masao Doi, Sam F. Edwards, and Samuel Frederick Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics*. Clarendon Press, 1988. Google-Books-ID : dMzGyWs3GKcC.
- [44] Adrian F. Pegoraro, Paul Janmey, and David A. Weitz. Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(11) :a022038, November 2017.
- [45] F. Huber, J. Schnauß, S. Rönicke, P. Rauch, K. Müller, C. Fütterer, and J. Käs. Emergent complexity of the cytoskeleton : from single filaments to tissue. *Advances in Physics*, 62(1) :1–112, February 2013.
- [46] Clifford P. Brangwynne, Frederick C. MacKintosh, Sanjay Kumar, Nicholas A. Geisse, Jennifer Talbot, L. Mahadevan, Kevin K. Parker, Donald E. Ingber, and David A. Weitz. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *The Journal of Cell Biology*, 173(5) :733–741, June 2006.

- [47] Johanna Block, Viktor Schroeder, Paul Pawelzyk, Norbert Willenbacher, and Sarah Köster. Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(11) :3053–3064, November 2015.
- [48] Katarzyna Pogoda and Paul A Janmey. Transmit and protect : The mechanical functions of intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 85 :102281, December 2023.
- [49] Filipe Nunes. Molecular organization and mechanics of single vimentin filaments revealed by super-resolution imaging. *SCIENCE ADVANCES*, 2022.
- [50] Peter Fratzl, Klaus Misof, Ivo Zizak, Gert Rapp, Heinz Amenitsch, and Sigrid Bernstorff. Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2) :119–122, 1998.
- [51] Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1) :929–958, June 2009.
- [52] Sylvie Ricard-Blum. The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1) :a004978, January 2011.
- [53] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*, 316(Pt 1) :1, May 1996.
- [54] Andrew K. Baldwin, Andreja Simpson, Ruth Steer, Stuart A. Cain, and Cay M. Kielty. Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15 :e8, August 2013.
- [55] M. Lannoy, S. Slove, and M.-P. Jacob. The function of elastic fibers in the arteries : Beyond elasticity. *Pathologie Biologie*, 62(2) :79–83, April 2014.
- [56] Etienne Guyon, Jean Pierre Hulin, and Luc Petit. *Hydrodynamique physique*. EDP Sciences, 2001.
- [57] Joana E. Saraiva and Elias H. Barriga. Chapter one - The basics of collective cell migration : unity makes strength. In Ivana Pajic-Lijakovic and Elias H Barriga, editors, *Viscoelasticity and Collective Cell Migration*, pages 1–19. Academic Press, January 2021.
- [58] M. S. Steinberg. Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science (New York, N.Y.)*, 141(3579) :401–408, August 1963.

- 
- [59] Ramsey A. Foty and Malcolm S. Steinberg. The differential adhesion hypothesis : a direct evaluation. *Developmental Biology*, 278(1) :255–263, February 2005.
- [60] Albert K. Harris. Is cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion ? A critique of the steinberg hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 61(2) :267–285, September 1976.
- [61] G. Wayne Brodland. The Differential Interfacial Tension Hypothesis (DITH) : A Comprehensive Theory for the Self-Rearrangement of Embryonic Cells and Tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(2) :188–197, April 2002. Number : 2.
- [62] M. Lisa Manning, Ramsey A. Foty, Malcolm S. Steinberg, Eva-Maria Schoetz, and Barry H. Honig. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28) :12517–12522, 2010. Number : 28.
- [63] Stéphane Douezan, Karine Guevorkian, Randa Naouar, Sylvie Dufour, Damien Cuvelier, and Françoise Brochard-Wyart. Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18) :7315–7320, May 2011. Company : National Academy of Sciences Distributor : National Academy of Sciences Institution : National Academy of Sciences Label : National Academy of Sciences Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [64] David Gonzalez-Rodriguez, Karine Guevorkian, Stéphane Douezan, and Françoise Brochard-Wyart. Soft Matter Models of Developing Tissues and Tumors. *Science*, 338(6109) :910–917, November 2012. Number : 6109.
- [65] Ming Wang, Shaobao Liu, Zhimin Xu, Kai Qu, Moxiao Li, Xin Chen, Qing Xue, Guy M. Genin, Tian Jian Lu, and Feng Xu. Characterizing poroelasticity of biological tissues by spherical indentation : An improved theory for large relaxation. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 138 :103920, May 2020.
- [66] Jean Cacheux, Jose Ordonez-Miranda, Aurélien Bancaud, Laurent Jalabert, Daniel Alcaide, Masahiro Nomura, and Yukiko T. Matsunaga. Asymmetry of tensile versus compressive elasticity and permeability contributes to the regulation of exchanges in collagen gels. *Science Advances*, 9(31) :eadf9775, August 2023.
- [67] Monan Wang and Fengjie Liu. Compressible Hyperelastic Models for Soft Biological Tissue : A Review. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 8(10) :1375–1389, October 2018.

- [68] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5) :288–290, May 1986. Publisher : Optica Publishing Group.
- [69] Itia A. Favre-Bulle and Ethan K. Scott. Optical tweezers across scales in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 32(11) :932–946, November 2022.
- [70] Karel Svoboda, Christoph F. Schmidt, Bruce J. Schnapp, and Steven M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448) :721–727, October 1993. Publisher : Nature Publishing Group.
- [71] Karel Svoboda and Steven M. Block. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell*, 77(5) :773–784, June 1994.
- [72] Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Hamid Mahmood, Tess J. Moon, C. Casey Cunningham, and Josef Käs. The Optical Stretcher : A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophysical Journal*, 81(2) :767–784, August 2001.
- [73] Charlie Gosse and Vincent Croquette. Magnetic Tweezers : Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophysical Journal*, 82(6) :3314–3329, June 2002.
- [74] Navid Bonakdar, Achim Schilling, Marina Spörrer, Pablo Lennert, Astrid Mainka, Lilli Winter, Gernot Walko, Gerhard Wiche, Ben Fabry, and Wolfgang H. Goldmann. Determining the mechanical properties of plectin in mouse myoblasts and keratinocytes. *Experimental Cell Research*, 331(2) :331–337, February 2015.
- [75] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *The Review of Scientific Instruments*, 78(11) :114301, November 2007.
- [76] Francesco Mosconi, Jean François Allemand, David Bensimon, and Vincent Croquette. Measurement of the Torque on a Single Stretched and Twisted DNA Using Magnetic Tweezers. *Physical Review Letters*, 102(7) :078301, February 2009.
- [77] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9) :930–933, March 1986.
- [78] Yves F. Duf rene, Toshio Ando, Ricardo Garcia, David Alsteens, David Martinez-Martin, Andreas Engel, Christoph Gerber, and Daniel J. M ller. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12(4) :295–307, April 2017.

- 
- [79] Andrea Alessandrini and Paolo Facci. AFM : a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology*, 16(6) :R65, April 2005.
- [80] Sarah E. Cross, Yu-Sheng Jin, Jianyu Rao, and James K. Gimzewski. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*, 2(12) :780–783, December 2007. Publisher : Nature Publishing Group.
- [81] E. Evans and A. Yeung. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal*, 56(1) :151–160, July 1989. Number : 1.
- [82] Oliver Otto, Philipp Rosendahl, Alexander Mietke, Stefan Golfier, Christoph Herold, Daniel Klaue, Salvatore Girardo, Stefano Pagliara, Andrew Ekpenyong, Angela Jacobi, Manja Wobus, Nicole Töpfner, Ulrich F Keyser, Jörg Mansfeld, Elisabeth Fischer-Friedrich, and Jochen Guck. Real-time deformability cytometry : on-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nature Methods*, 12(3) :199–202, March 2015.
- [83] Andre Lai, Stefan Hinz, Alan Dong, Michael Lustig, Mark A. LaBarge, and Lydia L. Sohn. Multi-Zone Visco-Node-Pore Sensing : A Microfluidic Platform for Multi-Frequency Viscoelastic Phenotyping of Single Cells. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)*, page e2406013, September 2024.
- [84] T. A. Waigh. Microrheology of complex fluids. *Reports on Progress in Physics*, 68(3) :685, February 2005.
- [85] Raya Sorkin, Giulia Bergamaschi, Douwe Kamsma, Guy Brand, Elya Dekel, Yifat Ofir-Birin, Ariel Rudik, Marta Gironella, Felix Ritort, Neta Regev-Rudzki, Wouter H. Roos, and Gijs J. L. Wuite. Probing cellular mechanics with acoustic force spectroscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 29(16) :2005–2011, August 2018.
- [86] Gerrit Sitters, Douwe Kamsma, Gregor Thalhammer, Monika Ritsch-Marte, Erwin J G Peterman, and Gijs J L Wuite. Acoustic force spectroscopy. *Nature Methods*, 12(1) :47–50, January 2015.
- [87] Robert W. Style, Rostislav Boltyanskiy, Guy K. German, Callen Hyland, Christopher W. MacMinn, Aaron F. Mertz, Larry A. Wilen, Ye Xu, and Eric R. Dufresne. Traction force microscopy in physics and biology. *Soft Matter*, 10(23) :4047–4055, May 2014. Publisher : The Royal Society of Chemistry.
- [88] Kevin M. Beussman, Marita L. Rodriguez, Andrea Leonard, Nikita Taparia, Curtis R. Thompson, and Nathan J. Sniadecki. Micropost arrays for measuring stem cell-derived cardiomyocyte contractility. *Methods*, 94 :43–50, February 2016.

- [89] R. A. Foty, C. M. Pfleger, G. Forgacs, and M. S. Steinberg. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development (Cambridge, England)*, 122(5) :1611–1620, May 1996.
- [90] Yuri M. Efremov, Irina M. Zurina, Viktoria S. Presniakova, Nastasia V. Kosheleva, Denis V. Butnaru, Andrey A. Svistunov, Yury A. Rochev, and Peter S. Timashev. Mechanical properties of cell sheets and spheroids : the link between single cells and complex tissues. *Biophysical Reviews*, 13(4) :541–561, August 2021.
- [91] Franziska Hirschhaeuser, Heike Menne, Claudia Dittfeld, Jonathan West, Wolfgang Mueller-Klieser, and Leoni A. Kunz-Schughart. Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, 148(1) :3–15, July 2010.
- [92] Monika E Dolega, Sylvain Monnier, Benjamin Brunel, Jean-François Joanny, Pierre Recho, and Giovanni Cappello. Extracellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *eLife*, 10 :e63258, March 2021. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd.
- [93] Morgan Delarue, Jean-François Joanny, Frank Jülicher, and Jacques Prost. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface Focus*, 4(6) :20140033, December 2014.
- [94] Ramsey A. Foty, Gabor Forgacs, Cathie M. Pfleger, and Malcolm S. Steinberg. Liquid properties of embryonic tissues : Measurement of interfacial tensions. *Physical Review Letters*, 72(14) :2298–2301, April 1994.
- [95] Abbas Mgharbel, Hélène Delanoë-Ayari, and Jean-Paul Rieu. Measuring accurately liquid and tissue surface tension with a compression plate tensiometer. *HFSP Journal*, 3(3) :213–221, June 2009.
- [96] Ali Kalantarian, Hiromasa Ninomiya, Sameh M.I. Saad, Robert David, Rudolf Winkl-bauer, and A. Wilhelm Neumann. Axisymmetric Drop Shape Analysis for Estimating the Surface Tension of Cell Aggregates by Centrifugation. *Biophysical Journal*, 96(4) :1606–1616, February 2009.
- [97] C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J.N. Pons, J.-C. Bacri, and F. Gazeau. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6) :1001–1011, March 2003.
- [98] Irène Nagle, Florence Delort, Sylvie Hénon, Claire Wilhelm, Sabrina Batonnet-Pichon, and Myriam Reffay. The importance of intermediate filaments in the shape maintenance of myoblast model tissues. *eLife*, 11 :e76409, December 2022.

- 
- [99] Gaëtan Mary, François Mazuel, Vincent Nier, Florian Fage, Irène Nagle, Louisiane Devaud, Jean-Claude Bacri, Sophie Asnacios, Atef Asnacios, Cyprien Gay, Philippe Marcq, Claire Wilhelm, and Myriam Reffay. All-in-one rheometry and nonlinear rheology of multicellular aggregates. *Physical Review E*, 105(5) :054407, May 2022.
- [100] David Oriola, Miquel Marin-Riera, Kerim Anlaş, Nicola Gritti, Marina Sanaki-Matsumiya, Germaine Aalderink, Miki Ebisuya, James Sharpe, and Vikas Trivedi. Arrested coalescence of multicellular aggregates. *Soft Matter*, 18(19) :3771–3780, 2022.
- [101] Karoly Jakab, Brook Damon, Françoise Marga, Octavian Doaga, Vladimir Mironov, Ioan Kosztin, Roger Markwald, and Gabor Forgacs. Relating cell and tissue mechanics : Implications and applications. *Developmental Dynamics*, 237(9) :2438–2449, 2008. \_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/dvdy.21684>.
- [102] Tomita Vasilica Stirbat, Abbas Mgharbel, Selena Bodenec, Karine Ferri, Hichem C. Mertani, Jean-Paul Rieu, and Hélène Delanoë-Ayari. Fine Tuning of Tissues’ Viscosity and Surface Tension through Contractility Suggests a New Role for a-Catenin. *PLoS ONE*, 8(2) :e52554, February 2013.
- [103] Giuliano Scarcelli, William J. Polacheck, Hadi T. Nia, Kripa Patel, Alan J. Grodzinsky, Roger D. Kamm, and Seok Hyun Yun. Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy. *Nature Methods*, 12(12) :1132–1134, December 2015.
- [104] Robert Prevedel, Alba Diz-Muñoz, Giancarlo Ruocco, and Giuseppe Antonacci. Brillouin microscopy : an emerging tool for mechanobiology. *Nature Methods*, 16(10) :969–977, October 2019.
- [105] Raimund Schlüßler, Stephanie Möllmert, Shada Abuhattum, Gheorghe Cojoc, Paul Müller, Kyoo Hyun Kim, Conrad Möckel, Conrad Zimmermann, Jürgen Czarske, and Jochen Guck. Mechanical Mapping of Spinal Cord Growth and Repair in Living Zebrafish Larvae by Brillouin Imaging. *Biophysical Journal*, 115(5) :911–923, September 2018.
- [106] A. Manduca, T. E. Oliphant, M. A. Dresner, J. L. Mahowald, S. A. Kruse, E. Amromin, J. P. Felmlee, J. F. Greenleaf, and R. L. Ehman. Magnetic resonance elastography : Non-invasive mapping of tissue elasticity. *Medical Image Analysis*, 5(4) :237–254, December 2001.
- [107] J. Ophir, I. Céspedes, H. Ponnekanti, Y. Yazdi, and X. Li. Elastography : a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic Imaging*, 13(2) :111–134, April 1991.

- [108] Karine Guevorkian, Marie-Josée Colbert, Mélanie Durth, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Physical Review Letters*, 104(21) :218101, 2010. Number : 21.
  
- [109] Ruben C. Boot, Alessio Roscani, Lennard van Buren, Samadarshi Maity, Gijsje H. Koenderink, and Pouyan E. Boukany. High-throughput mechanophenotyping of multicellular spheroids using a microfluidic micropipette aspiration chip. *Lab on a Chip*, page 10.1039.D2LC01060G, 2023.



## Chapitre 2

# Viscoélasticité des tissus : dispositif expérimental et réponse à un échelon de pression

Dans ce chapitre, nous présentons une puce microfluidique innovante conçue pour la caractérisation mécanique quantitative des tissus biologiques. Composée de deux éléments, cette puce permet de réaliser des aspirations par micropipette (AMP) sur plusieurs échantillons simultanément, ce qui améliore l'efficacité et la reproductibilité des mesures. Nous détaillerons sa conception et sa fabrication, en mettant en avant les avancées qu'elle apporte.

Nous introduirons ensuite un modèle viscoélastique existant, capable de reproduire la réponse des sphéroïdes soumis à un échelon de pression. Ce modèle nous permet d'extraire des paramètres fondamentaux tels que la viscosité et l'élasticité des tissus, et nous proposons des améliorations de ce dernier basées sur des simulations numériques. Les premiers résultats expérimentaux, discutés sur une lignée cellulaire de sarcome murin (S180) déjà caractérisée dans la littérature, nous ont permis de valider notre dispositif.

Enfin, nous approfondirons les liens entre les propriétés mécaniques macroscopiques des tissus et leurs origines microscopiques en explorant l'impact de certaines substances chimiques. Nous aborderons également l'utilisation de marquages fluorescents et de l'imagerie 3D pour mieux comprendre la structure interne des sphéroïdes et leur comportement sous contrainte mécanique.

## 2.1 Développement et utilisation d'une micropipette sur puce

### 2.1.1 Une puce composée de deux éléments

#### Principe général

La puce microfluidique que nous présentons ici repose sur une architecture novatrice, composée de deux éléments : une puce en PDMS (polydiméthylsiloxane), un polymère souple et transparent couramment utilisé en microfluidique, et un élément coulissant intégrant des micropipettes, que l'on appelle "tigette". Cette architecture s'inspire largement des travaux de Bastien Venzac [1], qui a démontré l'utilisation de tels éléments coulissants afin de modifier l'architecture d'une puce au cours du temps. Dans notre cas, l'objectif est cependant différent : cet assemblage permet de tirer parti de plusieurs plans de fabrication en photolithographie, aboutissant à l'intégration de pipettes circulaires dans le plan des canaux microfluidiques de la puce en PDMS.

Initialement développée par une doctorante, Marianne Elias [2], pour caractériser les propriétés mécaniques de membranes artificielles telles que les vésicules unilamellaires géantes (GUVs), nous avons adapté et optimisé cette puce pour mesurer les propriétés mécaniques de tissus biologiques 3D. Cette configuration unique favorise la parallélisation des mesures tout en améliorant la reproductibilité des expériences, ce qui est essentiel pour obtenir des données fiables dans des études comparatives. Cette méthode est détaillée dans notre article publié [3].

Le principe de cette puce est illustré dans la figure 2.1. La première partie, en PDMS, est une puce comportant un canal principal reliant une entrée et une sortie, formant le chemin par lequel circulent les échantillons à aspirer. Ce canal est intersecté par un second canal ouvert sur l'extérieur, conçu pour accueillir la tigette. La tigette, qui constitue la deuxième partie de la puce, est un parallélépipède allongé doté de plusieurs trous circulaires traversant toute son épaisseur ; ces trous constituent les micropipettes.

Lorsque la tigette est insérée dans la puce, ses trous s'alignent avec le canal principal, interrompant ainsi le flux entre l'entrée et la sortie. Dès lors, le flux dans la puce ne passe plus qu'au travers de ces micropipettes. On peut alors injecter des objets biologiques à l'entrée

de la puce et le flux va les guider automatiquement vers chaque pipette jusqu'à ce qu'ils obstruent chacune de ces dernières. Ces échantillons peuvent être de n'importe quel type de tissu cellulaire ou de matériau à caractériser, comme des hydrogels. Cependant, nous prendrons l'exemple des sphéroïdes (agrégats cellulaires sphériques) pour illustrer le fonctionnement de la puce.

Une fois les sphéroïdes en position, une pression est appliquée à l'entrée de la puce, provoquant l'aspiration simultanée de tous les sphéroïdes dans les pipettes. Cette méthode permet de capturer et de mesurer plusieurs échantillons en parallèle, assurant une grande efficacité et une uniformité dans les conditions expérimentales. Le débit de mesure est donc considérablement accru : au lieu de caractériser un seul échantillon pendant plusieurs heures, le nombre d'échantillons mesurés est multiplié par le nombre de pipettes parallèles. Cette approche est particulièrement intéressante puisque les sphéroïdes évoluent au cours du temps, rendant essentiel leur mesure simultanée pour garantir la comparabilité des résultats.

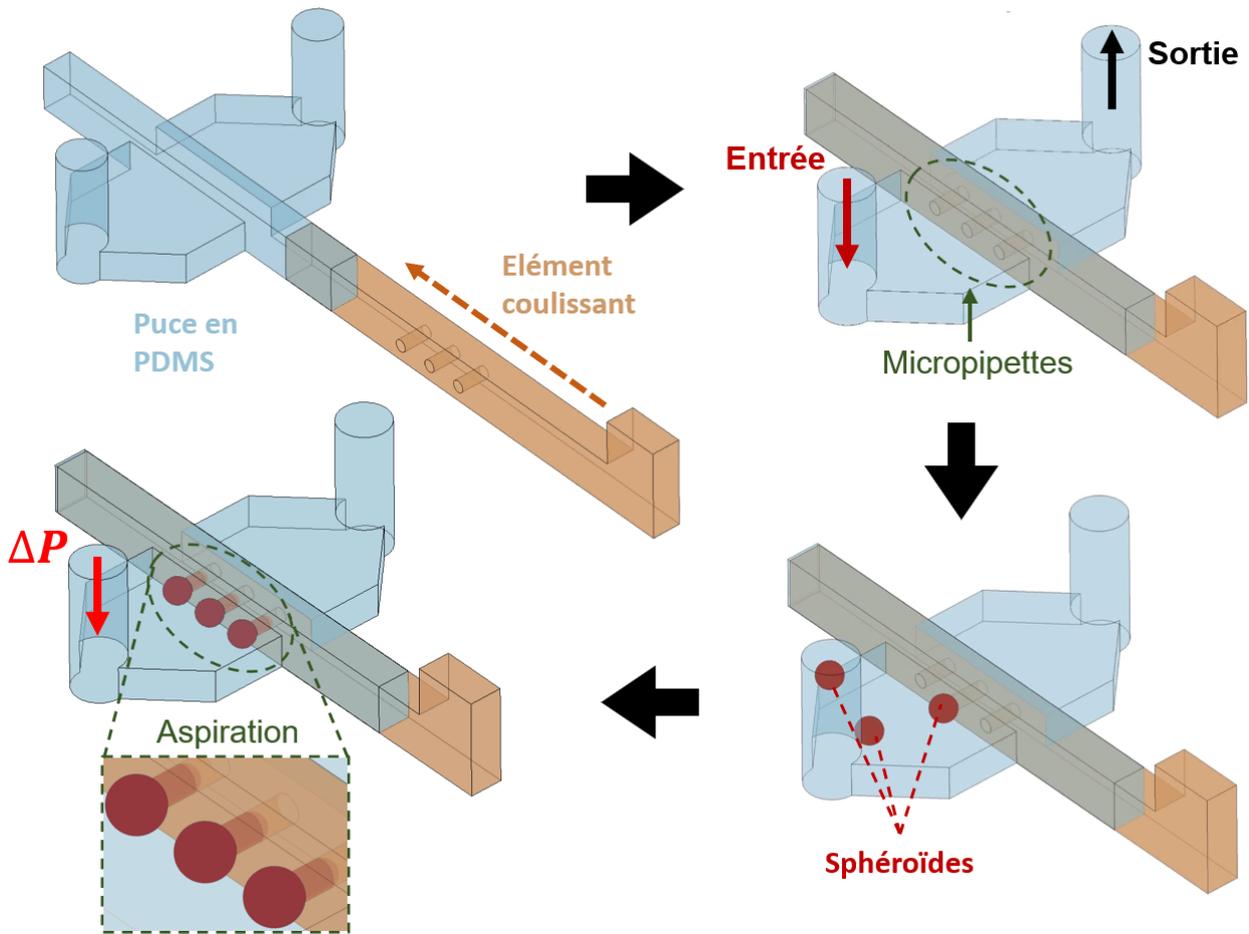


FIGURE 2.1 – Schéma illustrant le principe de l'aspiration par micropipette (AMP) intégrée dans une puce microfluidique. L'élément coulissant (tigette), contenant les micropipettes, est inséré dans le guide dédié au sein de la puce microfluidique en PDMS. Une fois insérée, la tigette est alignée précisément avec le canal principal de la puce. Les sphéroïdes sont introduits dans le canal d'entrée, et le flux les guide automatiquement vers les micropipettes. L'application d'une pression à l'entrée de la puce provoque l'aspiration des sphéroïdes dans les micropipettes, permettant une mesure simultanée de leurs propriétés mécaniques.

Cette approche présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles d'aspiration par micropipette. Tout d'abord, elle permet une manipulation automatisée et précise des échantillons. De plus, la parallélisation des mesures accélère le processus expérimental, ce qui est particulièrement bénéfique au vu de la grande variabilité intrinsèque aux objets biologiques. Enfin, l'utilisation des tigettes offre une flexibilité dans la conception de la puce, permettant d'ajuster le nombre, la taille et potentiellement la forme des micropipettes en fonction des besoins spécifiques de l'expérience.

En résumé, cette puce microfluidique constitue un outil puissant pour la caractérisation mécanique quantitative des objets biologiques. Elle combine les avantages de la microfluidique, tels que le contrôle facilité d'échantillons microscopiques et un contrôle très fin des conditions physicochimiques (température,  $O_2$ ,  $CO_2$ , etc.).

### L'élément coulissant (ou "tigette")

L'élément clé du dispositif est la tigette, elle contient les micropipettes utilisées pour l'aspiration des échantillons. Contrairement aux micropipettes traditionnelles, qui sont souvent des tubes en verre fabriqués manuellement, les micropipettes de notre puce sont intégrées dans cet élément solide composé de résine photosensible que nous structurons par photolithographie. La photolithographie permet d'obtenir des dimensions précises et des surfaces lisses permettant de minimiser la friction lors de l'aspiration des échantillons. Cette technique permet également d'obtenir un grand nombre de tigettes en un seul processus (plus de 150 tigettes par wafer). Pour cela, on procède comme schématisé sur la figure 2.2.

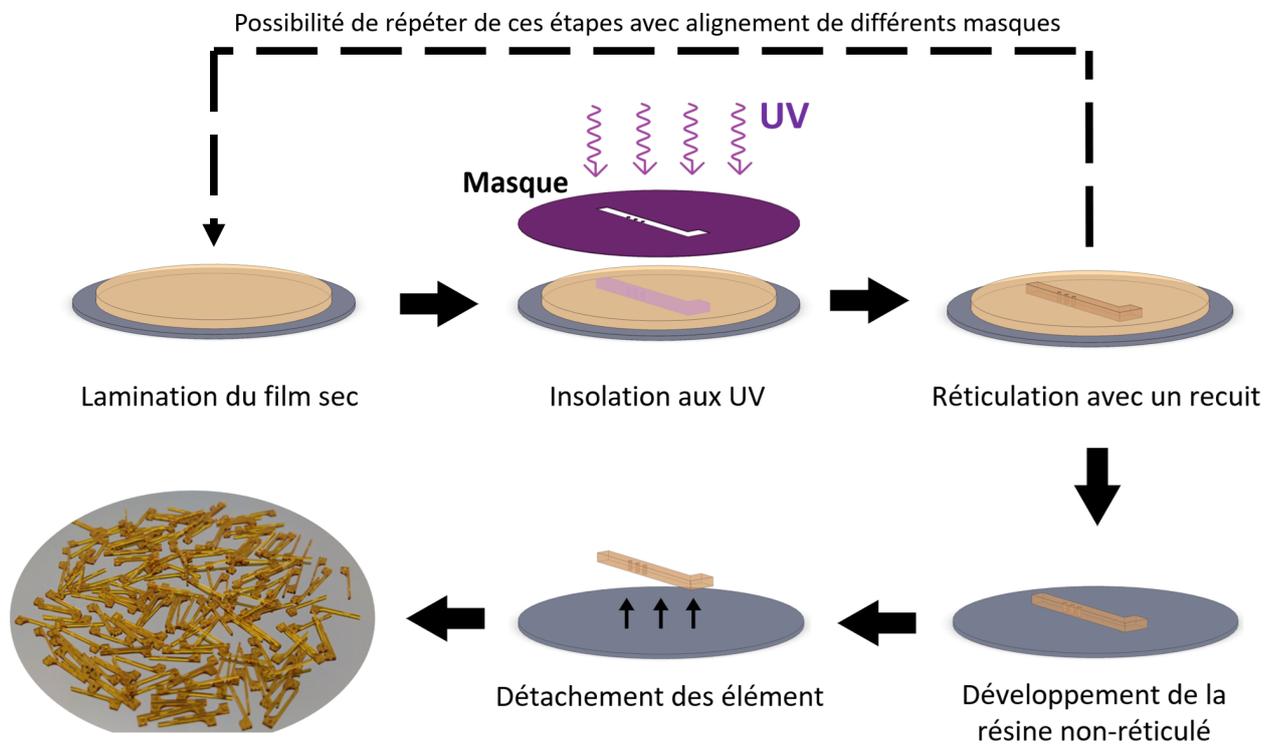


FIGURE 2.2 – Étapes de fabrication des tigettes par photolithographie. Le processus commence par la lamination d'un film sec sur un wafer en silicium, préalablement recouvert d'une fine couche de Cu/Ti. Le film est ensuite exposé aux UV pour activer des photoinitiateurs dans les zones exposées. Un recuit permet la réticulation de la résine aux endroits exposés. Il est possible de relaminer une deuxième couche de film sec sur la première et de l'insoler avec un alignement précis d'un nouveau masque, permettant ainsi de créer des designs plus complexes à plusieurs niveaux. La résine non réticulée est ensuite développée dans un solvant. Une attaque chimique de la couche de Cu/Ti libère finalement les tigettes du wafer. Photographie des centaines de tigettes obtenues à la fin d'un de ces processus

Les micropipettes sont fabriquées en utilisant un film sec photosensible (SUEx), particulièrement adapté pour la fabrication d'éléments épais ( $>100 \mu\text{m}$ ) en photolithographie. Le

processus commence par le dépôt du film sur un wafer de 4 pouces en silicium, sur lequel a été réalisé un dépôt de cuivre/titane de quelques nanomètres. Ce dépôt sacrificiel est crucial pour la dernière étape du processus de fabrication permettant de libérer les tiges du wafer.

Le film est ensuite exposé à une source de lumière UV au travers d'un masque de photolithographie, où le design souhaité pour les éléments est gravé. Ces masques ont été gravés dans la salle blanche du LAAS à partir de designs 2D réalisés avec le logiciel Clewin. L'insolation permet d'activer les photoinitiateurs, présents dans le film, uniquement dans les régions exposées à la lumière. L'alignement du masque et l'insolation ont été réalisés grâce à une aligneuse de masque (MA6 Gen4, SÜSS MicroTec). Un recuit suit cette exposition et permet la réticulation de la résine dans les zones où les photoinitiateurs ont été activés. Enfin, le film est développé dans un solvant (SU-8 Developer) pour éliminer les zones non exposées, révélant ainsi les éléments structurés avec les trous qui formeront les micropipettes. Cependant, ces éléments sont toujours fixés au substrat. On réalise alors une attaque chimique de la couche sacrificielle Cu/Ti afin de détacher les tiges. On obtient ainsi plus d'une centaine de tiges, avec différentes configurations (taille et nombre de pipettes) en un seul procédé de microfabrication, d'une durée d'environ une journée.

Ces films secs SUEX n'avaient jamais été utilisés dans la salle blanche du LAAS auparavant. Nous avons donc dû travailler sur l'optimisation de l'ensemble du processus de fabrication. Pour cela, j'ai co-encadré un stagiaire, afin de déterminer les paramètres optimaux d'insolation et de recuit. L'objectif était d'obtenir les meilleurs rapports d'aspect possibles avec une bonne résolution pour différentes épaisseurs de film. Grâce à ces paramètres de fabrication optimisés, nous avons pu produire des micropipettes avec un rapport d'aspect élevé ( $\sim 20$ , par exemple : diamètre de 25  $\mu\text{m}$  sur une longueur de 500  $\mu\text{m}$ ). Ces optimisations ont également permis de réduire la rugosité de la surface intérieure des micropipettes en effectuant un fort recuit après développement. On a ainsi réussi à obtenir des aspérités inférieures à une centaine de nm, comme illustré sur la figure 2.3.

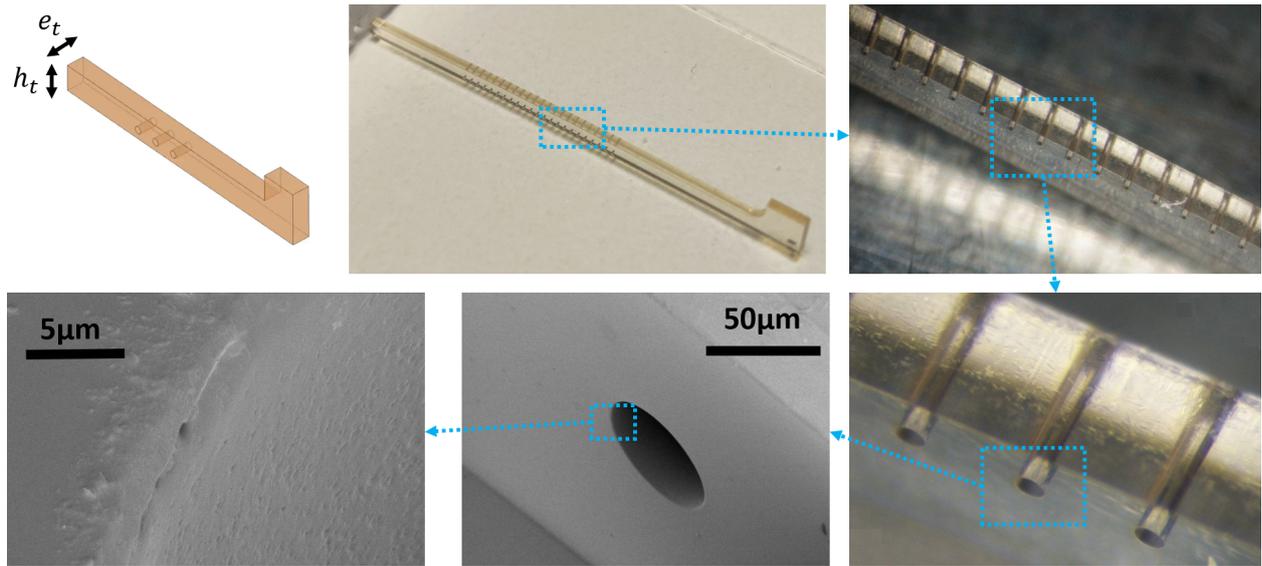


FIGURE 2.3 – Schéma du design général des tiges. Photographies et images en microscopie électronique illustrant le haut rapport d'aspect, la bonne résolution ainsi que la faible rugosité des pipettes.

Afin de limiter l'adhésion des tissus biologiques à ces éléments, nous avons réalisé un traitement de surface à base de FDTS (perfluorodécyltrichlorosilane). Ce traitement a été effectué à l'aide de la machine SPD de la société MemsStar. Réalisé en phase gazeuse, ce traitement permet de couvrir uniformément toutes les surfaces des éléments, y compris l'intérieur des pipettes.

Cette méthode nous permet de produire un grand nombre de tiges avec des dimensions précises, qui minimisent l'adhésion et la friction des tissus biologiques sur ces dernières. Cependant, un inconvénient notable est la fluorescence intrinsèque des résines utilisées pour fabriquer ces tiges. Cette fluorescence peut poser problème lors des observations de microscopie, notamment pour des fluorophores peu lumineux et dont le spectre d'émission se superpose à celui de la résine. Une analyse détaillée du spectre d'émission et d'absorption 2D de la résine SUEX est présentée dans l'annexe A.5.

Pour pallier ce problème, nous avons développé un procédé de fabrication alternatif basé sur la gravure biphoton du verre, en utilisant la machine LASER NANOFACORY de la société Femtika. Cette technique, connue sous le nom de "Selective Laser Etching" (SLE), permet la fabrication de pièces en verre complexes avec une précision micrométrique. Un faisceau laser femtoseconde modifie la structure du verre au point focal. En déplaçant spatialement ce faisceau, on écrit point par point les régions à graver qui sont ensuite éliminées par une solution de gravure. Cette technique nous a permis d'obtenir des tiges en verre avec la même géométrie et aucune fluorescence. Cependant, la gravure point par point gé-

nère une rugosité beaucoup plus importante qui génère de la friction et de l'adhésion avec les tissus. Ces tiges ont donc été utilisées seulement pour l'observation par fluorescence, mais pas pour la mesure quantitative des propriétés mécaniques.

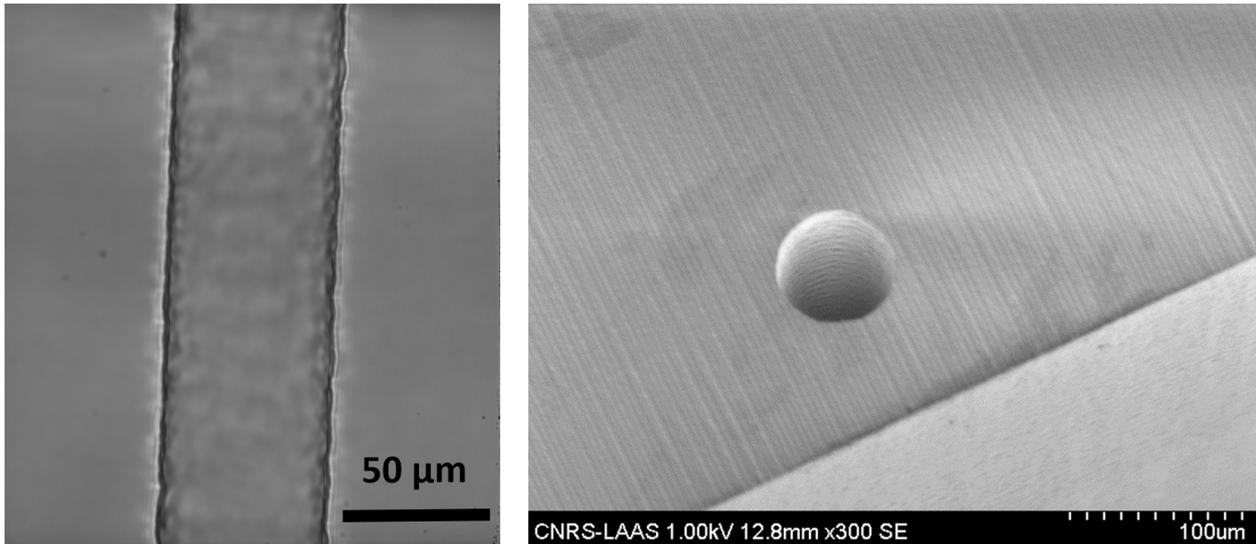


FIGURE 2.4 – Images de microscopie à champ clair et de microscopie électronique à balayage des tiges en verre, montrant une rugosité supérieure à celle obtenue par photolithographie.

### La partie en PDMS

Comme nous l'avons vu, les tiges sont destinées à s'insérer dans le second élément de notre dispositif : une puce en PDMS. Le PDMS (polydiméthylsiloxane) est un polymère largement utilisé dans les applications microfluidiques, en raison de plusieurs propriétés avantageuses. En plus de sa biocompatibilité, qui le rend bien adapté pour les études impliquant des échantillons biologiques, le PDMS possède une très bonne transparence optique, essentielle pour les observations microscopiques en temps réel. De plus, sa perméabilité au gaz permet de maintenir un environnement contrôlé autour des échantillons, ce qui est crucial pour les expériences de longue durée. Enfin, le PDMS est également très déformable (typiquement 1 MPa), une caractéristique qui nous a permis d'assurer une bonne étanchéité au niveau de l'élément coulissant, comme nous le verrons plus en détail par la suite.

Ces puces ont été obtenues par un procédé classique de moulage du PDMS (SYLGARD, avec un ratio de 10 :1 entre polymère et réticulant). Les moules utilisés pour le moulage ont été fabriqués de deux manières distinctes : soit par photolithographie avec des films secs, soit par impression 3D (stéréolithographie) comme illustré sur la figure 2.5.

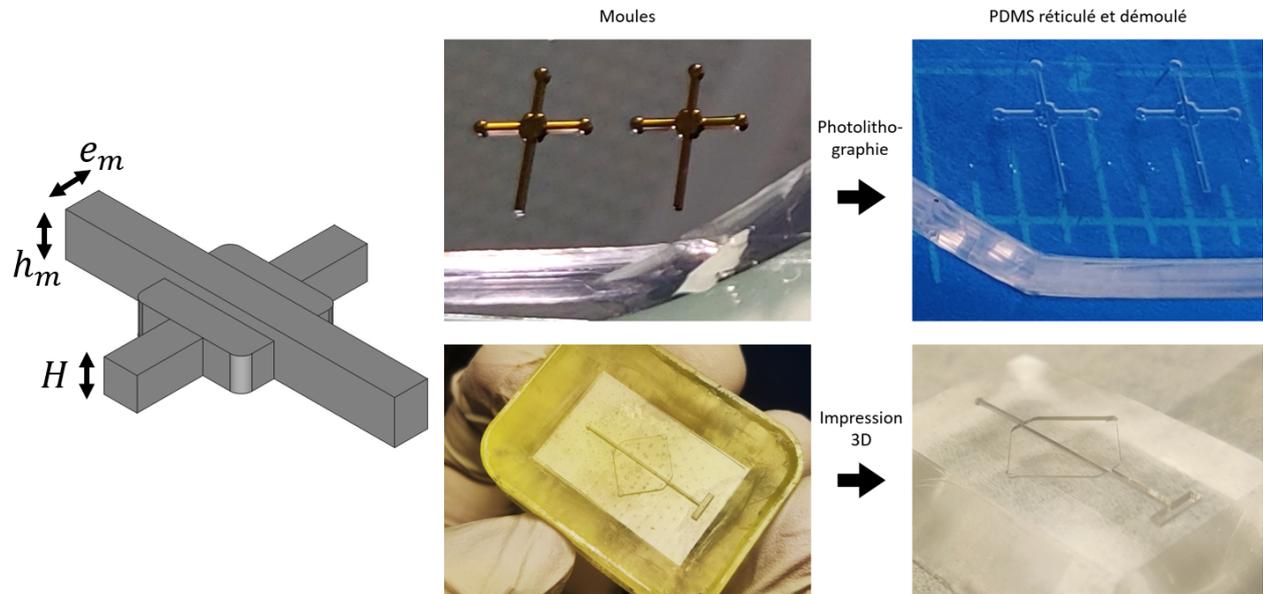


FIGURE 2.5 – Schéma du design général des moules utilisés. Photographies des moules fabriqués par photolithographie et par impression 3D, ainsi que du PDMS démoulé après réticulation sur ces moules. Le PDMS obtenu présente la géométrie négative des moules.

Le protocole de fabrication des moules par photolithographie est similaire à celui des tiges, à la différence près que les motifs ne sont pas détachés du substrat à la fin du processus. Le même traitement de surface que celui des tiges, à base de FDTS, est appliqué pour faciliter le démoulage du PDMS.

La photolithographie offre une résolution supérieure à celle de l'impression 3D, ainsi qu'une meilleure planéité du substrat autour des motifs formant les canaux. Cette planéité est due aux substrats, qui sont des wafers en silicium, dont les défauts de planéité n'excèdent pas quelques dizaines de nanomètres. Cette caractéristique est un avantage pour les étapes de collage plasma qui suivront. Cependant, le processus de photolithographie présente l'inconvénient d'être plus long et plus coûteux que l'impression 3D. De plus, les moules utilisés comportent au minimum deux niveaux qui nécessitent un alignement précis, faute de quoi le moule est inutilisable.

L'impression 3D par stéréolithographie, réalisée avec une imprimante de la société DWS (modèle DW 029XC) en utilisant la résine "Therma DS3000", a principalement permis un prototypage rapide. Cette technique s'est avérée particulièrement utile pour créer des puces adaptées à des échantillons dont les dimensions sortaient des standards ( $> 400 \mu\text{m}$ ). De plus, cette technique nous a également permis de tester des géométries impossibles à obtenir par photolithographie.

Le design de ces moules suit toujours le même principe et est schématisé sur la figure

2.5. Ces moules sont en forme de croix et comportent toujours au moins deux niveaux. Le premier niveau permet de mouler le canal microfluidique principal reliant l'entrée et la sortie de la puce. Ce canal est dimensionné de manière à permettre le passage des objets biologiques à aspirer. Il s'élargit au niveau de son intersection avec le canal tigelette, permettant ainsi l'aspiration simultanée de plusieurs sphéroïdes. La hauteur  $H$  de ce canal est optimale lorsqu'elle est légèrement supérieure au diamètre des objets à étudier. Si la hauteur est trop faible, les objets ne peuvent pas passer, tandis que si elle est trop grande, ils ont tendance à sédimenter au fond, où le flux est minimal, compliquant leur manipulation. La majorité des expériences sur les sphéroïdes ont été réalisées avec une hauteur  $H = 450 \mu\text{m}$ , ce qui est approprié pour les sphéroïdes de 150 à 400  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Le second niveau correspond au canal qui accueillera la tigelette. Ce canal a pour but de guider l'insertion de la tigelette et de limiter les fuites potentielles autour de celle-ci. Ce canal, d'une hauteur  $h_m$  et d'une épaisseur  $e_m$ , est volontairement sous-dimensionné par rapport aux dimensions de la tigelette. Étant plus grande et plus épaisse, la tigelette déforme le PDMS lors de son insertion et ceci permet d'avoir une bonne étanchéité. Une série de tests a permis de montrer que le ratio :  $\frac{h_t}{h_m} \sim \frac{e_t}{e_m} \sim 1,2$  est optimal pour assurer cette étanchéité. Avec ce ratio, une tigelette sans micropipette permet une étanchéité totale entre l'entrée et la sortie pour des différences de pressions allant jusqu'à 1 bar.

Une fois ces moules fabriqués, nous versons ensuite le mélange de polymère et de réticulant formant le PDMS encore liquide sur ces derniers. Le tout est ensuite placé sous une cloche à vide afin d'éliminer les bulles d'air potentiellement présentes. Pour réticuler le PDMS, nous plaçons les échantillons dans un four à 60 °C pendant environ 5 heures. Une fois solidifié, le PDMS est démoulé, comme illustré à la figure 2.5. Nous découpons alors les excédents de PDMS autour des motifs formés par le moule et nous coupons le PDMS à la base du canal de la tigelette de manière à le rendre ouvert sur l'extérieur. Enfin, nous utilisons un "puncher" (ou poinçonneur) pour créer des trous dans le PDMS à l'entrée, à la sortie, ainsi qu'au bout du canal de la tigelette. Ce dernier trou permettra de faciliter l'insertion de la tigelette en permettant à l'air de s'échapper de la puce.

Nous ne collons pas directement ce bloc de PDMS sur une lamelle de microscope, car cela entraînerait de nombreuses fuites entre la tigelette et la lamelle. Pour assurer une bonne étanchéité autour de la tigelette et faciliter son insertion, il est nécessaire d'intercaler une fine couche de PDMS entre la lamelle et le bloc principal. Pour réaliser cela, nous déposons du PDMS encore liquide sur un wafer vierge, que nous mettons en rotation à l'aide d'une tournette. Cette technique de "spin-coating" permet d'obtenir l'épaisseur souhaitée en ajustant la vitesse de rotation. Nous avons principalement utilisé des couches de 100  $\mu\text{m}$  (2000rpm), car

## 2.1. Développement et utilisation d'une micropipette sur puce

elles offrent une bonne étanchéité sans être trop épaisses, ce qui imposerait des distances de travail élevées et limiterait les possibilités d'utilisation des objectifs de microscopie. Une fois cette couche réticulée, nous collons le bloc principal à cette couche à l'aide d'un traitement plasma au dioxygène. Ensuite, nous découpons et décollons cet assemblage pour finalement le recoller avec le même plasma, sur une lamelle de microscope. Ceci nous permet d'obtenir la puce finale, comme illustré à la figure 2.6.

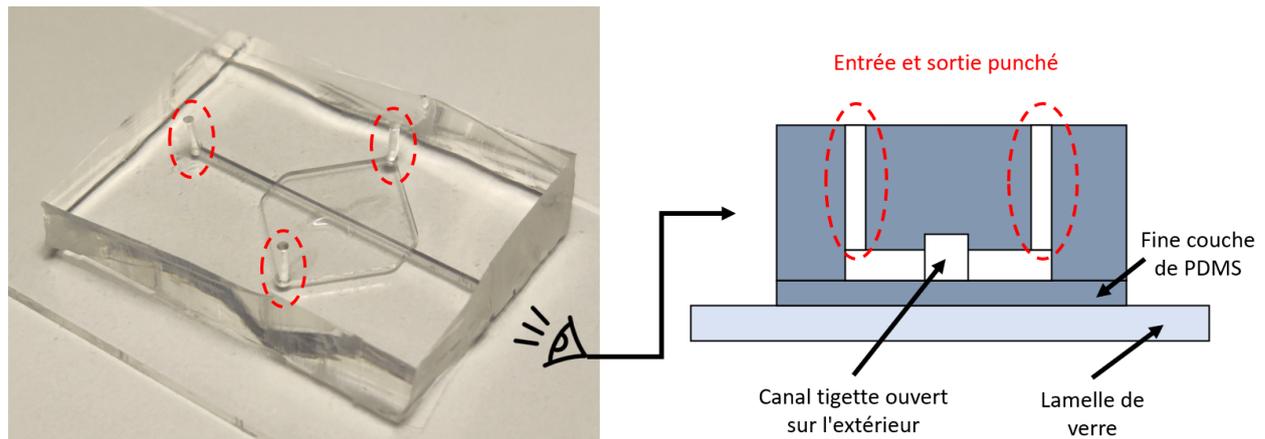


FIGURE 2.6 – Photographie de la puce en PDMS, avec les trois trous réalisés au "puncher" mis en évidence. Schéma de la section verticale de la puce au niveau du canal principal.

### 2.1.2 Assemblage et fonctionnement de la puce microfluidique

Comme nous l'avons vu, l'assemblage de ces deux éléments se fait par insertion de l'élément coulissant dans le canal microfluidique dédié de la puce en PDMS. Cette étape est réalisée manuellement sous un microscope binoculaire pour un alignement précis des micropipettes avec le canal principal. Afin de faciliter l'insertion, il est nécessaire de lubrifier ces deux éléments avec de l'isopropanol.

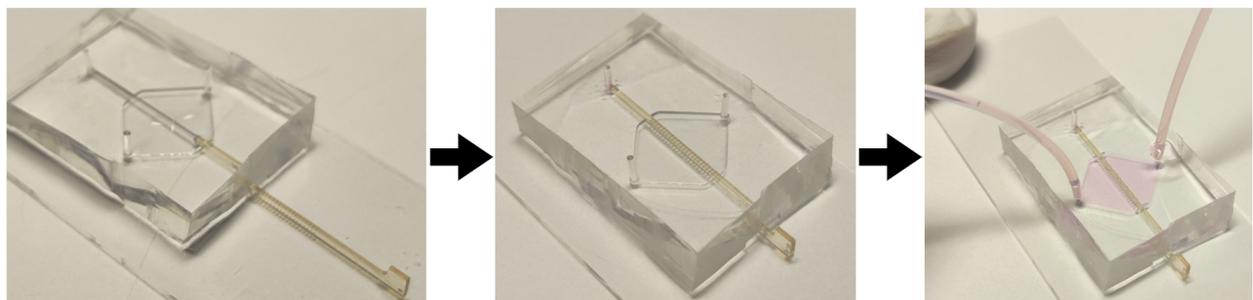


FIGURE 2.7 – Illustration de l'insertion de la tige dans le canal dédié. Remplissage de la puce avec du milieu de culture grâce à des tubes en PTFE insérés dans l'entrée et la sortie de la puce.

On place ensuite la puce sous une cloche à vide afin d'éliminer toutes les traces d'isopropanol, qui pourraient être toxiques pour nos échantillons. L'étape suivante est de remplir la puce avec un milieu adapté aux échantillons (PBS pour des expériences courtes ou milieu de culture) et d'éliminer les bulles d'air résiduelles. Pour cela, on peut injecter un fluide à l'entrée ou à la sortie de la puce en connectant des tubes en PTFE dont le diamètre extérieur est adapté à la taille du puncher utilisé. Ces tubes doivent également posséder un diamètre intérieur supérieur à la taille des échantillons à mesurer, afin que ceux-ci puissent entrer dans la puce via ces tubes. Pour éliminer les bulles d'air résiduelles, on peut tirer parti des propriétés de perméabilité du PDMS au gaz. En mettant l'entrée et la sortie sous pression, on parvient à expulser l'air de ces bulles au travers du PDMS.

Une fois la puce correctement remplie, nous pouvons injecter nos sphéroïdes via le tube d'entrée. Pour cela, nous aspirons manuellement (à l'aide d'une seringue connectée au tube) le nombre adéquat d'échantillons. Ce nombre doit être au moins égal au nombre de micropipettes présentes dans la puce, sinon certaines micropipettes pourraient rester libres, ce qui pourrait poser des problèmes, comme nous le verrons par la suite. Une fois que le bon nombre de sphéroïdes est présent dans le tube, nous pouvons connecter ce dernier à l'entrée de la puce et réaliser le montage présenté sur la figure 2.8 afin de contrôler la pression à l'entrée et à la sortie. Pour cela, nous utilisons un contrôleur de pression Fluigent (MFCS 4 voies, 0-69 mbar), qui permet d'appliquer des pressions précises à l'ordre du dixième de mbar.

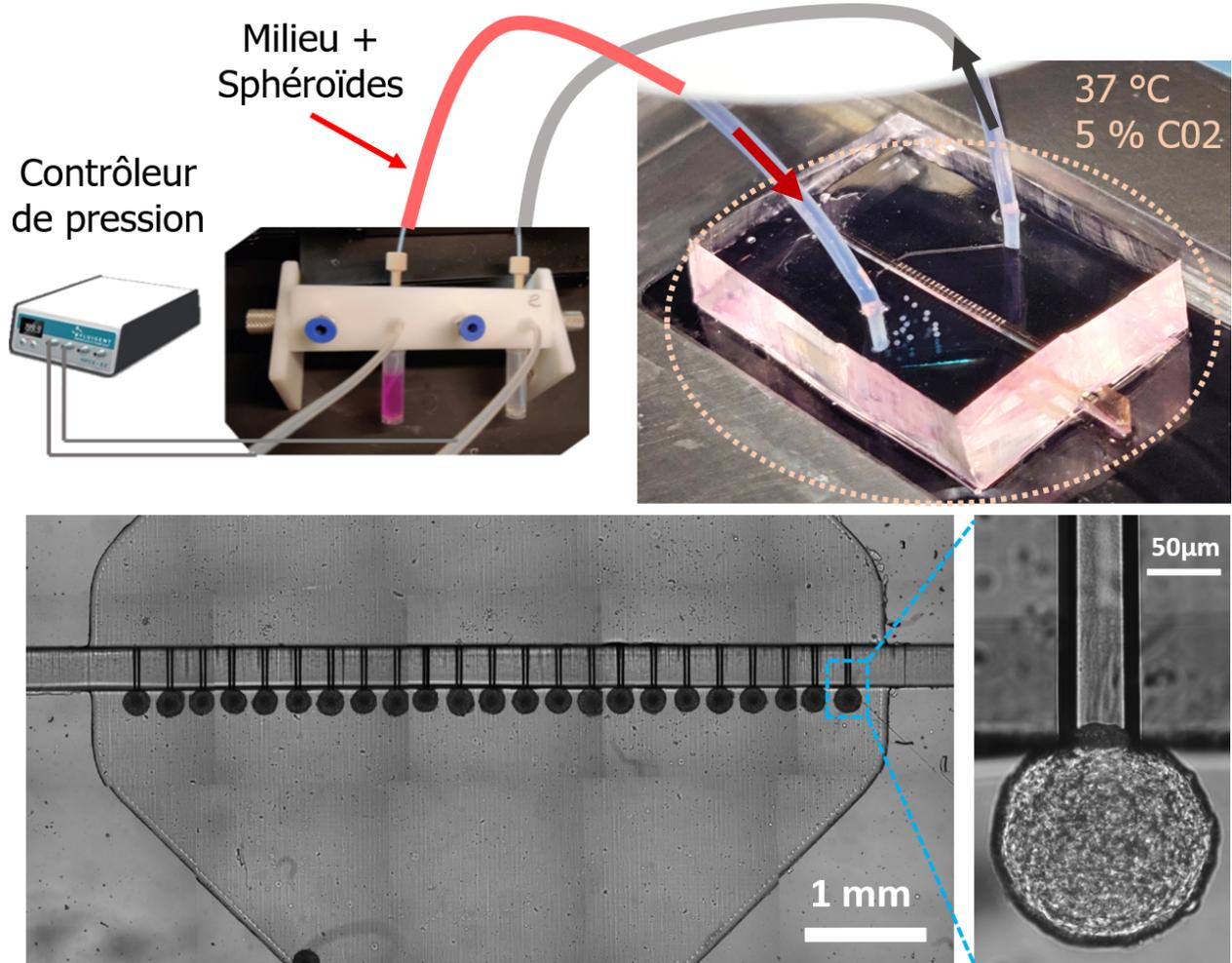


FIGURE 2.8 – Schéma du montage expérimental et photographie de la puce sur le microscope avec l'arrivée des sphéroïdes. Image reconstruite par assemblage (stitching) d'images de microscopie en champ clair, montrant 23 sphéroïdes capturés par les 23 pipettes d'une puce. Image de microscopie à plus haute résolution montrant un seul sphéroïde capturé.

La puce est ensuite placée sur un microscope inversé (ZEISS Observer 7) permettant de visualiser l'intérieur de la puce. Le microscope est équipé d'une chambre d'incubation qui maintient un environnement physiologique (par exemple, 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>). En appliquant une faible pression (1 à 2 mbar) à l'entrée, un flux est généré, allant de l'entrée vers la sortie de la puce. Ce flux, qui est contraint de s'écouler au travers des micropipettes, transporte automatiquement les sphéroïdes présents dans le tube jusqu'à celles-ci. La pression est manuellement réglée de manière à ce que les échantillons soient alignés et immobilisés devant les micropipettes sans subir de perturbations excessives. Nous pouvons voir un exemple de cette configuration sur la figure 2.8 avec 23 sphéroïdes faisant face à 23 pipettes.

À ce stade, tout est prêt pour réaliser une expérience d'aspiration par micropipette (AMP) sur les sphéroïdes. Pour aspirer ces derniers, nous appliquons une surpression  $\Delta P$  à l'entrée de la puce par rapport à la sortie, à l'aide du contrôleur Fluigent. Cette configuration,

où la pression est exercée à l'entrée, est cependant équivalente à une configuration où l'on aspirerait à la sortie. En aspirant avec une pression  $\Delta P$  à la sortie, on aurait  $P_{atm}$  à l'entrée et  $P_{atm} - \Delta P$  à la sortie. Ici, nous avons  $P_{atm} + \Delta P$  en entrée et  $P_{atm}$  en sortie. Ces deux configurations sont identiques, à l'exception du changement de référence de pression hydrostatique. Cependant, ce changement (de quelques dizaines de mbar) n'aura que des conséquences minimales, compte tenu de l'incompressibilité de l'eau et du fait que les sphéroïdes sont principalement composés d'eau.

Lorsqu'on applique cette pression, on observe une aspiration des sphéroïdes, comme illustré sur la figure 2.9.

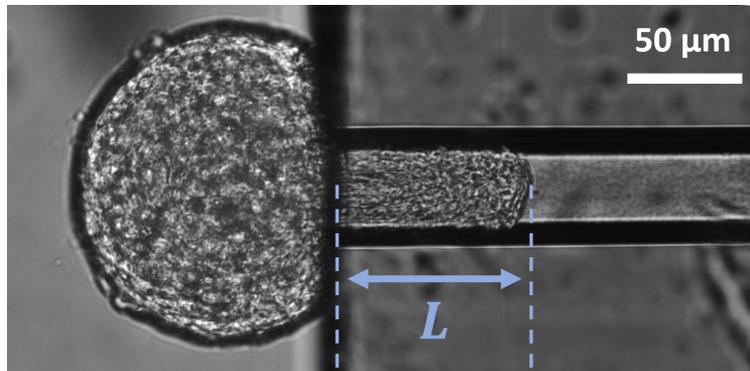


FIGURE 2.9 – Image de microscopie en champ clair montrant un sphéroïde aspiré dans une micropipette. La longueur  $L$ , représentée ici schématiquement, est mesurée au fil du temps pour quantifier la déformation du sphéroïde. La forme cylindrique de la pipette agit optiquement comme une lentille convergente, créant ainsi deux zones sombres visibles près des bords de la pipette. Une géométrie différente de pipette a été fabriquée pour pallier ce problème et est présentée dans l'annexe A.8.

Le principe des expériences d'AMP est de mesurer, au fil du temps, la longueur  $L$ , de la langue de sphéroïde aspirée dans la pipette. C'est l'analyse de la dynamique de cette déformation qui nous permettra de quantifier les propriétés viscoélastiques du sphéroïde.

### 2.1.3 Mesure et automatisation

Le choix du nombre de sphéroïdes aspirés simultanément se fait au détriment de la résolution spatiale et/ou temporelle. En effet, si l'on souhaite obtenir une résolution spatiale élevée, il est nécessaire d'utiliser des objectifs de microscopie avec un fort grossissement, ce qui réduit le champ de vision et, par conséquent, le nombre de sphéroïdes qu'il contient. Ceci peut être nécessaire si l'on s'intéresse à de faibles déformations. Avec le matériel utilisé,

le champ d'observation du microscope permet d'observer, par exemple, un seul sphéroïde avec un objectif 63X, deux sphéroïdes avec un 20X, quatre avec un 10X et jusqu'à sept avec un 5X. Si la résolution temporelle n'est pas primordiale, il est tout à fait possible d'utiliser un fort grossissement et de programmer la platine motorisée du microscope pour capturer toutes les positions nécessaires à la mesure de chaque sphéroïde. Cependant, la capture de plusieurs images avec changement de position et de mise au point prend plusieurs secondes entre chaque prise. Par conséquent, la capture d'une dizaine de positions limite la résolution temporelle à des intervalles proches d'une minute. Ceci peut ne pas convenir si l'on s'intéresse à des déformations rapides. Il y a donc un compromis à faire entre le nombre de parallélisations et la résolution spatiale et/ou temporelle.

Pour automatiser la mesure des déformations des sphéroïdes dans les micropipettes, nous avons développé un algorithme d'analyse d'image spécifique en utilisant le package "scikit-image" sous Python, qui fournit des outils avancés pour le traitement et l'analyse d'images. Ce processus permet de traiter les images capturées lors des expériences afin d'extraire les longueurs des langues aspirées au cours du temps pour chaque position. Cependant, cet algorithme ne détecte pas automatiquement la position de l'entrée de la pipette dans les images. Cette tâche s'est avérée impossible en raison de la variabilité de cette zone et du faible contraste observé dans celle-ci. Nous rognons donc manuellement chaque position de manière à ce que l'entrée de la pipette se situe sur le bord de la séquence d'images, comme illustrée dans la figure 2.10.

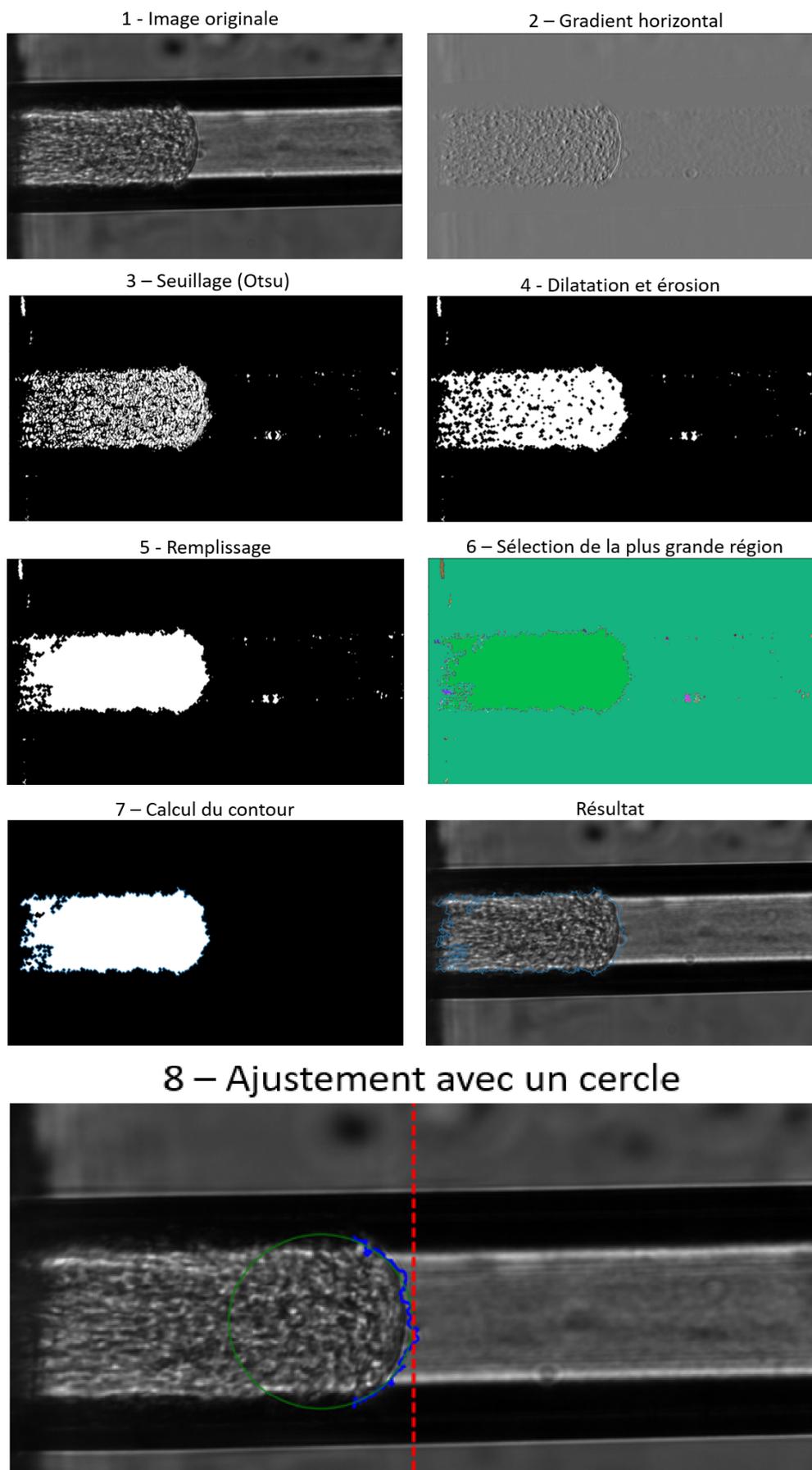


FIGURE 2.10 – Illustration des différentes étapes de l’algorithme d’analyse d’image.

Le processus commence par le calcul de la "dérivée" de l'image le long de l'axe de la micropipette (plus précisément, on réalise une convolution de l'image avec la partie verticale de l'opérateur de Sobel). Cette étape permet de détecter des variations d'intensité horizontale. Or de telles variations ne sont présentes que dans la langue aspirée (la partie du sphéroïde pénétrant dans la pipette). Cette méthode permet donc de faire "disparaître" les bords de la pipette dans l'image. Ensuite, nous appliquons une méthode de seuillage basée sur l'algorithme d'Otsu, qui ajuste automatiquement le seuil pour distinguer les éléments d'intérêt du reste de l'image.

Après le seuillage, l'image obtenue est traitée par des opérations de dilatation, d'érosion et de remplissage. Ces opérations morphologiques sont essentielles pour éliminer les petites imperfections dues au bruit d'image ou à des débris, et pour consolider la région représentant la langue aspirée. La combinaison de la dilatation et de l'érosion permet de connecter des régions proches qui ne l'étaient pas initialement, tandis que le remplissage comble les trous présents dans la langue, évitant ainsi qu'ils ne perturbent l'analyse.

Une fois ces opérations réalisées, plusieurs régions segmentées peuvent subsister dans l'image. Pour isoler la région correspondant à la langue aspirée, nous procédons à une analyse des surfaces des régions segmentées. Seule la région avec la plus grande surface est conservée, car elle correspond à la langue aspirée, tandis que les petites régions qui correspondent à des artefacts ou à des débris sont écartées.

On calcule alors le contour de cette zone et on peut voir sur la figure 2.10 que cette série d'étapes nous a permis de segmenter précisément la langue aspirée. L'étape finale de l'algorithme consiste à identifier le bout de la langue aspirée. Pour cela, nous ajustons avec un cercle le bout du contour représentant le ménisque de la langue. Cette approche permet de définir avec précision la position du bout de la langue, en évitant le bruit et les biais qui pourraient être causés par des cellules ou des vésicules détachées de la langue principale.

Grâce à cet algorithme d'analyse d'image, il est possible d'automatiser la mesure de la déformation des sphéroïdes sur toute la durée de l'aspiration et sur toutes les différentes positions. Cette automatisation permet également de réduire les biais humains potentiels dans l'analyse des images, garantissant des résultats plus reproductibles et fiables.

## 2.2 Fabrication des sphéroïdes

La majorité des résultats présentés dans cette section ont été obtenus à partir de la lignée cellulaire A338. Cette lignée provient de cellules pancréatiques de souris, qui ont été immortalisées et dans lesquelles une mutation a été induite sur le gène *Kras*, représentative de la majorité des cancers du pancréas.

Le choix de cette lignée cellulaire a été principalement motivé par sa capacité à former des sphéroïdes de manière rapide et efficace. En effet, en faisant agréger un nombre prédéterminé de cellules, il est possible d'obtenir, en une vingtaine d'heures, des agrégats de taille contrôlée, présentant une structure presque parfaitement sphérique.

De plus, cette lignée cellulaire se distingue par une grande cohésion entre les cellules, ce qui confère aux sphéroïdes formés une certaine "solidité". Contrairement à d'autres modèles plus fragiles, les sphéroïdes obtenus avec la lignée A338 résistent bien à la manipulation et ne se désagrègent pas facilement. Cette "robustesse" a été particulièrement avantageuse dans le cadre du développement de la puce et de son fonctionnement, car elle a considérablement réduit les risques de dommages lors des étapes préparatoires à l'aspiration. Ainsi, cette lignée nous a permis de manipuler les sphéroïdes sans nécessiter une extrême précaution, bien que nous soyons restés, bien entendu, très vigilants au cours de chaque expérience.

Au-delà de ces avantages pratiques, cette lignée cellulaire permet de modéliser des microtumeurs pancréatiques sous forme de sphéroïdes, ce qui confère aux résultats obtenus sur les propriétés mécaniques de ces structures un intérêt biologique. Ces sphéroïdes constituent un modèle pertinent pour étudier les tumeurs en trois dimensions, fournissant des données potentiellement transposables à des contextes biologiques.

Durant ma thèse, plusieurs techniques ont été utilisées pour la formation de ces sphéroïdes. Tout d'abord, nous avons employé la méthode des gouttes suspendues, dont le principe est illustré dans la figure 2.11. Cette technique présente l'avantage d'être simple, peu coûteuse, et permet de générer un grand nombre de sphéroïdes en peu de temps. Cependant, elle présente certaines limitations pour la culture à long terme. En effet, même dans des atmosphères saturées en humidité, les gouttes ont tendance à s'évaporer, ce qui réduit la stabilité des cultures. De plus, la quantité limitée de nutriments dans ces gouttes s'épuise rapidement, limitant ainsi la viabilité des sphéroïdes sur des périodes prolongées. En conséquence, au fil de ma thèse, d'autres techniques de création de sphéroïdes ont été développées pour pallier ces inconvénients.

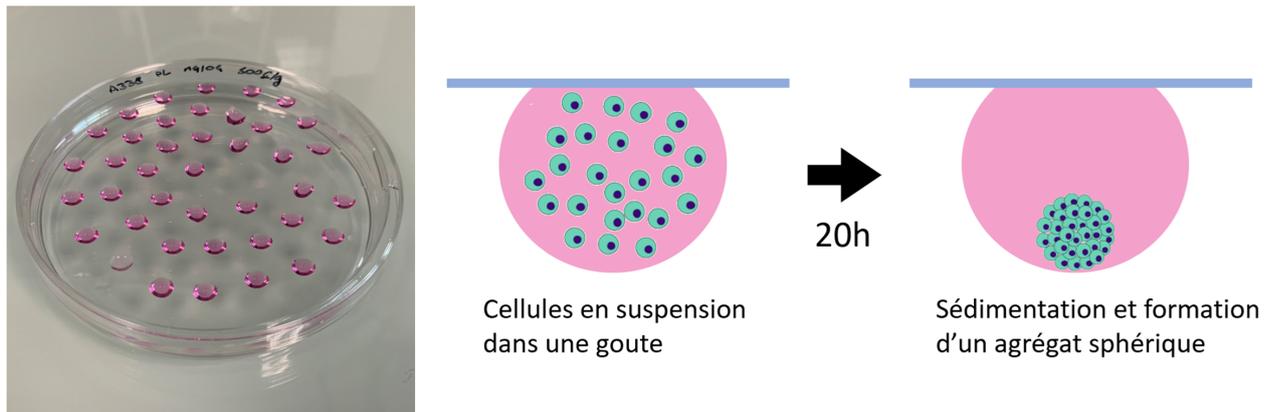


FIGURE 2.11 – Image et schéma de la formation de sphéroïdes par la méthode des gouttes suspendues. Une goutte composée d'un nombre choisi de cellules et de milieu de culture est déposée sur le couvercle d'une boîte de Pétri, qui est ensuite retournée. Les cellules sédimentent au fond de la goutte et s'agrègent entre elles pour former un sphéroïde

Une des solutions adoptées a été l'utilisation de "tampons" imprimés en 3D (stéréolithographie), qui nous ont permis de créer des structures en agarose au sein de plaques à 6 puits. Ces tampons, ainsi que leur géométrie, sont décrits en détail dans l'annexe A.6. Grâce à cette approche, nous avons pu produire un grand nombre de sphéroïdes tout en assurant un approvisionnement adéquat en nutriments et une culture prolongée sans problème d'évaporation.

Enfin, nous avons également largement utilisé des plaques commerciales de 96 puits avec des puits arrondis, dont les surfaces sont traitées pour empêcher l'adhérence des cellules (Corning Costar Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, CLS7007). Ces plaques se sont révélées particulièrement utiles pour tester différentes conditions expérimentales, notamment dans les études explorant l'impact de certaines substances chimiques sur les sphéroïdes.

## 2.3 Mesure des propriétés mécaniques de sphéroïdes par application d'échelon de pression

### 2.3.1 Réponse à un échelon de pression et lien avec les propriétés rhéologiques de l'agrégat

L'expérience classique d'AMP sur un sphéroïde, développée par Karine Guevorkian et ses collègues [4], consiste à appliquer un échelon de pression et à observer la dynamique avec laquelle ce sphéroïde se déforme et s'écoule dans la micropipette. Plus précisément, on applique une pression  $\Delta P$  à  $t = 0$  à l'entrée de la puce et cette pression est maintenue constante au cours du temps. Nous présentons ici le travail réalisé par cette équipe, permettant de relier cette dynamique aux propriétés rhéologiques de l'agrégat cellulaire dont l'élasticité  $E$ , la viscosité  $\eta$  et la tension de surface  $\gamma$ . Cependant, certains points ont légèrement été modifiés.

#### Pression effective induite par la tension de surface

Sous l'effet de cet échelon de pression, le sphéroïde subit une déformation, et deux cas de figure peuvent être observés.

Les agrégats cellulaires, comme nous l'avons vu précédemment (cf. 1.3.2), possèdent une tension de surface effective  $\gamma$ , qui est responsable de leur forme sphérique. En raison de cette tension de surface, il existe une pression seuil,  $\Delta P_c$ , en dessous de laquelle les effets de la tension de surface dominant, empêchant ainsi l'écoulement viscoélastique du sphéroïde dans la pipette.

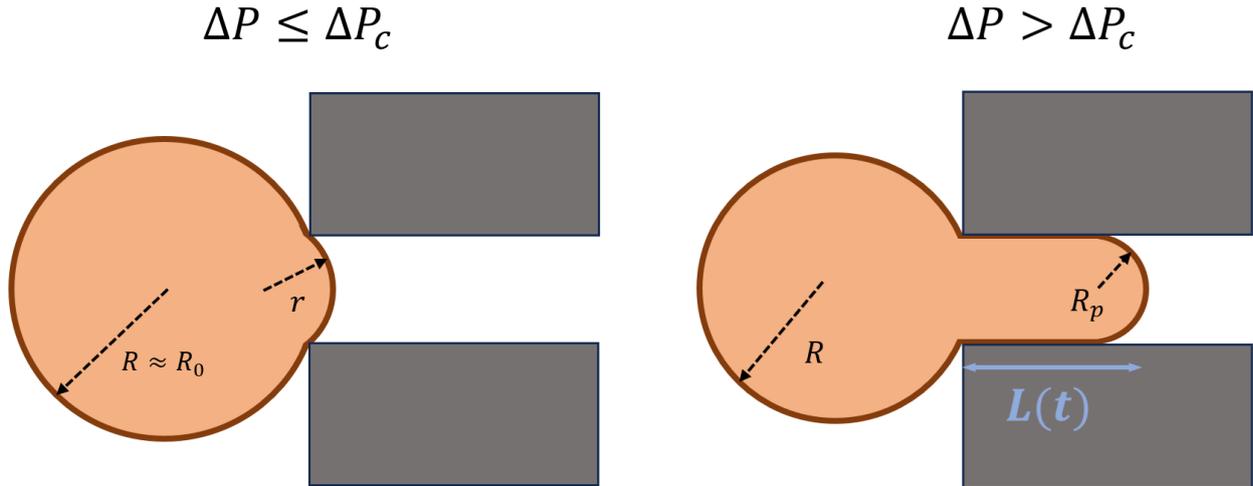


FIGURE 2.12 – Schéma de l'aspiration d'un sphéroïde par micropipette. Dans le cas où la pression d'aspiration est inférieure à la pression seuil  $\Delta P_c$ , le sphéroïde ne s'écoule pas, et le rayon de courbure  $r$  de la partie aspirée est supérieur au rayon de la pipette  $R_p$ . En revanche, lorsque la pression d'aspiration dépasse la pression seuil, le sphéroïde s'écoule dans la pipette.

En effet, en deçà de cette pression seuil, même si le sphéroïde a le temps de dissiper les contraintes élastiques et de se comporter comme un fluide, il atteindra une déformation maximale. On se place dans cette condition où le sphéroïde peut être traité comme un fluide<sup>1</sup> et on suppose que le tissu n'interagit pas avec les parois de la pipette (condition de mouillage nul). Dans ces conditions, on peut déterminer l'équilibre mécanique en considérant la pression comme homogène dans le sphéroïde et en appliquant la loi de Laplace sur les surfaces internes et externes à la pipette :

$$\Delta P + \frac{2\gamma}{R} = \frac{2\gamma}{r} \quad (2.1)$$

où  $r$  est le rayon de courbure de la partie aspirée dans la micropipette, comme illustré à la figure 2.12. Il apparaît que lorsque la pression appliquée,  $\Delta P$ , dépasse la valeur critique,  $\Delta P_c = 2\gamma(1/R_p - 1/R)$ , le sphéroïde atteint la courbure maximale imposée par la pipette et peut commencer à s'écouler dans celle-ci.

Dans ce deuxième cas de figure, lorsque  $\Delta P > \Delta P_c$ , le sphéroïde s'écoule dans la pipette, et une langue de longueur  $L$ , se forme à l'intérieur de celle-ci, comme représentée à la figure 2.12. Cependant, la tension de surface continue d'exercer une force qui freine l'aspiration

1. Les propriétés viscoélastiques des agrégats font que les sphéroïdes atteignent avec une certaine dynamique cette déformation. Cette dynamique peut être analysé pour déterminer des propriétés viscoélastiques comme le montre Guevorkian *et al.* dans [5]. Nous avons également étudié ce régime ( $\Delta P < \Delta P_c$ ) afin de déterminer la tension de surface (cf. annexe A.8)

du sphéroïde. Il est donc nécessaire de prendre en compte cet effet pour obtenir la pression effective  $\Delta P'$ , qui contribue réellement à la déformation du sphéroïde.

Dans ce cas, on peut exprimer simplement l'énergie libre du système. C'est la somme de l'énergie de surface due à la tension superficielle et du travail de la pression appliquée. En faisant une légère approximation géométrique (aucune incidence, car le terme correctif ne dépend pas de  $L$ ) on obtient :

$$\mathcal{F} = (4\pi R^2 + 2\pi R_p L)\gamma - \Delta P \pi R_p^2 L \quad (2.2)$$

Ainsi, on peut obtenir la force d'aspiration effective,  $f$  qui contribue à la déformation,  $L$  de l'agrégat par :  $f = -\frac{d\mathcal{F}}{dL}$ , ce qui nous donne :

$$f = -(8\pi R \frac{dR}{dL} + 2\pi R_p)\gamma + \Delta P \pi R_p^2 \quad (2.3)$$

En considérant que le volume du sphéroïde est globalement conservé (et en faisant une légère approximation géométrique), on a :

$$\frac{4}{3}\pi R_0^3 = \frac{4}{3}\pi R^3 + \pi R_p^2 L \quad (2.4)$$

$$\rightarrow 0 = 4\pi R^2 dR + \pi R_p^2 dL \quad (2.5)$$

$$\rightarrow \frac{dR}{dL} = -\frac{1}{4} \frac{R_p^2}{R^2} \quad (2.6)$$

Ainsi la force d'aspiration effective,  $f$  s'exprime comme :

$$f = \pi R_p^2 (\Delta P - \Delta P_c) \quad (2.7)$$

On voit donc que la tension de surface a pour conséquence de réduire la contrainte qui s'applique effectivement sur le matériau viscoélastique, et cette pression effective est donnée par :  $\Delta P' = \Delta P - \Delta P_c$ .

### Observation expérimentale de la dynamique de déformation

Lorsqu'on applique un échelon de pression avec une pression  $\Delta P > \Delta P_c$ , on observe une déformation qui suit toujours la même dynamique, comme illustrée sur la figure 2.13.

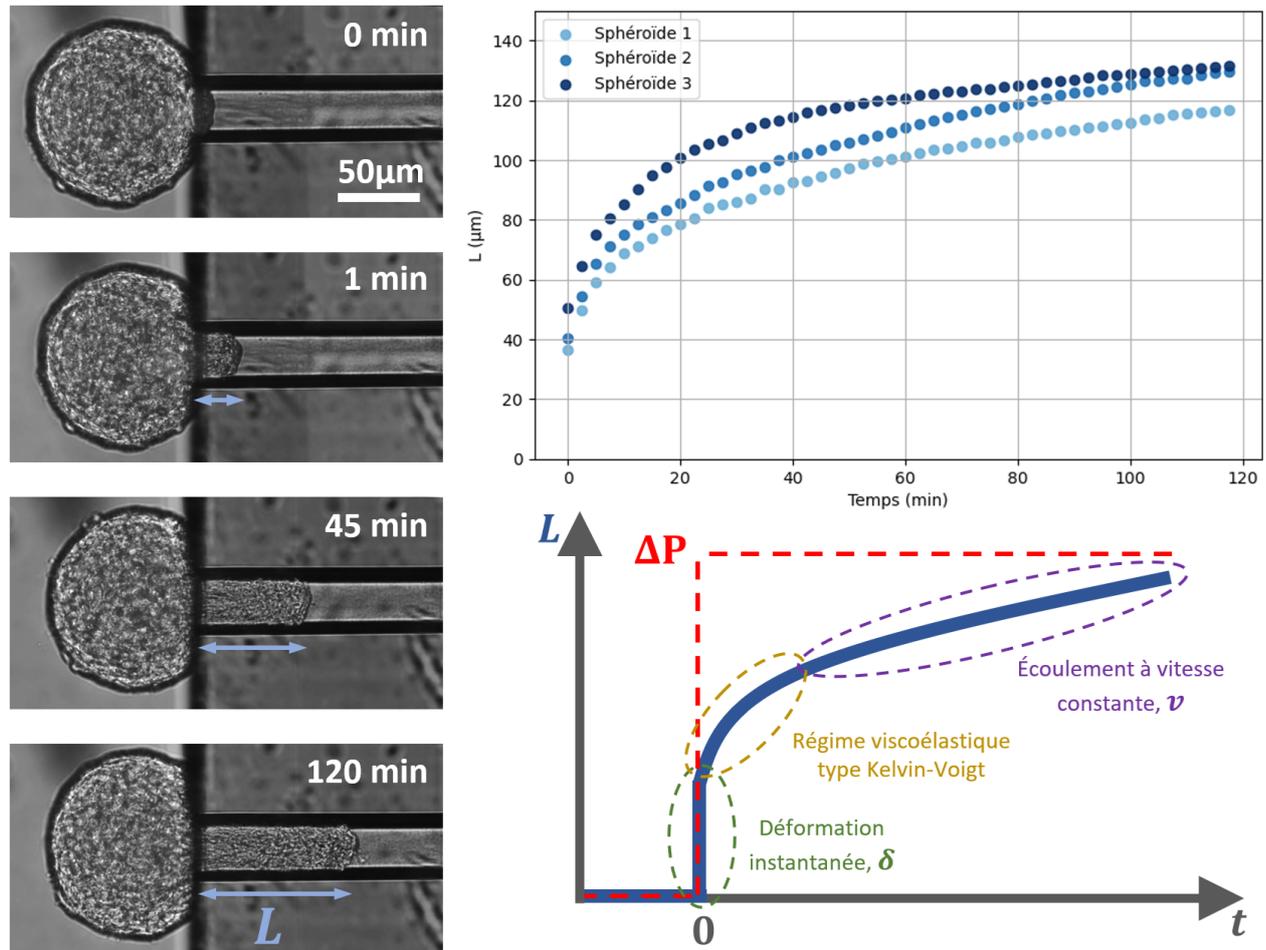


FIGURE 2.13 – Images de microscopie en champ clair montrant l'aspiration d'un sphéroïde soumis à un échelon de pression. Graphique illustrant la dynamique d'aspiration pour trois sphéroïdes aspirés simultanément dans une même puce. Schéma représentant le profil général de l'aspiration sous échelon de pression.

Cette dynamique se compose d'abord d'une déformation initiale,  $\delta$ , quasi-instantanée semblable à celle d'un solide élastique. Elle est suivie par un régime viscoélastique de quelques dizaines de minutes (similaire à la réponse d'un modèle de Kelvin-Voigt). Enfin, aux temps longs, on observe un écoulement à vitesse constante,  $v$ , du tissu dans la pipette, semblable au comportement d'un fluide visqueux qui s'écoulerait en ne dissipant de l'énergie qu'à l'entrée de la pipette (sans interaction avec les parois; autrement, un profil en  $L \propto \sqrt{t}$  serait observé, dû à l'augmentation des dissipations avec la longueur de la langue).

### Lien entre élasticité et déformation instantanée

Comme nous venons de le voir, du fait de sa tension de surface, la contrainte qui s'applique réellement sur les propriétés viscoélastiques du sphéroïde est  $\Delta P'$ . Lorsque cette contrainte est appliquée à  $t = 0$ , on observe une déformation instantanée  $\delta = L(0^+)$  du sphéroïde. Afin de déterminer l'élasticité de l'agrégat à partir de cette déformation initiale, il est nécessaire de connaître la loi donnant la déformation  $\delta$  d'un matériau élastique aspiré à la pression  $\Delta P'$  par une pipette de rayon  $R_p$ .

Pour cela, Guevorkian *et al.* utilisent la formule donnée par Aoki *et al.* dans leur article de 1997 [6]. Dans cet article, les chercheurs ont réalisé des simulations numériques par éléments finis, qui simulent l'AMP d'un matériau élastique linéaire, de module de Young  $E$ . Sous leur condition particulière<sup>2</sup>, ils montrent que l'on a la relation :

$$\delta = C_e \frac{R_p \Delta P'}{E} \quad (2.8)$$

avec  $C_e$  un facteur géométrique tenant compte de la largeur des parois de la pipette. Dans notre cas, cette largeur est infinie, ce qui correspond à  $C_e = 0,97$  que l'on peut raisonnablement approximer par 1. Ainsi, à partir de la déformation initiale  $\delta$ , on peut remonter à l'élasticité  $E_i$  de notre agrégat avec :

$$E_i = \frac{R_p \Delta P'}{\delta} \quad (2.9)$$

Il convient toutefois de noter quelques nuances concernant la mesure précise de  $\delta$ . Cependant, cette partie peut être ignorée en passant directement à la section suivante (2.3.1), car elle n'affecte pas les principes fondamentaux.

---

2. La géométrie qu'ils aspirent n'est pas une sphère, mais un cube. De plus, l'élasticité linéaire d'un matériau nécessite un couple de 2 constantes pour être entièrement caractérisé, le plus classique étant celui formé par le module de Young  $E$  et le coefficient de poisson  $\nu$ . Dans ce papier les auteurs considèrent le matériau comme quasiment incompressible en prenant un coefficient de poisson égal à 0.49 (l'incompressibilité stricte est  $\nu = 1/2$  mais cela pose généralement des problèmes numériques). Suite à certaines interrogations arrivées tardivement durant ma thèse, nous avons voulu réaliser nos propres simulations afin de prendre en compte les corrections liées à la compressibilité et la géométrie sphérique. Ces résultats sont développés dans la section 2.4. Cependant, comme ces résultats ont été très tardifs, la plupart des résultats présents dans ce manuscrit ont été issus du modèle utilisant la formule proposée par Aoki.

Si l'on définit  $\delta$  comme étant la déformation, il faut faire attention à ne pas prendre pour origine de mesure de  $L$ , exactement l'entrée de la pipette. En effet, du fait de sa forme sphérique, le seul fait d'être en contact avec la pipette a pour conséquence qu'une partie du sphéroïde soit déjà à l'intérieur de la pipette, même avant de subir une déformation.

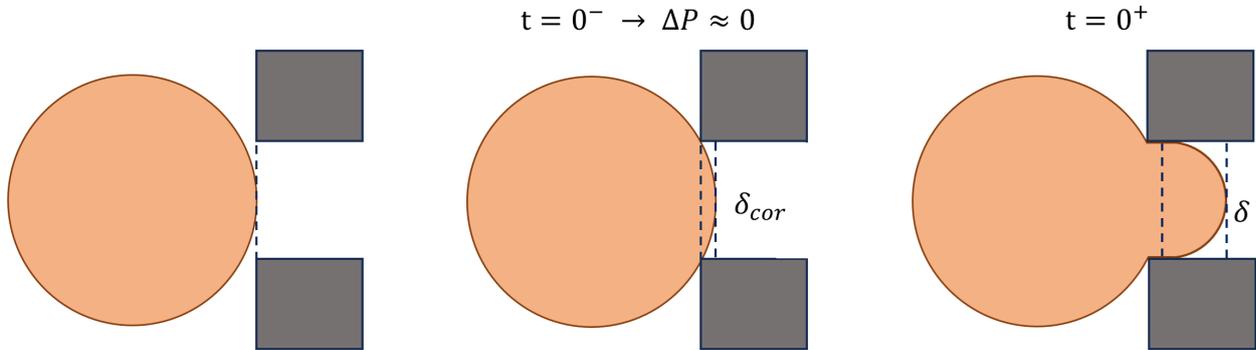


FIGURE 2.14 – Schéma illustrant la correction appliquée à l'origine des mesures de déformation.

Il est donc nécessaire de définir précisément l'origine de la mesure de  $L$  selon l'une des deux options suivantes :

- Prendre l'origine à la position du bout du sphéroïde en contact avec la pipette, avant qu'une pression significative ne l'ait déformé.
- Prendre l'origine à l'entrée de la pipette, puis soustraire la petite quantité  $\delta_{cor} = R_0 - \sqrt{R_0^2 - R_p^2}$ , qui biaise légèrement la mesure de la déformation.

Cette correction reste néanmoins très faible et a un impact négligeable sur les mesures d'élasticité dans la plupart des cas.

Ceci étant, les auteurs du travail pionnier ont fait un choix différent, considérant que la quantité à prendre en compte pour remonter à l'élasticité est  $\delta - R_p$ , ce qui conduit à la formule suivante (équation (8.6) dans [5]) :

$$E_i = \frac{R_p \Delta P'}{\delta - R_p} \quad (2.10)$$

Cette formulation est sûrement motivée par le fait d'avoir une déformation  $\delta = R_p$  lorsque  $\Delta P = \Delta P_c$ . Cependant, même si cela est l'état d'équilibre vers lequel le système doit tendre au temps long, nous pensons qu'il est erroné d'appliquer cette formule dans le cas de la déformation instantanée. En effet, si l'on imagine un matériau très rigide, mais qui se comporte tout de même au temps long comme un fluide, on pourrait observer pour  $\Delta P > \Delta P_c$

une déformation initiale plus petite que  $R_p$ . Cette formule serait alors inutilisable, car donnant une élasticité négative (notre formule serait également erronée, car on n'aurait pas  $\Delta P' = \Delta P - \Delta P_c$  dans ce cas).

Cependant, cet ajustement a un impact minime, surtout en raison des déformations relativement importantes observées dans les tissus.

---

### Lien entre viscosité et écoulement au temps long

Après avoir analysé la déformation instantanée et son lien avec l'élasticité, il est nécessaire de s'intéresser au comportement du sphéroïde à long terme, lorsque l'écoulement devient constant. La vitesse d'écoulement,  $v$ , peut être directement reliée à la viscosité  $\eta$  du sphéroïde. Pour cela, nous nous appuyons sur les travaux de Z. Dagan et al. [7] qui ont développé un modèle pour l'écoulement de liquides visqueux dans des capillaires.

Dans le cadre de notre étude, nous faisons l'hypothèse qu'il n'y a pas de frottement significatif avec les parois de la pipette, ou du moins que ces frottements sont négligeables (ce qui a été vérifié expérimentalement). Cela nous permet de considérer que dans ce régime, le seul phénomène qui s'oppose à l'écoulement du sphéroïde est la dissipation visqueuse qui a lieu à l'entrée de la pipette.

Dans ce régime, on a alors la force appliquée par la pression d'aspiration  $f = \pi R_p^2 \Delta P'$  qui est entièrement contrebalancée par la force issue des dissipations visqueuses à l'entrée de la pipette et dont Z. Dagan *et al.* donne une formulation :  $f_{visc} = 3\pi^2 \eta R_p v$ . On peut ainsi relier directement la vitesse d'écoulement observée à la viscosité interne de l'agrégat, car dans ce régime stationnaire on a  $f = f_{visc}$ , ce qui nous donne :

$$\eta = \frac{R_p \Delta P'}{3\pi v} \quad (2.11)$$

### 2.3.2 Modèle viscoélastique

Nous venons de voir comment relier les régimes extrêmes (temps court et temps long) à l'élasticité et à la viscosité du sphéroïde. Cependant, l'observation de la réponse du sphéroïde à un échelon de pression montre que son comportement ne se limite pas à ces deux régimes distincts. En effet, la dynamique du sphéroïde comprend des phases intermédiaires complexes, qui ne peuvent être capturées par une simple description purement élastique ou purement visqueuse.

#### Construction d'un diagramme rhéologique

Afin d'analyser, en détail, la totalité de cette dynamique complexe, il est pertinent d'utiliser un diagramme rhéologique. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, ces diagrammes, généralement composés de combinaisons d'éléments élastiques (représentés par des ressorts) et d'éléments visqueux (représentés par des amortisseurs), permettent de reproduire les comportements viscoélastiques complexes des matériaux. Ces modèles permettent d'établir une relation entre la déformation  $\epsilon$  et la contrainte  $\sigma$ . Dans notre cas, nous imposons la contrainte,  $\sigma = \Delta P'$  et nous regardons la déformation  $\epsilon = L/R_p$  qu'elle engendre. Afin de reproduire le comportement des sphéroïdes, il est pertinent de partir du modèle de Kelvin-Voigt, qui permet de reproduire qualitativement le régime transitoire observé.

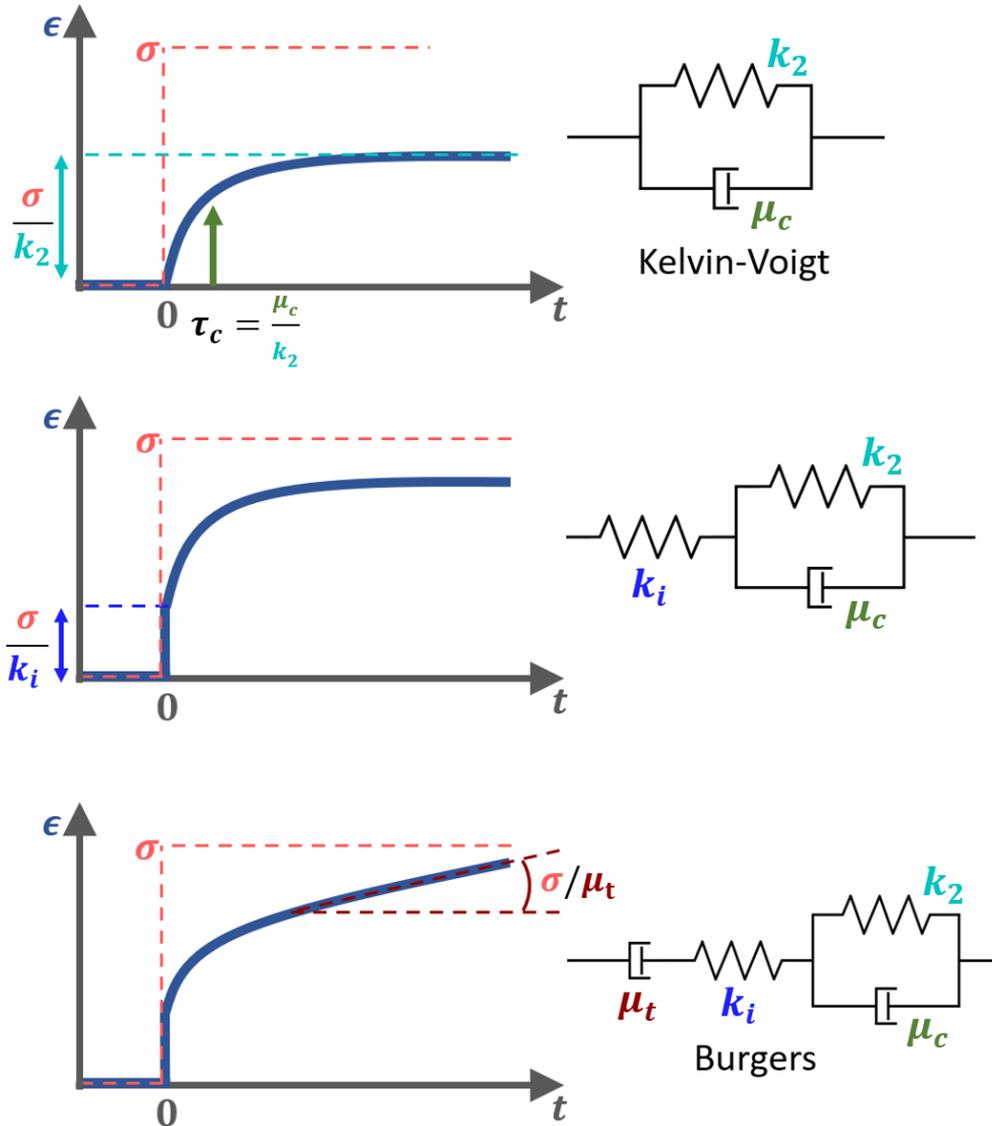


FIGURE 2.15 – Illustration de la réponse à un échelon de pression pour différents modèles viscoélastiques. Chaque étape montre l'impact sur la réponse mécanique de l'ajout progressif d'éléments au diagramme rhéologique.

Le modèle de Kelvin-Voigt est constitué d'un élément élastique  $k_2$  en parallèle avec un élément visqueux  $\mu_c$ . La réponse de ce modèle à un échelon de contrainte est illustrée sur la figure 2.15. Bien que ce modèle soit capable de reproduire le comportement viscoélastique transitoire observé, il ne permet pas de capturer la déformation instantanée ni l'écoulement visqueux à long terme.

Pour modéliser ces comportements supplémentaires, il est nécessaire de complexifier le modèle. En ajoutant un élément élastique  $k_i$  en série avec le modèle de Kelvin-Voigt, on obtient la composante de déformation élastique instantanée. Ce modèle ainsi formé permet de décrire un solide viscoélastique qui présenterait au temps court une élasticité  $k_i$  et puis au bout de quelque temps caractéristique  $\tau_c = \mu/k_2$ , une élasticité plus faible  $k_f = \frac{k_i k_2}{k_i + k_2}$ .

Ensuite, en intégrant un élément visqueux  $\mu_t$  en série avec l'ensemble, on parvient à modéliser l'écoulement à vitesse constante observé aux temps long et ainsi à retrouver qualitativement, le comportement observé précédemment. Ces différents modèles sont également illustrés sur la figure 2.15. Ce dernier modèle s'appelle modèle de Burgers et il permet de reproduire très fidèlement les dynamiques observées expérimentalement.

*Remarque : Nous avons adopté un diagramme légèrement différent de celui de Karine Guevorkian [É al dans \[4\]](#), mais il y a une équivalence totale entre ces deux diagrammes et ils conduisent à la même réponse viscoélastique. Nous avons juste trouvé son utilisation plus pratique et il est plus communément utilisé pour ce type de réponse (exemple dans COMSOL).*

### Résolution du modèle viscoélastique et lien avec les propriétés du tissu

Comme nous l'avons vu, le régime visqueux observé à long terme est modélisé dans le cadre viscoélastique par l'amortisseur placé en série avec l'ensemble des autres éléments. Nous aborderons ce point plus en détail dans la section suivante, mais il est important de noter que cet écoulement visqueux est lié à une restructuration du tissu. En d'autres termes, la déformation du sphéroïde, dans ce régime, s'accompagne d'une réorganisation des cellules au niveau du tissu. Plus précisément, nous observons un cisaillement à l'entrée de la pipette, où des couches de cellules glissent les unes sur les autres, jusqu'à changer de position relative. Cette viscosité apparaît donc à l'échelle du tissu et c'est pourquoi nous notons cet amortisseur  $\mu_t$ .

Le reste du modèle correspond donc au comportement mécanique de ce qui compose le tissu, c'est-à-dire les cellules et la matrice extracellulaire. Cet ensemble (cellule+MEC) se comporte donc comme un solide viscoélastique qui présenterait au temps court une élasticité initiale et puis, au bout d'un certain temps, une élasticité finale plus faible. On notera  $k_i$ ,  $k_2$  et  $\mu_c$  les paramètres de ce modèle comme cela est schématisé sur la figure 2.16.

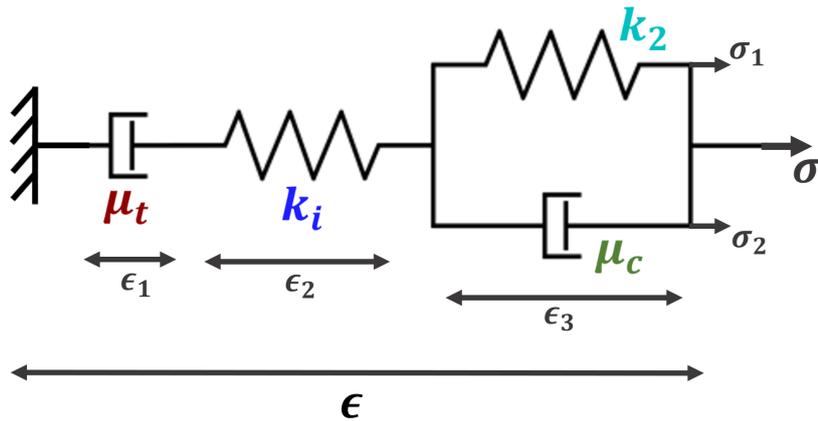


FIGURE 2.16 – Modèle viscoélastique type Burger

Pour obtenir la relation entre la déformation  $\epsilon$  et la contrainte  $\sigma$  pour le modèle viscoélastique présenté, nous allons analyser les composants individuels du modèle et leur interaction. Pour rappel, les lois de comportement des éléments individuels sont :

$$\begin{aligned} \epsilon &= \sigma/k && \text{pour un ressort d'élasticité } k \\ \dot{\epsilon} &= \sigma/\mu && \text{pour un amortisseur de viscosité } \mu \end{aligned}$$

Dans l'élément Kelvin-Voigt, la somme des contraintes de chaque branche est égale à la contrainte totale :

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2 \quad (2.12)$$

La déformation totale est la somme des déformations des 3 éléments en série :

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2 + \epsilon_3 \quad (2.13)$$

En dérivant (2.13) et en utilisant les lois de comportement, on obtient :

$$\begin{aligned}
 \dot{\epsilon} &= \frac{\sigma}{\mu_t} + \frac{\dot{\sigma}}{k_i} + \frac{\sigma_2}{\mu_c} \\
 &= \frac{\sigma}{\mu_t} + \frac{\dot{\sigma}}{k_i} + \frac{\sigma_2}{\mu_c} + \left( \frac{\sigma_1}{\mu_c} - \frac{\sigma_1}{\mu_c} \right) \\
 &= \frac{\sigma}{\mu_t} + \frac{\dot{\sigma}}{k_i} + \frac{\sigma}{\mu_c} - \frac{k_2 \epsilon_3}{\mu_c} \\
 &= \frac{\dot{\sigma}}{k_i} + \left[ \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} \right] \sigma - \frac{k_2}{\mu_c} (\epsilon - \epsilon_1 - \epsilon_2)
 \end{aligned}$$

En dérivant cette équation, on obtient la loi de comportement de notre modèle viscoélastique :

$$\begin{aligned}
 \ddot{\epsilon} &= \frac{\ddot{\sigma}}{k_i} + \left[ \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} \right] \dot{\sigma} - \frac{k_2}{\mu_c} \left( \dot{\epsilon} - \frac{\sigma}{\mu_t} - \frac{\dot{\sigma}}{k_i} \right) \\
 \Rightarrow \ddot{\epsilon} + \frac{k_2}{\mu_c} \dot{\epsilon} &= \frac{1}{k_i} \ddot{\sigma} + \left[ \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} + \frac{k_2}{k_i \mu_c} \right] \dot{\sigma} + \frac{k_2}{\mu_t \mu_c} \sigma
 \end{aligned} \tag{2.14}$$

On peut ainsi résoudre cette équation différentielle dans le cas où l'on applique un échelon de pression.  $\sigma$  est alors défini par :

$$\sigma(t) = \begin{cases} 0 & \text{pour } t < 0 \\ \Delta P' = \Delta P - \Delta P_c & \text{pour } t \geq 0 \end{cases}$$

En définissant  $\tau_c = \mu_c/k_2$ , on a pour  $t \geq 0$  :

$$\ddot{\epsilon} + \frac{1}{\tau_c} \dot{\epsilon} = \frac{\Delta P'}{\mu_t \tau_c} \tag{2.15}$$

La résolution de cette équation différentielle et la détermination des constantes à partir des conditions initiales est assez triviale et peut être sautée à la lecture en allant directement à la solution 2.16.

En intégrant, on obtient :

$$\dot{\epsilon} + \frac{1}{\tau_c}\epsilon = \frac{\Delta P'}{\mu_t \tau_c}t + A$$

En cherchant une solution particulière sous la forme d'un polynôme de degré 1, on a :

$$\begin{aligned} \Rightarrow \quad \epsilon_H(t) &= B e^{-t/\tau_c} \quad \text{et} \quad \epsilon_P(t) = Ct + D \\ &\Rightarrow C + \frac{C}{\tau_c}t + \frac{D}{\tau_c} = \frac{\Delta P'}{\mu_t \tau_c}t + A \\ \Rightarrow \quad \begin{cases} \frac{C}{\tau_c} = \frac{\Delta P'}{\mu_t \tau_c} \\ C + \frac{D}{\tau_c} = A \end{cases} &\Rightarrow \begin{cases} C = \frac{\Delta P'}{\mu_t} \\ D = \tau_c \left[ A - \frac{\Delta P'}{\mu_t} \right] \end{cases} \\ \epsilon(t) &= B e^{-t/\tau_c} + \frac{\Delta P'}{\mu_t}(t - \tau_c) + \tau_c A \end{aligned}$$

On a deux conditions initiales en  $t = 0^+$  (qui sont la somme des conditions des modèles de Maxwell et Kelvin-Voigt, puisqu'en série) :

$$\begin{aligned} \begin{cases} \epsilon(0) = \frac{\Delta P'}{k_i} &= B - \frac{\tau_c \Delta P'}{\mu_t} + \tau_c A \\ \dot{\epsilon}(0) = \left( \frac{1}{\mu_c} + \frac{1}{\mu_t} \right) \Delta P' &= \frac{\Delta P'}{\mu_t} - \frac{B}{\tau_c} \end{cases} \\ \Rightarrow \quad \begin{cases} B = -\frac{\tau_c \Delta P'}{\mu_c} \\ A = \Delta P' \left( \frac{1}{k_i \tau_c} + \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} \right) \end{cases} \\ \Rightarrow \quad \epsilon(t) = \Delta P' \left[ \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_2} (1 - e^{-t/\tau_c}) + \frac{t}{\mu_t} \right] \end{aligned}$$


---

En prenant  $\epsilon = L/R_p$  on a donc :

$$\boxed{L(t) = R_p \Delta P' \left[ \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_2} (1 - e^{-t/\tau_c}) + \frac{t}{\mu_t} \right]} \quad (2.16)$$

Afin de relier les paramètres de ce modèle viscoélastique aux grandeurs réelles d'élasticité et de viscosité du sphéroïde, on utilise les résultats des régimes court (eq.2.9) et long (eq.2.11)

montrés juste avant.

$$\begin{aligned} \delta = L(0^+) &= \frac{R_p \Delta P'}{k_i} = \frac{R_p \Delta P'}{E_i} \quad \Rightarrow \quad k_i = E_i \\ v = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dL}{dt} &= \frac{R_p \Delta P'}{\mu_t} = \frac{R_p \Delta P'}{3\pi\eta} \quad \Rightarrow \quad \mu_t = 3\pi\eta \end{aligned} \quad (2.17)$$

En considérant, au vu de la réponse observé, que les sphéroïdes présentent initialement une élasticité  $E_i$  puis, qu'au bout de quelque  $\tau_c$  leurs modules de Young diminuent pour atteindre la valeur,  $E_f$ , on a alors :

$$k_2 = \frac{E_i E_f}{E_i - E_f} \quad (2.18)$$

On a donc en définitive :

$$\boxed{L(t) = \frac{R_p \Delta P'}{E_f} \left[ 1 - \frac{E_i - E_f}{E_i} e^{-t/\tau_c} \right] + \frac{R_p \Delta P'}{3\pi\eta} t} \quad (2.19)$$

À partir de la réponse complète d'un sphéroïde à un échelon de pression, il est possible de déterminer 4 paramètres rhéologiques qui sont :

- $E_i$  : Qui peut s'interpréter comme l'élasticité initiale, ou le module de Young instantané, perçue lorsque le tissu est soumis à une sollicitation soudaine. Ce paramètre reflète la rigidité du tissu dans le régime de réponse élastique à court terme. Il représente la capacité du matériau à résister à une déformation rapide, avant que les réarrangements (notamment ceux internes aux cellules) n'interviennent.
- $E_f$  : L'élasticité finale qui représente la rigidité perçue lorsque le tissu est sollicité sur une période prolongée, après un certain temps ( $> \tau_c$ ), qui a permis des réarrangements internes accompagnés de dissipations visqueuses.
- $\tau_c$  : Le temps de relaxation, qui décrit la transition entre les deux régimes d'élasticité. On peut interpréter ce temps comme celui permettant de relaxer les contrainte élastique au niveau des cellules et de la matrice. On peut ainsi lui associer une viscosité ( $\eta_c = \tau_c \frac{E_i E_f}{E_i - E_f}$ ) interprétable comme une viscosité effective des réseaux de protéines fibreuses qui composent le cytosquelette et la matrice (temps de relaxation microscopique).

pique).

- $\eta$  : La viscosité du tissu à long terme, qui correspond à la capacité du sphéroïde à s'écouler comme un fluide lorsqu'il est sollicité sur des durées prolongées. Ce paramètre est essentiel pour caractériser la capacité du tissu à se réorganiser et est lié à l'adhésion et à l'activité des cellules.

On peut également construire un autre temps caractéristique :  $\tau_t = \frac{\eta}{E_f}$ , et qui est l'analogue de  $\tau_c$  mais qui décrit le temps que mettent les contraintes élastiques à se relaxer à l'échelle du tissu du fait des réarrangements cellulaires (temps de relaxation mésoscopique).

Cependant, il nous manque une grandeur qui reste indéterminée avec la seule analyse de cette aspiration : la tension de surface  $\gamma$  ou la pression seuil qui lui est associée  $\Delta P_c$ .

## Discussions sur la tension de surface

La mesure de la pression seuil  $\Delta P_c$  est cruciale, car elle est indispensable pour la détermination précise des autres paramètres rhéologiques. De plus, elle permet de calculer la tension de surface  $\gamma$  du sphéroïde, un paramètre riche d'intérêts, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1.

Guevorkian *et al.* proposent une méthode pour mesurer cette pression seuil en observant la rétraction du sphéroïde vers sa forme sphérique une fois l'aspiration terminée. Son protocole consiste, après une longue période d'aspiration, à relâcher la pression  $\Delta P$  et à mesurer la dynamique de rétraction en suivant l'évolution de la longueur de la langue  $L$  à l'intérieur de la micropipette. Elle observe que la dynamique de rétraction suit un comportement similaire à celui de l'aspiration, comme illustré sur la figure 2.17.

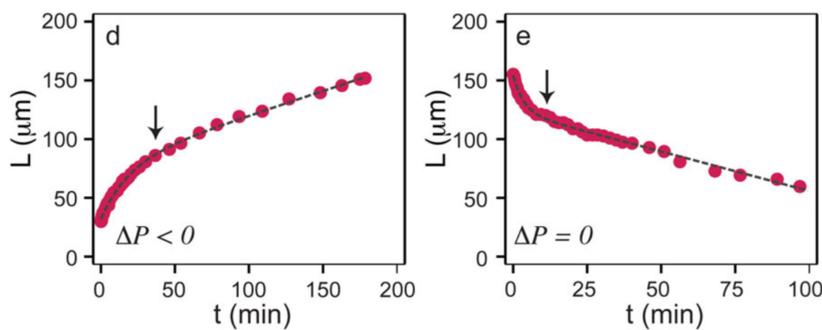


FIGURE 2.17 – aspiration et rétraction [4]

De manière similaire à l'aspiration, on observe, à long terme, un écoulement à vitesse constante  $v_r$  lors de la rétraction. Cette dynamique résulte d'un équilibre entre deux forces principales :

- La tension de surface, qui agit comme un moteur en générant une force de rappel égale à  $\pi R_p^2 \Delta P_c$  cherchant à restaurer la forme sphérique du sphéroïde.
- La viscosité du tissu, qui freine cette rétraction, en jouant un rôle de dissipation visqueuse. Karine Guevorkian fait l'hypothèse que la dissipation visqueuse qui s'oppose à la tension de surface pendant la rétraction suit la même loi que celle observée lors de l'aspiration :  $3\pi^2 \eta R_p v_r$ .

Sous ces conditions, on peut alors de la même manière que précédemment exprimer la vitesse de rétraction :  $v_r = \frac{R_p \Delta P_c}{3\pi \eta}$ . En mesurant alors les vitesses d'aspiration  $v_a$  et de rétraction  $v_r$  du sphéroïde lorsqu'une pression  $\Delta P$  est appliquée lors de l'aspiration, on peut mesurer la pression critique  $\Delta P_c$  grâce à la relation suivante :

$$\Delta P_c = \Delta P \frac{v_r}{v_a + v_r} \quad (2.20)$$

Il est indéniable que cette méthode permet de sonder efficacement la tension de surface d'un sphéroïde. Par exemple, si deux sphéroïdes sont aspirés sous la même pression, mais que l'un présente une aspiration plus lente et une rétraction plus rapide, il est clair qu'une tension de surface plus élevée est à l'origine de cette différence.

Cependant, cette quantification des forces de dissipation visqueuse pendant la rétraction pourrait ne pas être complètement exacte dans tous les cas. Ce doute est apparu lors de nos observations sur la lignée A338, où la rétraction ne se déroule pas de la même manière que dans les travaux de Guevorkian *et al.*, réalisés avec la lignée S180 (sarcome murin). En effet, dans la majorité des cas, nous avons observé un phénomène distinct illustré à la figure 2.18.

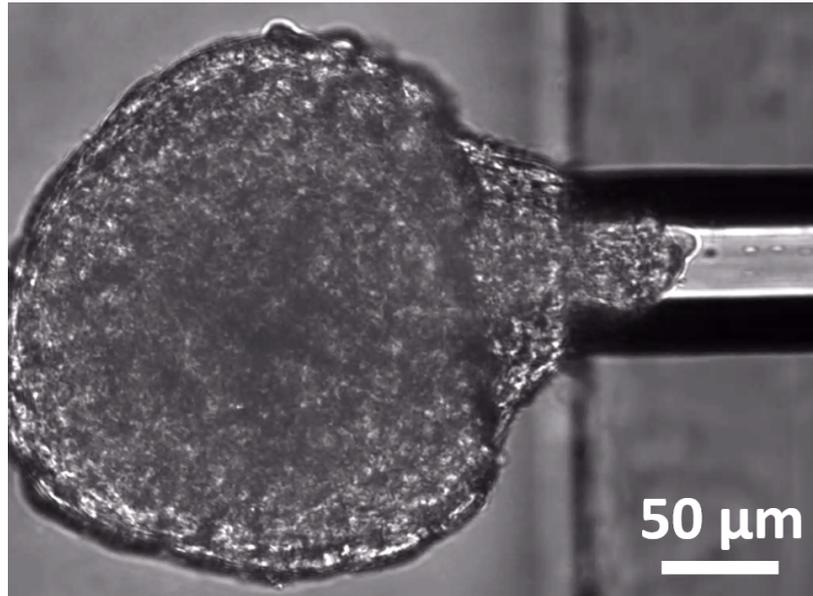


FIGURE 2.18 – retraction

Lorsque nous retirons la pression d'aspiration, le sphéroïde se rétracte effectivement pour revenir à une forme sphérique, mais cette rétraction s'accompagne d'une éjection très rapide du sphéroïde hors de la micropipette<sup>3</sup>. En une dizaine de minutes, nous observons la rétraction complète de la langue, mais le sphéroïde n'a pas retrouvé sa forme sphérique. La partie qui a été aspirée prend une forme conique, comme illustré à la figure 2.18. Ce phénomène se produit également lorsque la pression n'est pas totalement relâchée, mais qu'une légère pression (de l'ordre de 1 à 2 mbar) continue d'être appliquée (ce phénomène ne provient donc pas d'une surpression qui se serait accumulée du côté de la sortie de la puce). Cette éjection rapide pourrait être due à des contraintes élastiques stockées dans le sphéroïde, qui, lorsqu'on enlève la pression d'aspiration, provoquent cette éjection. Il est également possible que ce soit simplement l'effet de la tension de surface qui génère une force poussant le sphéroïde déformé hors de la pipette. En effet, la courbure importante de la surface du sphéroïde au niveau des bords de la pipette pourrait générer une force due à la tension de surface, entraînant ainsi l'éjection du sphéroïde hors de la pipette.

Cependant, dans le cas étudié par Karine Guevorkian, où le sphéroïde se rétracte en passant par les mêmes états que lors de l'aspiration, il est raisonnable de supposer que les dissipations visqueuses restent similaires lors des deux phases (aspiration et rétraction), puisque le sphéroïde traverse les mêmes états de déformation.

Puisque nous avons été en incapacité de déduire la tension de surface de nos sphéroïdes

---

3. Ceci démontre le peu d'adhésion ou de frottement qu'il y a entre le tissu et la micropipette confirmant l'hypothèse de non-mouillage et le fait de négliger les frottements

avec cette méthode, nous avons utilisé 3 manières différentes pour quantifier cette grandeur sur nos objets :

- La première méthode a consisté à réaliser des fusions entre deux sphéroïdes de même taille [8]. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, il est possible de déterminer le rapport entre la tension de surface et la viscosité en analysant la dynamique de fusion de deux sphéroïdes. En effet, lorsque deux sphéroïdes entrent en contact, leur fusion dépend de la compétition entre la tension de surface, qui tend à minimiser la surface, et la viscosité, qui ralentit le processus. L'analyse de cette dynamique nous permet d'extraire des informations sur ces deux paramètres. Cette étude, détaillée dans l'annexe A.8, nous a permis de mesurer une tension de surface de l'ordre de 5 mN/m (en prenant la valeur de la viscosité à 1,2 MPa.s, valeur moyenne issue des centaines de résultats obtenus).
- Nous avons également exploré le régime dans lequel la pression appliquée lors de l'aspiration par micropipette est inférieure à la pression seuil  $\Delta P_c$ . En réalisant des rampes successives d'aspiration, dans lesquelles la pression est augmentée par paliers de 0,5 mbar, et en laissant à chaque fois au sphéroïde un temps suffisant (environ 30 minutes) pour atteindre sa forme d'équilibre, nous avons pu identifier la pression critique avec une précision de 0,5 mbar. Cette pression correspond au moment où la déformation observée dépasse le rayon de la micropipette  $R_p$ , et où le sphéroïde commence à s'écouler. Cette méthode, détaillée dans l'annexe A.8, nous a permis de mesurer une tension de surface d'environ 10 mN/m.
- Enfin, nous avons employé une méthode similaire à celle utilisée par Karine Guevorkian mais qui évite le problème de la rétraction. Elle consiste à appliquer une première pression  $\Delta P_1$  lors de l'aspiration initiale, comme décrit précédemment, puis à augmenter cette pression en appliquant une deuxième pression  $\Delta P_2$ , supérieure à la première (inférieure marcherait également). En analysant les vitesses d'écoulement observées au temps long,  $v_1$  pour  $\Delta P_1$  et  $v_2$  pour  $\Delta P_2$ , il est possible de calculer la pression seuil  $\Delta P_c$  à l'aide de la relation suivante :  $\Delta P_c = \frac{v_2 \Delta P_1 - v_1 \Delta P_2}{v_2 - v_1}$ . Cette méthode nous a également fourni une estimation de 10 mN/m pour la tension de surface des sphéroïdes.

Par la suite, nous nous sommes moins intéressés à la mesure précise de la tension de surface, pour plusieurs raisons. D'une part, la littérature sur ce sujet est très abondante, et il existe d'autres méthodes, comme celles décrites au chapitre 1, qui permettent probablement une mesure plus précise de ce paramètre. D'autre part, notre attention s'est plutôt portée

sur les mesures de viscoélasticité, qui étaient plus pertinentes pour nos objectifs.

Pour ces mesures, nous avons supposé une tension de surface constante de 10 mN/m. En privilégiant l'application de pressions élevées ( $> 40$  mbar), nous avons pu négliger les erreurs potentielles induites par des variations de la tension de surface autour de cette valeur. En effet, même si la tension de surface d'un sphéroïde particulier était deux fois plus élevée (20 mN/m) et que nous continuions à utiliser une valeur estimée à 10 mN/m, l'erreur sur la pression effective  $\Delta P'$  resterait faible.

Prenons un exemple concret : pour une pression d'aspiration typique de 50 mbar et en considérant des dimensions standards pour le sphéroïde et la pipette ( $R_0 = 120\mu\text{m}$  et  $R_p = 40\mu\text{m}$ ), l'erreur induite par une tension de surface deux fois plus élevée (20 mN/m) sur la pression  $\Delta P'$  serait de 3 mbar, soit 6 %.

### Conclusion

En réalisant un ajustement de la dynamique d'aspiration avec ce modèle viscoélastique, nous pouvons mesurer les quatre paramètres rhéologiques : l'élasticité initiale  $E_i$ , l'élasticité finale  $E_f$ , le temps de relaxation  $\tau_c$ , et la viscosité à long terme  $\eta$  (et potentiellement la tension de surface  $\gamma$ ). Grâce à ces ajustements (cf. figure 2.19), nous avons pu reproduire avec précision la dynamique complète de déformation des sphéroïdes en réponse à un échelon de pression. Ce modèle viscoélastique, en prenant en compte la tension de surface, permet de caractériser de manière exhaustive le comportement mécanique des sphéroïdes, depuis la déformation instantanée jusqu'à l'écoulement visqueux à long terme.

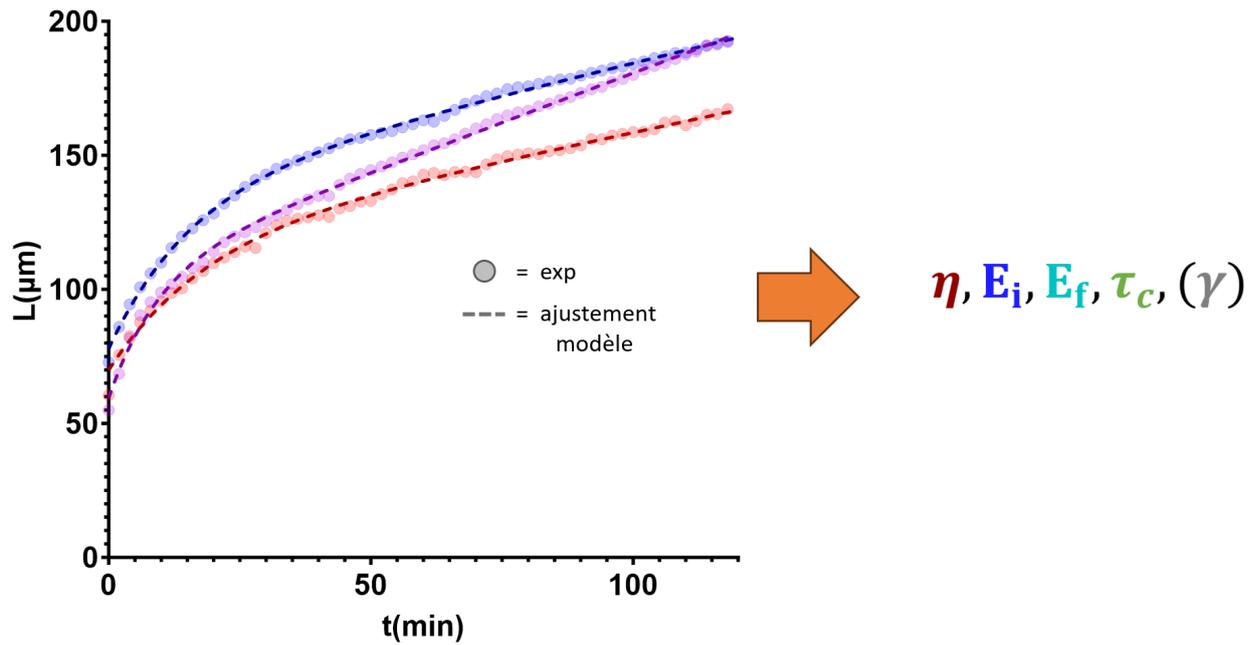


FIGURE 2.19 – Ajustement de l'aspiration de 3 sphéroïdes (de dimension  $R_0 \sim 100\mu\text{m}$  aspiré simultanément avec notre dispositif. Avec un rayon de pipette  $R_p = 35\mu\text{m}$ , et une pression d'aspiration de  $\Delta P = 50\text{mbar}$ .

### 2.3.3 Premiers résultats et validation du dispositif sur une lignée déjà caractérisée

#### Validation du dispositif sur la lignée S180

Afin de valider quantitativement notre dispositif par rapport aux expériences classiques d'aspiration par micropipette en verre, nous avons effectué des mesures sur la lignée de cellules de sarcome murin S180, caractérisée par Guevorkian et al.[4]. Grâce à Gregory Beaune, que nous remercions ici, nous avons pu nous procurer cette lignée de cellules pour mener nos propres expériences.

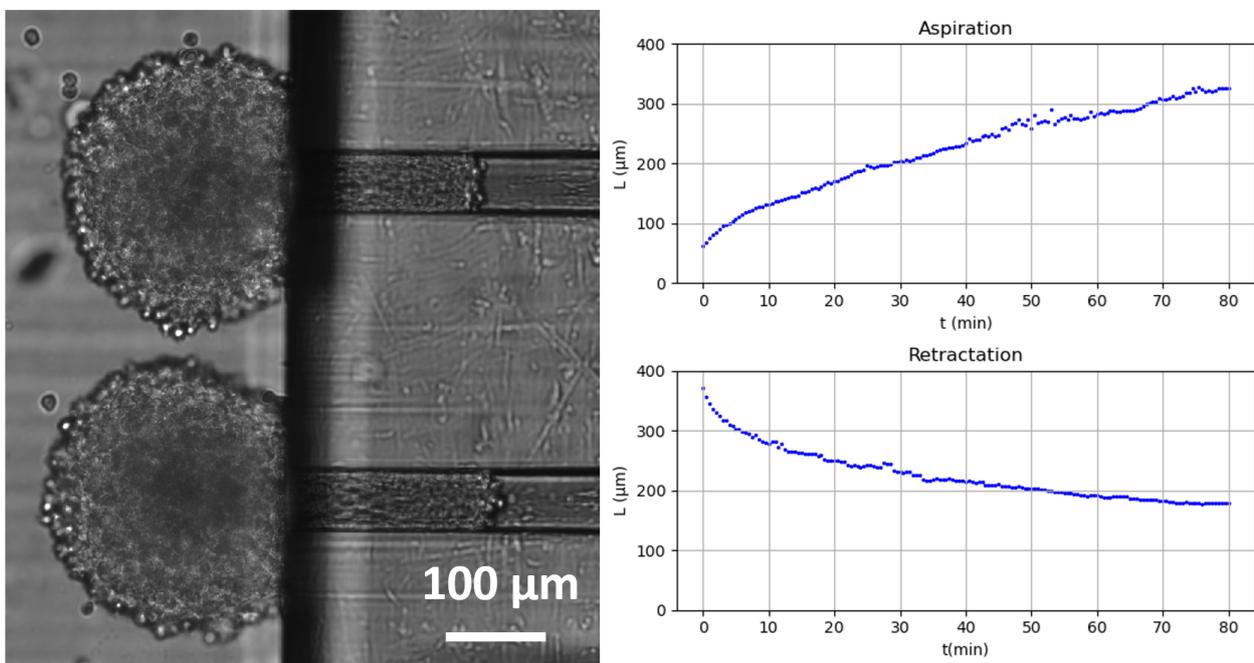


FIGURE 2.20 – Image en microscopie à champs claire de deux sphéroïdes (lignée S180) pendant la rétraction (40 min après avoir retiré la pression). Évolution de la longueur de la langue  $L$  lors de l'aspiration et lors de la rétraction (pour un sphéroïde de dimension  $R_0 = 120\mu\text{m}$ , un rayon de pipette  $R_p = 30\mu\text{m}$ , et une pression d'aspiration de  $\Delta P = 25\text{mbar}$ ).

Comme cela est illustré sur la figure 2.20, avec les sphéroïdes issus de cette lignée, nous avons observé un comportement de rétraction similaire à celui décrit par Karine Guevorkian, ce qui nous a permis de mesurer la tension de surface de ces objets. Nous avons appliqué le protocole décrit précédemment afin de mesurer les différents paramètres rhéologiques sur un ensemble de 23 sphéroïdes distincts. Les résultats obtenus pour ces mesures sont représentés sous forme de distributions, comme illustré dans la figure 2.21 :

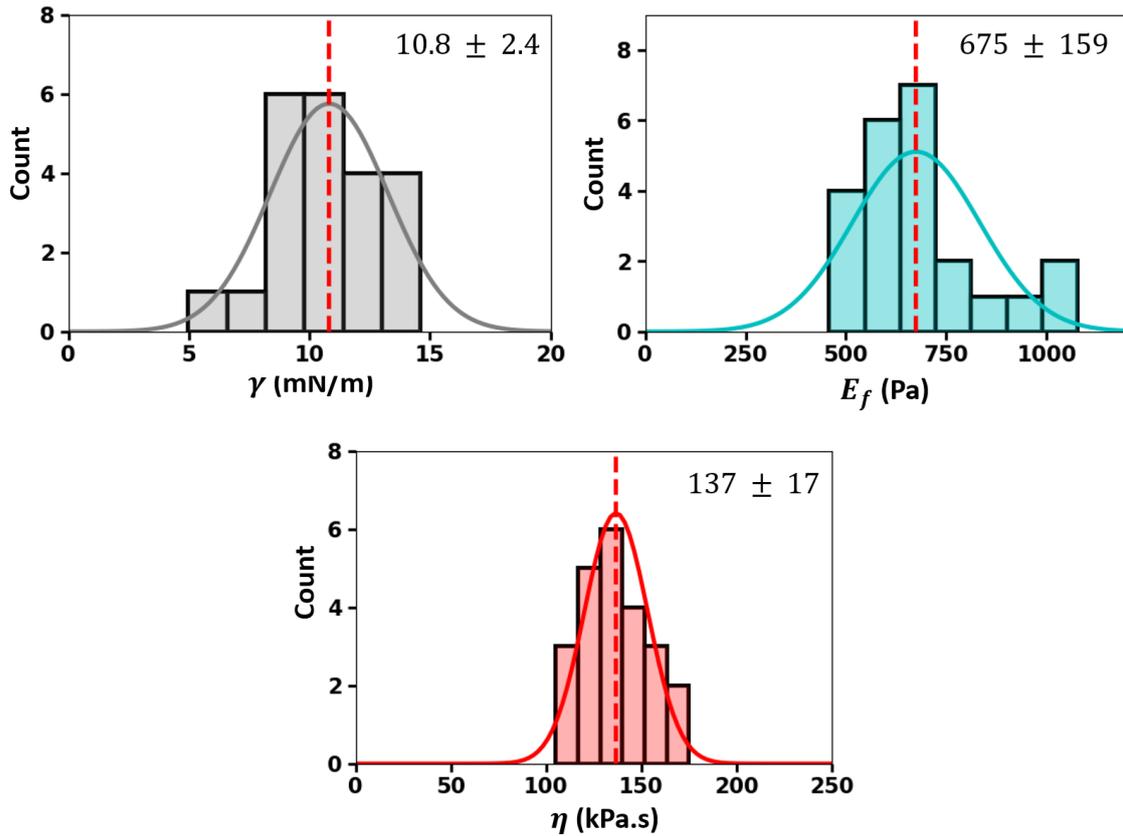


FIGURE 2.21 – Distribution des paramètres mesurés pour la lignée S180.

Nous avons ensuite comparé nos résultats avec ceux obtenus en utilisant un dispositif classique d'aspiration par micropipette en verre. La comparaison des valeurs des paramètres rhéologiques, notamment la tension de surface  $\gamma$ , l'élasticité à long terme  $E_f$ , et la viscosité  $\eta$ , est présentée dans le tableau ci-dessous :

	$\gamma$ (mN/m)	$E_f$ (Pa)	$\eta$ (kPa.s)
Guevorkian <i>et al.</i> [4]	$\sim 15$	$700 \pm 100$	$190 \pm 30$
Notre puce microfluidique	$11 \pm 3$	$680 \pm 160$	$140 \pm 20$

TABLE 2.1 – Comparaison des résultats obtenus avec la méthode classique d'AMP et notre dispositif microfluidique.

Les résultats montrent une forte similarité entre les deux ensembles de mesures, confirmant ainsi la validité de notre dispositif microfluidique pour la caractérisation des propriétés rhéologiques des sphéroïdes. Bien que de légères variations puissent être observées dans les valeurs de la tension de surface et de la viscosité<sup>4</sup>, ces différences restent dans la marge

4. La différence observée dans les mesures de viscosité pourrait être due à l'utilisation de lignées cellulaires légèrement différentes. En effet, les auteurs de l'étude ont travaillé avec plusieurs lignées S180 exprimant différentes quantités de cadhérine. Les résultats que nous présentons ici ont été obtenus avec la lignée S180

d'erreur, ce qui témoigne de la robustesse de notre système.

### Résultats sur la lignée A338

Comme évoqué précédemment, nous avons concentré notre travail sur la lignée de cancer pancréatique murin A338, en raison des nombreux avantages qu'elle présente. En exploitant la capacité de haut débit de notre méthode, nous avons pu réaliser un nombre considérable de mesures ( $N=134$ ) sur des sphéroïdes issus de cette lignée. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 2.22. Toutes ces mesures ont été effectuées à l'aide de dispositifs à cinq pipettes, au cours d'environ 30 expériences, chacune durant quelques heures.

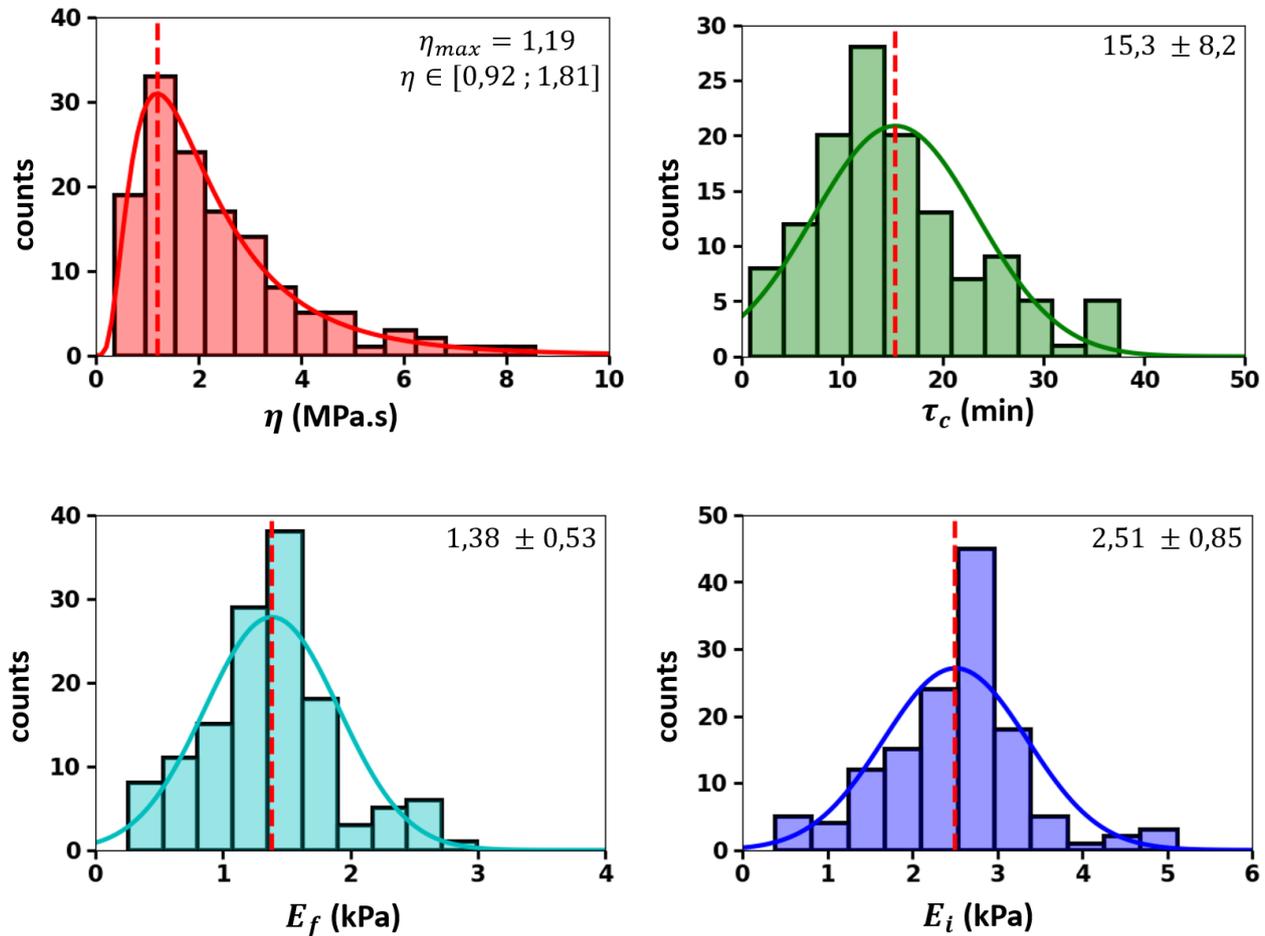


FIGURE 2.22 – Distribution des paramètres mesurés sur 134 sphéroïdes issu de la lignée A338.

Nous pouvons constater une dispersion notable dans les mesures des propriétés méca-

E-cad GFP, qui pourrait exprimer moins de cadhérine que celle utilisée dans l'article. Cela pourrait expliquer la viscosité légèrement plus faible que nous avons mesurée.

niques des sphéroïdes issus d'une même lignée. Cette variabilité peut s'expliquer en grande partie par la nature même des objets biologiques, intrinsèquement hétérogènes. Les analyses ont révélé un module élastique final  $E_f = 1.4 \pm 0.5$  kPa, un module élastique instantané  $E_i = 2.5 \pm 0.9$  kPa ainsi qu'un temps de relaxation  $\tau_c = 15.3 \pm 8.1$  min (les barres d'erreur indiquent l'écart type de la distribution gaussienne). Concernant la viscosité, la distribution observée était mieux ajustée par une distribution log-normale que par une distribution gaussienne. Le maximum de la distribution ajustée est  $\eta_{max} = 1.20$  MPa·s, (auquel on peut associer l'intervalle  $[0,92; 1,81]$ , analogue à l'intervalle [moyenne  $\pm$  écart-type] pour une distribution normale, mais adapté à l'asymétrie de la distribution log-normale). Ce phénomène est assez classique en biologie<sup>5</sup>.

À notre connaissance, aucune mesure viscoélastique n'a été publiée concernant cette lignée cellulaire spécifique. Toutefois, les valeurs d'élasticité que nous avons obtenues sont très proches de celles mesurées par indentation sur des biopsies de pancréas [9]. Il est intéressant de noter que les sphéroïdes issus de cette lignée cellulaire se distinguent nettement par leur viscosité et leur rigidité bien plus élevées comparées aux sphéroïdes de sarcome murin (S180) que nous avons étudiés précédemment. Cette différence souligne l'hétérogénéité marquée des propriétés mécaniques que l'on peut rencontrer d'un tissu à l'autre.

Les 134 expériences réalisées ont couvert une large gamme de paramètres expérimentaux : notamment les rayons de sphéroïdes  $R_p$  (compris entre 60  $\mu\text{m}$  et 120  $\mu\text{m}$ ), l'âge des sphéroïdes (compris entre 1 et 7 jours), les pressions d'aspiration  $\Delta P$  (comprises entre 30 et 70 mbar) et les rayons de pipettes (compris entre 20  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$ ). Cette diversité des conditions expérimentales a contribué à une partie de la grande dispersion observée dans les résultats. Lorsque l'analyse est limitée aux sphéroïdes mesurés dans des conditions expérimentales strictement similaires, la dispersion des résultats est nettement réduite. En effet, la variabilité entre les sphéroïdes d'un même lot, mesurés dans les mêmes conditions, est plus faible : la moyenne des écarts-types, calculée à partir d'expériences individuelles où 5 à 23 mesures simultanées ont été réalisées, est de  $\sigma_{\eta_{\text{lot}}} = 0.5$  MPa·s pour la viscosité et  $\sigma_{E_i, \text{lot}} = 0.35$  kPa pour l'élasticité instantanée (dispersion quasiment deux fois plus faible).

Pour approfondir l'analyse de la dispersion observée et déterminer si l'âge ou la taille des sphéroïdes influencent significativement les grandeurs rhéologiques mesurées, nous avons construit une matrice de corrélation (Figure 2.23). En examinant les coefficients de corrélation de la matrice (compris entre  $-1$  et  $1$ ), nous pouvons identifier si des dépendances signi-

---

5. En effet, selon le théorème central limite, la somme d'un grand nombre de variables aléatoires indépendantes tend vers une distribution gaussienne. Cependant, lorsque la grandeur mesurée résulte de la multiplication de nombreux facteurs aléatoires, c'est le logarithme de cette variable qui suit une distribution gaussienne. Cela implique que la variable elle-même suit une distribution log-normale.

ficatives existent entre les paramètres expérimentaux et les grandeurs rhéologiques mesurées.

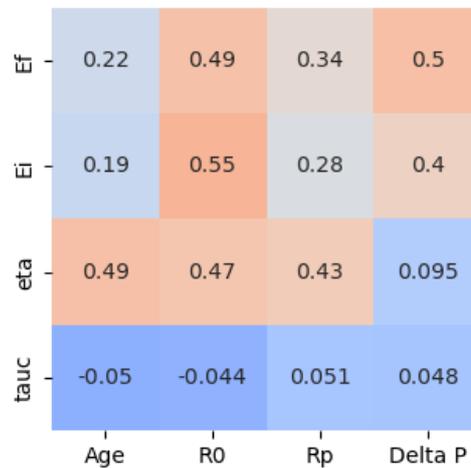


FIGURE 2.23 – Matrice de corrélation entre les paramètres expérimentaux et les grandeurs mesurées. Un coefficient proche de 1 indique une forte corrélation positive : lorsque l'une des variables augmente, l'autre a tendance à augmenter également. Un coefficient proche de -1 signale une forte corrélation négative : lorsque l'une des variables augmente, l'autre a tendance à diminuer. Un coefficient autour de 0 suggère qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les deux variables.

Premièrement, nous observons une corrélation significative entre l'âge du sphéroïde et sa viscosité (figure 2.24). Bien que nous ne puissions pas tirer de conclusions définitives à partir de ce seul constat, il est possible qu'avec le temps, la densité cellulaire et les liaisons d'adhésion entre les cellules augmentent au sein du sphéroïde, conduisant à une viscosité plus élevée.

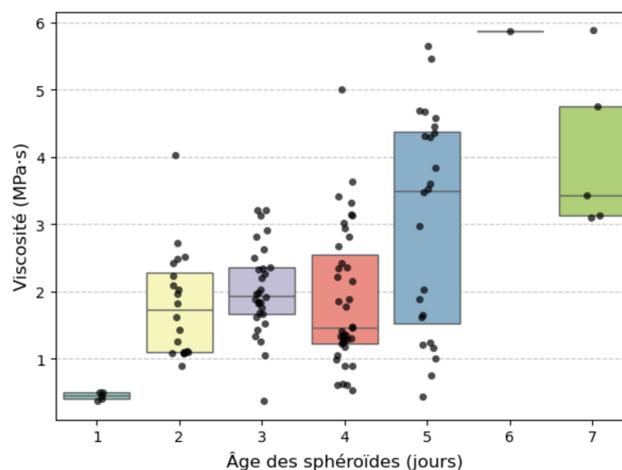


FIGURE 2.24 – Variation de la viscosité en fonction de l'âge des sphéroïdes A338.

Ensuite, il existe également une corrélation notable entre les mesures d'élasticité (initiale et finale) et la pression appliquée. Cela peut être attribué au fait que l'élasticité n'est pas

parfaitement linéaire sur la gamme de contraintes appliquées, ce qui conduit à des mesures d'élasticité plus élevées lorsque des contraintes plus importantes sont appliquées. Cependant, cette variation reste modérée : une augmentation de l'élasticité finale  $E_f$ , passant de 1,1 kPa à 1,4 kPa, a été observée lorsque la pression d'aspiration est passée de 30 à 50 mbar.

Enfin, la corrélation la plus marquée concerne les valeurs d'élasticités, tant initiale que finale, qui augmentent avec la taille des sphéroïdes, comme l'illustre la figure 2.25. Cette relation semble être spécifiquement liée à la taille des sphéroïdes plutôt qu'à leur âge, puisque cette tendance se maintient même lorsque des sphéroïdes de même âge mais de tailles différentes sont comparés.

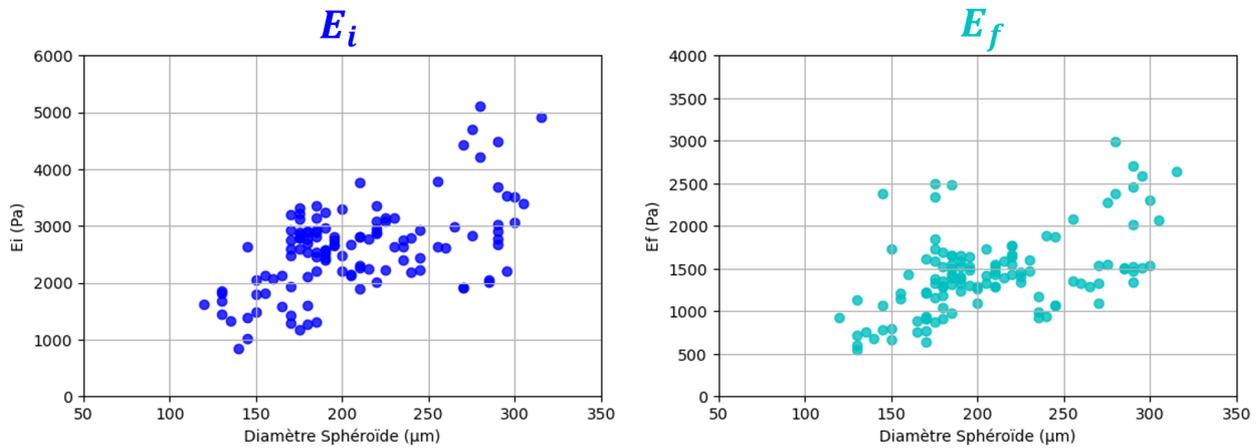


FIGURE 2.25 – Influence de la taille des sphéroïdes sur les mesures d'élasticité. Les sphéroïdes de plus grande taille tendent à présenter des valeurs d'élasticité plus élevées, tant pour l'élasticité initiale  $E_i$  que pour l'élasticité finale  $E_f$ .

Une hypothèse serait que la taille des sphéroïdes induise des modifications physiologiques, notamment par un gradient de nutriments plus prononcé entre le centre et la périphérie, modifiant ainsi les propriétés mécaniques du tissu. Cependant, cette hypothèse soulève des interrogations, car les mesures d'élasticité, particulièrement celles de l'élasticité initiale, se concentrent sur des déformations localisées à la périphérie des sphéroïdes. Il semble donc peu probable que le manque de nutriments au centre puisse provoquer une modification mécanique significative à cette échelle locale.

Nous nous sommes plutôt interrogés sur les potentielles améliorations que l'on pourrait apporter au modèle grâce auquel on remonte aux propriétés mécaniques à partir des déformations observées. Dans ce modèle, le rayon des sphéroïdes n'apparaît dans les calculs que via la pression critique  $\Delta P_c$ , qui intègre la contribution de la tension de surface. Toutefois, lorsque nous tentons d'expliquer la dépendance au rayon uniquement en considérant cette

pression critique, les valeurs de tension de surface obtenues sont trop élevées pour être réalistes, atteignant plusieurs centaines de mN/m, bien au-delà des valeurs attendues pour des tissus biologiques (typiquement de l'ordre de quelques mN/m). C'est pourquoi, comme nous allons le voir dans la section qui suit, nous avons supposé qu'un effet géométrique pouvait être à la base de cette observation.

## 2.4 Amélioration des mesures d'élasticité et simulation

La mesure des propriétés élastiques du sphéroïde découle directement de la déformation instantanée  $\delta$  grâce à la formule issue de l'article de Aoki *et al.* [6]. Dans cet article, les auteurs simulent les déformations d'un cube aspiré par une micropipette. Or, dans notre cas, nous n'aspérons pas une surface plane, mais une sphère dont le rayon n'est pas infiniment grand devant le rayon de la pipette.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la formule  $\delta = \Delta P R_p / E$ , issue de cet article, pourrait présenter des limitations lorsqu'elle est appliquée à un objet sphérique. De plus, cette formule repose sur l'hypothèse que le matériau est incompressible (coefficient de Poisson  $\nu$  proche de  $1/2$ ), or, comme nous l'avons vu, cela n'est pas forcément le cas des tissus biologiques. Par ailleurs, la prise en compte de la dépendance de cette déformation au coefficient de Poisson est nécessaire pour l'étude que nous aborderons au prochain chapitre.

Afin de clarifier ces résultats et de mieux comprendre cette dépendance au rayon, nous avons décidé d'élargir cette formule en adoptant une approche similaire à celle de Aoki et ses collègues, mais en abandonnant l'hypothèse d'incompressibilité et en prenant en compte la géométrie spécifique de nos expériences. Nous avons ainsi développé une simulation par éléments finis avec le logiciel COMSOL Multiphysics, permettant de modéliser l'aspiration d'une sphère élastique par une pipette. Cette simulation intègre non seulement **l'ensemble** des propriétés élastiques ( $E$  et  $\nu$ ) du matériau étudié, mais aussi les effets géométriques liés au rayon des sphéroïdes, afin de capturer précisément les déformations mécaniques induites lors de l'aspiration.

### 2.4.1 Construction du modèle numérique COMSOL

Pour réaliser cette modélisation, nous nous sommes inspirés du modèle COMSOL existant "Ball Check Valve", qui simule un système anti-retour pour un conduit hydraulique. Ce modèle est particulièrement pertinent pour notre cas, car il est composé d'une sphère en mouvement qui interagit avec un fluide. Lorsque le fluide s'écoule dans le "mauvais sens", il pousse la sphère contre un joint torique, bloquant ainsi l'écoulement. Ce système présente de nombreuses similarités avec nos expériences et s'est donc révélé particulièrement utile pour développer les bases d'une simulation reproduisant l'AMP d'un sphéroïde.

Nous avons reproduit la géométrie des éléments présents lors d'une AMP d'un sphéroïde. Étant donné que ce système possède une symétrie de révolution autour de l'axe de la pipette, nous avons réalisé une modélisation en **2D axisymétrique**, comme montrée sur la figure 2.26.

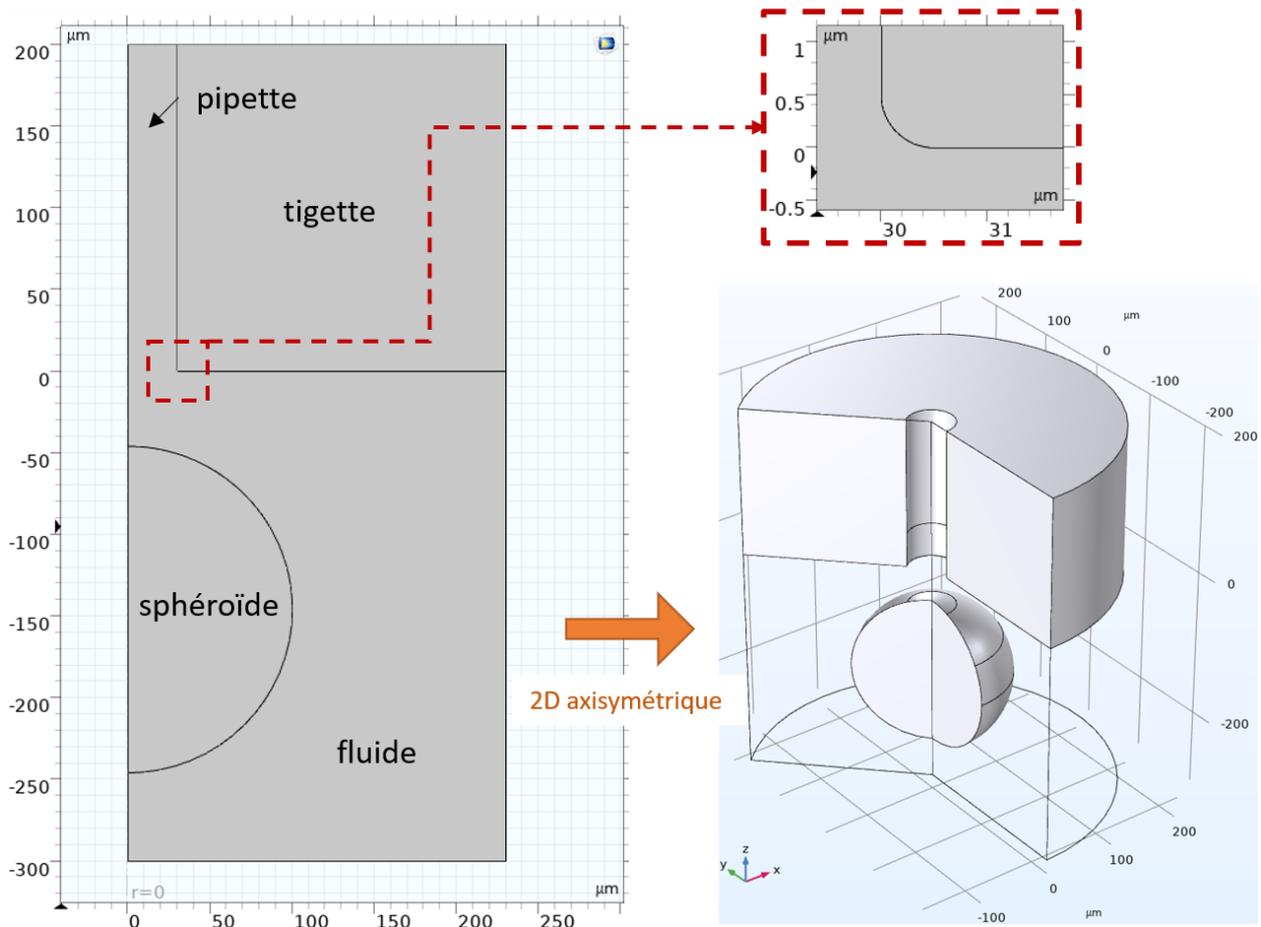


FIGURE 2.26 – Illustration de la géométrie 2D axisymétrique du modèle COMSOL. Un congé de  $0,5 \mu\text{m}$  de rayon a été réalisé sur l'angle inférieur gauche du rectangle représentant les bords de la pipette afin de répartir les contraintes et d'assurer une meilleure résolution numérique.

Le sphéroïde est modélisé comme un matériau élastique linéaire, homogène et isotrope, entièrement décrit par deux paramètres mécaniques : module de Young  $E$  et coefficient de Poisson  $\nu$ . La tigette est, elle, considérée comme un solide indéformable. L'écoulement du fluide environnant est modélisé par un écoulement laminaire avec un fluide possédant la viscosité dynamique  $\mu_{\text{eau}}$ , mais cette propriété n'a pas d'importance pour les simulations. Le rôle du fluide dans ces simulations est uniquement d'appliquer les bonnes contraintes sur le sphéroïde via le module multiphysique de COMSOL "Fluid-Structure Interaction".

Cette interaction fluide-structure, qui permet de coupler la mécanique du solide avec l'écoulement laminaire, s'avère indispensable pour reproduire fidèlement les contraintes exercées sur le sphéroïde. Elle permet d'appliquer les contraintes de l'aspiration sur les bonnes régions de la surface du sphéroïde, au cours de toute la déformation. En effet, lorsque le sphéroïde se déforme, les zones de sa surface en contact avec la pression atmosphérique  $P_{atm}$  et celles soumises à la pression  $P_{atm} + \Delta P$ , changent continuellement. Cet effet est complexe à modéliser sans intégrer un fluide, car cela nécessiterait une mise à jour continue des frontières soumises aux différentes pressions. En incorporant l'interaction fluide-structure dans la simulation, nous avons pu correctement appliquer les contraintes sur la surface déformée du sphéroïde tout au long du processus d'aspiration.

Un autre aspect essentiel de cette simulation est de rendre le sphéroïde mobile. Il est crucial que le centre de gravité du sphéroïde puisse se déplacer en réponse aux forces exercées par le fluide lors de l'aspiration. Cela est rendu possible dans COMSOL grâce à l'utilisation d'un maillage mobile (Moving Mesh), qui permet au sphéroïde de se déplacer librement dans le domaine de simulation. Au début de la simulation, le fluide exerce une force sur le sphéroïde, le déplaçant jusqu'à l'entrée de la micropipette. Par la suite, le sphéroïde entre en contact avec la tige et se déforme progressivement en pénétrant dans la pipette, sans être contraint par un point d'ancrage fixe.

Le contact entre le sphéroïde et la pipette a été simulé en utilisant la fonctionnalité de **contact sans frottement** de COMSOL. Ce contact ne se produit pas exactement lorsque le sphéroïde entre en contact géométrique avec la tige, mais lorsqu'ils sont à une distance d'offset  $d_{offset}$ . Ceci est nécessaire pour assurer la continuité du fluide et éviter des problèmes numériques. Cette valeur a été prise très faible ( $d_{offset} = 0,5, \mu\text{m}$ ) et est prise en compte dans le changement de géométrie qu'elle induit (réduction de  $R_p$ ). Des tests de variation de cet offset autour de cette valeur ont montré que les résultats restent stables, validant ainsi la robustesse de la simulation.

Pour assurer la précision et la stabilité numérique de la simulation, une attention particulière a été portée à la génération du maillage. Un maillage fin et régulier a été utilisé dans les zones critiques, notamment au point de contact entre le sphéroïde et le bord de la pipette, comme montré sur la figure 2.27. C'est la zone où les contraintes sont maximales lors de l'aspiration. Un maillage par quadrilatères pour le sphéroïde a été choisi, car ce type de maillage est plus adapté pour les grandes déformations élastiques.

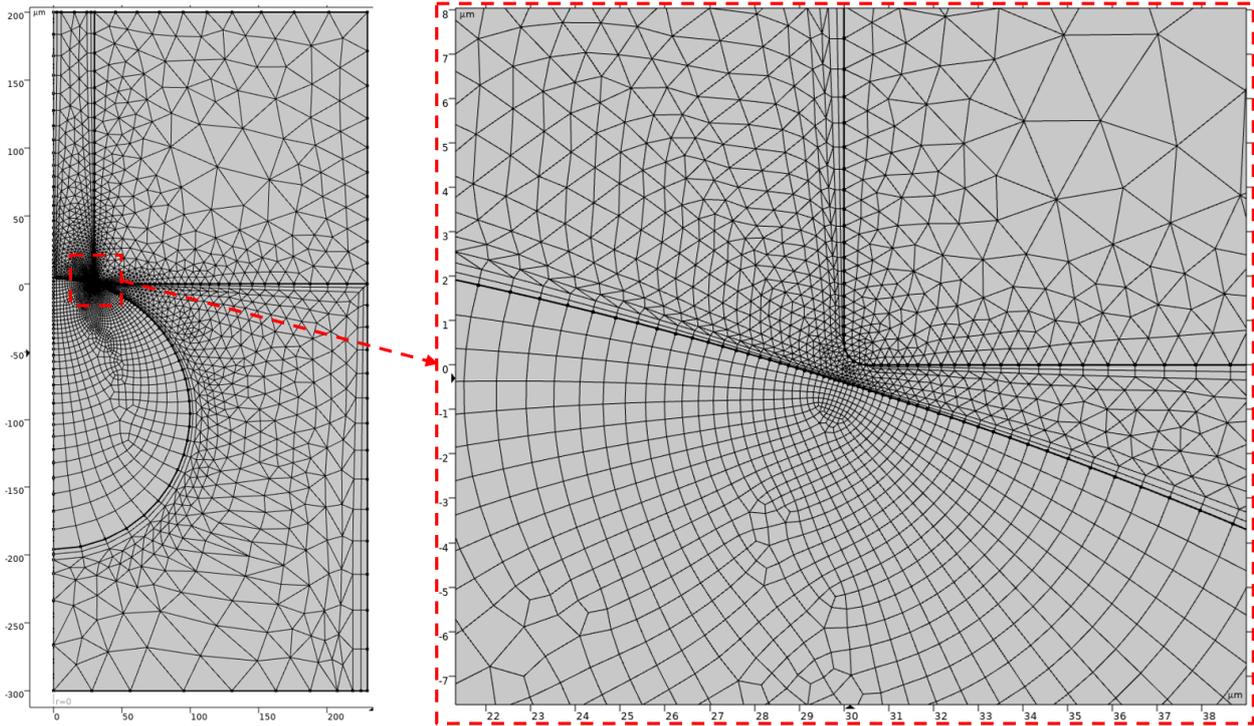


FIGURE 2.27 – Illustration du maillage du modèle COMSOL.

### 2.4.2 Simulation d'une aspiration par micropipette (AMP)

La simulation consiste en une étude temporelle dans laquelle, initialement, le sphéroïde n'est pas en contact avec la pipette. Une petite pression initiale (environ 10 Pa) est progressivement appliquée, tandis que la pression à la sortie reste nulle. Sous cette faible aspiration, le sphéroïde se déplace jusqu'à entrer en contact avec la pipette, puis se déforme légèrement jusqu'à atteindre sa forme d'équilibre. Cette pression minimale ne provoque pas de déformation notable, mais la position du sphéroïde dans cette configuration sert de référence pour mesurer les déformations ultérieures. Ensuite, la pression appliquée est progressivement augmentée de la quantité  $\Delta P$ , et on observe la déformation progressive du sphéroïde au fur et à mesure que la pression augmente. La figure 2.28 montre un exemple des résultats obtenus lors d'une simulation. Ils illustrent les contraintes dans le sphéroïde ainsi que la pression et la vitesse du fluide.

## 2.4. Amélioration des mesures d'élasticité et simulation

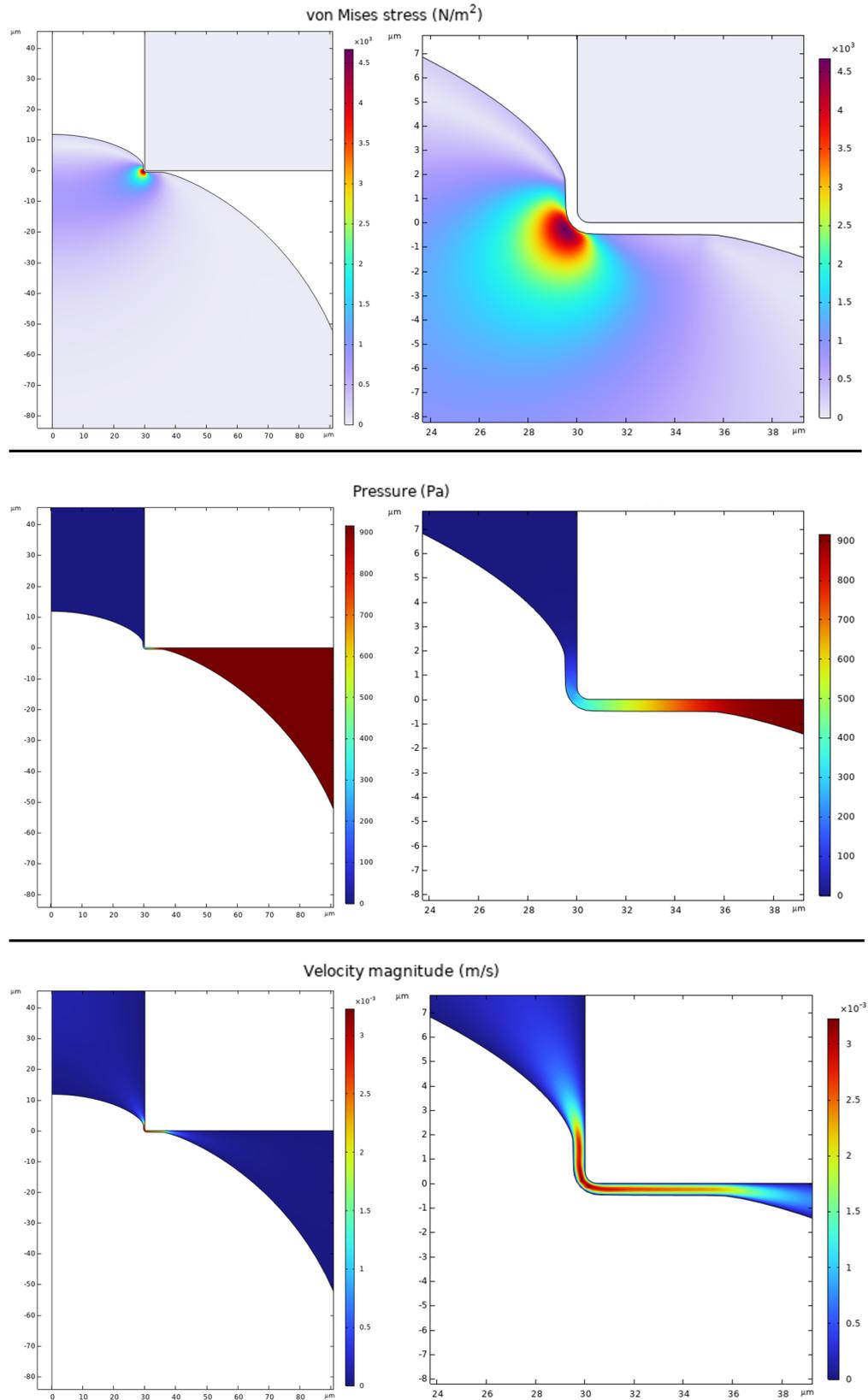


FIGURE 2.28 – Distribution des contraintes de Von Mises dans le sphéroïde et représentation des champs de pression et de vitesse dans le fluide au cours de l'aspiration. Les contraintes de Von Mises permettent de synthétiser l'intensité de la contrainte dans un matériau en combinant les différentes composantes du tenseur des contraintes.

On observe que les contraintes se concentrent principalement sur la région en contact direct avec le bord de la pipette. Ce résultat, bien qu'attendu, revêt un intérêt particulier en lien avec certains résultats développés dans la section suivante<sup>6</sup>. De plus, la quasi-totalité des pertes de charges dans le fluide se produisent sur une distance d'environ 1  $\mu\text{m}$ , situées au bout de la pipette. Ceci confirme la validité des contraintes appliquées via l'interaction fluide-structure.

Nous pouvons ainsi étudier la déformation  $\delta$  du bout du sphéroïde dans la pipette, en réponse à l'augmentation de pression  $\Delta P$ .

Notons que nous avons démarré ces simulations en utilisant les travaux de Aoki *et al.* [6] comme référence, c'est-à-dire en prenant un coefficient de Poisson  $\nu = 0,49$  et considérant le cas d'un contact plan obtenu avec un sphéroïde "carré" appuyé contre la micropipette. Le résultat de cette simulation est parfaitement en accord avec ce modèle (résultat non présenté), c'est-à-dire :

$$\delta_{Aoki} = 0.97 \times R_p \frac{\Delta P}{E} \quad (2.21)$$

### 2.4.3 Résultats des simulations et établissement d'une loi empirique

En réalisant de nombreuses simulations, nous avons pu analyser la dépendance des déformations  $\delta$  en fonction des différents paramètres : module de Young  $E$ , le coefficient de Poisson  $\nu$ , le rayon du sphéroïde  $R_0$ , le rayon de la pipette  $R_p$  et la pression d'aspiration  $\Delta P$ .

#### Dépendance de la déformation à la pression d'aspiration et au module de Young

Tout d'abord, nous observons une proportionnalité parfaite entre  $\delta$  et  $\Delta P$ , ce qui est attendu puisqu'on modélise le sphéroïde comme un solide élastique linéaire. Cela nous a permis de travailler avec de faibles pressions (typiquement 50 Pa), réduisant ainsi le temps de calcul de chaque simulation. De plus, nous avons également constaté une proportionnalité

---

6. Des marquages fluorescents de l'actine montrent un renforcement du cytosquelette précisément dans cette région (cf. section 2.5.2)

parfaite de  $\delta$  avec  $1/E$ .

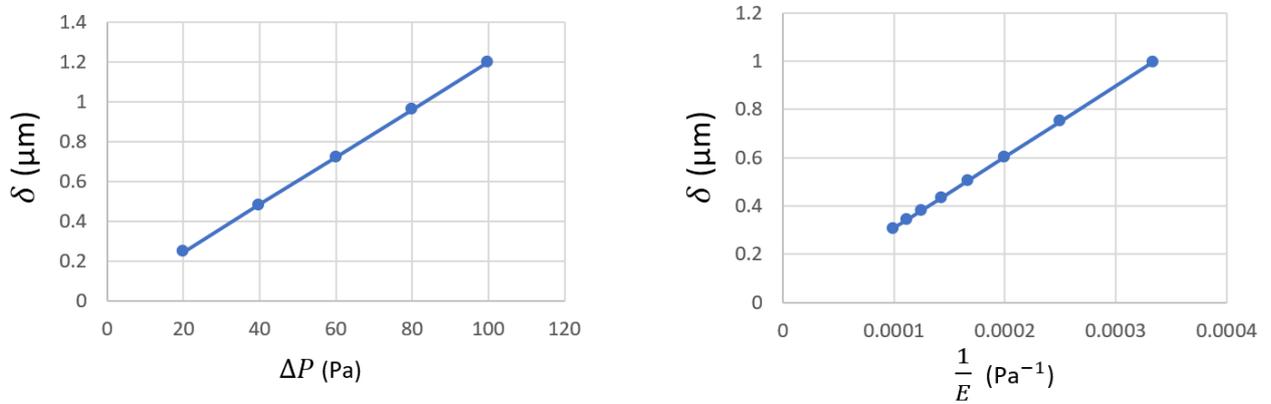


FIGURE 2.29 – Évolution de la déformation  $\delta_{simu}$  en fonction de la pression d'aspiration  $\Delta P$  et de l'inverse du module de Young  $1/E$ . Les simulations ont été réalisées avec les paramètres suivants (lorsque ceux-ci ne varient pas) : un coefficient de Poisson  $\nu = 0.47$ , un module de Young  $E = 5, kPa$ , un rayon de pipette  $R_p = 30, \mu m$ , un rayon de sphéroïde  $R_0 = 100, \mu m$ , et une pression d'aspiration  $\Delta P = 50, Pa$

Les dépendances à la pression et au module de Young sont donc bien en accord avec la loi d'échelle de la formule de Aoki *et al.* :

$$\delta_{Aoki} = R_p \Delta P / E \quad (2.22)$$

### Influence des paramètres géométriques

Nous avons ensuite étudié l'effet des paramètres géométriques, notamment le rayon de la pipette  $R_p$  et le rayon du sphéroïde  $R_0$ , sur la déformation  $\delta$ . Pour cela, nous avons normalisé les déformations simulées par  $\delta_{Aoki}$ . Cette normalisation permet de mettre en évidence les écarts par rapport au modèle théorique de référence.

## 2. Viscoélasticité des tissus : dispositif expérimental et réponse à un échelon de pression

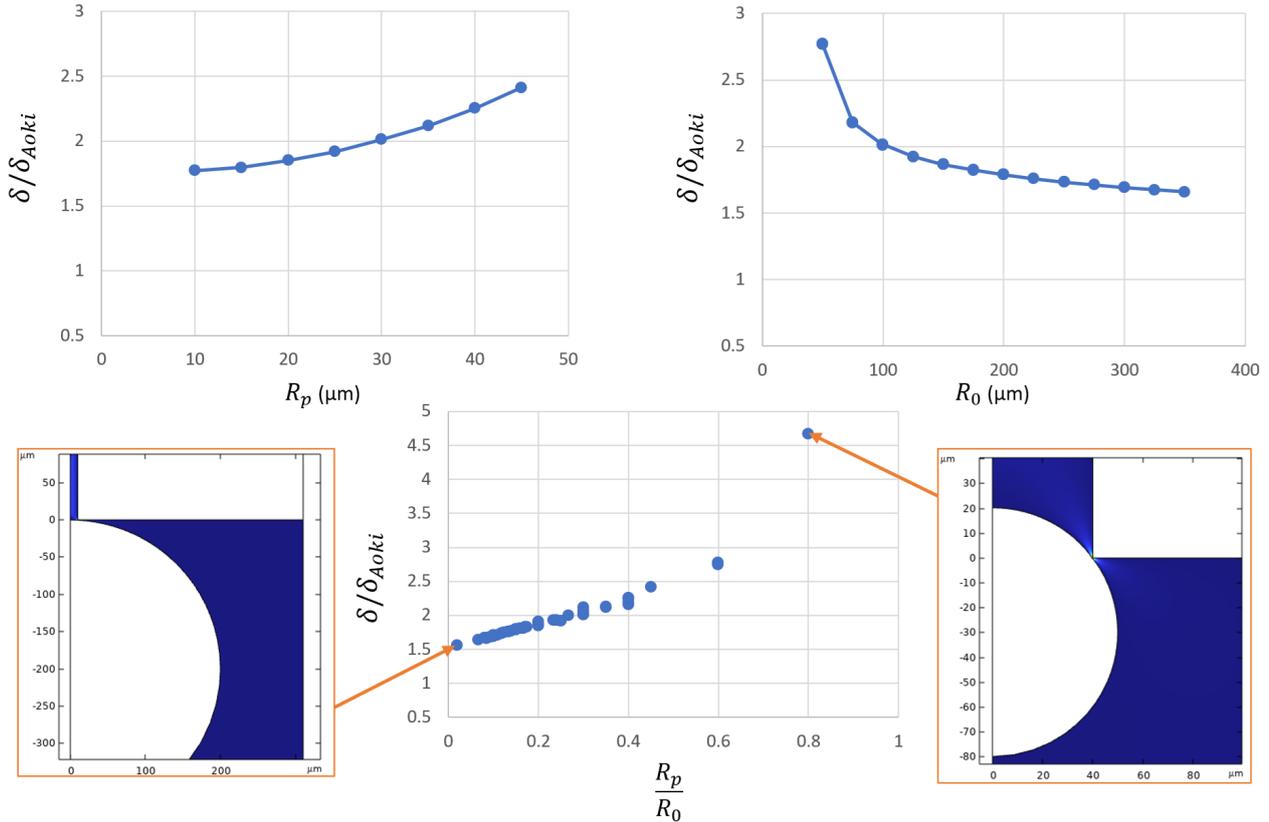


FIGURE 2.30 – Évolution de la déformation normalisée  $\delta_{simu}/\delta_{Aoki}$  en fonction du rayon de la pipette  $R_p$ , du rayon de sphéroïde  $R_0$  et du rapport  $R_p/R_0$ . Les simulations ont été réalisées avec les paramètres suivants : un coefficient de Poisson  $\nu = 0.47$ , un module de Young  $E = 5, \text{kPa}$ , et une pression d'aspiration  $\Delta P = 50, \text{Pa}$

Nous observons sur la figure 2.30 qu'une dépendance subsiste avec le rayon de la pipette, indiquant que la formule d'Aoki ne s'applique pas parfaitement dans le cas de l'AMP d'objets sphériques. Cela suggère qu'une correction prenant en compte les paramètres géométriques pourrait améliorer la précision du modèle.

*Remarque :* Nous observons également que ce rapport ne tend pas vers 1 quand  $R_0 \gg R_p$ , mais une valeur que l'on nomme  $\alpha$  et qui dépend du coefficient de poisson utilisé (ici, pour  $\nu = 0,47$ , on a  $\alpha = 1.52$ ). Cette dépendance sera discutée dans un second temps.

Par ailleurs, l'influence du rayon des sphéroïdes sur la déformation est également notable. Plus les dimensions du sphéroïde se rapprochent de celles de la pipette, plus la déformation devient prononcée. En analysant toutes les combinaisons de valeurs pour  $R_p$  variant de 10 à 40  $\mu\text{m}$  par pas de 5  $\mu\text{m}$ , et  $R_0$  de 50 à 300  $\mu\text{m}$  par pas de 50  $\mu\text{m}$ , il apparaît clairement que cette dépendance est directement liée au rapport  $R_p/R_0$ . Cela est mis en évidence par l'alignement des résultats de toutes ces simulations le long d'une courbe commune sur le panneau du bas de la figure 2.30.

Pour améliorer le modèle et tenir compte de cette dépendance géométrique, la stratégie la plus directe consiste à ajuster les résultats avec une loi polynomiale, permettant ainsi de développer une loi empirique fonctionnelle. Si l'on se limite à décrire l'AMP de sphéroïdes vérifiant  $R_0 \geq 2R_p$  (ce qui correspond aux conditions expérimentales courantes dans nos travaux), le comportement de la déformation en fonction du rapport  $R_p/R_0$  est suffisamment linéaire pour qu'un polynôme de degré 1 suffise à modéliser la déformation avec précision. En procédant à un ajustement linéaire des données de simulation, nous obtenons la relation suivante :

$$\delta'_{\text{line}} = \alpha \cdot \frac{R_p \Delta P}{E} \left( 1 + C \frac{R_p}{R_0} \right) \quad \text{avec } C = 1,14 \quad (2.23)$$

où  $\delta'_{\text{line}}$  représente la déformation corrigée par cette loi empirique linéaire, et  $C$  est un coefficient déterminé par ajustement sur les données de simulation.

Cependant, nous avons noté que lorsque le rayon de la pipette  $R_p$  devient égal au rayon du sphéroïde  $R_0$ , le sphéroïde peut théoriquement passer sans se déformer à travers la pipette. Dans ce cas limite ( $R_p = R_0$ ), on s'attendrait à ce que la loi donnant la déformation diverge. Pour prendre en compte cette situation limite et modéliser la divergence attendue, nous avons proposé une formule corrigée qui s'exprime ainsi :

$$\delta'_1 = \alpha \frac{R_p \Delta P}{E \left( 1 - \frac{R_p}{R_0} \right)} \quad (2.24)$$

En normalisant les résultats des simulations par ces formules corrigées, nous obtenons les résultats présentés sur la figure suivante 2.31 :

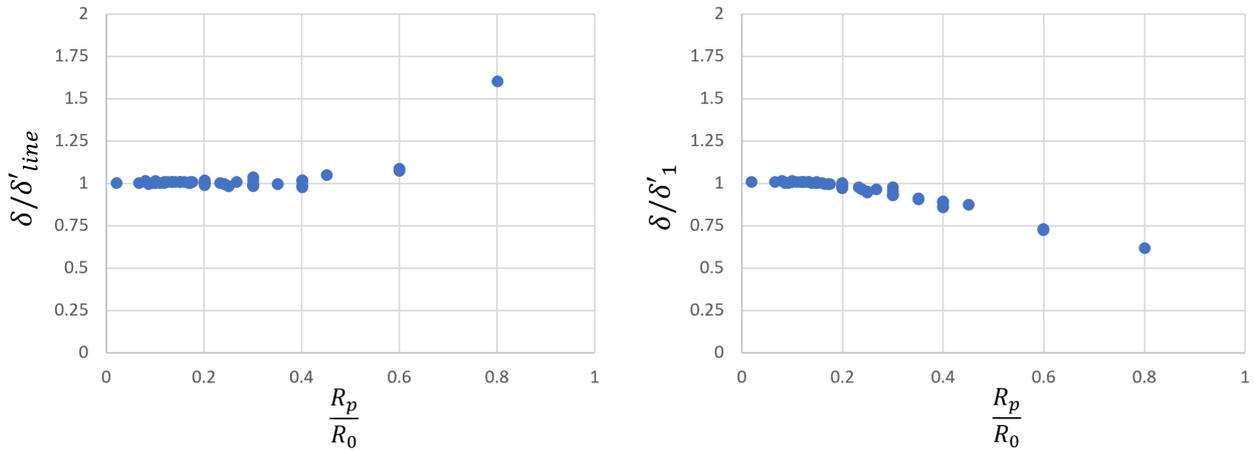


FIGURE 2.31 – Évolution des déformations normalisées  $\delta_{simu}/\delta'_{line}$  et  $\delta_{simu}/\delta'_1$  en fonction du rapport  $R_p/R_0$ . La formule linéaire  $\delta'_{line}$  montre une excellente concordance avec les simulations pour  $R_0 \geq 2R_p$ , tandis que la formule  $\delta'_1$  devient moins précise pour  $R_0 \leq 3R_p$ .

Nous constatons que la formule issue de l'ajustement linéaire,  $\delta'_{lin}$ , permet de prédire très fidèlement les résultats de toutes les simulations pour lesquelles  $R_0 \geq 2R_p$ . La déviation entre les valeurs simulées et celles prédites par cette loi empirique reste inférieure à 3% dans cette plage. En revanche, la formule  $\delta'_1$ , qui est davantage artificielle dans sa construction, devient rapidement moins précise, avec une erreur supérieure à 10%, dès que  $R_0 \leq 3R_p$ .

### Influence du coefficient de Poisson

Enfin, nous avons étudié les dépendances de la déformation  $\delta$  par rapport au coefficient de Poisson  $\nu$ . Ce coefficient est crucial, car il caractérise la compressibilité du matériau, mais pas uniquement. En réalité, c'est le couple  $(E, \nu)$  qui permet de décrire complètement le comportement élastique d'un matériau isotrope et homogène. Selon le type de contrainte appliquée, différentes constantes élastiques, issues de combinaisons de  $E$  et  $\nu$ , interviennent pour décrire la réponse mécanique du matériau. Par exemple, dans le cas d'un cisaillement pur, c'est le module de cisaillement  $G$  qui est pertinent, défini par la relation  $G = \frac{E}{2(1+\nu)}$ .

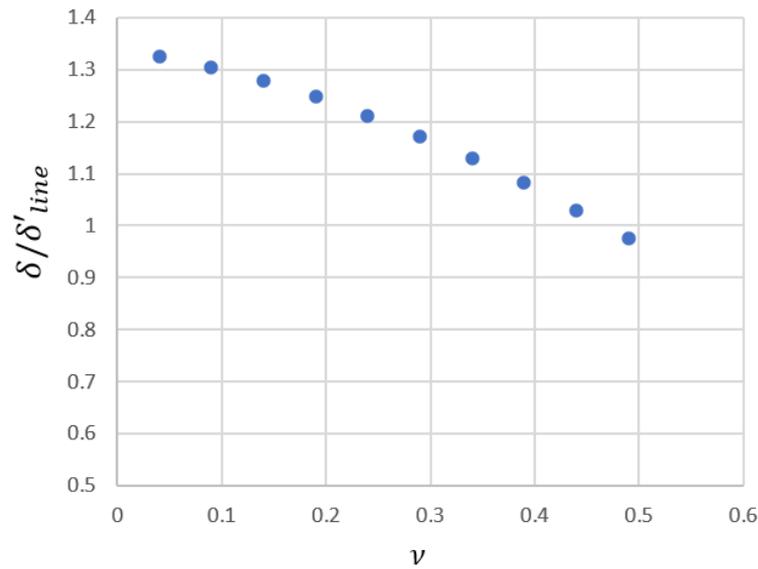


FIGURE 2.32 – Évolution de la déformation normalisé  $\delta_{simu}/\delta'line$  en fonction du coefficient de poisson  $\nu$ .

Nous avons fait varier le coefficient de Poisson  $\nu$  pour étudier son influence sur la déformation  $\delta$ , et le profil obtenu est illustré dans la figure 2.32. En ajustant ces données par un polynôme (de degré 2 ici), nous avons observé une dépendance quasi-parfaite de la déformation en fonction de  $1 - \nu^2$ .

La constante élastique qui semble émerger lors de l'AMP est donc  $E/(1 - \nu^2)$ . On peut remarquer une certaine logique dans ce résultat, car c'est la même constante qui apparaît lors de l'indentation d'un matériau (par exemple par AFM). On peut voir certaines similitudes entre l'AMP et une indentation lorsqu'on regarde les bords de la pipette qui s'enfonce dans le sphéroïde.

### Loi empirique finale

En intégrant l'ensemble des observations issues de nos simulations numériques, nous proposons la loi empirique suivante pour décrire la déformation  $\delta$  d'un sphéroïde lors de l'aspiration par micropipette :

$$\boxed{\delta = \alpha R_p \Delta P \frac{1 - \nu^2}{E} \left( 1 + C \frac{R_p}{R_0} \right)} \quad \text{avec} \quad \alpha = 1,88 \quad \text{et} \quad C = 1,14 \quad (2.25)$$

Les constantes  $\alpha = 1,88$  et  $C = 1,14$  ont été déterminées par ajustement sur l'ensemble

des données de simulation. Pour valider cette loi empirique, nous avons compilé les résultats de plus de 200 simulations numériques, explorant une vaste plage de valeurs pour les cinq paramètres clés : le module de Young  $E$ , le coefficient de Poisson  $\nu$ , le rayon du sphéroïde  $R_0$ , le rayon de la pipette  $R_p$  et la pression d'aspiration  $\Delta P$ .

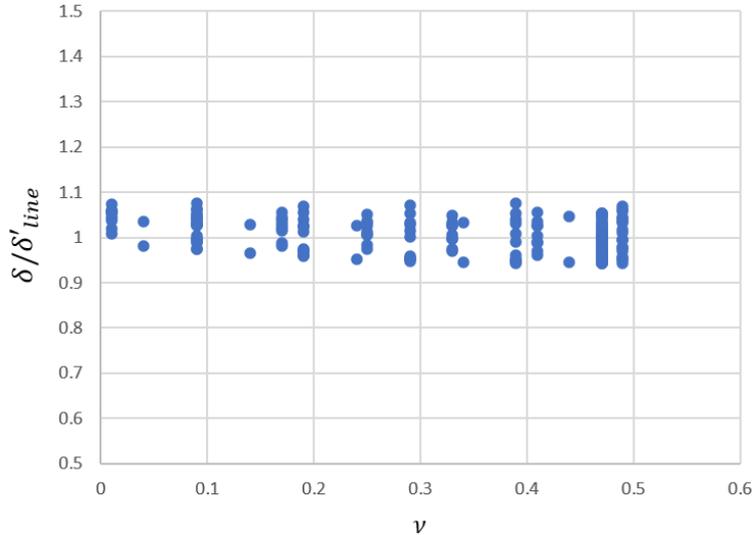


FIGURE 2.33 – Comparaison entre les résultats des simulations numériques et les prédictions de la loi empirique finale. Le rapport  $\delta_{\text{simu}}/\delta$  est tracé en fonction du coefficient de Poisson.

Nous observons que la loi empirique prédit la déformation avec une précision remarquable sur l'ensemble des simulations réalisées. L'écart relatif maximal entre les simulations et le modèle est inférieur à 8%. De plus, pour les valeurs des paramètres correspondant aux conditions expérimentales effectivement utilisées (notamment lorsque  $R_0 \geq 3R_p$ ), l'écart entre les simulations et les prédictions de la loi ne dépasse pas les 3%.

Cette loi offre une description plus fidèle du comportement mécanique des sphéroïdes lors de l'aspiration par micropipette, et pourra être utilisée pour interpréter avec plus de précision les résultats expérimentaux obtenus. Elle met en évidence l'importance de considérer les paramètres géométriques, mais permet également de mieux tenir compte des propriétés élastiques de l'échantillon, notamment pour les matériaux compressibles.

*Remarque : Chronologiquement, cette partie a été développée assez tardivement ; les corrections du modèle apportées par ces résultats n'ont donc pas encore été utilisées pour rectifier l'analyse et fournir des données présentables. Cependant, on a pu observer que ces résultats permettent de diminuer fortement la corrélation observée entre l'élasticité mesurée et la taille des sphéroïdes.*

## 2.5 Étude des liens entre constituants et propriétés mécaniques des tissus

Comme discuté au chapitre 1 1.3, certains constituants microscopiques sont suspectés de jouer un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des tissus. Cette section vise à explorer les liens entre les composants individuels des tissus et les propriétés mécaniques macroscopiques que l'on mesure grâce à la modélisation par le diagramme rhéologique à quatre paramètres.

### 2.5.1 Perturbation bio chimique

Cette étude a été réalisée en partie avec Pierre Lapeze, un étudiant en stage, que nous avons recruté pour évaluer l'impact de différentes substances chimiques ciblant des composants spécifiques suspectés d'influencer les propriétés mécaniques des sphéroïdes. En raison de contraintes de temps, cette étude demeure préliminaire et nécessiterait des optimisations et des répétitions pour confirmer les résultats. Nous présentons néanmoins ici quelques résultats préliminaires obtenus.

#### **Les adhésions cellule-cellule : impact de l'EDTA**

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier le lien entre l'adhésion intercellulaire et la viscosité observée sur le long terme. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acide éthylène-diaminetétraacétique (EDTA). L'EDTA affecte l'adhésion entre les cellules en chélatant les ions métalliques, notamment le calcium, nécessaire au fonctionnement des cadhérines, les principales protéines impliquées dans l'adhésion intercellulaire.

Le protocole que nous avons mis en place, consiste à incuber les cellules avec de l'EDTA, dès le début de la formation des sphéroïdes. La figure 2.34 présente les résultats que nous avons obtenus pour plusieurs concentrations.

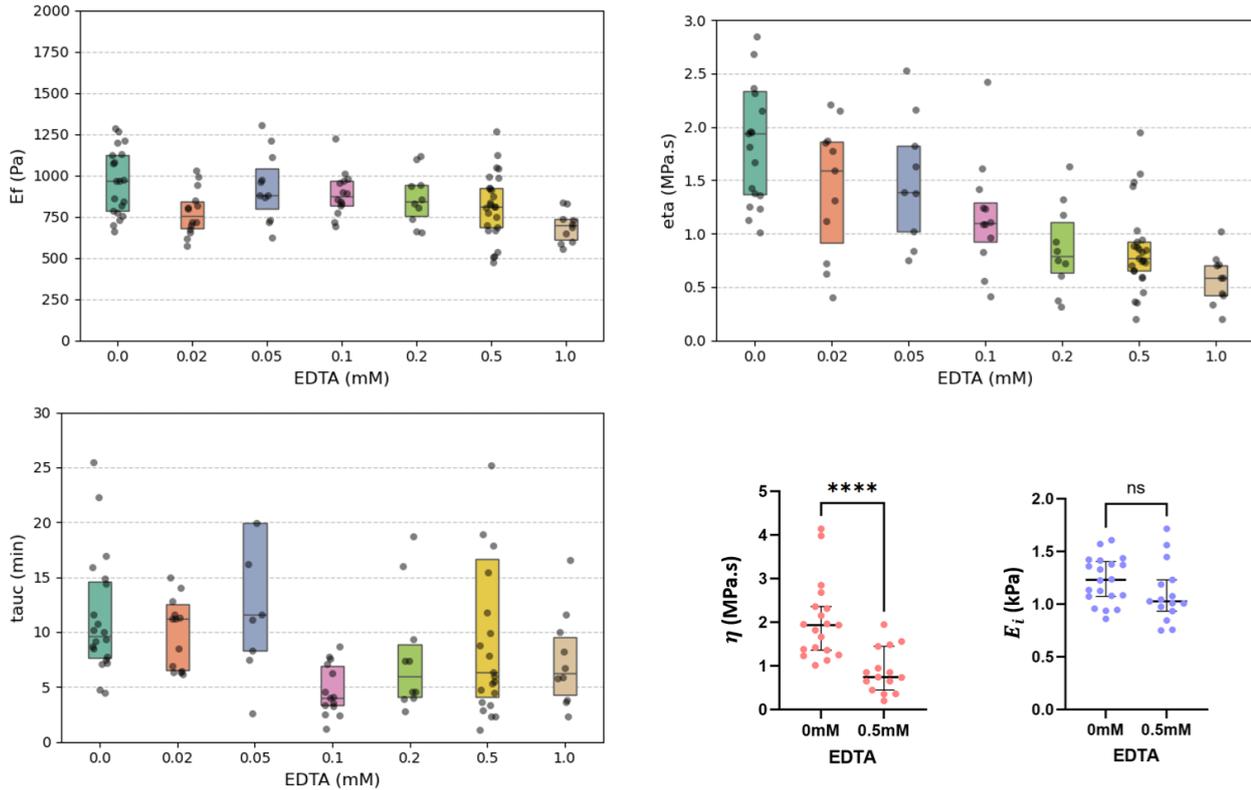


FIGURE 2.34 – Effet de l'EDTA sur les paramètres viscoélastiques des sphéroïdes en fonction de la concentration (0 à 1 mM). Les graphiques montrent l'évolution de l'élasticité finale ( $E_f$ ), de la viscosité ( $\eta$ ) et du temps caractéristique ( $\tau_c$ ). En plus de ces paramètres, deux tests statistiques sont illustrés : l'un montre un impact significatif de l'EDTA sur la viscosité (test  $t$  de Student,  $p < 0.0001$ ) et l'autre montre l'absence de changement significatif sur l'élasticité ( $E_i$ ).

Les résultats montrent que la viscosité des sphéroïdes diminue avec l'augmentation de la concentration en EDTA, tandis que l'élasticité ( $E_i$  et  $E_f$ ) et le temps caractéristique  $\tau_c$  ne semblent pas dépendre significativement de la concentration d'EDTA, ni donc de l'adhésion intercellulaire. Ce comportement est cohérent avec une réduction de l'adhésion intercellulaire, facilitant le réarrangement des cellules, ce qui entraîne une diminution de la viscosité. En revanche, l'élasticité et le temps caractéristique  $\tau_c$ , soupçonnés d'être issus du cytosquelette cellulaire et de la matrice extracellulaire, ne sont pas affectés par cette perturbation chimique, confirmant leur relative indépendance vis-à-vis des jonctions intercellulaires.

### Contractilité du cytosquelette : impact de la blebbistatine

Ensuite, nous avons cherché à étudier l'impact d'un dérèglement de l'activité contractile du cytosquelette cellulaire en utilisant la blebbistatine (( $\pm$ )-blebbistatine, 203390, Sigma-Aldrich), un inhibiteur spécifique de la myosine II. La contractilité du cytosquelette est

supposée avoir un impact sur la viscoélasticité des cellules, mais également sur la tension de surface des agrégats en réduisant la tension corticale des cellules (cf. 1.3.2).

Afin d'évaluer les effets de la blebbistatine sur la tension de surface des sphéroïdes, nous avons utilisé la lignée cellulaire de sarcome murin (S180), qui nous a permis d'analyser les rétractions. Cependant, au cours de cette étude, nous avons rencontré des problèmes d'adhésion entre les agrégats et les pipettes (probablement dus à un lot différent de tiges), ce qui a rendu les données de rétractions inexploitable et empêché la mesure de la tension de surface des agrégats.

Le protocole a donc été légèrement ajusté. Conformément aux instructions du fournisseur, la solution de travail de blebbistatine contient 90 % de DMSO, ce qui a impliqué une quantité significative de DMSO dans le milieu de culture lorsque nous avons travaillé avec des concentrations de blebbistatine de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ . Cette forte concentration de DMSO s'est avérée toxique pour les cellules et a limité nos conditions expérimentales. Ainsi, il n'a pas été possible d'ajouter la blebbistatine directement lors de la formation des sphéroïdes. À la place, nous avons introduit la blebbistatine environ 15 heures avant les mesures, une fois les sphéroïdes déjà formés, afin de permettre une diffusion homogène du composé à travers l'ensemble du sphéroïde.

Malgré cette adaptation, la présence élevée de DMSO a continué de poser des problèmes de viabilité cellulaire, visibles dans les résultats obtenus pour le groupe de contrôle (0  $\mu\text{M}$  de blebbistatine). Ce groupe a été traité avec la même concentration de DMSO que la condition à 30  $\mu\text{M}$ , mais sans ajout de blebbistatine (solvant seul). Les effets cytotoxiques du DMSO dans le groupe contrôle montrent clairement l'influence de ce solvant à des concentrations élevées et ajoutent une variable complexe dans l'interprétation des résultats.

Dans les figures 2.35, nous présentons l'impact de la blebbistatine sur les propriétés viscoélastiques des sphéroïdes :

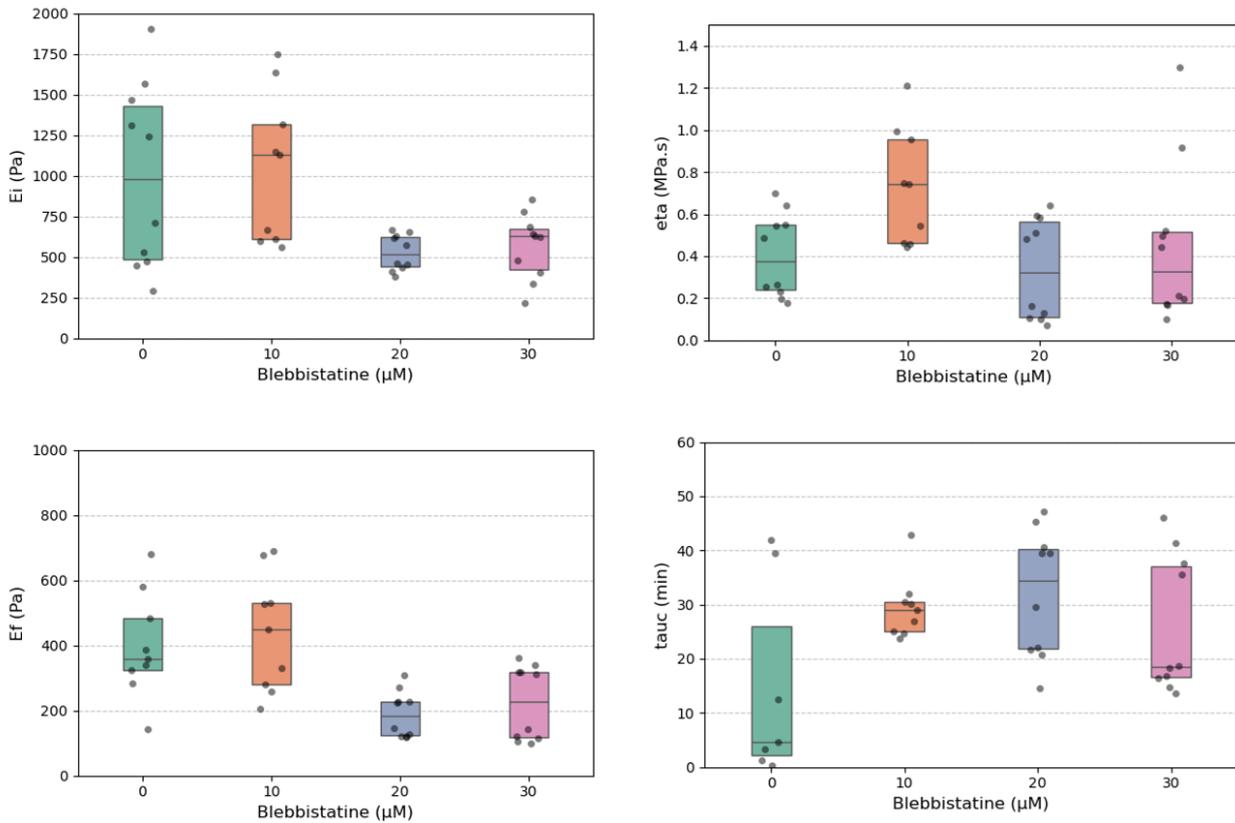


FIGURE 2.35 – Évolution des paramètres viscoélastiques des sphéroïdes en fonction de la concentration en blebbistatine (0, 10, 20, et 30  $\mu\text{M}$ ). Les paramètres mesurés incluent les élasticités initiale ( $E_i$ ) et finale ( $E_f$ ), la viscosité ( $\eta$ ) et le temps caractéristique ( $\tau_c$ ). La condition à 0  $\mu\text{M}$  correspond au contrôle, pour lequel la même quantité de solvant (DMSO) que pour la condition à 30  $\mu\text{M}$  a été ajoutée, sans blebbistatine.

Nous observons une réduction des élasticités, tant initiale que finale, suite à l'inhibition de l'activité contractile par la blebbistatine. En revanche, la viscosité et le temps caractéristique ( $\tau_c$ ) ne montrent pas de variation significative, suggérant que l'inhibition de la myosine II affecte principalement les propriétés élastiques à court et long terme, sans influencer de manière substantielle la dynamique de relaxation des cellules. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence en raison des difficultés méthodologiques précédemment évoquées.

### La matrice extracellulaire : Ajout de collagène dans le milieu de culture

Afin d'étudier l'impact de la matrice extracellulaire (MEC) sur les propriétés des sphéroïdes, nous avons cherché à augmenter la quantité de MEC en ajoutant du collagène, son principal constituant, directement dans le milieu de culture lors de la formation des sphéroïdes (comme décrit dans cet article [10]).

Après environ trente heures, les sphéroïdes obtenus sont significativement plus grands, avec un diamètre environ deux fois supérieur, correspondant à un volume approximativement huit fois plus élevé. Bien qu'une mesure précise de la densité cellulaire soit nécessaire, nos observations indiquent que cette augmentation de taille est due en grande partie à un plus grand nombre de cellules. Le collagène semble donc avoir stimulé la croissance des sphéroïdes au-delà de son rôle attendu dans la MEC, induisant potentiellement des effets biologiques additionnels non anticipés.

En conséquence, aucune étude approfondie n'a été menée à la suite de ce résultat inattendu. Une seule série d'expériences a été réalisée pour comparer les sphéroïdes contrôles avec ceux formés dans un milieu contenant 0,01 mg/mL de collagène. Dans cette condition, nous avons observé que l'élasticité des sphéroïdes était environ deux fois plus élevée, tandis que leur viscosité augmentait d'un facteur trois, en présence de collagène.

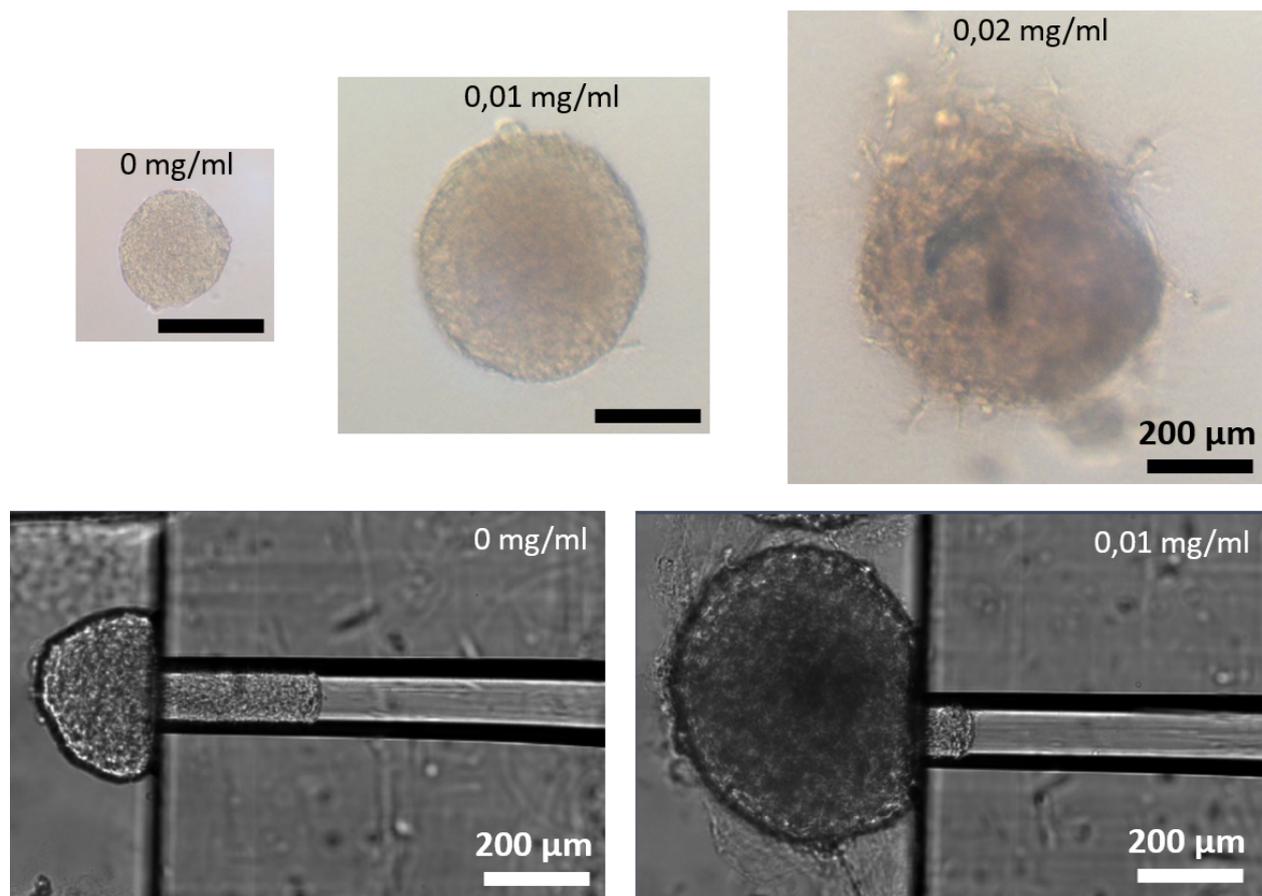


FIGURE 2.36 – Images des sphéroïdes obtenus après 30 heures d'agrégation dans un milieu de culture sans et avec différentes concentrations de collagène de type I. Illustration de l'aspiration de deux sphéroïdes, avec et sans ajout de collagène lors de leur formation, après une heure d'aspiration à 40 mbar.

### Déplétion de l'eau : Choc osmotique

Enfin, une dernière étude a consisté à réaliser un choc osmotique sur les sphéroïdes en ajoutant du sorbitol au milieu de culture, suivi d'une mesure quelques minutes après cet ajout. Ce choc hypertonique entraîne une perte partielle d'eau dans les cellules, augmentant ainsi l'encombrement et la concentration en protéines fibreuses du cytosquelette.

Après plusieurs dizaines de minutes, les cellules commencent à sécréter des macromolécules pour s'adapter à la nouvelle osmolarité de la solution, annulant l'effet initial du choc osmotique. Par conséquent, seules les premières minutes après l'ajout du sorbitol sont véritablement exploitables. Seule la mesure de l'élasticité initiale ( $E_i$ ), pertinente dans ce contexte, est donc présentée dans la figure 2.37.

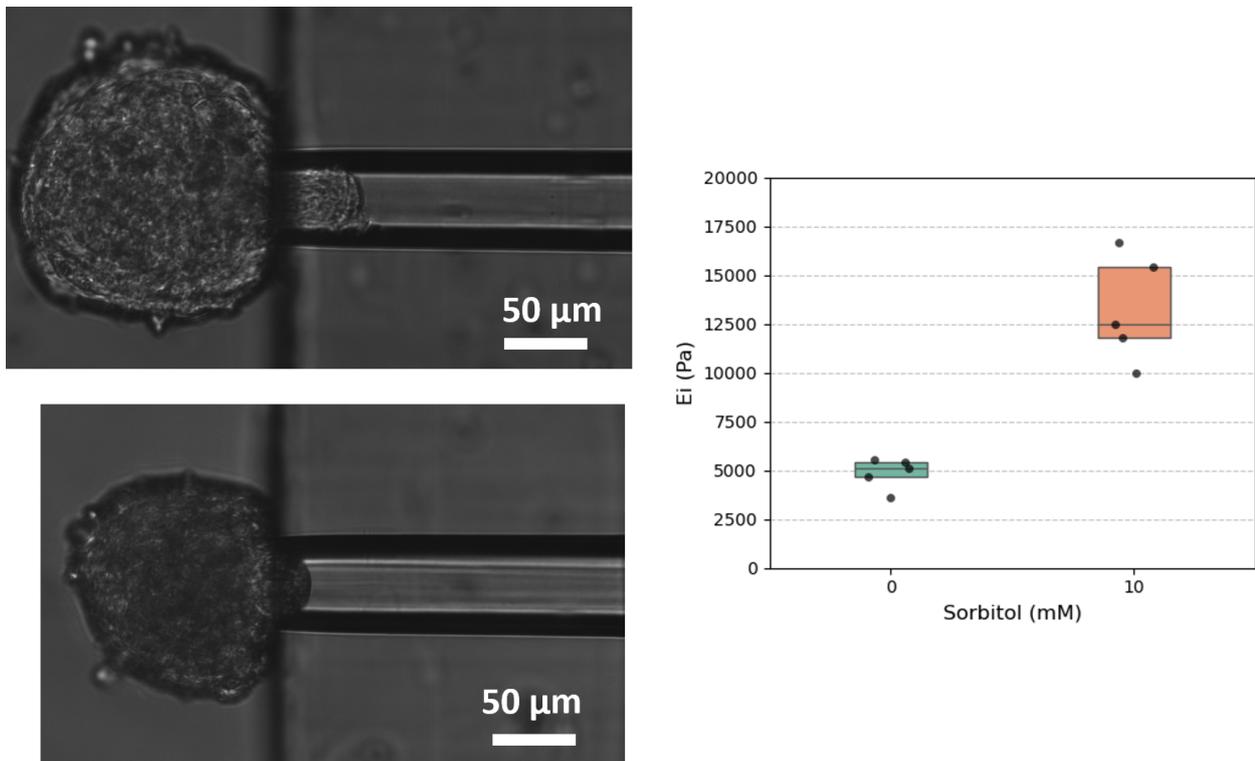


FIGURE 2.37 – Images d'un sphéroïde témoin (en haut) et d'un sphéroïde ayant subi un choc osmotique (en bas), une minute après l'application d'une pression d'aspiration de 40 mbar.

On observe une rigidification du tissu d'un facteur trois suite à cette déplétion en eau. Une hypothèse pour expliquer ce résultat pourrait être l'origine élastique du comportement cellulaire, liée au cytosquelette, qui agit comme un réseau de polymères. L'augmentation de la concentration en fibres dans ce réseau accroît les points d'entrecroisement de ces chaînes (voir 1.3.1), ce qui conduit à une augmentation de la rigidité des cellules.

### 2.5.2 Visualisation des différents constituants lors de l'AMP

Afin de poursuivre l'étude des liens entre les constituants du tissu et ses propriétés mécaniques, nous avons entrepris de visualiser les déformations cellulaires, les réarrangements tissulaires et les composants qui jouent un rôle clé dans la mécanique du tissu pendant une AMP.

#### Cadhérines et déformation cellulaire

La figure 2.38 illustre l'aspiration d'un sphéroïde dérivé de la lignée cellulaire S180 modifiée génétiquement pour exprimer des cadhérines fluorescentes (GFP). Le marquage des cadhérines a permis de visualiser les jonctions intercellulaires et de suivre les déformations des cellules au cours de l'aspiration, car ces protéines sont situées à la surface des membranes cellulaires et nous donnent donc accès à la morphologie cellulaire.

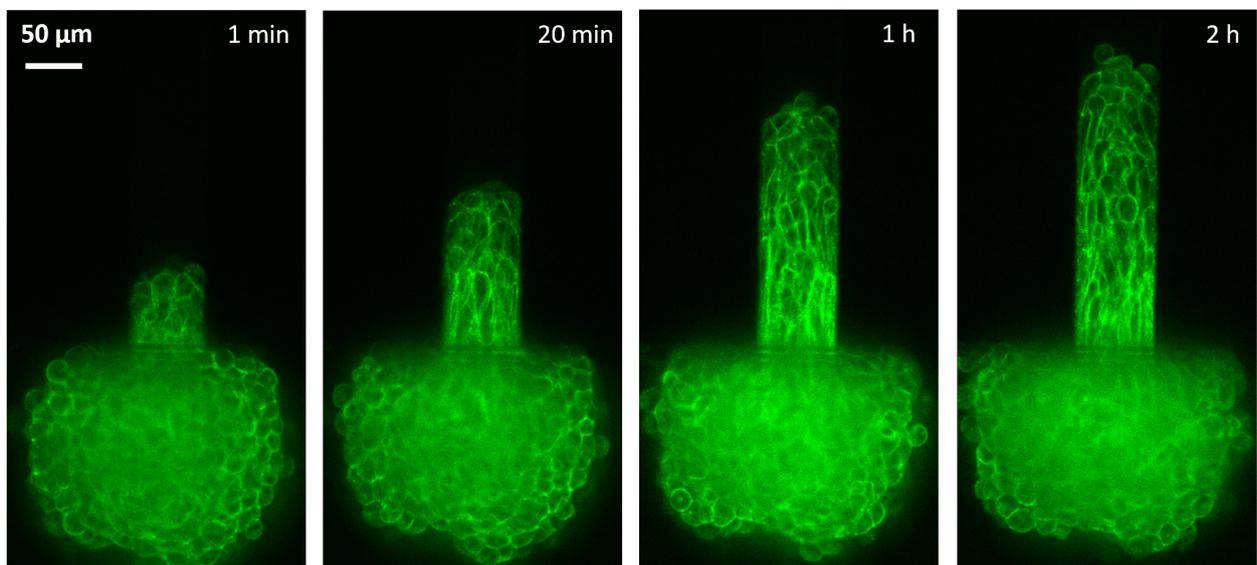


FIGURE 2.38 – Image en microscopie confocale de cadhérines fluorescentes dans une lignée cellulaire S180 modifiée pour exprimer des cadhérines marquées par GFP. Ce marquage permet de visualiser les jonctions intercellulaires et de suivre les déformations cellulaires lors de l'aspiration.

Dans un premier temps, nous avons observé que la déformation durant les premières dizaines de minutes est essentiellement due à un allongement des cellules. Cela corrobore notre modèle rhéologique proposé, selon lequel, aux temps proches de  $\tau_c$ , le matériau se comporte

comme un solide viscoélastique passant d'une élasticité initiale  $E_i$  à une élasticité finale  $E_f$  avec le temps caractéristique  $\tau_c$ . Ce comportement est attribué à la viscoélasticité intrinsèque des cellules, et possiblement à celle de la matrice extracellulaire.

Ensuite, ces observations nous permettent de constater que, sur des temps plus longs, c'est bien une réorganisation des cellules à l'échelle du tissu qui se produit, entraînant un écoulement du sphéroïde dans la pipette. Nous avons pu visualiser des événements de type T1, où les cellules échangent leurs voisins.

Il est également intéressant de noter que le tissu semble réagir au stress mécanique auquel il est soumis, avec une intensité de fluorescence plus élevée à proximité de l'entrée de la pipette où le stress est maximal. Cette augmentation de l'intensité est corrélée à une concentration accrue de cadhérines à ces emplacements. Il est plausible que les cellules recrutent davantage de cadhérines lorsqu'elles sont soumises à un stress mécanique pour renforcer les adhésions intercellulaires et résister à la déformation.

### Déformation du noyau cellulaire

La figure 2.39 présente l'aspiration d'un sphéroïde dont les noyaux cellulaires ont été marqués avec du Hoechst 33342. Ce marquage fluorescent spécifique du noyau nous a permis de visualiser directement les déformations que ces derniers subissent lors de l'aspiration par micropipette.

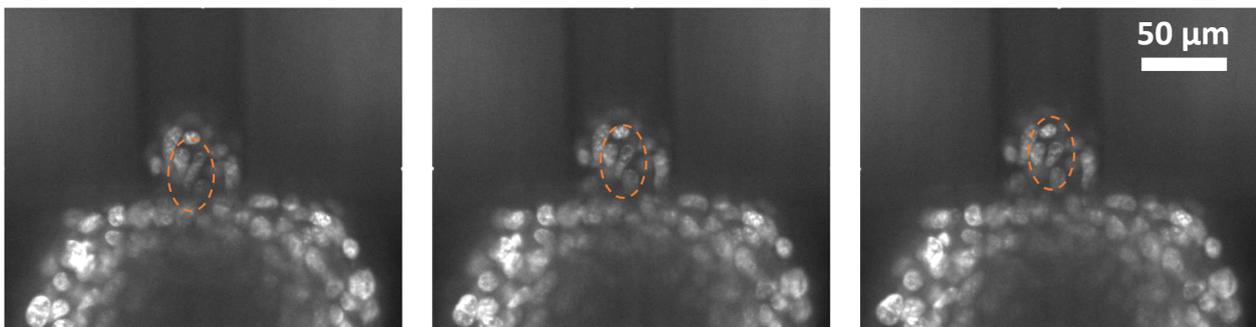


FIGURE 2.39 – Image en microscopie confocale de la déformation des noyaux cellulaires marqués avec du Hoechst. Lors de l'aspiration, les noyaux subissent des déformations significatives, contribuant aux propriétés mécaniques du tissu.

Nos observations révèlent que les noyaux subissent des déformations notables lorsqu'ils pénètrent dans la région de constriction de la micropipette. Étant donné que le noyau est relativement rigide, avec un module élastique compris entre 2 et 4 kPa [11], ces déformations

suggèrent que le noyau contribue de manière significative aux propriétés mécaniques globales du tissu.

Il est à noter que ce stress sur le noyau des cellules entraîne probablement l'activation de certaines voies de mécanotransduction, ce qui est sans doute à l'origine de réponses adaptatives de la cellule, telles que la réorganisation du cytosquelette d'actine, que nous abordons dans la section suivante.

### **Réaction du cytosquelette d'actine aux contraintes mécaniques**

Pour approfondir notre compréhension des origines microscopiques de la mécanique tissulaire, nous avons cherché à établir un protocole permettant de fixer les sphéroïdes à la paraformaldéhyde (PFA) en cours d'aspiration. Cette technique permet de marquer des constituants d'intérêt, comme les filaments d'actine, dans un état déformé en conservant leurs structures.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'utiliser une puce microfluidique décrite dans l'Annexe A.1, permettant de modifier l'environnement des sphéroïdes tout en continuant l'aspiration. Cependant, cette approche n'a pas abouti : la PFA a provoqué une adhésion trop forte des sphéroïdes aux tiges, rendant impossible leur extraction de la puce sans dommage. En réponse à cette limitation, nous avons développé une méthode alternative : les sphéroïdes sont aspirés pendant environ trois heures, puis rapidement extraits de la puce et plongés dans la PFA en moins d'une minute, afin de préserver au mieux leur état déformé et de figer les modifications biochimiques induites par le stress mécanique.

Les sphéroïdes sont restés dans la PFA pendant au moins une demi-journée pour assurer une fixation complète, y compris au cœur de l'agrégat. Le reste du protocole impliquait une série de bains successifs, chacun durant environ une journée, afin de garantir une pénétration homogène des réactifs.

Nous avons ensuite appliqué un protocole classique de marquage fluorescent sur les sphéroïdes fixés. La première étape consiste à perméabiliser les agrégats avec une solution de Triton X-100 à 0,5 %, facilitant la pénétration des marqueurs et anticorps. Nous avons ensuite utilisé des marqueurs spécifiques, notamment le DAPI pour la visualisation des noyaux cellulaires, et la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 568 pour marquer les filaments d'actine. Le marquage a été réalisé dans une solution contenant 0,1 % de Triton pour maintenir la perméabilisation et de la BSA pour bloquer les interactions non spécifiques.

Une étape de transparisation a ensuite été réalisée avec une solution de glycérol à 80 %, permettant d'augmenter la transparence optique de l'échantillon. Cette préparation a permis d'obtenir des reconstructions 3D en microscopie confocale à balayage, illustrées dans la figure 2.40.

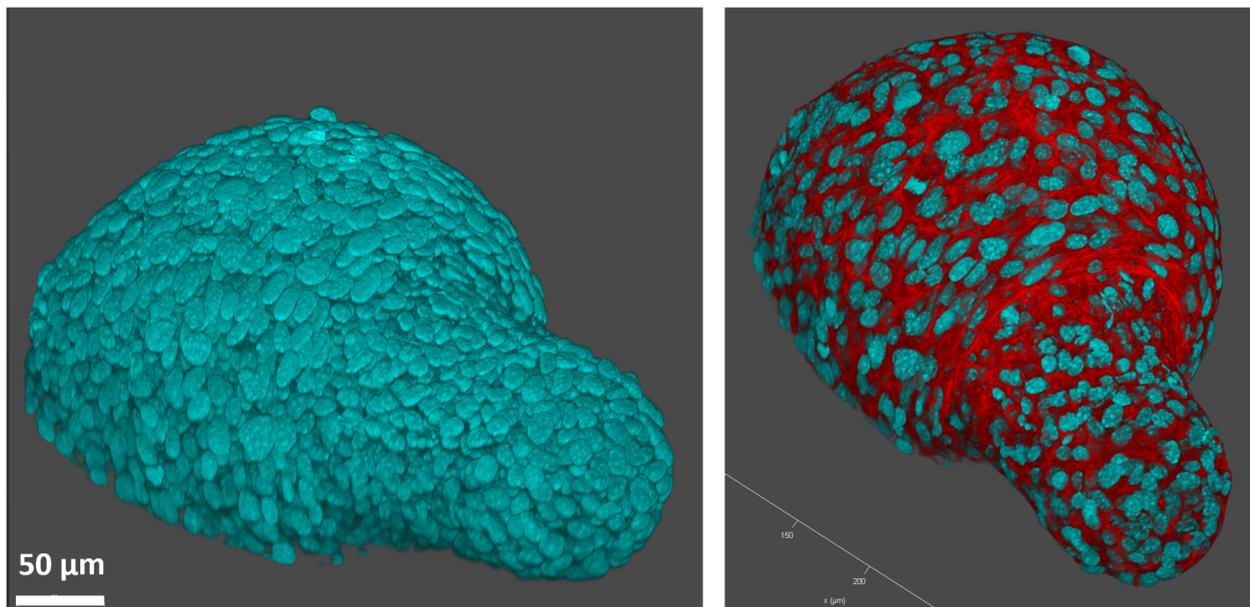
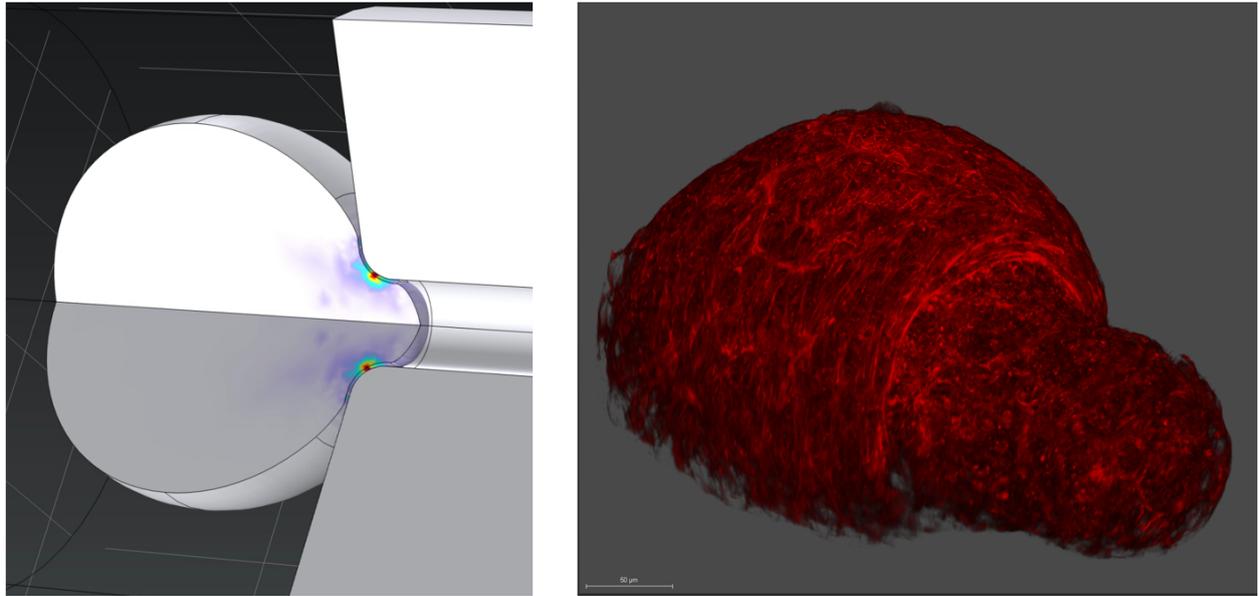


FIGURE 2.40 – Reconstruction 3D issue d'images de microscopie confocale montrant les noyaux cellulaires marqués avec du DAPI (bleu) et les filaments d'actine marqués avec de la phalloïdine (rouge) dans un sphéroïde aspiré.

Nous observons d'abord que les noyaux cellulaires occupent un volume important dans les sphéroïdes, ce qui corrobore les hypothèses précédentes sur leur contribution significative aux propriétés mécaniques globales de l'agrégat. Par ailleurs, un anneau rouge intense, révélant une concentration accrue d'actine, est visible dans la zone en contact direct avec l'entrée de la pipette.

La figure 2.41 illustre cette corrélation entre les fibres de stress d'actine et les contraintes mécaniques appliquées au sphéroïde lors de l'aspiration, indiquant une réponse active des cellules aux forces mécaniques.



*FIGURE 2.41 – Reconstruction 3D issue d’images de microscopie confocale montrant les fibres de stress d’actine (rouge) en corrélation avec les contraintes mécaniques subies. Une intensité plus forte est observée dans les zones du sphéroïde en contact avec l’entrée de la pipette, en parfaites corrélations avec les cartographies de contraintes issues des simulations COMSOL.*

Ces observations expérimentales sont en accord avec nos simulations par éléments finis réalisées avec COMSOL Multiphysics, qui montrent que cette zone est soumise à des contraintes maximales. L’accumulation de structures d’actine dans les zones de haute contrainte suggère un remodelage actif du cytosquelette, contribuant à l’adaptation mécanique du tissu en réponse aux sollicitations externes.

En conclusion, cette étude a mis en évidence les liens complexes entre les constituants microscopiques des tissus et leurs propriétés mécaniques macroscopiques. Les perturbations biochimiques ciblées ont démontré que l’adhésion intercellulaire, modulée par l’EDTA, influence principalement la viscosité du tissu en facilitant les réarrangements cellulaires, tandis que la contractilité du cytosquelette, inhibée par la blebbistatine, affecte l’élasticité sans modifier significativement la viscosité. L’ajout de collagène dans le milieu de culture a suggéré un rôle de la matrice extracellulaire dans l’augmentation des propriétés élastiques et visqueuses, bien que des effets inattendus sur la croissance des sphéroïdes nécessitent des investigations supplémentaires. Le choc osmotique a révélé que la déplétion en eau rigidifie le tissu, probablement en augmentant la concentration des fibres cytosquelettiques.

Par ailleurs, les études de visualisation ont permis d’observer que les déformations initiales des sphéroïdes sont dues à l’allongement des cellules, en accord avec le modèle rhéologique proposé, et que des réarrangements cellulaires de type T1 contribuent à l’écoulement du tissu

sur des temps plus longs. La déformation significative des noyaux cellulaires lors de l'aspiration souligne leur contribution aux propriétés mécaniques du tissu, compte tenu de leur rigidité intrinsèque. De plus, la réponse adaptative du cytosquelette d'actine aux contraintes mécaniques, avec une accumulation de fibres de stress dans les zones de haute contrainte, indique un remodelage actif du tissu en réponse aux sollicitations externes.

## 2.6 Application à des tissus plus complexes

À mesure que notre technologie a progressé et que nous avons communiqué sur ses performances, plusieurs groupes de recherches ont manifesté leur intérêt pour cette dernière, notamment dans le domaine de la biologie du développement, où, comme discuté au chapitre 1, les propriétés mécaniques des tissus jouent un rôle majeur. Cela a conduit à l'établissement de plusieurs collaborations pour mesurer les propriétés mécaniques de tissus plus complexes. Deux de ces collaborations ont fait l'objet d'études approfondies que je détaille très brièvement ici.

### 2.6.1 Comparaison des propriétés mécaniques d'organoïdes de cortex préfrontal entre différentes espèces de mammifères

La première collaboration concerne le groupe de Miki Ebisuya de l'Université de Dresde, avec la participation de son étudiante en thèse, Shuting Xu, qui est venue à plusieurs reprises au LAAS. Ce groupe s'intéresse aux mécanismes de différenciation cellulaire et aux rythmes biologiques qui varient entre différentes espèces de mammifères. Nous avons travaillé sur des organoïdes de cortex préfrontal dérivés de cellules souches induites de lignées humaines, murines et de gorille. Cette collaboration nous a conduits à développer de nouveaux dispositifs adaptés aux grandes dimensions de leurs organoïdes, pouvant atteindre le millimètre.

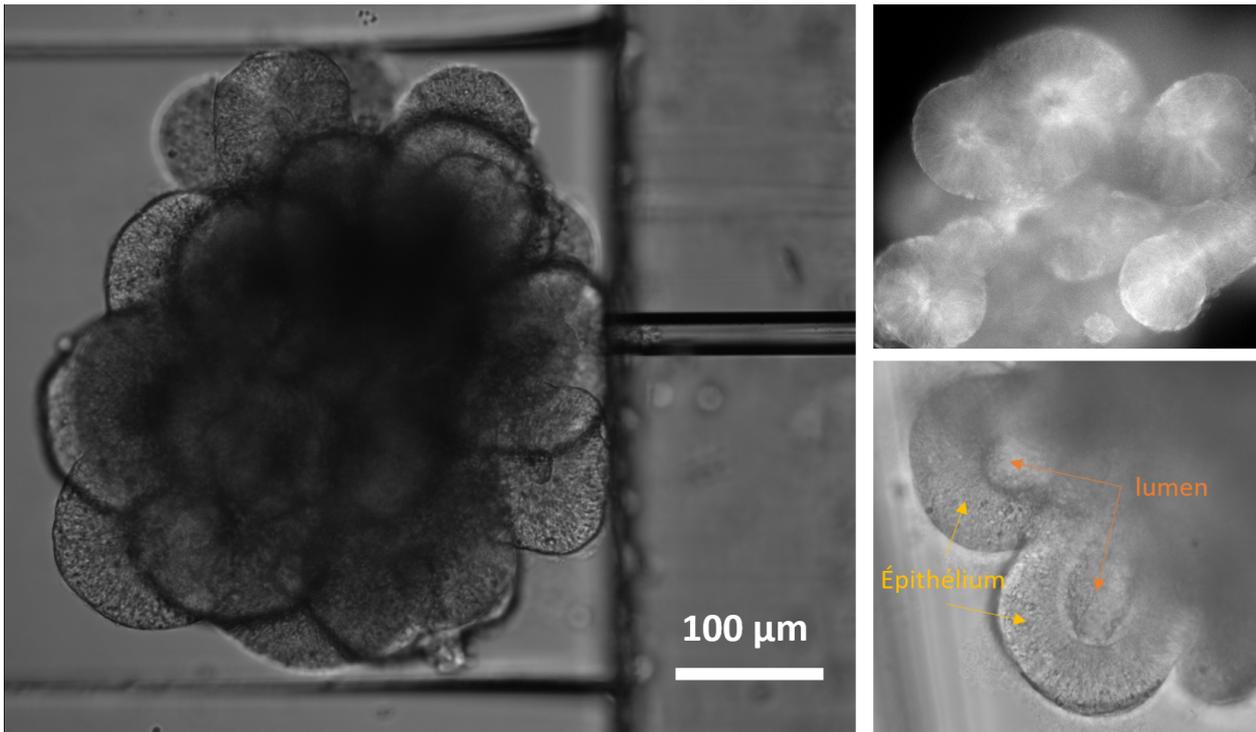


FIGURE 2.42 – Image de microscopie montrant l'aspiration d'un organoïde de cortex pré-frontal de gorille fabriqué à partir de cellules souches induites. Ces organoïdes présentent une structure en forme de "buds" dans laquelle des épithéliums enferment un lumen.

Ces tissus sont plus complexes que les agrégats précédemment étudiés, car ils ne sont pas véritablement tridimensionnels. Ils se composent de structures en forme de "buds" contenant un lumen, ce qui signifie que nous aspirons principalement des feuillets cellulaires, plutôt que des agrégats 3D denses. Cette configuration nous a amenés à repenser et adapter le modèle afin de caractériser de tels objets. Ce travail est également lié à une autre collaboration de l'équipe, avec Olivier Cochet-Escartin, qui utilise notre dispositif pour étudier des hydres présentant une organisation cellulaire similaire [12].

### 2.6.2 Étude des tissus postérieurs de l'embryon de caille

La deuxième collaboration a été menée avec le groupe de Bertrand Benazeraf au CBI de Toulouse, avec le recrutement de Vincent Renoust, un stagiaire en coencadrement avec Bertrand et moi-même. Cette collaboration a porté sur l'étude du développement embryonnaire chez les vertébrés, et en particulier chez l'embryon de caille. L'allongement axial de l'embryon, un processus où la structure embryonnaire s'étend le long de l'axe antéro-postérieur, fait intervenir plusieurs tissus postérieurs, notamment le mésoderme présomitique (PSM), le tube neural (NT) et la zone de progéniteurs (PZ). Le PSM est destiné à former des somites,

futurs constituants du squelette et des muscles, tandis que le NT formera le futur système nerveux. La PZ, quant à elle, constitue une zone de cellules souches multipotentes qui migreront vers le PSM ou le NT. Une question clé de cette équipe est de déterminer si les cellules se différencient avant de migrer vers le tissu adéquat, ou si elles migrent d'abord, et c'est l'environnement physico-chimique qui induit une différenciation appropriée.

Pour explorer les propriétés mécaniques de ces tissus et mieux comprendre leur influence sur la migration et la différenciation cellulaires, nous avons utilisé une approche par explants. Nous avons isolé chaque tissu embryonnaire pour en réaliser une analyse mécanique individuelle. Les tissus postérieurs (PSM, NT, PZ) ont été disséqués pour obtenir des explants de chacun, sur lesquels nous avons effectué des expériences d'aspiration avec notre dispositif. Ces explants, similaires à nos sphéroïdes, se présentent sous forme de sphères d'environ cent micromètres de diamètre. Les résultats montrent une disparité marquée dans les propriétés mécaniques des trois tissus étudiés.

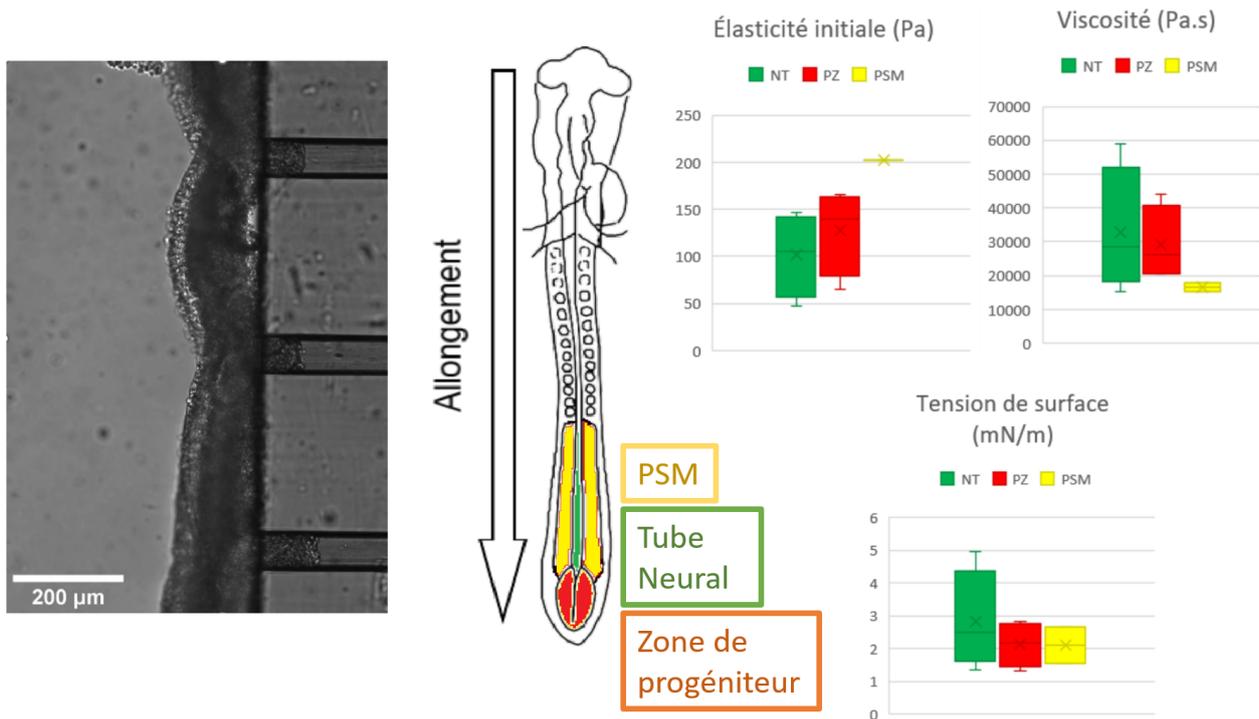


FIGURE 2.43 – Image en microscopie montrant l'aspiration de plusieurs zones du tube neural d'un embryon de caille le long de son axe antéro-postérieur pour mesurer les variations de propriétés mécaniques. Schéma des différents types cellulaires présents dans la zone postérieure d'un embryon de vertébré et résultats des propriétés mécaniques mesurées sur des explants de ces différentes zones (4 NT, 4 PZ et 2 PSM).

Les résultats, bien que préliminaires, ont révélé que le NT est plus rigide que le PSM. Cette rigidité élevée du NT pourrait favoriser la différenciation des cellules migrantes en

cellules neurales dans cette région, en accord avec les résultats discutés au chapitre 1 sur l'impact de la rigidité de l'environnement sur le destin cellulaire. Sans entrer dans les détails de cette étude encore en cours, nous évoquons également le projet de mesurer un gradient supposé de rigidité le long de l'axe antéro-postérieur en réalisant des aspirations simultanées le long de cet axe, comme montré dans la figure 2.43. Un projet ANR vient de démarrer sur ce sujet, attestant de son intérêt jugé par des instances extérieures.

## Bibliographie

- [1] Bastien Venzac, Yang Liu, Ivan Ferrante, Pablo Vargas, Ayako Yamada, Rémi Courson, Marine Verhulsel, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy, and Stéphanie Descroix. Sliding walls : a new paradigm for fluidic actuation and protocol implementation in microfluidics. *Microsystems & Nanoengineering*, 6(1) :1–10, April 2020. Publisher : Nature Publishing Group.
- [2] Marianne Elias. *Microfluidique pour manipuler et étudier des membranes biomimétiques*. thesis, Toulouse 3, May 2021.
- [3] Sylvain Landiech, Marianne Elias, Pierre Lapèze, Hajar Ajiyel, Marine Plancke, Blanca González-Bermúdez, Adrian Laborde, Fabien Mesnilgrente, David Bourrier, Debora Berti, Costanza Montis, Laurent Mazenq, Jérémy Baldo, Clément Roux, Morgan Delarue, and Pierre Joseph. Parallel on-chip micropipettes enabling quantitative multiplexed characterization of vesicle mechanics and cell aggregates rheology. *APL Bioengineering*, 8(2) :026122, June 2024.
- [4] Karine Guevorkian, Marie-Josée Colbert, Mélanie Durth, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Physical Review Letters*, 104(21) :218101, 2010. Number : 21.
- [5] Karine Guevorkian, Françoise Brochard-Wyart, and David Gonzalez-Rodriguez. Chapter eight - Flow dynamics of 3D multicellular systems into capillaries. In Ivana Pajic-Lijakovic and Elias H Barriga, editors, *Viscoelasticity and Collective Cell Migration*, pages 193–223. Academic Press, January 2021.
- [6] Takahira Aoki, Toshiro Ohashi, Takeo Matsumoto, and Masaaki Sato. The pipette aspiration applied to the local stiffness measurement of soft tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 25(3) :581–587, May 1997.
- [7] Zeev Dagan, Sheldon Weinbaum, and Robert Pfeffer. An infinite-series solution for the creeping motion through an orifice of finite length. *Journal of Fluid Mechanics*, 115(-1) :505, February 1982.
- [8] David Oriola, Miquel Marin-Riera, Kerim Anlaş, Nicola Gritti, Marina Sanaki-Matsumiya, Germaine Aalderink, Miki Ebisuya, James Sharpe, and Vikas Trivedi. Arrested coalescence of multicellular aggregates. *Soft Matter*, 18(19) :3771–3780, 2022.
- [9] Michele Pagnanelli, Francesco De Gaetano, Arianna Callera, Gennaro Nappo, Giovanni Capretti, Silvia Carrara, Alice Maria Renata Ferrari, Francesco Cellesi, Maria Laura

- Costantino, and Alessandro Zerbi. Analysis of the Mechanical Characteristics of Human Pancreas through Indentation : Preliminary In Vitro Results on Surgical Samples. *Biomedicines*, 12(1) :91, January 2024.
- [10] Daria Tsvirkun, Jean Revilloud, Arianna Giannetti, and Claude Verdier. The intriguing role of collagen on the rheology of cancer cell spheroids. *Journal of Biomechanics*, 141 :111229, August 2022.
- [11] Kris Noel Dahl, Samuel M. Kahn, Katherine L. Wilson, and Dennis E. Discher. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 20) :4779–4786, September 2004.
- [12] Thomas Perros, Anaïs Biquet-Bisquert, Zacchari Ben Meriem, Morgan Delarue, Pierre Joseph, Philippe Marcq, and Olivier Cochet-Escartin. Mechanical characterization of regenerating Hydra tissue spheres. *Biophysical Journal*, 123(13) :1792–1803, July 2024. Publisher : Elsevier.





## Chapitre 3

# Poroélasticité d'agrégats cellulaires couplée à leur viscoélasticité : réponse à une pression oscillante

Dans le chapitre précédent, nous avons examiné la réponse d'un sphéroïde à un échelon de pression. Nous avons voulu approfondir cette étude en sondant la dynamique de ces objets biologiques sur différentes échelles de temps ciblées, grâce à l'application de pressions d'aspiration périodiques.

Cette étude démontre que le modèle viscoélastique standard ne permet pas de décrire la totalité de la réponse des sphéroïdes. Nous proposons d'inclure les effets poroélastiques, c'est-à-dire les propriétés poreuses des tissus, afin d'obtenir un ajustement complet des données expérimentales.

Nous démontrons que cette analyse fréquentielle permet de fournir une caractérisation complète de l'élasticité des tissus, incluant le module de Young et le coefficient de Poisson, ainsi que des propriétés poreuses avec la perméabilité. À notre connaissance, cela constitue une avancée par rapport aux travaux précédents dans ce domaine.

Nous commencerons ce chapitre en présentant la méthode expérimentale. Nous verrons ensuite un modèle analytique ainsi que des simulations de la poroviscoélasticité. Enfin, nous finirons avec l'étude quantitative de nos résultats expérimentaux.

## 3.1 Aspiration en régime sinusoïdal forcé

Les expériences avec un échelon de pression ont montré que les tissus se comportent aux temps très courts ( $<1$  min) comme des solides purement élastiques, à des temps intermédiaires comme des solides viscoélastiques ( $\sim 10$  min) et au temps long ( $>1$ h) comme des fluides visqueux.

Un échelon donne accès à ces différentes échelles de temps, car il est la résultante d'une somme continue d'harmoniques sur l'ensemble du spectre fréquentiel. Cependant, cette méthode de stimulation ne permet pas d'isoler un comportement spécifique pour une plage temporelle donnée. Par conséquent, nous avons cherché à approfondir notre étude en balayant le spectre fréquentiel à l'aide d'excitations en régime sinusoïdal forcé. Cette approche permet de mieux découpler les différents mécanismes impliqués dans chaque dynamique.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre 1, cette méthode de stimulation est relativement classique dans le domaine de la rhéologie.

### 3.1.1 Mise en place expérimentale

La mise en place expérimentale pour l'aspiration avec une pression sinusoïdale débute de la même manière que pour une pression en échelon. Les sphéroïdes sont positionnés devant chaque pipette des mêmes puces microfluidiques et les mêmes contrôleurs de pression sont utilisés. L'idée est ensuite d'appliquer aux sphéroïdes une pression d'aspiration de la forme  $\Delta P(t) = P_0 + P_1 \sin(\omega t)$ , avec  $P_0 > P_1$ . En effet, au-delà des lourdes complications expérimentales que demanderait l'application de pressions positive et négative au cours de la même expérience, on est obligé de toujours aspirer le sphéroïde. Si la pression d'aspiration venait à être négative, le sphéroïde serait expulsé de la pipette et cette dynamique n'aurait aucun lien avec les propriétés mécaniques du tissu étudié.

Ainsi, l'offset  $P_0$  est indispensable. Dans ces conditions, le sphéroïde subit donc la superposition de deux contraintes : un échelon de pression  $P_0$  et une pression oscillante  $P_1 \sin(\omega t)$ . Si on applique directement une telle contrainte, on observe la déformation représentée sur le kymographe de la figure 3.1.

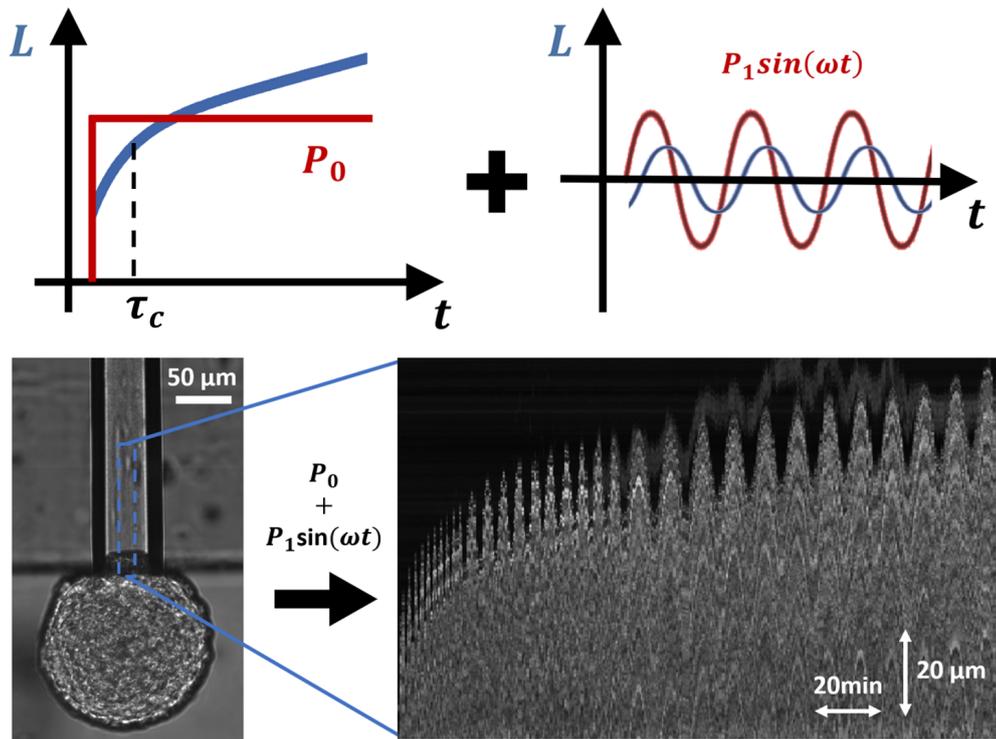


FIGURE 3.1 – Schéma illustrant la décomposition des contraintes et des déformations en une partie échelon et une partie sinusoïdale. Kymographe montrant que la déformation est bien la somme de ces deux réponses.

On observe que la déformation de la langue résulte de l'addition de la réponse à un échelon et de la réponse à une pression sinusoïdale (cela démontre une certaine linéarité du matériau et nous conforte sur la pertinence du modèle viscoélastique linéaire présenté précédemment). Puisque nous nous intéressons uniquement à la deuxième composante, il est nécessaire de soustraire la partie échelon. En attendant un certain temps (typiquement quelque  $\tau_c$ ), la réponse à un échelon se stabilise en une droite affine (correspondant à l'écoulement visqueux du tissu), ce qui la rend beaucoup plus facile à corriger.

L'expérience classique que j'ai réalisée consiste donc à appliquer un échelon de pression  $\Delta P = P_0$  pendant une certaine durée ( $\approx 1$  h), puis à appliquer une suite de pression oscillante  $\Delta P = P_0 + P_1 \sin(\omega t)$ , en faisant varier la période  $T$  des oscillations ( $\omega = 2\pi/T$ ). En appliquant ce protocole, on peut voir sur la figure 3.2 que le mouvement du bout de la langue peut être ajusté par une fonction sinusoïdale à laquelle on rajoute une droite affine.

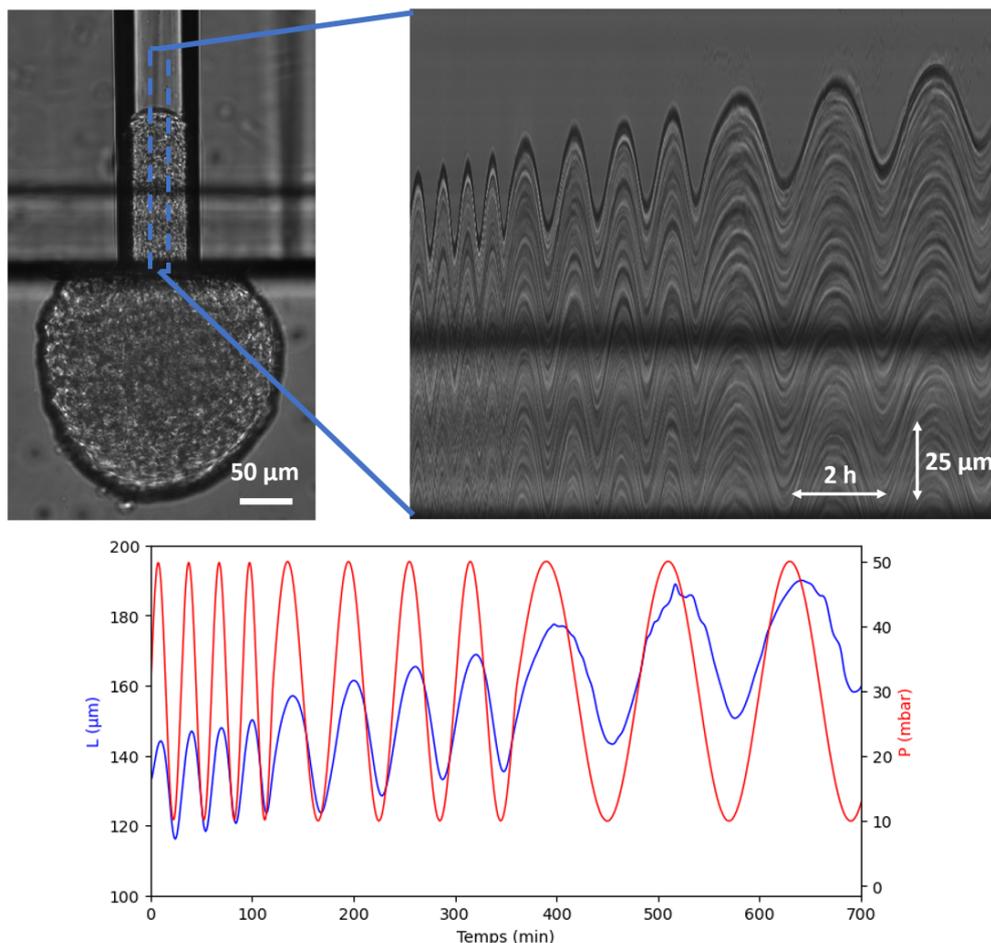


FIGURE 3.2 – Kymographe montrant une aspiration oscillante après un échelon de 1h. Succession de trois périodes : 30min, 1h et 2h. Superposition de la pression d'aspiration avec la position du bout de la langue sur un même axe temporel.

Un élément expérimental essentiel pour mesurer correctement le déphasage de ces oscillations (en particulier à haute fréquence) est la synchronisation temporelle entre la pression appliquée par le contrôleur de pression (Fluigent) et la déformation mesurée à partir des images du microscope (ZEISS Observer 7, piloté par le logiciel ZEN). Dans un premier temps, j'ai tenté de synchroniser ces deux éléments indépendants via le logiciel LabVIEW, mais cette approche s'est avérée assez complexe à mettre en œuvre.

Une solution plus simple est venue de l'utilisation des métadonnées collectées par ces deux instruments. En effet, le logiciel Oxygène, qui pilote le contrôleur de pression Fluigent, peut enregistrer la pression appliquée au cours du temps et utiliser l'horloge de l'ordinateur auquel il est connecté pour définir une origine temporelle. De même, les métadonnées accompagnant une acquisition du microscope ZEISS incluent une origine temporelle basée sur l'horloge du même ordinateur et les temps écoulés depuis ce point lors de la capture de chaque image.

De cette manière, j'ai pu utiliser le même script python que celui présenté dans la partie 2.1.3 afin d'obtenir la position du bout de la langue au cours du temps. Puis j'ai pu synchroniser sur une même base de temps ce signal avec le signal de pression. Ainsi, on peut superposer sur un même graphique la contrainte et la déformation subies par le sphéroïde au cours du temps. On peut voir une telle superposition pour une succession de pression oscillante de période 30min, 1h et 2h sur la figure 3.2. On remarque bien un déphasage entre la déformation du tissu et le stress qui lui est appliqué. De plus, on peut remarquer que l'amplitude des déformations et ce déphasage varient selon la période imposée.

Afin de mesurer ces deux grandeurs pour chaque fréquence, j'ai décidé d'ajuster le signal de pression mesuré avec une fonction du type  $P(t) = P_0 + P_1 \sin(\omega t + \psi_1)$  (3 paramètres :  $P_0$ ,  $P_1$  et  $\psi_1$ ). Puisque le mouvement du bout de la langue semble être décrit par une fonction sinusoïdale à laquelle on rajoute une droite affine, je l'ai ajusté avec une fonction du type :

$$L(t) = L_0 + Ct + \Delta L \sin(\omega t + \psi_2) \quad (4 \text{ paramètres : } L_0, C, \Delta L \text{ et } \psi_2) \quad (3.1)$$

L'exemple d'un tel ajustement est montré sur la figure 3.3 où j'ai sélectionné la fenêtre de temps durant laquelle une seule période est appliquée. On peut voir que  $L$  suit assez bien le comportement supposé. On a ainsi accès à une mesure du déphasage  $\phi$  entre ces deux signaux avec  $\phi = \psi_2 - \psi_1$  et on mesure directement l'amplitude des déformations avec  $\Delta L$ .

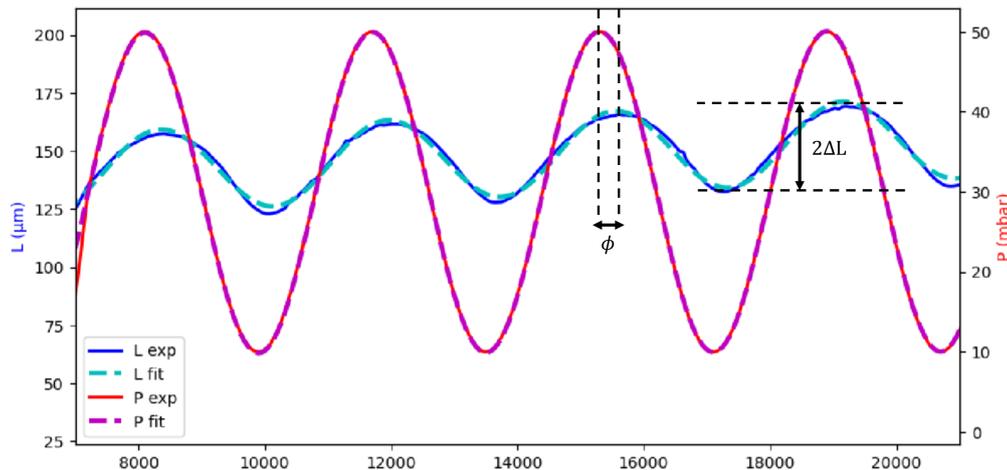


FIGURE 3.3 – Ajustement de la pression d’aspiration est de la position du bout de la langue pour la mesure du déphasage et de l’amplitude.

Les expériences que j’ai réalisées consistent d’abord à aspirer un sphéroïde avec une pression constante  $P_0$  pendant environ une heure. Le sphéroïde, ainsi déformé d’une longueur

$L_0$ , subit ensuite une série de pressions oscillantes de la forme  $P_0 + P_1 \sin(\omega t)$ , avec des périodes d'oscillation variant de quelques secondes à plusieurs heures. Chaque fréquence est ensuite analysée indépendamment pour obtenir l'amplitude et le déphasage de la réponse du tissu. Ces analyses permettent de tracer l'évolution de ces deux grandeurs en fonction de la période, produisant ainsi l'équivalent des diagrammes de Bode utilisés en électricité pour les régimes sinusoïdaux forcés.

### 3.1.2 Validation du dispositif expérimental

Nous verrons par la suite l'intégralité des résultats expérimentaux donnant ces diagrammes de Bode, mais un des premiers résultats observés a nécessité une vérification du dispositif expérimental. Nous avons observé un déphasage non négligeable aux hautes fréquences (période inférieure à la dizaine de secondes). Ceci était inattendu, car le modèle viscoélastique présenté précédemment prévoit qu'à des échelles de temps courtes, le sphéroïde se comporte comme un solide purement élastique. On devrait donc observer des déformations en phase avec la pression appliquée.

Plusieurs éléments expérimentaux n'ayant aucun lien avec les propriétés des tissus pourraient en être la cause, comme une mauvaise synchronisation temporelle de la pression avec les images de microscopie. On peut également penser à un retard d'acheminement de la pression entre la sortie du contrôleur Fluigent et l'endroit où se trouvent les sphéroïdes dans la puce. En effet, en examinant le dispositif expérimental, on a remarqué la longueur considérable de tubes reliant le contrôleur de pression à la puce microfluidique. Ces tubes, faits de matériaux assez mous comme le silicone et le PTFE, ainsi que le PDMS constituant ma puce, peuvent se déformer. Ces déformations peuvent entraîner une accumulation temporaire de pression, créant un effet de capacité, similaire aux condensateurs en électricité. Cela pourrait engendrer un retard entre la pression appliquée par le contrôleur et la pression réellement ressentie par les sphéroïdes. Ce délai causerait alors, à hautes fréquences, un déphasage artificiel, sans lien avec les propriétés des tissus.

Afin de vérifier qu'aucun élément expérimental ou bien d'analyse ne perturbe les mesures, j'ai décidé de créer des objets de la taille et de la forme de mes sphéroïdes avec un comportement de solides élastiques. Ceci nous permet d'être dans les mêmes conditions, notamment pour les résistances hydrauliques du circuit. Avec de tels objets, on doit observer à la fin de tout le processus une déformation en phase avec la pression mesurée à la sortie du contrôleur. Pour cela, j'ai choisi de fabriquer des billes en agarose 2 % (connues pour leurs comportements élastiques dans la gamme de fréquences étudiées [1]) de quelques centaines

de micromètres de diamètre.

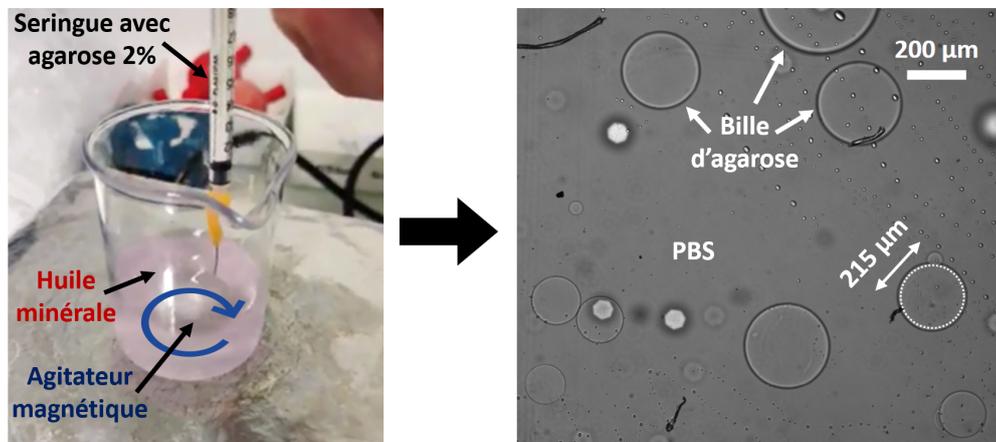


FIGURE 3.4 – Illustration du processus de création de billes en agarose à partir d'une seringue dans de l'huile en rotation. Image au microscope des billes et de leur taille.

Les billes d'agarose ont été fabriquées en m'inspirant des puces microfluidiques génératrices de gouttes dites à "jonction en T" [2]. Le principe repose sur l'utilisation de deux liquides non miscibles pour créer des gouttes de taille monodisperse. Le premier liquide s'écoule rapidement et rencontre, à une intersection en forme de T, le second qui s'écoule plus lentement. Le premier liquide étire et pince le second, entraînant le détachement et la formation de gouttes.

J'ai reproduit ce processus sans recourir à une puce microfluidique en utilisant de l'huile minérale froide que j'ai mise en rotation grâce à un agitateur magnétique. Dans cette huile, j'ai plongé une seringue remplie d'une solution d'agarose à 2 % chaude, et donc encore liquide. Ce système simule la jonction en T : au-delà d'une certaine taille, les gouttes d'agarose formées à l'embout de la seringue sont détachées par la force exercée par l'huile en rotation, puis refroidissent et se solidifient dans cette dernière.

En ajustant le débit de la solution d'agarose et la vitesse de rotation de l'agitateur ( $\sim 50 \mu\text{L/s}$  et 1000 rpm), j'ai rapidement obtenu des billes de la taille souhaitée, comme illustré dans la figure 3.4. La distribution en taille des billes est un peu moins monodisperse qu'avec une véritable puce microfluidique génératrice de gouttes, mais il aurait été très compliqué de manipuler l'agarose sans qu'il se solidifie et bouche les canaux dans une telle puce.

Ensuite, après plusieurs rinçages avec une solution d'eau et de surfactant (Pluronic F-127, 2 %), j'ai pu transférer ces billes en phase aqueuse, sans avoir de résidus d'huile. J'ai alors procédé de la même manière qu'avec les sphéroïdes pour les charger dans ma puce et leur

appliquer une aspiration oscillante. J'ai ainsi pu superposer sur un même axe temporel leur déformation et la pression mesurée en sortie du contrôleur (Figure 3.5). Cette expérience a été réalisée avec une période d'oscillation de 1 s, correspondant au maximum des capacités du Fluigent. Ce choix a été fait, car un retard dû à l'effet capacitif ou à une mauvaise synchronisation causerait un déphasage d'autant plus important que la fréquence est élevée.

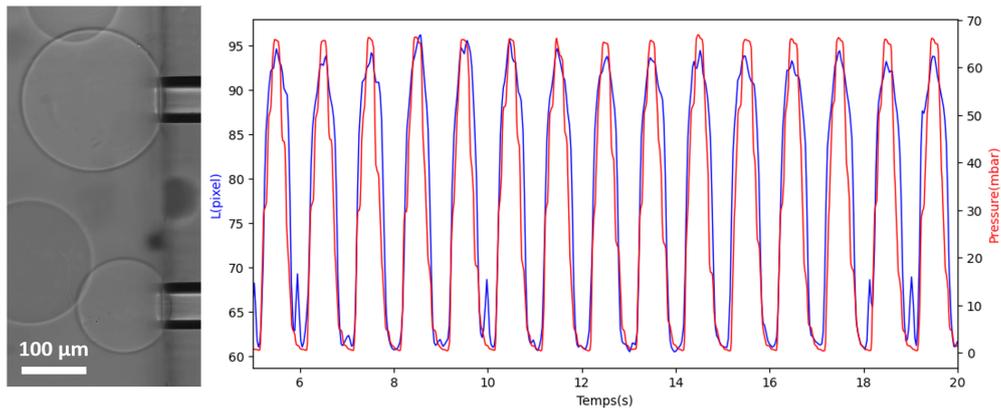


FIGURE 3.5 – Image des billes d'agarose aspirée par les micropipettes du dispositif microfluidique. Superposition des signaux de pression appliquée et de la déformation mesurée (3,077 pixels/ $\mu\text{m}$ ) pour une période d'oscillation de 1s.

On observe que ces deux signaux sont parfaitement en phase ( $\phi < 3^\circ$ ). La pression est donc transmise de la sortie du générateur aux sphéroïdes avec une durée négligeable devant la seconde et il ne semble pas y avoir de problèmes de synchronisation. De manière plus générale, cette expérience nous permet de valider la méthode expérimentale dans son ensemble et de conclure que l'on est capable de mesurer des déphasages dus uniquement aux propriétés mécaniques, pour toutes les fréquences inférieures à 1 Hz.

*Remarque : On verra par la suite que pour un objet purement élastique, mais qui présente des propriétés poreuses, l'observation d'un déphasage est possible. Or, l'agarose est un matériau poreux avec une perméabilité comparable aux sphéroïdes utilisé [3]. Cependant, nous verrons que les déformations poroélastiques sont proportionnelles à la longueur de la langue aspirée, mais ici, l'agarose 2 % est très rigide ( $\sim \text{MPa}$ ) donc la langue est quasi inexistante et les effets poroélastiques le sont également.*

## 3.2 Construction d'un modèle poroviscoélastique

Nous commencerons cette section par voir que le modèle viscoélastique utilisé jusqu'à maintenant ne permet pas de reproduire les résultats observés expérimentalement. Nous développerons ensuite le formalisme pour prédire la réponse d'un matériau poroélastique, et nous proposerons un modèle complet de l'AMP que l'on peut qualifier de poroviscoélastique. Ce modèle analytique sera enfin validé par des simulations numériques de type éléments finis réalisées avec le logiciel COMSOL.

### 3.2.1 Confrontation avec le modèle viscoélastique : un déphasage non prédit

À partir du modèle viscoélastique présenté dans la section 2.3.2 et notamment de l'équation (2.14) liant les déformations aux contraintes, nous pouvons calculer l'amplitude et le déphasage de ces déformations selon la fréquence. Pour cela, nous utilisons la méthode classique pour les régimes sinusoïdaux forcés, qui repose sur l'hypothèse que les déformations oscillent à la même fréquence que les contraintes. Cela se traduit en notation complexe par  $\tilde{\sigma} = \sigma_0 e^{j\omega t}$  et  $\tilde{\epsilon} = \tilde{\epsilon}_0 e^{j\omega t}$ . En injectant cela dans (2.14) on trouve une expression de  $\tilde{\epsilon}_0$  en fonction des paramètres viscoélastiques du modèle et de la fréquence imposée :

$$\begin{aligned} -\omega^2 \tilde{\epsilon}_0 + \frac{k_2}{\mu_c} j\omega \tilde{\epsilon}_0 &= \frac{-\omega^2}{k_i} \sigma_0 + \left[ \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} + \frac{k_2}{k_i \mu_c} \right] j\omega \sigma_0 + \frac{k_2}{\mu_t \mu_c} \sigma_0 \\ \Rightarrow \frac{\tilde{\epsilon}_0}{\sigma_0} &= \frac{\frac{1}{\tau_c \mu_t} + j\omega \left( \frac{1}{\mu_t} + \frac{1}{\mu_c} + \frac{1}{\tau_c k_i} \right) - \frac{\omega^2}{k_i}}{\frac{j\omega}{\tau_c} - \omega^2} \end{aligned}$$

On peut ensuite remplacer les paramètres du modèle par les grandeurs physiques de notre tissu avec les équations (2.17). En réarrangeant cette équation, on obtient :

$$\Rightarrow \tilde{\epsilon}_0 = P_1 \left[ \frac{1}{E_i} + \frac{1}{3\pi\eta j\omega} + \frac{E_i - E_f}{E_i E_f (1 + j\omega\tau_c)} \right] \quad (3.2)$$

On peut alors facilement remonter aux expressions de l'amplitude avec  $\Delta L = R_p |\tilde{\epsilon}_0|$  et du déphasage avec  $\phi = \arg(\tilde{\epsilon}_0)$ . Malheureusement, les formules analytiques de ces deux grandeurs ne sont pas simplifiables dans une forme exploitable à la main, nous sommes donc

obligés de les calculer numériquement. Cependant, on peut vérifier les cas limites des hautes et basses fréquences :

$$\left\{ \begin{array}{l} \tilde{\epsilon}_0 \xrightarrow{\omega \rightarrow \infty} \frac{P_1}{E_i} \quad \text{et} \quad \Delta L = R_p \frac{P_1}{E_i} \quad \text{et} \quad \psi = 0 \\ \tilde{\epsilon}_0 \xrightarrow{\omega \rightarrow 0} \frac{P_1}{3\pi\eta j\omega} \quad \text{et} \quad \Delta L \rightarrow +\infty \quad \text{et} \quad \psi = -\frac{\pi}{2} \end{array} \right.$$

On reconnaît le comportement d'un solide purement élastique aux fréquences élevées et le comportement d'un fluide visqueux aux basses fréquences.

En exploitant l'échelon de 1h qui précède les oscillations, on peut mesurer de la même manière que dans le chapitre 2, les quatre paramètres  $E_i$ ,  $E_f$ ,  $\tau_c$  et  $\eta$ . On peut alors superposer le diagramme de Bode théorique venant du modèle viscoélastique, avec les mesures expérimentales de déphasage et d'amplitude. On peut voir une telle superposition sur la figure 3.6.

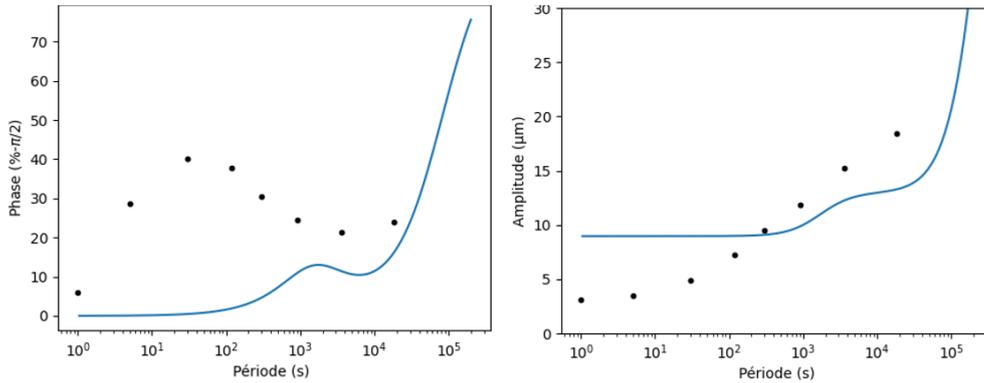


FIGURE 3.6 – Déphasage et amplitude des déformations du sphéroïde selon la période des oscillations. Le déphasage étant compris entre 0 pour le solide élastique et  $-\pi/2$  pour le fluide visqueux, les graphiques de déphasage seront gradués en pourcentage de  $-\pi/2$ . Ainsi un solide élastique à un déphasage de 0 % et un fluide visqueux de 100 %.

On remarque que le modèle prédit "assez bien" le déphasage pour les longues périodes ( $> 5\text{min}$ ) mais on note la présence d'un pic aux alentours de plusieurs dizaines de secondes qui n'est pas du tout prédit par ce dernier.

J'ai observé ce pic inexplicable vers le milieu de ma deuxième année. L'explication de son origine que je propose par la suite m'aura pris quasiment tout le temps restant de ma thèse et m'aura amené à revoir en profondeur certains aspects de la mécanique des tissus.

### 3.2.2 Introduction à la poroélasticité

En discutant avec des membres de mon équipe (Jean Cacheux et Aurélien Bancaud), qui travaillent sur les propriétés mécaniques de biomatériaux tels que le collagène, une idée a émergé. Ils ont montré dans leurs travaux [4] que les propriétés poreuses des matériaux biologiques, comme les gels de collagène, influencent considérablement les déformations qu'ils subissent. Les interactions entre le fluide et le solide modifient les déformations du matériau et engendrent certaines dynamiques qui pourraient expliquer le pic. La théorie qui est utilisée pour décrire de tels phénomènes est appelée poroélasticité.

La poroélasticité est une branche de la mécanique des milieux continus qui étudie les interactions entre les déformations mécaniques d'un matériau poreux et les mouvements du fluide contenu dans ses pores. Cette discipline trouve des applications dans plusieurs domaines comme ici en biophysique, mais le principal reste la géologie et la géomécanique notamment pour l'extraction du pétrole dans les roches. Historiquement, c'est Karl Terzaghi dans les années 1920 qui a fait naître cette théorie en s'intéressant à la consolidation des sols. Terzaghi a proposé que les sols peuvent être modélisés comme des matériaux poreux où les vides sont remplis d'eau, et il a formulé des théories pour prédire le tassement des sols sous l'effet d'une charge. C'est ensuite Maurice Anthony Biot qui a généralisé cette théorie dans les années 40 pour inclure des effets tridimensionnels et des charges variables dans le temps, établissant ainsi les bases de la théorie moderne de la poroélasticité [5] [6].

Le comportement mécanique d'un matériau poreux, saturé par un fluide, diffère d'un matériau classique qui aurait les mêmes propriétés. Un exemple très parlant est montré sur la figure 3.7. On y voit une éponge sur laquelle on appuie d'abord avec un piston imperméable, puis sur laquelle on applique la même contrainte, mais cette fois via un fluide qui la traverse. En visualisant les déformations, on voit que l'on passe d'un profil linéaire classique en élasticité à un profil quadratique venant de la poroélasticité.

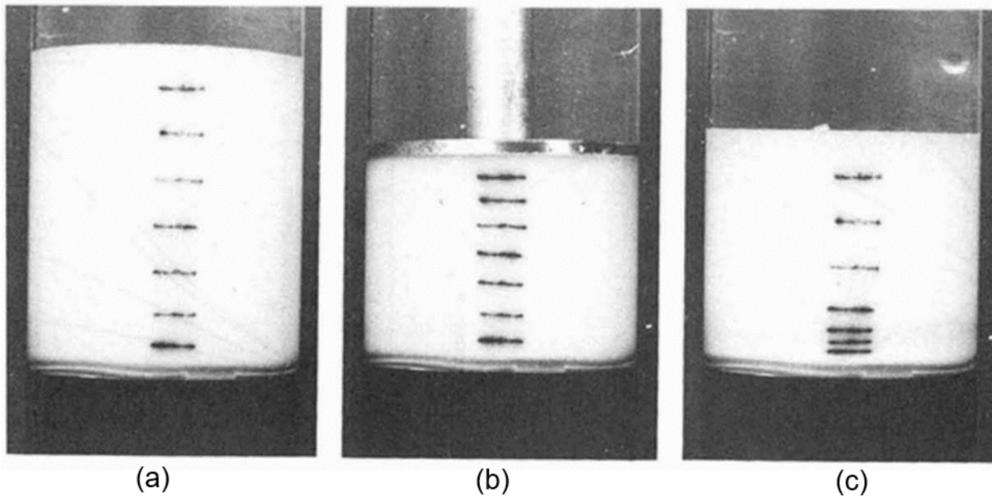


FIGURE 3.7 – Distribution de la déformation dans une matrice poreuse déformable dans différentes conditions [7] : (a) sans charge, sans écoulement, montrant la mousse dans son état détendu ; (b) compression mécanique sans écoulement, montrant une distribution uniforme de la déformation ; (c) distribution non uniforme de la déformation résultant de l'écoulement.

Les concepts fondamentaux de la poroélasticité reposent sur les idées suivantes :

Le matériau poreux est composé d'une matrice solide (le squelette) formant des pores remplis de fluide. La déformation du squelette est décrite par des équations de la mécanique des milieux continus. L'écoulement du fluide dans les pores obéit à la loi de Darcy, qui relie la vitesse du fluide à son gradient de pression et à la perméabilité du matériau. La poroélasticité résulte de l'interaction entre ce solide et ce fluide, en intégrant aux contraintes dans le squelette une composante due au gradient de pression présent dans le fluide.

### 3.2.3 Modélisation de l'AMP par 2 sous-systèmes

Si l'on considère un sphéroïde comme un matériau poreux saturé en eau, lors d'une aspiration par micropipette, ce dernier subit différents types de déformations selon la position observée. Un schéma illustrant ces déformations est proposé dans la figure 3.8. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les déformations viscoélastiques se produisent principalement à l'entrée de la pipette. Le matériau est à cet endroit, en contact direct avec le bord de la micropipette et subit une contrainte mécanique intense. Les déformations sont alors essentiellement dues aux forces appliquées par la pipette, provoquant une compression et un cisaillement du matériau sans interaction significative avec le fluide interstitiel.

En revanche, sur un tel système, les déformations poroélastiques se manifestent sur tout le long de la langue déjà aspirée ( $L_0$ ), en raison de l'établissement d'un gradient de pression

à l'intérieur de celle-ci. En effet, à l'équilibre par exemple, il s'établit un gradient de pression uniforme ( $\approx \Delta P/L_0$ ) et ce dernier induit des déformations dans le squelette solide en interaction avec le fluide. Ainsi, les déformations poroélastiques ne sont pas confinées à l'entrée de la pipette, où elles jouent un rôle négligeable, mais s'étendent sur toute la longueur de la langue aspirée. Même si ces déformations sont localement faibles, leur intégration sur une importante longueur de langue ne l'est pas forcément.

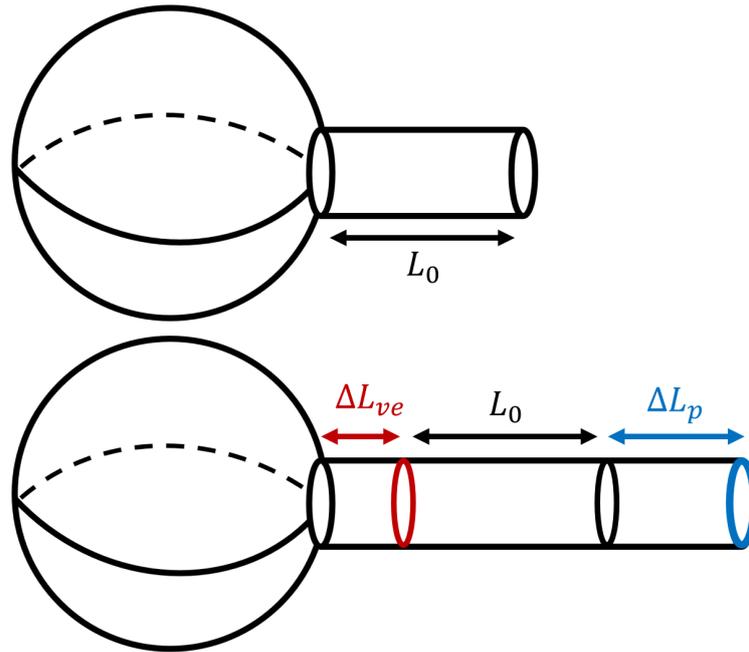


FIGURE 3.8 – Schéma illustrant les différents types de déformations subies par un sphéroïde aspiré par une micropipette. La partie avant du sphéroïde en contact avec le bord de la pipette subit des déformations viscoélastiques ( $\Delta L_{ve}$ ), tandis que le reste de la langue aspirée subit des déformations poroélastiques ( $\Delta L_p$ ) en raison du gradient de pression.

On peut alors modéliser le système entier comme une combinaison de deux sous-systèmes en série : un système viscoélastique situé à l'entrée de la pipette, participant à l'élongation à hauteur de  $\Delta L_{ve}$  et un système poroélastique qui participe à hauteur de  $\Delta L_p$ . Ainsi, le déplacement total du bout de la langue  $\Delta L$  résulte de la somme :  $\Delta L_{ve} + \Delta L_p$ .

Dans le chapitre 2, section 2.4, nous avons présenté une amélioration de la formule décrivant la déformation élastique (correspondant à  $\Delta L_{ve}$  aux temps très courts, que l'on note  $\Delta L_e$ ), en tenant compte de la géométrie sphérique du matériau aspiré et de sa compressibilité. Ces résultats ont été obtenus après l'étude présentée ici. C'est pourquoi, dans cette partie, nous utilisons toujours la formule proposée par Aoki *et al.* [8], selon laquelle la déformation élastique est donnée par  $\Delta L_e = \Delta P R_p / E$ .

### 3.2.4 Construction d'un modèle poroélastique 1D de l'AMP

#### Rappel sur l'élasticité linéaire, homogène et isotrope

Avant de voir le modèle poroélastique permettant de décrire le second système évoqué juste avant, il est nécessaire de faire quelques rappels sur l'élasticité. Notamment afin de présenter les notations et conventions utilisées.

La théorie classique de l'élasticité utilise des équations qui font appel à deux constantes afin de caractériser entièrement un matériau. Le couple le plus connu est sûrement celui composé du module de Young,  $E$ , et du coefficient de poisson,  $\nu$ . Cependant, selon la manière dont est sollicité un matériau, il est possible d'utiliser d'autres constantes fondamentales afin de simplifier les relations entre les contraintes et les déformations. Parmi toutes ces constantes, on peut citer le module d'élasticité isostatique,  $K$ , le module de cisaillement,  $G$ , le coefficient de Lamé,  $\lambda$  ou le module d'onde de compression,  $M$ . Toutes ces constantes peuvent s'exprimer en fonction des autres comme le montre le tableau 3.1 ci-dessous.

	$(\lambda, G)$	$(M, G)$	$(E, \nu)$	$(K, G)$	$(G, \nu)$
$K$ [Pa]	$\lambda + \frac{2G}{3}$	$M - \frac{4G}{3}$	$\frac{E}{3(1-2\nu)}$		$\frac{2G(1+\nu)}{3(1-2\nu)}$
$E$ [Pa]	$\frac{G(3\lambda+2G)}{\lambda+G}$	$\frac{G(3M-4G)}{M-G}$		$\frac{9KG}{3K+G}$	$2G(1+\nu)$
$\lambda$ [Pa]		$M - 2G$	$\frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}$	$K - \frac{2G}{3}$	$\frac{2G\nu}{1-2\nu}$
$G$ [Pa]			$\frac{E}{2(1+\nu)}$		
$\nu$ [1]	$\frac{\lambda}{2(\lambda+G)}$	$\frac{M-2G}{2M-2G}$		$\frac{3K-2G}{2(3K+G)}$	
$M$ [Pa]	$\lambda + 2G$		$\frac{E(1-\nu)}{(1+\nu)(1-2\nu)}$	$K + \frac{4G}{3}$	$\frac{2G(1-\nu)}{1-2\nu}$

TABLE 3.1 – Liens entre les différentes constantes d'élasticité

Afin de décrire les déformations du matériau solide, on définit le tenseur des déformations  $\epsilon$  de la manière suivante :

$$\epsilon_{ij} = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \quad (3.3)$$

où  $u_i$  est la  $i$ ème composante du champ de déplacement,  $\vec{u}$ , dans le solide.

Dans le cas simple d'un matériau élastique, linéaire, homogène et isotrope, ce tenseur des déformations est directement lié au tenseur des contraintes,  $\boldsymbol{\sigma}$ , par la loi constitutive du matériau<sup>1</sup> (loi de Hooke en 3D) :

$$\epsilon_{ij} = \frac{1 + \nu}{E} \sigma_{ij} - \frac{3\nu}{E} \bar{\sigma} \delta_{ij} \quad \text{avec} \quad \delta_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{si } i = j \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.4)$$

où  $\bar{\sigma} = tr(\boldsymbol{\sigma})/3$  est la contrainte moyenne qui est un invariant (indépendante de la base utilisée). On utilise ici la convention usuelle où les contraintes en compression sont négatives et positives en extension. Ainsi, la contrainte moyenne que subirait un matériau soumis à une pression hydrostatique  $P$  est  $\bar{\sigma} = -P$ .

On peut inverser cette relation afin d'obtenir le tenseur des contraintes en fonction de celui des déformations :

$$\sigma_{ij} = \left( K - \frac{2}{3}G \right) \bar{\epsilon} \delta_{ij} + 2G\epsilon_{ij} \quad (3.5)$$

où  $\bar{\epsilon} = tr(\boldsymbol{\epsilon}) = \vec{\nabla} \cdot \vec{u}$  est le taux de déformation qui lui aussi est un invariant. Cette grandeur traduit les changements de volume qui ont lieu au sein du matériau.  $\bar{\epsilon} = 0$  indique que le matériau n'a pas changé de volume localement et  $\bar{\epsilon} < 0$  (respectivement  $\bar{\epsilon} > 0$ ) indique qu'il a été comprimé (respectivement dilaté). En sommant les 3 équations où  $i = j$  on obtient d'ailleurs la relation :

$$\bar{\epsilon} = \frac{\bar{\sigma}}{K} \quad (3.6)$$

qui lie les changements de volume du matériau à la contrainte moyenne qu'il subit. On remarque que le module d'élasticité isostatique,  $K$ , est directement lié à la compressibilité isotherme,  $\chi_T$  définie en thermodynamique par :  $\frac{1}{K} = \chi_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T$ .

En l'absence de forces volumiques extérieures comme la gravité, l'équilibre mécanique est donné par les 3 relations (équilibre des forces suivant  $i = x, y$ , et  $z$ ) :

---

1. Dans le cas d'un matériau viscoélastique, cette loi est modifiée pour prendre en compte les effets visqueux. Il existe plusieurs études permettant d'obtenir une loi constitutive de ce type à partir de diagrammes rhéologiques, comme nous l'avons discuté dans la section 1.2.2.

$$\sum_j \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} = 0 \quad (3.7)$$

On obtient en injectant l'équation (3.5) dans (3.7) :

$$G\Delta u_i + (G + \lambda) \frac{\partial \bar{\epsilon}}{\partial x_i} = 0 \quad (3.8)$$

Ainsi, en connaissant les conditions aux limites et les propriétés élastiques d'un matériau, on peut résoudre ce système d'équations différentielles et déterminer exactement les déformations que subit notre solide.

### Le principe des contraintes effectives

Toute la théorie de Biot repose dans le principe de la contrainte effective,  $\sigma'$ . Elle représente la partie de la contrainte totale qui est réellement supportée par le squelette solide du matériau poreux. Dans le cas d'une charge qui appuierait sur un matériau poreux, la pression du fluide interstitiel aurait pour effet de diminuer la contrainte portée par le squelette solide seul. En considérant toujours que les contraintes sont positives lorsqu'elles sont en traction et que la pression est positive lorsqu'elle est en compression, cela se traduit par :

$$\sigma_{ij} = \sigma'_{ij} - \alpha p \delta_{ij} \quad (3.9)$$

où  $\alpha$  est le coefficient de Biot. Ce coefficient est quasiment toujours égal à un dans le cas des biomatériaux [9]<sup>2</sup>.

On considérera donc par la suite que  $\alpha = 1$  et donc que :

$$\sigma_{ij} = \sigma'_{ij} - p \delta_{ij} \quad (3.10)$$

Puisque le squelette solide ressent la contrainte amoindrie  $\sigma'$ , les déformations qu'il subit

---

2. Ceci est dû au fait que dans les biomatériaux, le squelette solide est beaucoup plus compressible que le fluide interstitiel. Cela signifie que la pression du fluide contribue pleinement à la déformation globale du matériau poreux.

obéissent à la loi :

$$\epsilon_{ij} = \frac{1 + \nu}{E} \sigma'_{ij} - \frac{3\nu}{E} \bar{\sigma} \delta_{ij} \quad (3.11)$$

Que l'on peut inverser de la même manière en :

$$\sigma'_{ij} = \left( K - \frac{2}{3}G \right) \bar{\epsilon} \delta_{ij} + 2G\epsilon_{ij} \quad (3.12)$$

On peut alors utiliser (3.9) :

$$\sigma_{ij} = \left( K - \frac{2}{3}G \right) \bar{\epsilon} \delta_{ij} + 2G\epsilon_{ij} - p\delta_{ij} \quad (3.13)$$

Et enfin utiliser la condition d'équilibre mécanique qui reste la même que (3.7) et obtenir l'équivalent de (3.8) pour la poroélasticité :

$$G\Delta u_i + (G + \lambda) \frac{\partial \bar{\epsilon}}{\partial x_i} = \frac{\partial p}{\partial x_i} \quad (3.14)$$

Je remarque qu'une autre vision par rapport à celle de la contrainte effective est peut-être possible et mène aux mêmes résultats. En effet, si l'on considère que le squelette est soumis aux mêmes équations qu'en élasticité simple, mais que le fluide exerce une action en rajoutant une force volumique extérieure dans l'équation de l'équilibre mécanique (3.7). Cela a pour conséquence de transformer cette équation en :

$$\sum_j \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} \quad (3.15)$$

Et cela mènerait exactement au même système d'équations différentielles que (3.14). Cependant, je n'ai jamais lu dans la littérature cette manière de voir les choses et il se peut que, dans certains cas, cette façon de conceptualiser le rôle du fluide dans le matériau mène à des résultats erronés.

#### **Application à l'AMP : réduction à une dimension**

Dans le découpage en 2 sous-systèmes proposé dans la section 3.2.3, on peut modéliser le second élément comme un tube poreux mesurant la longueur de la langue aspirée,  $L_0$ . Il est fixé à l'entrée de la pipette, car retenu par le reste du sphéroïde, et contraint par les

parois de celle-ci sur toute sa longueur. On peut ainsi réduire le problème à une dimension. Cependant, il faut être vigilant et prendre en compte le fait que les contraintes latérales sont non nulles afin d'obtenir la loi à 1D avec la bonne constante d'élasticité.

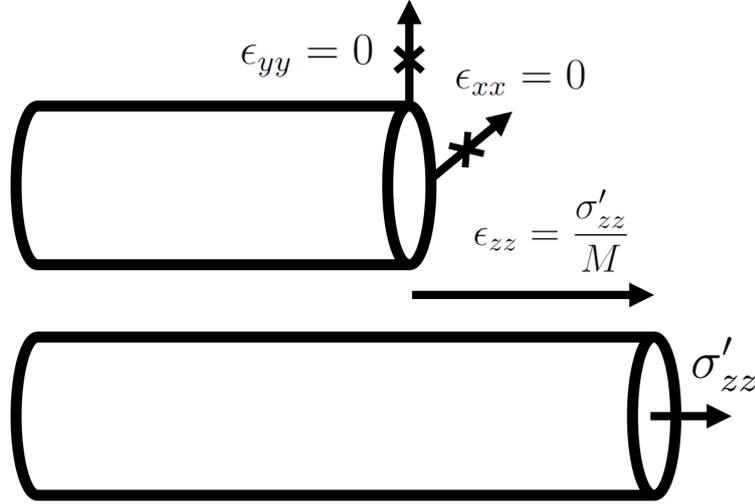


FIGURE 3.9 – Schéma de la langue aspirée. Elle est contrainte latéralement par les parois de la micropipette. Le système est réduit à une dimension, considérant que les déformations se produisent uniquement dans la direction de l'aspiration ( $z$ ).

Dans ce cas, la langue aspirée est confinée latéralement par les parois de la micropipette, ce qui empêche toute déformation dans les directions  $x$  et  $y$ . Cela signifie que les déformations horizontales  $\epsilon_{xx}$  et  $\epsilon_{yy}$  sont nulles, et toute déformation se produit uniquement dans la direction de l'aspiration,  $z$ . En utilisant ceci dans (3.11) on obtient :

$$\begin{cases} 0 = \frac{1+\nu}{E}\sigma'_{xx} - \frac{\nu}{E}(\sigma'_{xx} + \sigma'_{yy} + \sigma'_{zz}) \\ 0 = \frac{1+\nu}{E}\sigma'_{yy} - \frac{\nu}{E}(\sigma'_{xx} + \sigma'_{yy} + \sigma'_{zz}) \end{cases} \Rightarrow \sigma'_{xx} + \sigma'_{yy} = \frac{2\nu}{1-\nu}\sigma'_{zz} \quad (3.16)$$

En utilisant cette relation dans (3.11) pour  $i = j = z$ , on trouve :

$$\epsilon_{zz} = \frac{(1+\nu)(1-2\nu)}{E(1-\nu)}\sigma'_{zz} \quad \text{ou} \quad \sigma'_{zz} = M\epsilon_{zz} \quad (3.17)$$

où  $M$  est appelé, module d'onde de compression. C'est la constante élastique, qui intervient dans l'équation permettant de modéliser correctement, à une dimension, la relation entre les contraintes appliquées et les déformations observées dans un contexte de confinement latéral.

On peut ainsi réduire l'étude à un problème à 1D avec  $\vec{u} = u(z)\vec{e}_z$ . De la même manière que dans le cas général vu précédemment, on peut utiliser le principe des contraintes effectives

(3.10) afin d'obtenir :

$$\sigma_{zz} = M \frac{\partial u}{\partial z} - p \quad (3.18)$$

Enfin, on peut utiliser la condition de l'équilibre mécanique (3.7) et on obtient :

$$M \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = \frac{\partial p}{\partial z} \quad (3.19)$$

C'est l'équation constitutive de notre langue poroélastique.

### Solution dans le cas stationnaire

On peut alors d'ores et déjà résoudre le cas stationnaire où la pression a eu le temps de diffuser dans la langue et où on a donc un gradient uniforme de cette dernière. On modélise notre système comme montré sur la figure 3.10 :

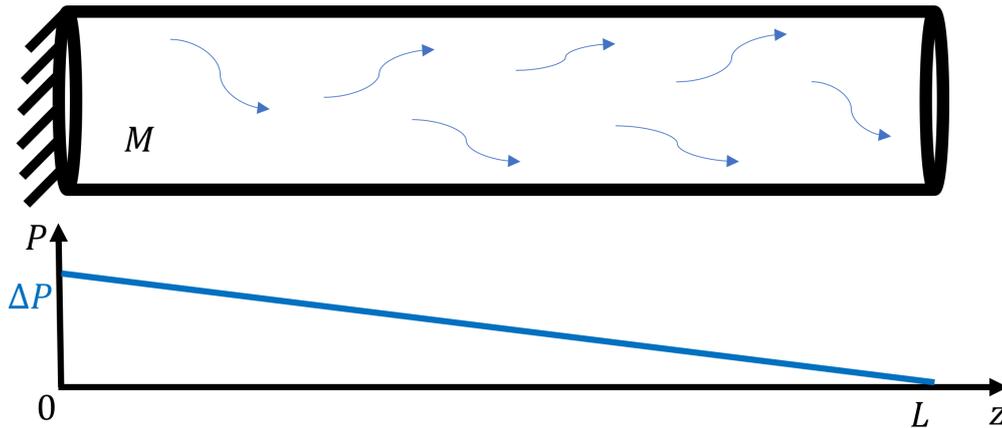


FIGURE 3.10 – Schéma du sous-système poroélastique 1D à l'équilibre. On considère le matériau clampé en  $z = 0$ . À l'équilibre, la pression appliquée  $\Delta P$  induit un gradient de pression uniforme le long de la langue.

Dans ces conditions, l'équation (3.19) est simplifiée et sa solution est un polynôme du second degré :

$$M \frac{d^2 u}{dz^2} = -\frac{\Delta P}{L_0} \quad \Rightarrow \quad u(z) = -\frac{\Delta P}{2ML_0} z^2 + Az + B \quad (3.20)$$

où  $A$  et  $B$  sont deux constantes d'intégration que l'on détermine grâce aux conditions aux limites  $u(0) = 0$  et  $\frac{du}{dz}(L_0) = 0$ . On peut ainsi exprimer les déformations poroélastiques qui ont lieu le long de la langue et on remarque que le profil de ces déformations est bien qua-

dratique et non linéaire comme le montre l'expérience de l'éponge présentée dans la figure 3.7. On peut également exprimer  $\Delta L_p$ , l'avancée du bout de la langue dû à la poroélasticité car  $\Delta L_p = u(L_0)$  :

$$u(z) = \frac{\Delta P}{M} \left( z - \frac{z^2}{2L_0} \right) \Rightarrow \boxed{\Delta L_p = \frac{\Delta P L_0}{2M} = \frac{\Delta P L_0}{2E} \cdot \frac{(1 + \nu)(1 - 2\nu)}{1 - \nu}} \quad (3.21)$$

On voit sur la figure 3.11 ci-dessous que  $\Delta L_p$  est très dépendant du coefficient de Poisson. Si ce dernier vaut  $1/2$ ,  $\Delta L_p = 0$  mais dès lors qu'il s'écarte un peu de cette valeur (ce qui n'est pas très documenté dans la littérature, mais qui est probablement le cas [10] [11]), les effets poroélastiques peuvent avoir des amplitudes non négligeables devant les déformations élastiques. Cela est d'autant plus important que la langue est longue, alors que les déformations élastiques ne dépendent pas de celle-ci.

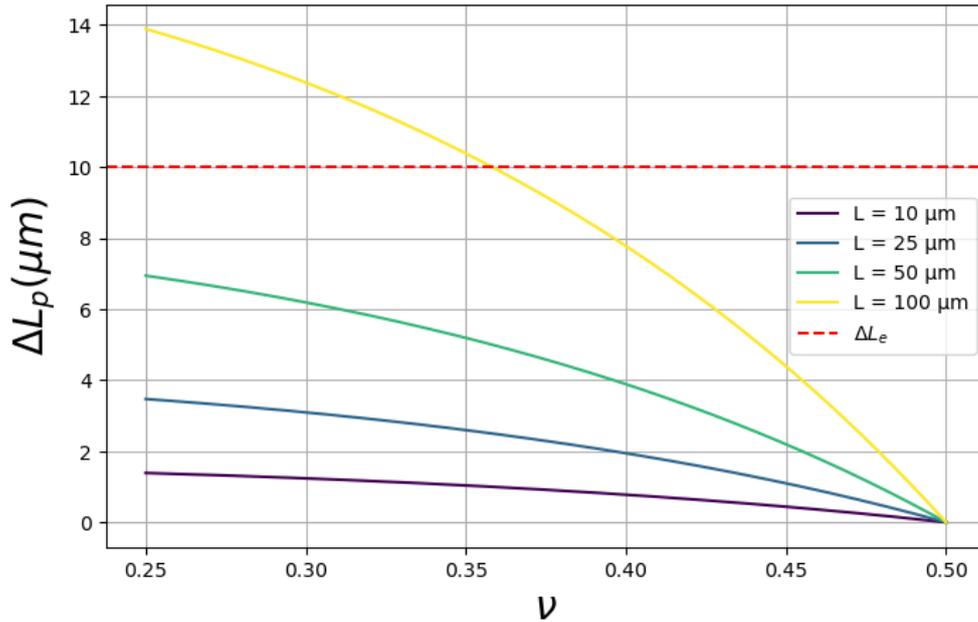


FIGURE 3.11 – Évolution de l'avancée de la langue dû à la poroélasticité en fonction du coefficient de poisson, avec  $\Delta P = 10\text{mbar}$  et  $E = 3\text{kPa}$ . À titre comparatif  $\Delta L_e = R_p \frac{\Delta P}{E}$  est tracé pour  $R_p = 30\mu\text{m}$

Si l'on ne prend pas en compte ces effets poroélastiques, les mesures de viscosité et d'élasticité réalisées par AMP risquent d'être biaisées. On peut surestimer la déformation due à la viscoélasticité, ce qui conduit à une sous-estimation des valeurs de viscosité et d'élasticité.

### Régime dynamique et solution du régime sinusoïdal forcé

Lorsqu'une pression d'aspiration varie rapidement dans le temps, la pression interstitielle au sein du matériau poreux n'a pas le temps nécessaire pour diffuser et établir un gradient uniforme. C'est ce phénomène que l'on suppose être à l'origine du pic de déphasage observé expérimentalement pour des périodes de quelques dizaines de secondes.

Cette étude dynamique repose sur la loi de Darcy qui permet de décrire les écoulements de fluide qui ont lieu au sein du matériau poreux et sur les lois de conservation de la masse du fluide et du solide.

La loi de Darcy locale exprime le lien entre le vecteur de flux volumique du fluide,  $\vec{q}$ , et le gradient de pression présent dans le matériau :

$$\vec{q} = -\frac{\kappa}{\mu} \vec{\nabla} p \quad \xrightarrow{\text{à 1D}} \quad q = -\frac{\kappa}{\mu} \frac{\partial p}{\partial z} \quad (3.22)$$

où  $\kappa$  est la perméabilité du matériau poreux ( $\kappa$  est une distance au carré et  $\sqrt{\kappa}$  s'interprète comme la taille typique des pores présents dans le matériau). On fait l'hypothèse ici que  $\kappa$  est constant. Certains modèles prennent en compte le fait que lorsqu'un matériau poreux se charge en eau, les pores se dilatent et  $\kappa$  augmente, mais on négligera ici ces effets. Enfin,  $\mu$ , est la viscosité dynamique du fluide qui s'écoule dans le matériau (ici, celle du milieu de culture, qui est très proche de celle de l'eau  $\approx 10^{-3} Pa.s$  [12]).

On peut relier ce vecteur de flux aux vitesses du fluide et du solide. Pour cela, on note  $n$ , la porosité du matériau saturé en fluide, c'est-à-dire que  $n \in [0, 1]$  est la proportion du volume occupé par le fluide (et donc  $(1 - n)$  est celle occupée par le squelette solide). On définit également  $\vec{v}_f$  (respectivement  $\vec{v}_s$ ), le champ de vitesse du fluide (respectivement du solide, on a donc d'ailleurs  $\vec{v}_s = \frac{\partial \vec{u}}{\partial t}$ ). La vitesse relative du fluide par rapport au squelette est donc  $\vec{v}_f - \vec{v}_s$  (et c'est bien cette vitesse qui est contrôlée par la loi de Darcy). On a alors :

$$\vec{q} = n(\vec{v}_f - \vec{v}_s) \quad (3.23)$$

On considère, comme Kenyon dans [13] et [14], que le solide qui compose le squelette du matériau est incompressible. Cela veut dire que le matériau qui forme les pores est incompressible, mais que le matériau poreux, qui ne commence à exister que lorsqu'on regarde le système d'un point de vue mésoscopique, peut lui être compressible et avoir un coefficient de Poisson différent de 1/2.

Ainsi, si l'on définit le vecteur de flux volumique total comme :  $\vec{W}_{tot} = n\vec{v}_f + (1 - n)\vec{v}_s$ , puisque les deux constituants sont incompressibles, c'est un flux conservatif et on a :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{W}_{tot} = 0 \quad (3.24)$$

On aurait également obtenu ce résultat en sommant la conservation volumique du solide qui compose le squelette,  $\vec{\nabla} \cdot [(1 - n)\vec{v}_s] = 0$  et du fluide,  $\vec{\nabla} \cdot (n\vec{v}_f) = 0$ . En combinant (3.23) avec (3.24) on obtient :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{q} + \vec{\nabla} \cdot \vec{v}_s = 0 \quad (3.25)$$

Cette équation peut aussi se comprendre physiquement avec le schéma ci-dessous :

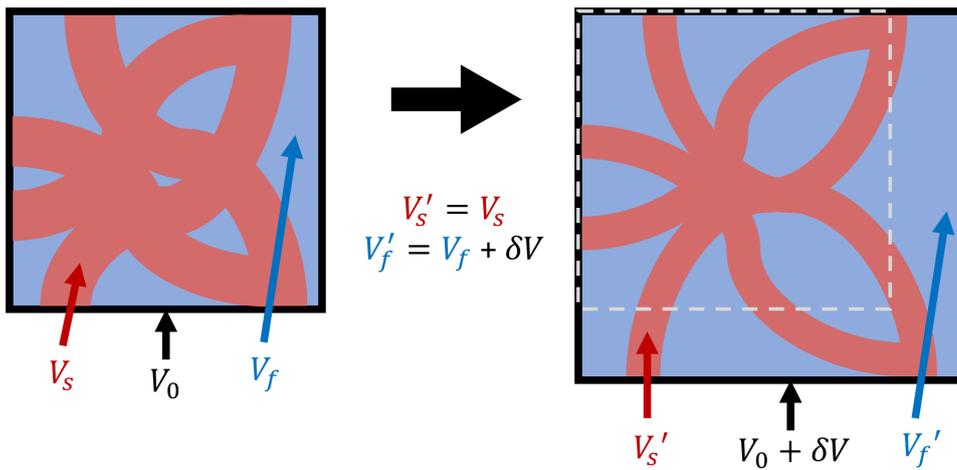


FIGURE 3.12 – Schéma de l'évolution du volume du matériau poreux. En considérant le matériau solide qui forme les pores comme incompressible, on voit que la variation de volume  $\delta V$  ( $\approx \bar{\epsilon}V_0$ ) du matériau poreux est uniquement dû à l'accumulation de fluide dans ce volume.

En intervertissant les dérivées spatiale et temporelle dans (3.25) on obtient :  $\frac{\partial \bar{\epsilon}}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{q}$ . Cette équation exprime le fait que les variations de volume du matériau poreux sont uniquement dues à l'accumulation de fluide.

En utilisant la loi de Darcy (3.22) et le fait que  $\vec{v}_s = \frac{\partial \vec{u}}{\partial t}$ , dans (3.25) on peut écrire :

$$-\frac{\kappa}{\mu} \Delta p + \vec{\nabla} \cdot \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = 0 \quad \xrightarrow{\text{à 1D}} \quad -\frac{\kappa}{\mu} \frac{\partial^2 p}{\partial z^2} + \frac{\partial}{\partial z} \left( \frac{\partial u}{\partial t} \right) = 0 \quad (3.26)$$

### 3.2. Construction d'un modèle poroviscoélastique

---

Dans notre cas, le passage à 1D nous permet d'intégrer cette équation en  $z$  et d'utiliser l'équation constitutive du matériau (3.19) pour obtenir l'équation :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = -\frac{\mu}{\kappa M} \frac{\partial u}{\partial t} + A(t) \quad (3.27)$$

où  $A(t)$  est une constante d'intégration. Afin de résoudre cette équation, il est nécessaire de passer dans l'espace de Fourier. Si, pour toute fonction, on note  $\hat{f}(\omega)$  la transformée de Fourier de  $f(t)$  on obtient :

$$\frac{\partial^2 \hat{u}}{\partial z^2} + \frac{1}{d^2} \hat{u} = \hat{A}(\omega) \quad , \quad \text{avec} \quad \boxed{d^2 = \frac{\kappa M}{j\omega\mu}} \quad (3.28)$$

La solution générale à cette équation s'écrit :

$$\hat{u}(z, \omega) = B(\omega)e^{z/d} + C(\omega)e^{-z/d} + d^2 \hat{A}(\omega) \quad (3.29)$$

On détermine les 3 constantes d'intégration,  $B$ ,  $C$  et  $\hat{A}$  grâce aux conditions aux limites suivantes :

$$u(0, t) = 0 \quad , \quad \frac{\partial u}{\partial z}(L_0, t) = 0 \quad \text{et} \quad \frac{\partial u}{\partial z}(0, t) = \frac{\Delta P(t)}{M} \quad (3.30)$$

Les deux premières sont les mêmes que dans l'étude stationnaire. La troisième condition s'obtient à partir de l'équation constitutive du matériau (3.19) et  $\Delta P(t)$  est la pression d'aspiration dynamique que l'on applique sur le sphéroïde. Ces conditions s'écrivent dans l'espace de Fourier comme :

$$\hat{u}(0, \omega) = 0 \quad , \quad \frac{\partial \hat{u}}{\partial z}(L_0, \omega) = 0 \quad \text{et} \quad \frac{\partial \hat{u}}{\partial z}(0, \omega) = \frac{\Delta \hat{P}(\omega)}{M}$$

On peut ainsi obtenir :

$$C = B e^{2L_0/d} \quad , \quad \hat{A} = -\frac{B}{d^2} (1 + e^{2L_0/d}) \quad \text{et} \quad B = \frac{d \Delta \hat{P}}{M(1 - e^{2L_0/d})}$$

Et donc :

$$\hat{u}(z, \omega) = \frac{d \Delta \hat{P}}{M} \cdot \frac{e^{z/d} + e^{(2L_0-z)/d} - e^{2L_0/d} - 1}{1 - e^{2L_0/d}} \quad (3.31)$$

Puisque l'on s'intéresse au mouvement du bout de la langue, on peut spécifier cette solution en  $z = L_0$  afin d'obtenir  $\Delta L_p(t) = u(L_0, t)$  :

$$\Delta \hat{L}_p(\omega) = \frac{d\hat{\Delta P}}{M} \cdot \frac{2e^{L_0/d} - e^{2L_0/d} - 1}{1 - e^{2L_0/d}} = \frac{d\hat{\Delta P}}{M} \cdot \tanh\left(\frac{L_0}{2d}\right) \quad (3.32)$$

Expérimentalement, j'applique une pression d'aspiration qui a pour forme  $\Delta P(t) = P_0 + P_1 \sin(\omega_0 t)$ . Il ne reste plus qu'à prendre la transformée de Fourier de cette pression, l'injecter dans (3.32) et réaliser la transformée de Fourier inverse afin d'obtenir la solution temporelle du mouvement du bout de la langue dû à la poroélasticité. Au vu de la linéarité du modèle et du fait qu'on est en régime sinusoïdal forcé, on se doute que la solution va être de la forme  $\Delta L_p(t) = \Delta L_{p0} + \Delta L_{p1} \sin(\omega_0 t + \phi_p)$ . Je détaille ci-dessous tout ce calcul (pas si trivial) permettant d'exprimer  $\Delta L_{p0}$ ,  $\Delta L_{p1}$  et  $\phi_p$  en fonction des propriétés du sphéroïde, mais cette partie peut être sautée à la lecture en allant directement à la solution (3.33).

---

La transformée de Fourier d'une telle pression d'aspiration s'écrit :

$$\Delta \hat{P} = 2\pi \left[ P_0 \delta(\omega) + \frac{P_1}{2j} \left( \delta(\omega - \omega_0) - \delta(\omega + \omega_0) \right) \right]$$

On a donc :

$$\Delta \hat{L}_p = \frac{2\pi L_0}{M} \left[ P_0 \delta(\omega) + \frac{P_1}{2j} \left( \delta(\omega - \omega_0) - \delta(\omega + \omega_0) \right) \right] F(\omega)$$

$$\text{avec } \boxed{F(\omega) = \frac{d}{L_0} \cdot \tanh\left(\frac{L_0}{2d}\right)}$$

$$\Rightarrow \Delta \hat{L}_p = \frac{2\pi L_0}{M} \left[ P_0 F(0) \delta(\omega) + \frac{P_1}{2j} \left( F(\omega_0) \delta(\omega - \omega_0) - F(-\omega_0) \delta(\omega + \omega_0) \right) \right]$$

On peut calculer  $F(0)$  en remarquant que :

$$d(\omega) = \sqrt{\frac{KM}{j\omega L_0}} = \sqrt{\frac{KM}{2\omega L_0}}(1-j) \quad \text{donc} \quad \begin{cases} d(0) \rightarrow \infty \\ \text{et } 1/d(0) = 0 \end{cases}$$

On a alors :

$$F(0) = \lim_{Z \rightarrow 0} \left( \frac{1}{Z} \cdot \tanh\left(\frac{Z}{2}\right) \right) = \frac{1}{2}$$

Ainsi :

$$\Rightarrow \Delta \hat{L}_p = \frac{\pi L_0}{M} \left[ P_0 \delta(\omega) - j P_1 \left( F(\omega_0) \delta(\omega - \omega_0) - F(-\omega_0) \delta(\omega + \omega_0) \right) \right]$$

On applique la transformée de Fourier inverse afin de repasser dans le domaine temporel :

$$\Delta L_p(t) = \frac{L_0}{2M} \int_{-\infty}^{\infty} \left[ P_0 \delta(\omega) - j P_1 \left( F(\omega_0) \delta(\omega - \omega_0) - F(-\omega_0) \delta(\omega + \omega_0) \right) \right] e^{j\omega t} d\omega$$

On peut remarquer que  $F(-\omega_0) = F^*(\omega_0)$ , où  $Z^*$  est le nombre complexe conjugué de  $Z$  ce qui donne :

$$\Rightarrow \Delta L_p(t) = \frac{L_0}{M} \left[ \frac{P_0}{2} + P_1 \frac{F(\omega_0) e^{j\omega_0 t} - F^*(\omega_0) e^{-j\omega_0 t}}{2j} \right]$$

Puisque  $\Im(Z) = \frac{Z-Z^*}{2j}$  :

$$\Rightarrow \Delta L_p(t) = \frac{L_0}{M} \left[ \frac{P_0}{2} + P_1 \Im \left( F(\omega_0) e^{j\omega_0 t} \right) \right]$$

En notant  $F(\omega_0) = \alpha e^{j\phi_p}$  on a :

$$\boxed{\Delta L_p(t) = \frac{L_0}{M} \left[ \frac{P_0}{2} + P_1 \alpha \cdot \sin(\omega_0 t + \phi_p) \right]}$$

Il ne reste plus qu'à exprimer  $\alpha$  et  $\phi_p$  en fonction des paramètres du modèle :

$$F(\omega_0) = \frac{1}{L_0} \sqrt{\frac{\kappa M}{\omega_0 \mu}} \cdot \frac{1-j}{\sqrt{2}} \cdot \tanh \left( \frac{L_0}{2} \sqrt{\frac{\omega_0 \mu}{\kappa M}} \cdot \frac{1+j}{\sqrt{2}} \right)$$

En utilisant le fait que :

$$\tanh(a + jb) = \frac{\tanh(a) + j \tan(b)}{1 + j \tanh(a) \tan(b)}$$

Et en posant <sup>3</sup> :

$$\lambda = L_0 \sqrt{\frac{\omega_0 \mu}{2 \kappa M}}$$

On obtient :

$$\Rightarrow F(\omega_0) = \frac{1-j}{2\lambda} \cdot \frac{\tanh(\lambda/2) + j \tan(\lambda/2)}{1 + j \tanh(\lambda/2) \tan(\lambda/2)}$$

Et donc :

$$\alpha = \frac{1}{2\lambda} \cdot \sqrt{\frac{\tanh^2(\lambda/2) + \tan^2(\lambda/2)}{1 + \tanh^2(\lambda/2) \tan^2(\lambda/2)}}$$

Que l'on peut simplifier en :

$$\alpha = \frac{1}{2\lambda} \cdot \sqrt{\frac{\cosh(\lambda) - \cos(\lambda)}{\cosh(\lambda) + \cos(\lambda)}}$$

Et :

$$\phi_p = -\frac{\pi}{4} + \arctan \left( \frac{\tan(\lambda/2)}{\tanh(\lambda/2)} \right) - \arctan \left( \tan(\lambda/2) \cdot \tanh(\lambda/2) \right)$$

Qui se simplifie en :

$$\phi_p = -\frac{\pi}{4} + \arctan \left( \frac{\sin(\lambda)}{\sinh(\lambda)} \right)$$

---

3. Attention : la constante  $\lambda$  mentionnée ici et par la suite ne correspond pas au coefficient de Lamé.

En modélisant le système, comme je viens de le faire, on trouve que la déformation poroélastique du sphéroïde,  $\Delta L_p(t)$ , soumis à une pression d'aspiration  $\Delta P(t) = P_0 + P_1 \sin(\omega_0 t)$ , est bien de la forme :

$$\Delta L_p(t) = \Delta L_{p0} + \Delta L_{p1} \sin(\omega_0 t + \phi_p) \quad (3.33)$$

$$\text{avec } \boxed{\Delta L_{p0} = \frac{L_0 P_0}{2M}} \quad , \quad \boxed{\Delta L_{p1} = \frac{L_0 P_1}{2M \lambda} \sqrt{\frac{\cosh(\lambda) - \cos(\lambda)}{\cosh(\lambda) + \cos(\lambda)}}}$$

$$\boxed{\phi_p = -\frac{\pi}{4} + \arctan\left(\frac{\sin(\lambda)}{\sinh(\lambda)}\right)} \quad \text{et où } \lambda = L_0 \sqrt{\frac{\omega_0 \mu}{2\kappa M}}$$

Puisque le régime stationnaire, étudié dans la section précédente, revient au même cas particulier  $P_1 = 0$ , on est rassuré de trouver que  $\Delta L_{p0}$  a bien la même formule que (3.21).

On remarque, dans la formule de  $\lambda$ , que l'on peut définir  $\tau_p = \frac{\mu L_0^2}{\kappa M}$ , un temps caractéristique poroélastique. Il représente le temps que met la pression pour diffuser le long de la langue de longueur  $L_0$  et le coefficient de diffusion associé à ce phénomène vaut  $\frac{\kappa M}{\mu}$ .

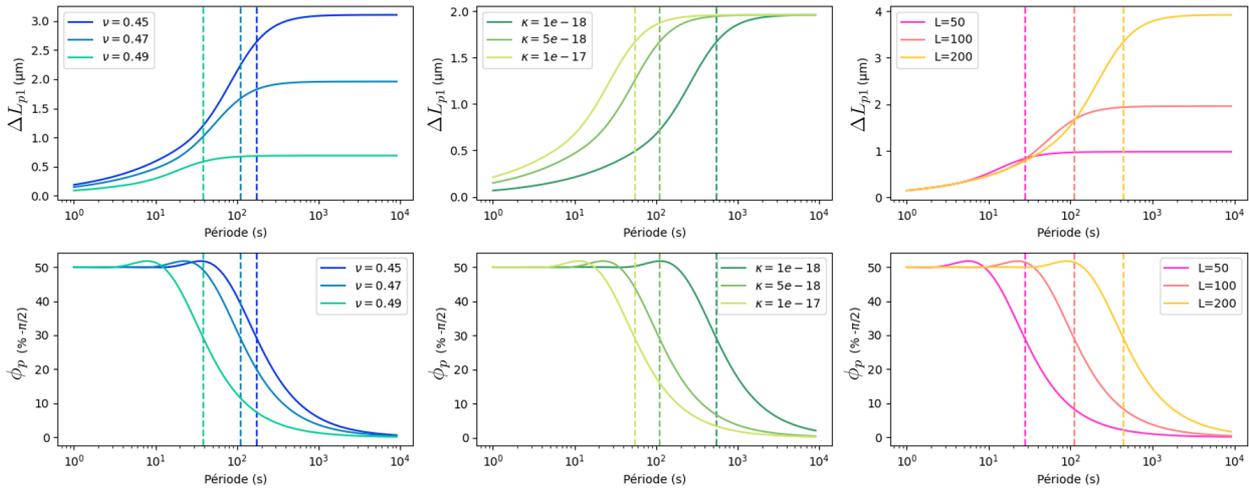


FIGURE 3.13 – Évolution des diagrammes de Bode (amplitude  $\Delta L_{p1}$  et déphasage  $\phi_p$ ) en fonction des 3 paramètres : coefficient de poisson  $\nu$ , perméabilité  $\kappa$  et longueur initiale de la langue  $L_0$ . Les lignes verticales en pointillé représentent  $\tau_p$ . Le jeu de paramètre utilisé est :  $P_1 = 10\text{mbar}$ ,  $\mu = 10^{-3}\text{Pa.s}$ ,  $E = 3\text{kPa}$  et lorsqu'ils ne varient pas  $\nu = 0.47$ ,  $\kappa = 5.10^{-18}\text{m}^2$  et  $L_0 = 100\mu\text{m}$ .

On peut voir sur la figure 3.13 l'évolution de l'amplitude  $\Delta L_{p1}$  et du déphasage  $\phi_p$  en fonction des différents paramètres. On observe que pour de longues périodes la pression a le temps de diffuser et est donc à l'équilibre à chaque instant, ce qui induit la disparition du déphasage et une amplitude maximale. On observe également une asymptote pour le déphasage aux hautes fréquences à  $-\pi/4$ . Ce résultat est assez surprenant, notamment par le fait qu'il ne dépende pas de la longueur de langue comme on aurait pu s'y attendre.

*Remarque : Ces résultats du modèle analytique ont été parfaitement reproduits par des simulations de poroélasticité avec COMSOL en prenant une géométrie simple de tube fixé à son origine.*

### 3.2.5 Modèle complet de poroviscoélasticité

Maintenant que nous avons modélisé les effets poroélastiques qui se manifestent dans la langue, on peut ajouter à ces déformations, les déformations viscoélastiques qui se produisent à l'entrée de la pipette comme nous l'avons vu dans la section 3.2.3. Pour rappel, cela consiste à voir le déplacement total du bout de la langue, comme résultant de la somme :  $\Delta L_{ve} + \Delta L_p$ .

### Modèle sans viscoélasticité

Puisque l'on s'intéresse au pic de déphasage situé aux hautes fréquences, on peut commencer par considérer que les déformations à l'entrée de la pipette sont seulement élastiques<sup>4</sup>. On a donc :

$$\Delta L_{ve} = \Delta L_e = R_p \frac{\Delta P}{E_i} \quad (3.34)$$

Lorsque l'on applique notre forçage sinusoïdal,  $\Delta P(t) = P_0 + P_1 \sin(\omega_0 t)$  on induit une déformation élastique :

$$\Delta L_e(t) = \Delta L_{e0} + \Delta L_{e1} \sin(\omega_0 t) \quad (3.35)$$

$$\text{avec } \boxed{\Delta L_{e0} = \frac{R_p P_0}{E_i}} \quad \text{et} \quad \boxed{\Delta L_{e1} = \frac{R_p P_1}{E_i}}$$

Avec ce même forçage, les déformations poroélastiques qui s'ajoutent sont celles calculées dans la partie précédente (3.33).

$$\Delta L_p(t) = \Delta L_{p0} + \Delta L_{p1} \sin(\omega_0 t + \phi_p) \quad (3.36)$$

$$\text{avec } \boxed{\Delta L_{p0} = \frac{L_0 P_0}{2M}} \quad , \quad \boxed{\Delta L_{p1} = \frac{L_0 P_1}{2M \lambda} \sqrt{\frac{\cosh(\lambda) - \cos(\lambda)}{\cosh(\lambda) + \cos(\lambda)}}$$

$$\boxed{\phi_p = -\frac{\pi}{4} + \arctan\left(\frac{\sin(\lambda)}{\sinh(\lambda)}\right)} \quad \text{et où} \quad \lambda = L_0 \sqrt{\frac{\omega_0 \mu}{2\kappa M}}$$

---

4. C'est donc ici que la formule révisé, présentée dans la section 2.4, doit intervenir.

Expérimentalement, comme on a vu dans la section 3.1.1, on isole la partie oscillante  $L_{sinu}$  des déformations de la langue. En reprenant les notations de l'équation (3.1) on note cette partie des déformations sous la forme :

$$L_{sinu}(t) = \Delta L \sin(\omega_0 t + \phi) \quad (3.37)$$

Cette partie des déformations résulte de la superposition des parties oscillantes de  $\Delta L_e$  et  $\Delta L_p$ . Puisque ces 2 parties sont des sinusoides de même fréquence, il est normal que leur somme soit également une sinusoides qui oscille à la même pulsation  $\omega_0$ . En faisant un peu de trigonométrie, on trouve la relation :

$$A \sin(\omega t + \phi_A) + B \sin(\omega t + \phi_B) = C \sin(\omega t + \phi_C) \quad (3.38)$$

$$\text{avec } C = \sqrt{A^2 + B^2 + 2AB \cos(\phi_A - \phi_B)}$$

$$\text{et } \phi_C = \arctan \left( \frac{A \sin(\phi_A) + B \sin(\phi_B)}{A \cos(\phi_A) + B \cos(\phi_B)} \right)$$

On peut donc exprimer le déphasage  $\phi$  et l'amplitude  $\Delta L$  en fonction des différents paramètres. On obtient :

$$\boxed{\Delta L = \sqrt{\Delta L_{e1}^2 + \Delta L_{p1}^2 + 2\Delta L_{e1}\Delta L_{p1} \cos(\phi_p)}} \quad (3.39)$$

$$\boxed{\phi = \arctan \left( \frac{\Delta L_{p1} \sin(\phi_p)}{\Delta L_{e1} + \Delta L_{p1} \cos(\phi_p)} \right)}$$

### 3.2. Construction d'un modèle poroviscoélastique

Il est alors possible de calculer numériquement ces deux grandeurs afin d'obtenir les diagrammes de Bode présents sur la figure 3.14.

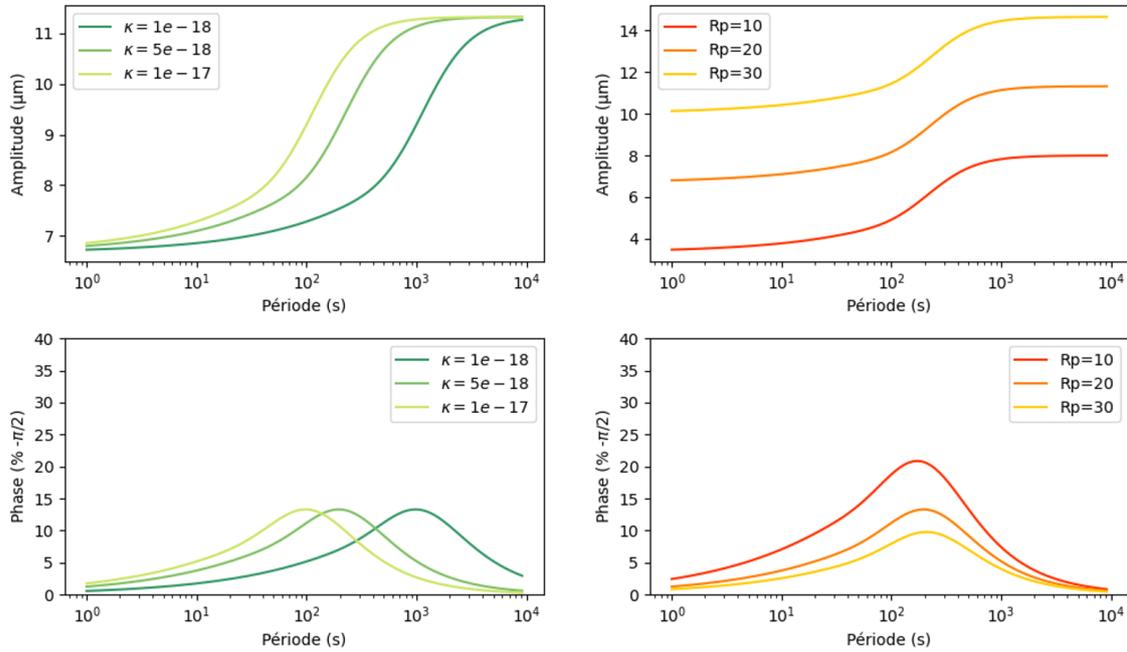


FIGURE 3.14 – Évolution des diagrammes de Bode (amplitude  $\Delta L$  et déphasage  $\phi$ ) en fonction des 2 paramètres : perméabilité  $\kappa$  et rayon de la pipette  $R_p$ . Le jeu de paramètre utilisé est :  $P_1 = 10\text{mbar}$ ,  $\mu = 10^{-3}\text{Pa.s}$ ,  $E = 3\text{kPa}$ ,  $\nu = 0.45$ ,  $L_0 = 150\mu\text{m}$  et lorsqu'ils ne varient pas  $\kappa = 5.10^{-18}\text{m}^2$  et  $R_p = 20\mu\text{m}$

On observe alors le même phénomène que celui constaté expérimentalement : la présence d'un pic dans le déphasage à des hautes fréquences. Cependant, bien que notre modèle soit analytique, il n'existe pas de formule simple pour déterminer la position et l'amplitude de ce pic. Même en utilisant des outils de calcul formel comme Mathematica, je n'ai pas réussi à obtenir une formule exploitable. En revanche, notre modèle est très simple à calculer numériquement, ce qui nous permet de déterminer facilement la fréquence du pic pour n'importe quel jeu de paramètres.

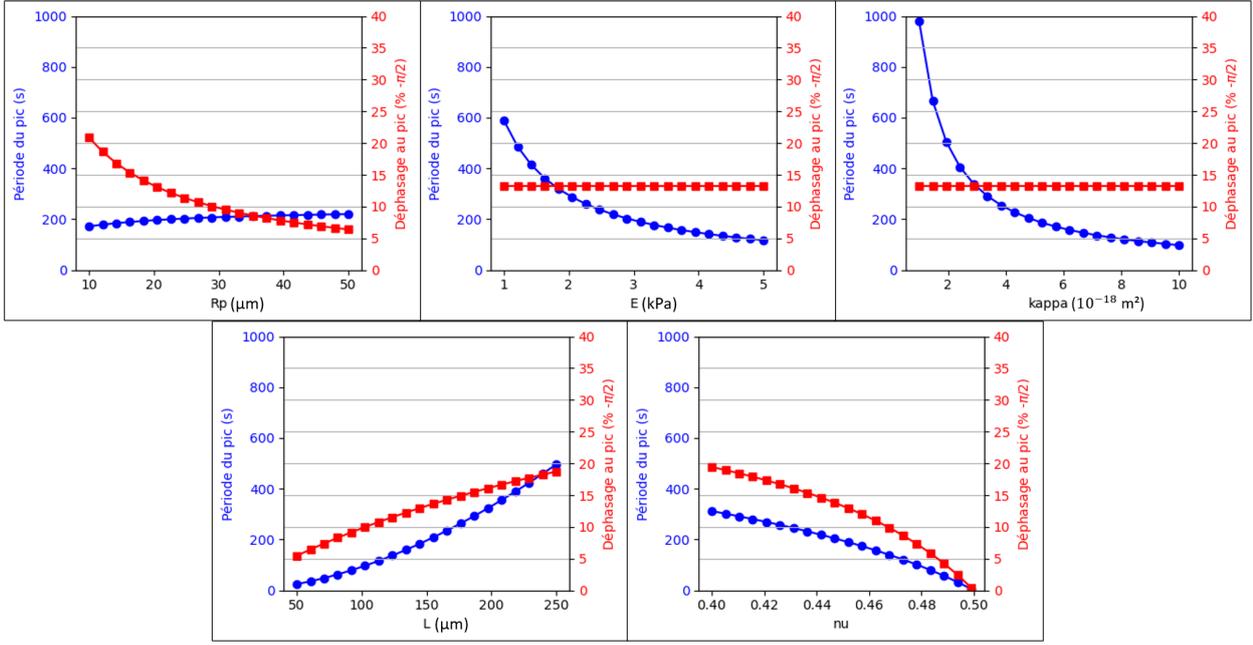


FIGURE 3.15 – Évolution de la position du pic et de sa hauteur en fonction des différents paramètres. Le jeu de paramètre utilisé lorsque ces paramètres ne varient pas est :  $P_1 = 10\text{mbar}$ ,  $\mu = 10^{-3}\text{Pa.s}$ ,  $E = 3\text{kPa}$ ,  $\nu = 0.45$ ,  $L_0 = 150\mu\text{m}$ ,  $\kappa = 5.10^{-18}\text{m}^2$  et  $R_p = 20\mu\text{m}$

### Modèle avec viscoélasticité

On peut aller plus loin et construire le modèle "complet" en prenant en compte les déformations viscoélastiques qui se produisent à l'entrée de la pipette. Dans le cas du même forçage sinusoïdal, la valeur de ces déformations a déjà été calculée dans la section 3.2.1 et on peut exprimer la partie oscillante de  $\Delta L_{ve}(t)$  en utilisant l'équation (3.2) :

$$\Delta L_{ve}(t) = \Delta L_{ve0} + \Delta L_{ve1} \sin(\omega_0 t + \phi_{ve}) \quad (3.40)$$

$$\text{avec } \boxed{\Delta L_{ve1} = R_p |\tilde{\epsilon}_0|} \quad \text{et} \quad \boxed{\phi_{ve} = \arg(\tilde{\epsilon}_0)}$$

$$\text{et où } \tilde{\epsilon}_0 = P_1 \left[ \frac{1}{E} + \frac{1}{3\pi\eta j\omega} + \frac{E - E_f}{EE_f(1 + j\omega\tau_c)} \right]$$

En utilisant la même formule de trigonométrie (3.38) que précédemment, on peut exprimer le déphasage  $\phi$  et l'amplitude  $\Delta L$  dans le cas où il y a des déformations viscoélastiques à l'entrée de la pipette. On obtient :

$$\Delta L = \sqrt{\Delta L_{ve1}^2 + \Delta L_{p1}^2 + 2\Delta L_{ve1}\Delta L_{p1} \cos(\phi_{ve} - \phi_p)} \quad (3.41)$$

$$\phi = \arctan\left(\frac{\Delta L_{ve1} \sin(\phi_{ve}) + \Delta L_{p1} \sin(\phi_p)}{\Delta L_{ve1} \cos(\phi_{ve}) + \Delta L_{p1} \cos(\phi_p)}\right)$$

On peut alors retracer les diagrammes de Bode correspondant à ce modèle complet que l'on nomme poroviscoélastique :

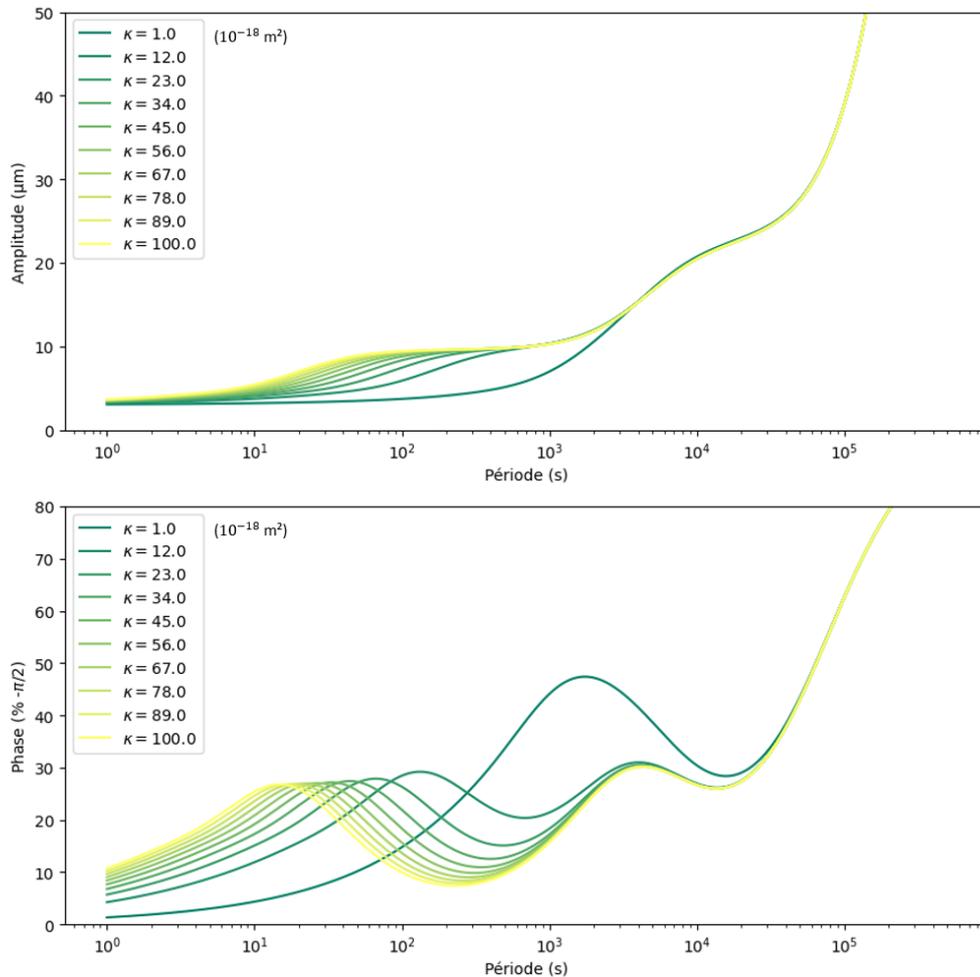


FIGURE 3.16 – Évolution des diagrammes de Bode en fonction de  $\kappa$  pour le modèle complet poroviscoélastique. Le jeu de paramètre utilisé est :  $P_1 = 10\text{mbar}$ ,  $\mu = 10^{-3}\text{Pa.s}$ ,  $E = 5\text{kPa}$ ,  $\nu = 0.4$ ,  $L_0 = 200\mu\text{m}$ ,  $R_p = 20\mu\text{m}$ ,  $E_f = 1\text{kPa}$ ,  $\tau_c = 15\text{min}$  et  $\eta = 1\text{MPa.s}$ .

On remarque que pour certains jeux de paramètres, le pic de poroélasticité et celui lié

du passage viscoélastique de  $E$  à  $E_f$  se superposent. Même si le pic de porosité ne se trouve pas exactement à la période  $\tau_p$  il en est proche. Ces cas de figure se produisent donc quand le temps poroélastique  $\tau_p$  est proche du temps viscoélastique  $\tau_c$

### 3.3 Simulations numériques et validation du modèle analytique

Afin de valider notre modèle analytique et, en particulier, certaines des hypothèses qu'il contient, nous avons entrepris des simulations d'aspiration par micropipette (AMP) sur des matériaux poroélastiques à l'aide du logiciel COMSOL. Chronologiquement, ces simulations (ainsi que la rédaction de cette section) ont été réalisées avant le développement du modèle d'AMP, beaucoup plus pertinent, présenté dans la section 2.4.

Ce logiciel permet de coupler différentes physiques afin de simuler des systèmes complexes. Il permet notamment de coupler la physique décrivant l'écoulement du fluide dans un matériau poreux (loi de Darcy) avec la mécanique des solides décrivant les contraintes et les déformations dans un solide. Ce couplage, comme nous l'avons vu, constitue la base de la théorie de la poroélasticité, et un module spécifique (nommé "poroélasticité") permet de simuler ces phénomènes dans COMSOL.

Nous avons tout d'abord créé une géométrie 2D-axisymétrique pour obtenir la forme des sphéroïdes aspirés, comme cela est montré sur la figure 3.17.

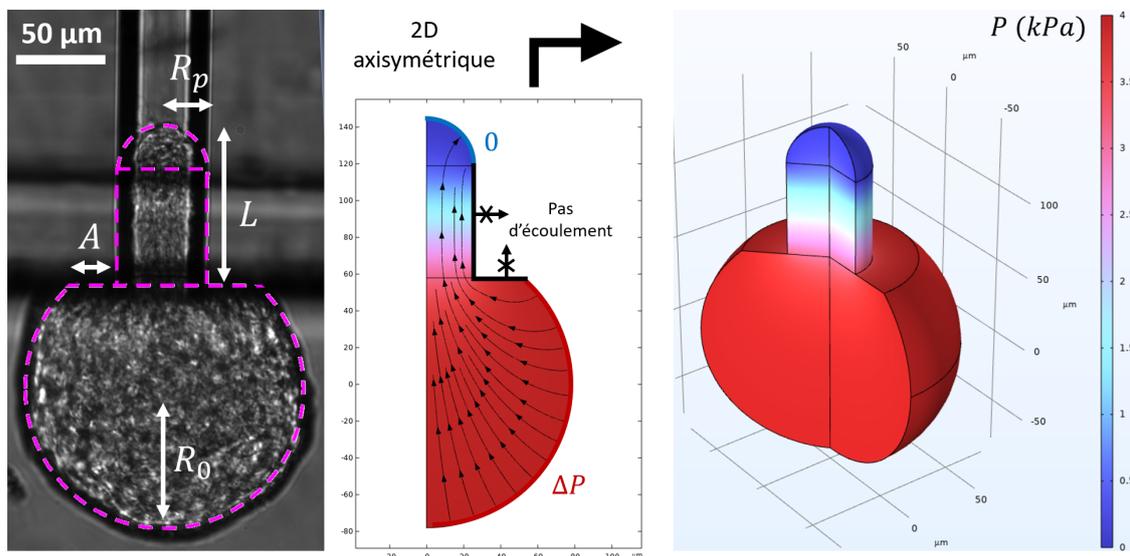


FIGURE 3.17 – Illustration de la géométrie utilisée pour les simulations COMSOL. Schéma des conditions aux limites appliqué dans COMSOL. Visualisation 3D du champ de pression simulé dans le sphéroïde avec la loi de Darcy.

Nous avons ensuite ajouté la physique "loi de Darcy" en donnant à notre matériau poreux une perméabilité  $\kappa$  et une viscosité  $\mu$  au fluide qui le remplit. Afin de reproduire les

expériences d'AMP, nous définissons les conditions aux limites suivantes :

- Pression  $\Delta P$  sur la surface du sphéroïde du côté de l'entrée de la puce.
- Pression nulle au bout de la langue.
- Pas d'écoulement au niveau des surfaces en contact avec la pipette.

La deuxième étape a consisté à intégrer la physique "mécanique du solide" en considérant d'abord le sphéroïde comme un solide purement élastique avec un module de Young  $E$  et un coefficient de poisson  $\nu$  car, comme nous l'avons vu, un couple de deux paramètres est nécessaire pour décrire la mécanique d'un solide élastique.

Afin de simuler les forces de contact avec les parois de la pipette, nous avons contraint les déplacements normaux (donc libres tangentiellement) sur les deux surfaces où ces contacts ont lieu. Ce sont les mêmes surfaces que l'on contraint avec une condition de non-écoulement dans la "loi de Darcy" (cf : figure 3.17).

Ceci revient à ce que le sphéroïde glisse sans friction sur les parois de la pipette. C'est l'hypothèse que nous avons faite depuis le début et qui a largement été vérifiée pour la lignée utilisée.<sup>5</sup>

Nous avons ainsi pu rajouter la multiphysique "poroélasticité" permettant de coupler ces deux physiques. La dernière étape a alors été d'optimiser le maillage de cette géométrie. Après plusieurs tests et des recherches, nous avons convergé vers un maillage principalement composé de quadrilatères libres. Ces éléments permettent de mieux simuler des déformations élastiques importantes.

Enfin, nous avons pu effectuer une étude temporelle sur ce système en imposant sur la surface du sphéroïde hors de la pipette, une pression dynamique du type  $P_0 + P_1 \sin(\omega t)$  (et toujours une pression nulle au bout de la langue). J'ai ainsi pu observer les déformations poroélastiques au sein du sphéroïde et notamment le déplacement du bout de la langue.

---

5. C'est cette méthode de simulation des contacts, actuellement en cours de révision avec la méthode améliorée développée dans le chapitre 2, qui n'est pas optimale. En effet, le matériau glisse sans frottement le long du segment, mais les extrémités des segments restent fixes et forment des points d'ancrage, ce qui fausse les déformations.

### 3.3. Simulations numériques et validation du modèle analytique

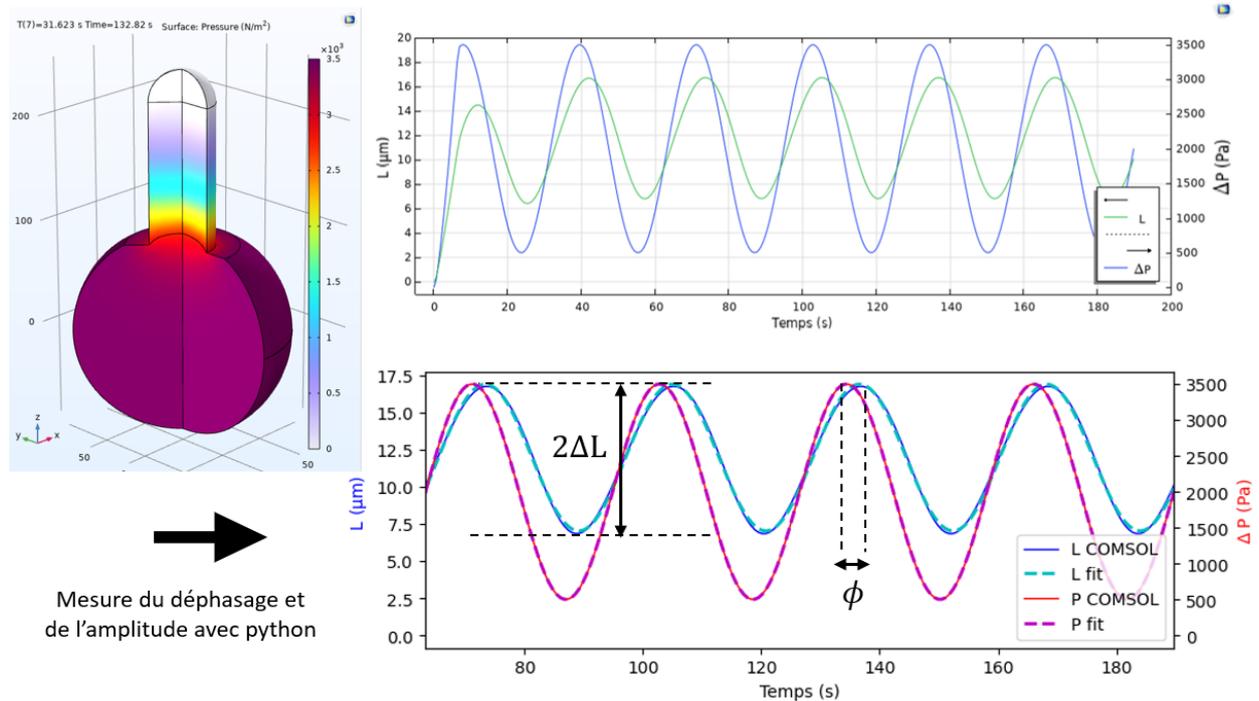


FIGURE 3.18 – Visualisation 3D du champ de pression et des déformations. Superposition du déplacement de la langue et de la pression appliquée. Mesure du déphasage et de l'amplitude avec un ajustement de ces 2 signaux

On observe sur la figure 3.18 un déphasage entre le mouvement du bout de la langue et la pression imposée. Comme nous l'avons vu dans le modèle précédent, ce retard vient du temps que met la pression à diffuser le long de la langue. Il y a donc un gradient de pression qui s'installe de manière retardée et ce gradient engendre un gonflement de la langue qui se charge en fluide.

Afin de quantifier le déphasage et l'amplitude qui en découle, j'ai réutilisé la même démarche que pour mes expériences en ajustant ces deux signaux par des sinusoides. J'ai alors réalisé une suite de simulations de la sorte en faisant varier la période des oscillations afin d'obtenir des diagrammes de Bode comme celui présenté sur la figure 3.19.

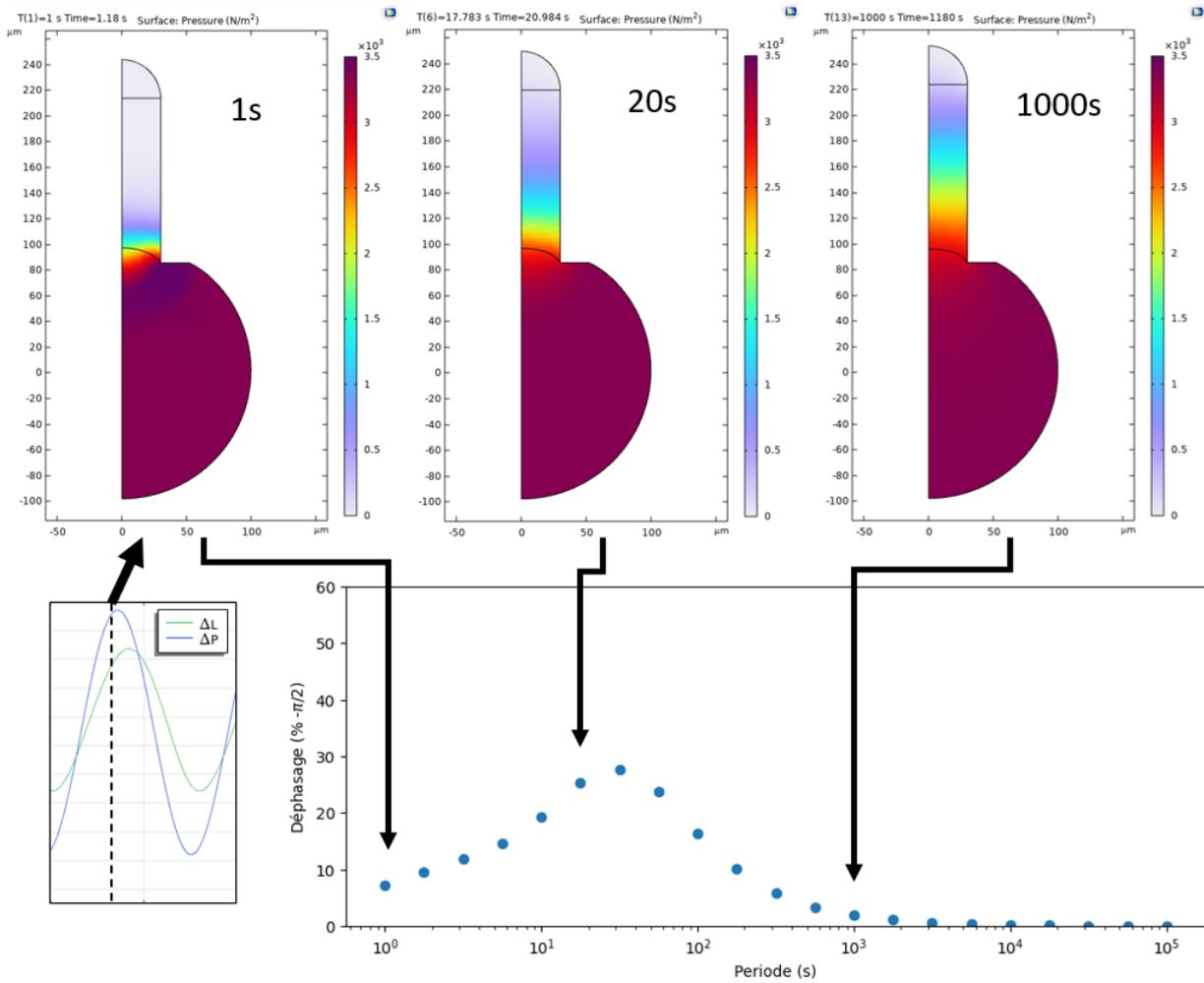


FIGURE 3.19 – Visualisation du champ de pression dans le sphéroïde au moment du pic de pression appliqué pour plusieurs périodes d'oscillation : 1s, 20s et 1000s. Diagramme de Bode du déphasage en fonction de la période

Nous avons retrouvé un pic présentant les mêmes caractéristiques que celui observé expérimentalement et par le modèle. COMSOL nous permet également de plus facilement illustrer l'origine physique de ce phénomène. En examinant les champs de pression dans le sphéroïde au moment où la pression imposée est maximale, on observe, selon la fréquence, les comportements suivants :

- **Pour les très courtes périodes** : La pression appliquée n'a pas le temps de diffuser dans la langue. Cela entraîne une faible amplitude des déformations dues à la poroélasticité. Les déformations élastiques à l'entrée de la pipette dominent, et ces dernières sont parfaitement en phase avec le stress imposé, ce qui se traduit par un déphasage quasi inexistant.
- **Au pic** : La pression a eu le temps de diffuser suffisamment en profondeur, provo-

quant un gonflement significatif de la langue. Lorsque la pression imposée commence à diminuer, le gradient de pression présent dans la langue continue à se propager, faisant encore gonfler la langue. Cette déformation, arrivant en retard par rapport au stress appliqué et ayant une amplitude non négligeable, entraîne un déphasage significatif.

- **Pour les longues périodes :** La pression a toujours eu le temps de diffuser et d'atteindre l'état d'équilibre. Ainsi, même si l'amplitude des déformations poroélastiques est maximale, elles sont en phase avec le stress appliqué. Cela résulte en une absence de déphasage.

Nous pouvons alors comparer ce que donnent ces simulations et notre modèle théorique pour un même jeu de paramètres :

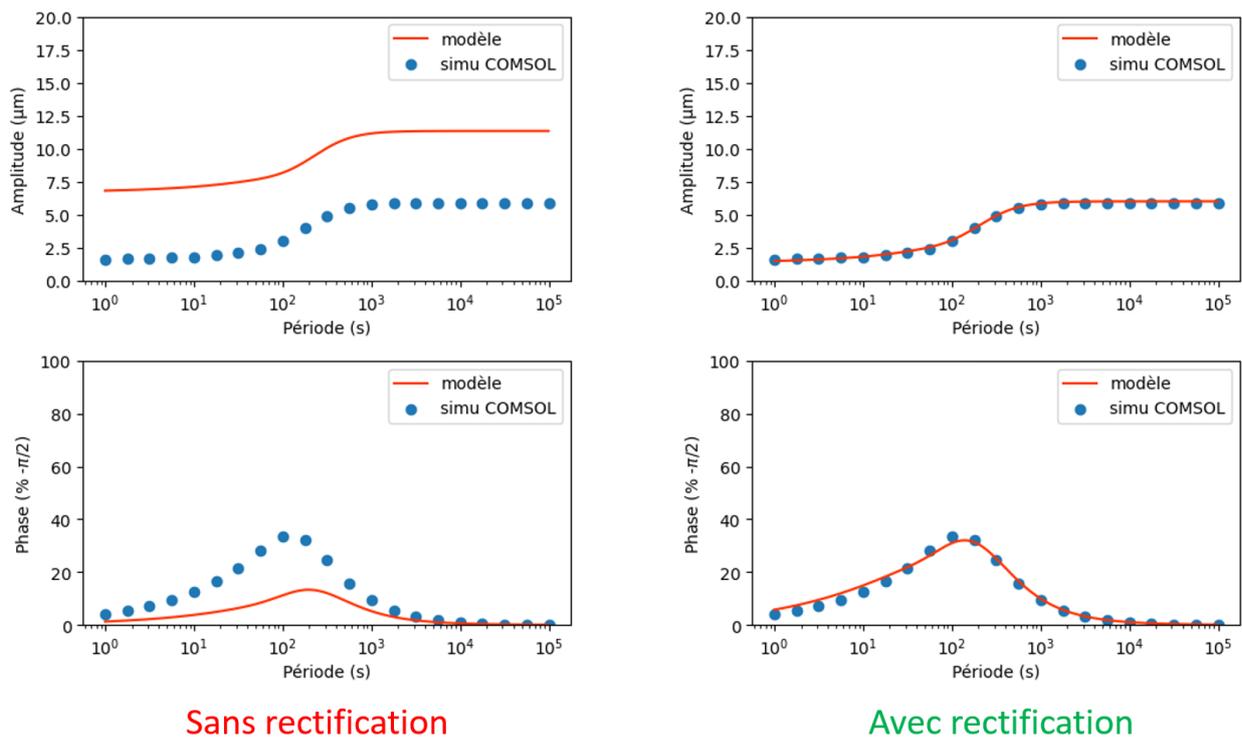


FIGURE 3.20 – Diagrammes de Bode de l'amplitude des déformations et du déphasage, comparant le modèle théorique aux simulations. Sans correction, on observe une grande différence en amplitude (facteur de 5) à haute fréquence, où la poroélasticité n'a pas d'effet significatif. Cette différence met en évidence des erreurs dans les simulations des déformations élastiques, dues aux points d'ancrage qui limitent ces déformations. Il est donc nécessaire d'ajuster le modèle théorique pour tenir compte de cette erreur issue des simulations. En appliquant cette correction ( $\beta = 5$ ), nous parvenons à très bien ajuster les résultats des simulations.

On observe dans la figure 3.20 que le modèle théorique n'est pas entièrement en accord

avec les résultats des simulations. En intégrant les résultats de simulations de la déformation élastique pour un sphéroïde (équation (2.25)), on doit bien considérer une correction dans cette étude. En effet, la déformation élastique à l'entrée de la pipette vaut  $\frac{R_p \Delta P}{\beta E}$ , où  $\beta$  est un facteur de 2,5 en considérant un sphéroïde avec un module de Poisson de 0,4 et les corrections géométriques. L'ajustement des données dans le panneau de droite de la figure 3.20 nécessite une correction supérieure de l'ordre de 5. Nous n'avons pas eu le temps de clarifier cette dernière erreur d'un facteur 2. Toutefois, nous pouvons démontrer un accord qualitatif très convaincant entre les simulations et le modèle théorique et les simulations. De plus, le pic de déphasage observé sur nos données expérimentales 3.6 est très naturellement reproduit par le modèle poroélastique linéaire.

### 3.4 Analyse des données expérimentales

Avant d'analyser les données expérimentales du régime sinusoïdal forcé à l'aide de notre modèle analytique, nous avons d'abord souhaité mesurer de manière indépendante la perméabilité de nos sphéroïdes. Cette étape nous permet d'obtenir une estimation de l'ordre de grandeur de la perméabilité, offrant ainsi un point de comparaison pour l'analyse qui suivra.

#### 3.4.1 Mesure de la perméabilité des tissus biologiques

Comme nous avons pu le voir, une des grandeurs importantes dans ces phénomènes qui impacte grandement la fréquence à laquelle se trouve le pic de déphasage, est la perméabilité  $\kappa$  (en  $m^2$ ). C'est la grandeur qui intervient dans la loi de Darcy. Elle traduit la facilité avec laquelle un fluide peut traverser le matériau. La perméabilité est directement liée à la structure du matériau, notamment à la taille et à la connectivité de ses pores. Une perméabilité élevée indique que le fluide peut se déplacer librement à travers le matériau, tandis qu'une perméabilité faible indique qu'il oppose une forte résistance au flux de ce fluide. En général, on peut considérer que  $\sqrt{\kappa}$  représente la taille typique des pores présents dans le matériau.

J'ai donc voulu mesurer cette grandeur sur mes sphéroïdes. Pour cela, j'ai mis en place une expérience exploitant les mêmes puces microfluidiques. J'ai réalisé des expériences classiques d'aspiration par micropipette en rajoutant des billes fluorescentes dans le milieu dont est remplie la puce. L'idée est de visualiser le flux du fluide s'écoulant à travers le tissu en traquant ces billes au cours du temps. J'ai choisi des billes de 500 nm de diamètre afin qu'elles ne sédimentent pas, mais qu'elles n'aient pas non plus un mouvement brownien trop important, permettant ainsi que leur trajectoire soit davantage corrélée au courant qui les emporte.

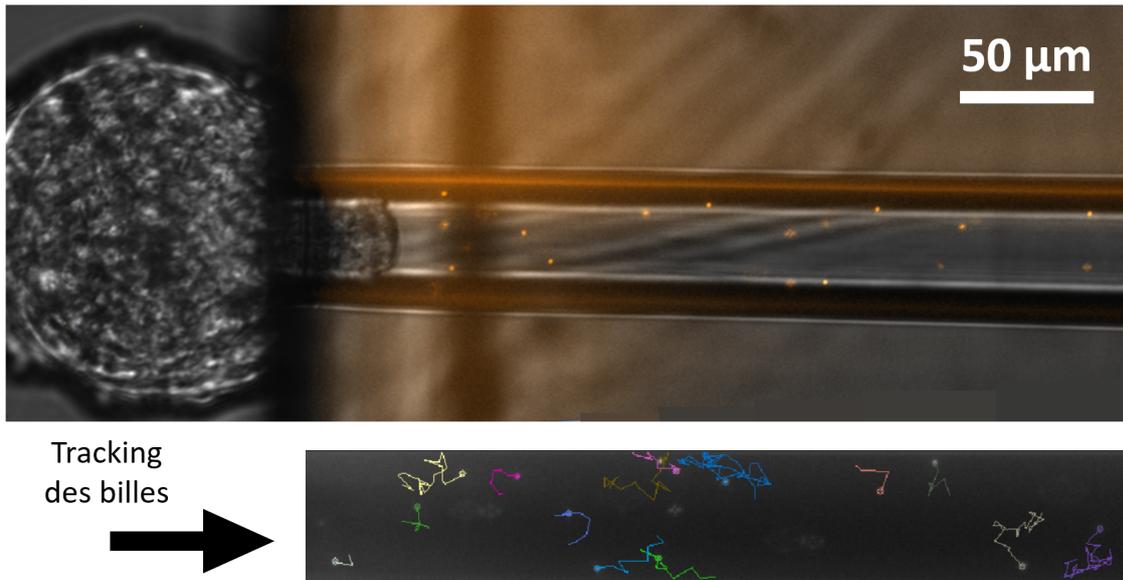


FIGURE 3.21 – Image au microscope du sphéroïde aspiré dans la pipette et des billes fluorescentes présente dans cette dernière (superposition champ clair + épifluorescence). Visualisation des trajectoires détectées grâce au module Mosaic de Image J.

On peut voir sur la figure 3.21, la présence de ces billes fluorescentes dans la micropipette et le suivi de la trajectoire de chaque bille au cours du temps. On observe que la dynamique de leur déplacement est dominée par la diffusion brownienne. On ne peut donc pas avoir directement accès aux flux qui s'écoule dans la micropipette et qui aurait traversé le sphéroïde. Cependant, si un tel flux était bien présent, il aurait pour conséquences de biaiser la trajectoire moyenne des particules dans sa direction.

Pour mesurer un tel biais, il faut prendre en compte la déformation du sphéroïde dans la pipette. En effet, lorsque la langue avance, elle emporte avec elle le fluide qui à son tour emporte les billes. Ce déplacement n'aurait cependant aucun lien avec un flux ayant traversé le sphéroïde. Ainsi, la grandeur pertinente à mesurer est présentée sur la figure 3.22.

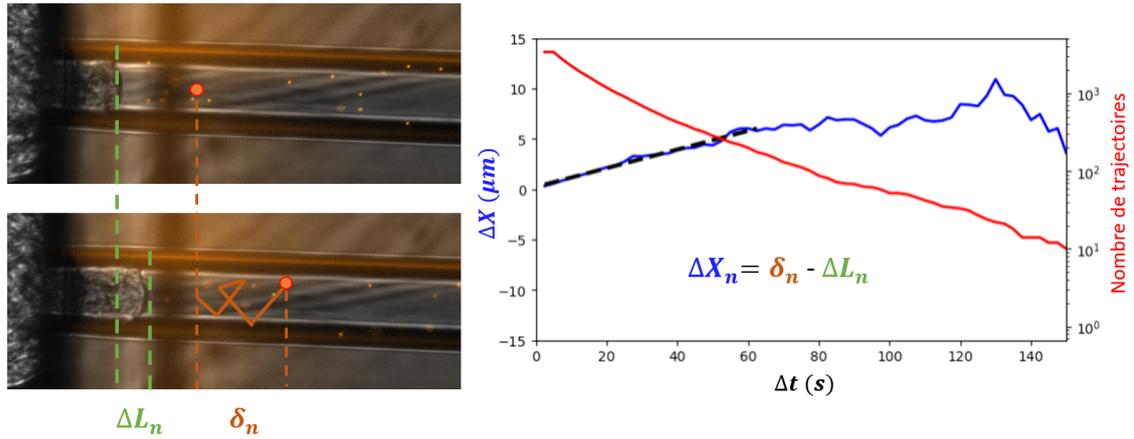


FIGURE 3.22 – Schéma du déplacement d'une bille et de l'avancée du sphéroïde au cours de  $n$  pas de temps. Graphique du déplacement moyen des billes fluorescentes en fonction du temps, après correction de l'avancée du sphéroïde.

On définit  $\Delta X(\Delta t)$ , le déplacement  $\delta$  (suivant l'axe de la pipette) de la bille pendant la durée  $\Delta t$ , auquel on retranche l'avancée du sphéroïde  $\Delta L$  qui a eu lieu durant le même laps de temps. Si aucun flux n'est présent dans la pipette, le mouvement des billes devrait être purement brownien (avec confinement). En moyennant  $\Delta X(\Delta t)$  sur un grand nombre de trajectoires, on devrait donc avoir  $\langle \Delta X(\Delta t) \rangle \rightarrow 0 \mu\text{m}$ . En revanche, dans le cas où un flux est présent, cette grandeur ne tendrait plus vers 0, mais vers  $\langle \Delta X(\Delta t) \rangle \rightarrow V_{moy} \Delta t$  avec  $V_{moy}$ , la vitesse moyenne du fluide dans la zone où l'on traque les billes fluorescentes. Étant donné qu'avec l'objectif utilisé, les billes sont suffisamment nettes sur toute l'épaisseur de la pipette pour être détectées, on peut considérer que cette zone correspond à toute la section de la pipette.

En moyennant ainsi cette grandeur avec les milliers de trajectoires détectées expérimentalement, on observe effectivement ce comportement comme le montre la figure 3.22. On peut alors facilement déterminer la vitesse moyenne du fluide s'écoulant dans la pipette (pente de la fonction affine ajustant la courbe). Au-delà d'une certaine durée, le nombre de trajectoires (courbe rouge) devient trop faible, la stochasticité du mouvement brownien prend alors le dessus.

Sans même avoir à considérer que cet écoulement prend la forme d'un écoulement de Poiseuille, on peut directement, grâce à la définition que nous avons faite de  $V_{moy}$ , remonter au débit volumique  $Q$  de milieu qui a traversé le sphéroïde par :  $Q = \pi R_p^2 V_{moy}$ . Il ne reste maintenant plus qu'à utiliser la loi de Darcy afin de déterminer la perméabilité du tissu à partir de cette grandeur. Cependant, cette loi dépend des paramètres géométriques du matériau. Nous avons tout de suite choisi de négliger l'évolution de la forme due au sphéroïde qui s'écoule dans la pipette, car entre le début et la fin de ces expériences (assez rapide) la

langue n'avance que de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Ceci étant, la forme des sphéroïdes aspirés, même supposée fixe, ne permet pas d'avoir une expression simple qui lierait  $Q$  à  $\kappa$ .

Nous nous sommes donc orientés à nouveau vers l'utilisation du logiciel de simulation multiphysique COMSOL. Comme nous l'avons vu, le module "loi de Darcy" de ce logiciel permet justement de résoudre numériquement ce problème pour n'importe quelle géométrie, en appliquant une loi de Darcy locale sur des éléments finis. J'ai donc réutilisé la géométrie 2D-axisymétrique présentée dans la figure 3.17 pour obtenir la forme des sphéroïdes aspirés. Nous pouvons entièrement et précisément mesurer celle-ci à partir des images de microscopie.

Supposant la viscosité du milieu comme proche de celle de l'eau, il ne reste plus qu'un seul paramètre à fixer pour pouvoir réaliser une simulation : la perméabilité  $\kappa$ . J'ai donc réalisé plusieurs études stationnaires en faisant varier la valeur de  $\kappa$ . Cela m'a permis d'obtenir pour chacune de ces études le débit volumique de fluide sortant par le bout de la langue. Comme on pouvait s'en douter, on observe (figure 3.23) une dépendance parfaitement linéaire du débit avec la perméabilité.

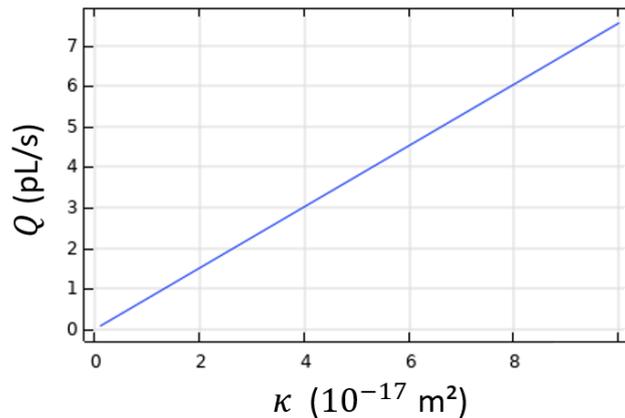


FIGURE 3.23 – Graphique des résultats de la simulation pour le débit volumique traversant le sphéroïde en fonction de la perméabilité

Ces simulations nous permettent donc de déterminer,  $U_{geo}$  le coefficient de proportionnalité, homogène à une vitesse et dépendant de la géométrie, grâce auquel on peut remonter à une mesure de la perméabilité des sphéroïdes par  $\kappa = Q/U_{geo}$ . Dans le cas de la lignée cellulaire que j'utilise (cancer pancréatique murin A338), j'ai mesuré une perméabilité  $\kappa \approx 5.10^{-18} \text{ m}^2$  (mesure sur seulement 2 sphéroïdes de  $150 \mu\text{m}$  de diamètre et âgés de 3j).

J'ai observé une importante variabilité entre chaque expérience et il semblerait que l'âge du sphéroïde influence beaucoup,  $\kappa$ . Une étude plus approfondie de cette grandeur est en cours pour regarder ces dépendances, mais les résultats sont encore trop préliminaires pour

être présentés. Cependant, nous pouvons conclure que l'effet de la porosité sur le transport de fluide ne peut pas être négligé. Les effets poroélastiques ne peuvent pas non plus être oubliés d'autant plus que les sphéroïdes sont des objets déformables.

#### 3.4.2 Analyse de la partie poroélastique

La possibilité d'analyser l'ensemble du spectre fréquentiel avec un modèle poroviscoélastique nous a semblé fournir une opportunité unique pour fournir une caractérisation détaillée complète des propriétés mécaniques des sphéroïdes, à savoir mesurer le module de Young et le coefficient de Poisson. En effet, la déformation en régime élastique et poroélastique ne suit pas du tout les mêmes lois d'échelle (voir équations (2.25) et (3.2.4)). La méthode optimale pour analyser les résultats reste toutefois encore à définir.

Une première approche consiste à éviter l'ajustement de l'intégralité des diagrammes de Bode avec le modèle théorique complet, afin de minimiser les problèmes liés aux dégénérescences potentielles entre les nombreux paramètres du modèle (six au total). De plus, un tel ajustement s'appuierait sur seulement une dizaine de points expérimentaux, correspondant au nombre typique de fréquences balayées lors des expériences. Nous avons donc opté pour une analyse focalisée sur les hautes fréquences des diagrammes de Bode. Le premier pic associé à la poroélasticité offre en effet un accès direct aux deux paramètres qui ne sont pas obtenus avec les mesures d'échelon : la perméabilité  $\kappa$  et le coefficient de Poisson  $\nu$ .

Cependant, comme nous l'avons vu dans la section 3.2.5, lorsque les temps caractéristiques poroélastique et viscoélastique sont proches, une superposition de ces deux effets peut survenir, et cette situation est fréquemment observée expérimentalement.

Il est alors impossible d'ajuster correctement l'ensemble du pic de déphasage associé à la poroélasticité, car la fin de ce pic est biaisée par les effets viscoélastiques. Néanmoins, nous pouvons considérer que, pour toutes les périodes plus rapides que celles du pic, les effets poroélastiques dominent largement.

Pour contourner cette limitation, nous avons développé un script qui calcule numériquement la somme des résidus entre le modèle poroélastique et les données expérimentales, en prenant en compte à la fois le déphasage et l'amplitude. En ne sélectionnant que les périodes inférieures au pic, j'ai ainsi pu identifier le jeu de paramètres  $E$ ,  $\kappa$ , et  $\nu$  qui minimise les résidus sur ces points spécifiques.

Malheureusement, à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, les résultats obtenus ne sont pas encore convaincants, comme l'illustre la figure 3.24. En effet, les valeurs des trois paramètres pour cet ajustement sont :  $\kappa = 2,4 \times 10^{-18}, \text{m}^2$ ,  $E = 40 \text{ kPa}$  et  $\nu = 3 \times 10^{-5}$ , ce qui n'est pas convaincant surtout pour le coefficient de Poisson.

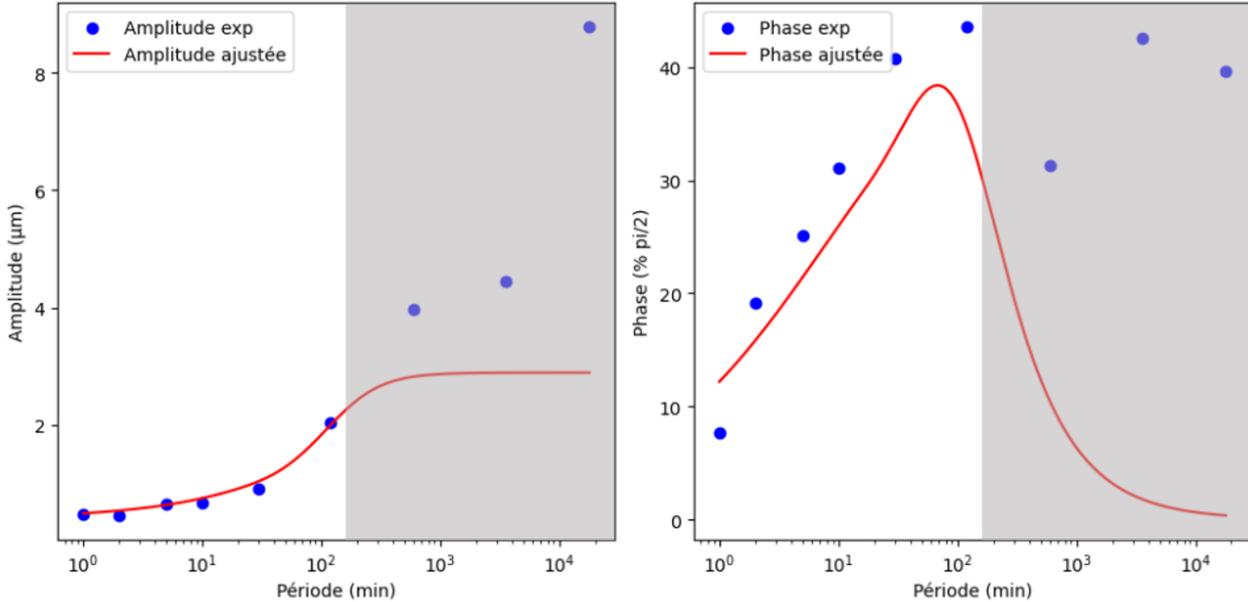


FIGURE 3.24 – Graphique montrant l'ajustement simultané des diagrammes de Bode pour l'amplitude et le déphasage. Seuls les points situés avant le pic de déphasage (zone en surbrillance) ont été inclus dans l'analyse. Cette expérience a été réalisée avec une pipette de rayon  $R_p = 25, \mu\text{m}$ , une longueur initiale  $\Delta L_0 = 150, \mu\text{m}$ , et une pression oscillante d'amplitude de 20 mbar (oscillations entre 20 et 60 mbar).

Nous constatons de manière générale que lorsqu'on ajuste trois paramètres simultanément, la valeur du coefficient de Poisson devient aberrante. Cela s'explique par une élasticité apparente très élevée dans les déformations élastiques observées à très haute fréquence. En effet, cette expérience a été réalisée avec une amplitude de pression oscillante de 20 mbar, et pour une période de 1 seconde, des déformations de  $0,5 \mu\text{m}$  sont mesurées. Cela conduit à des ajustements qui suggèrent une élasticité anormalement élevée que l'on reproduit en diminuant le coefficient de Poisson. À ce stade, nous devons réaliser une étude paramétrique avec un espace des paramètres plus limité, en fixant certaines grandeurs de manière plus ciblée, en particulier en utilisant notre étude sur la déformation élastique corrigée décrite avec l'équation (2.25).

Même s'il est encore un peu tôt pour des conclusions consolidées, on pourrait faire l'hypothèse que l'élasticité mesurée par la déformation initiale est plus grande que celle d'un sphéroïde à l'équilibre : la déformation poroélastique est volumique et infinitésimale, alors que l'élasticité initiale est localisée du fait du renforcement du cytosquelette d'actine lors

de l'aspiration, comme démontré dans la section 2.5.2. En effet, dans l'étape d'aspiration préalable à ces oscillations, une mesure de la déformation instantanée (2 secondes après application de la pression) donne un module de Young,  $E_i = 6$  kPa.

En conclusion, ce chapitre a permis de reproduire qualitativement l'ensemble des observations en régime sinusoïdal forcé en intégrant une contribution poroélastique. Cependant, le modèle théorique ayant été développé tardivement au cours de cette thèse, une analyse complète des résultats expérimentaux fondée sur ce modèle demande encore du temps.

## Bibliographie

- [1] V.T. Nayar, J.D. Weiland, C.S. Nelson, and A.M. Hodge. Elastic and viscoelastic characterization of agar. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 7 :60–68, March 2012.
- [2] Todd Thorsen, Richard W. Roberts, Frances H. Arnold, and Stephen R. Quake. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 86(18) :4163–4166, April 2001.
- [3] Erin M. Johnson and William M. Deen. Hydraulic permeability of agarose gels. *AIChE Journal*, 42(5) :1220–1224, May 1996.
- [4] Jean Cacheux, Jose Ordonez-Miranda, Aurélien Bancaud, Laurent Jalabert, Daniel Alcaide, Masahiro Nomura, and Yukiko T. Matsunaga. Asymmetry of tensile versus compressive elasticity and permeability contributes to the regulation of exchanges in collagen gels. *Science Advances*, 9(31) :eadf9775, August 2023.
- [5] Maurice A. Biot. General Theory of Three-Dimensional Consolidation. *Journal of Applied Physics*, 12(2) :155–164, February 1941.
- [6] M. A. Biot. Theory of Propagation of Elastic Waves in a Fluid-Saturated Porous Solid. I. Low-Frequency Range. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 28(2) :168–178, March 1956.
- [7] K. H. Parker, R. V. Mehta, and C. G. Caro. Steady Flow in Porous, Elastically Deformable Materials. *Journal of Applied Mechanics*, 54(4) :794–800, December 1987.
- [8] Takahira Aoki, Toshiro Ohashi, Takeo Matsumoto, and Masaaki Sato. The pipette aspiration applied to the local stiffness measurement of soft tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 25(3) :581–587, May 1997.
- [9] S. C. Cowin. Bone poroelasticity. *Journal of Biomechanics*, 32(3) :217–238, March 1999.
- [10] Yousef Javanmardi, Huw Colin-York, Nicolas Szita, Marco Fritzsche, and Emad Moeendarbary. Quantifying cell-generated forces : Poisson’s ratio matters. *Communications Physics*, 4(1) :237, November 2021.
- [11] A. P. G. Castro, P. Laity, M. Shariatzadeh, C. Wittkowske, C. Holland, and D. Lacroix. Combined numerical and experimental biomechanical characterization of soft collagen hydrogel substrate. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 27 :79, 2016.

- [12] Christine Poon. Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of *in vitro* devices. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 126 :105024, February 2022.
- [13] Douglas E. Kenyon. The theory of an incompressible solid-fluid mixture. *Archive for Rational Mechanics and Analysis*, 62(2) :131–147, June 1976.
- [14] D. E. Kenyon. Transient Filtration in a Porous Elastic Cylinder. *Journal of Applied Mechanics*, 43(4) :594–598, December 1976.



## Chapitre 4

### Conclusion et perspectives

## 4.1 Conclusion

Dans cette thèse, nous avons dans un premier temps présenté une puce microfluidique innovante pour la caractérisation mécanique quantitative des tissus biologiques. Composée de deux éléments — une partie en PDMS et une tige coulissante intégrant des micropipettes — cette puce permet de réaliser des aspirations par micropipette (AMP) sur plusieurs échantillons simultanément, améliorant ainsi l'efficacité et la reproductibilité des mesures.

Nous avons détaillé la conception, la fabrication et l'assemblage de la puce, en abordant les défis techniques, tels que la fabrication des tiges par photolithographie et l'optimisation des paramètres pour obtenir des micropipettes aux dimensions précises et à faible rugosité. Grâce aux films secs photosensibles (SUEx) et à des protocoles spécifiques, nous avons produit des composants adaptés à l'étude des tissus biologiques.

En appliquant des échelons de pression, nous avons mesuré la dynamique de déformation des sphéroïdes cellulaires via un modèle viscoélastique préexistant, basé sur un diagramme rhéologique, qui a permis d'extraire quatre paramètres caractérisant la viscoélasticité des tissus. Les premiers résultats sur la lignée de sarcome murin S180 concordent avec la littérature, validant la fiabilité de notre dispositif.

L'étude de la lignée de cancer pancréatique murin A338 a profité du haut débit de notre méthode, générant une vaste base de données qui, par analyse statistique, a révélé des informations importantes et conduit à des améliorations du modèle pour établir un lien entre l'élasticité et les déformations induites par l'AMP.

Des simulations numériques avec COMSOL Multiphysics, intégrant la géométrie sphérique et la compressibilité du matériau via le coefficient de Poisson, ont mis en évidence l'importance de ces facteurs pour déterminer précisément les paramètres mécaniques. Une loi empirique corrigée a ainsi été proposée pour affiner les mesures de déformation.

Nous avons également étudié les liens entre les constituants microscopiques des tissus et leurs propriétés mécaniques macroscopiques par des perturbations biochimiques ciblées. L'EDTA a montré que l'adhésion intercellulaire influence principalement la viscosité, facilitant les réarrangements cellulaires, tandis que la blebbistatine a modifié les propriétés élastiques sans affecter la viscosité. L'ajout de collagène a révélé une contribution de la matrice extracellulaire à la rigidité, bien que cet ajout ait aussi influencé la croissance des sphéroïdes. Enfin, un choc osmotique a révélé que la déplétion en eau rigidifie le tissu en

augmentant la concentration des fibres cytosquelettiques.

Les techniques de marquage fluorescent et d'imagerie 3D ont permis de visualiser les déformations cellulaires, les réarrangements tissulaires et la réponse du cytosquelette aux contraintes mécaniques. Les déformations initiales résultent de l'allongement cellulaire, tandis que sur des périodes plus longues, elles sont dues à des réarrangements cellulaires, en accord avec le modèle viscoélastique. L'accumulation de fibres d'actine dans les zones de haute contrainte a révélé une réponse adaptative du cytosquelette, corroborée par des simulations montrant des contraintes maximales dans ces régions.

Enfin, nous avons démontré l'applicabilité de notre dispositif à des tissus plus complexes grâce à des collaborations de recherche. L'étude d'organoïdes de cortex préfrontal de diverses espèces de mammifères a permis de comparer leurs propriétés mécaniques et d'explorer leur influence sur la différenciation cellulaire. De même, l'analyse de tissus embryonnaires de caille a révélé des différences de rigidité significatives entre les tissus postérieurs, suggérant un rôle potentiel dans la migration et la différenciation des cellules souches.

En conclusion, ce travail a abouti au développement d'un outil puissant pour la caractérisation mécanique des tissus biologiques, combinant des avancées technologiques et une modélisation approfondie. Les résultats enrichissent notre compréhension des mécanismes sous-jacents aux propriétés mécaniques des tissus et ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche en biologie du développement.

Dans un second temps, nous avons approfondi l'étude de la viscoélasticité des sphéroïdes en appliquant des pressions d'aspiration oscillantes afin de sonder leur dynamique sur différentes échelles de temps. Les expériences ont révélé que le modèle viscoélastique standard est insuffisant pour décrire pleinement la réponse des sphéroïdes, en raison notamment de l'apparition d'un pic de déphasage non prédit par ce modèle.

Pour expliquer ce comportement inattendu, nous avons introduit le concept de poroélasticité, qui prend en compte les propriétés poreuses des tissus et les interactions entre le fluide interstitiel et la matrice solide. Nous avons construit un modèle analytique poro-viscoélastique en décomposant la déformation du sphéroïde en deux contributions : une première viscoélastique à l'entrée de la pipette et une seconde poroélastique le long de la langue aspirée. Ce modèle a permis de reproduire qualitativement les principales caractéristiques des diagrammes de Bode obtenus expérimentalement, en particulier le pic de déphasage aux hautes fréquences.

Des simulations numériques avec COMSOL ont validé notre approche analytique, en reproduisant les phénomènes observés et en montrant le rôle crucial de la perméabilité et du coefficient de Poisson dans la dynamique et l'amplitude des déformations.

Nous avons également mesuré la perméabilité des tissus indépendamment, en suivant le déplacement de billes fluorescentes au sein des sphéroïdes aspirés. Ces mesures ont fourni un ordre de grandeur de la perméabilité qui a renforcé la validité de notre modèle.

L'analyse des données expérimentales a toutefois révélé certaines limitations. L'ajustement quantitatif des données à l'aide du modèle complet a été entravé par des problèmes de dégénérescence des paramètres et par la superposition des effets viscoélastiques et poroélastiques à certaines fréquences. Ces difficultés suggèrent que des phénomènes supplémentaires ou des ajustements du modèle pourraient être nécessaires pour décrire pleinement la réponse mécanique des sphéroïdes.

En conclusion, l'intégration de la poroélasticité dans la modélisation de la réponse des tissus biologiques soumis à des pressions oscillantes a permis une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et une caractérisation plus complète des propriétés mécaniques des tissus. Ce travail représente une avancée par rapport aux modèles précédents en intégrant des paramètres tels que la perméabilité et le coefficient de Poisson.

## 4.2 Perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives, que l'on peut regrouper en trois grandes catégories : les perspectives technologiques, les perspectives expérimentales, et enfin les perspectives théoriques et conceptuelles.

### 4.2.1 Perspectives technologiques

Tout d'abord, des améliorations technologiques peuvent être apportées au dispositif microfluidique. Un premier point serait de le rendre plus accessible et plus facile d'utilisation afin de le valoriser et de faciliter son exportation vers d'autres laboratoires, notamment dans le domaine de la biologie du développement, où l'intérêt pour un tel outil est considérable et où il pourrait répondre à un besoin méthodologique encore non satisfait. Une première piste

consiste à simplifier le système de contrôle de la pression en adoptant des systèmes basés sur des pressions hydrostatiques, remplaçant ainsi les contrôleurs de pression actuellement utilisés, souvent coûteux et nécessitant une source de pression externe. De plus, il serait nécessaire d'améliorer la puce pour faciliter le chargement des échantillons à mesurer. Enfin, fournir des outils numériques plus robustes, par exemple basés sur l'intelligence artificielle pour l'analyse d'images, permettrait d'accroître la facilité et la robustesse des analyses des expériences.

Un deuxième point est le développement de pipettes avec des géométries variées, au-delà de la forme circulaire classique. Par exemple, nous envisageons des pipettes « aplaties » de forme elliptique ou rectangulaire, ce qui faciliterait l'imagerie ainsi que l'analyse des déformations internes de l'agrégat en réduisant le système à deux dimensions. Une telle adaptation favoriserait une étude plus fine des déformations cellulaires et des réarrangements tissulaires, notamment l'étude des événements T1, où des réorganisations spécifiques des cellules au sein du tissu se produisent.

### 4.2.2 Perspectives expérimentales

Sur le plan expérimental, plusieurs pistes de recherche permettraient d'approfondir les résultats obtenus et d'explorer de nouvelles dimensions.

Premièrement, l'étude présentée dans la section 2.5.1, portant sur les liens entre les constituants cellulaires et les propriétés mécaniques macroscopiques des tissus, nécessite une augmentation du nombre de répétitions expérimentales, ainsi qu'une optimisation de certains protocoles afin d'améliorer la robustesse des données obtenues. Ensuite, il serait pertinent de poursuivre cette étude en explorant d'autres perturbations. Il serait par exemple très intéressant d'examiner le rôle des filaments intermédiaires, des structures encore peu étudiées, mais qui suscitent un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. On pourrait également envisager une étude approfondie des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire (MEC) en fonction de sa composition dans les différents types de tissus. Cette étude pourrait être d'une grande valeur, notamment pour l'ingénierie tissulaire, car une compréhension détaillée des caractéristiques mécaniques de la MEC permettrait de mieux reproduire ces environnements pour le développement de modèles de tissus *in vitro*.

Un autre axe d'exploration serait d'utiliser notre dispositif non pas comme une méthode destructive pour sonder la mécanique des tissus hors de leurs conditions physiologiques, mais pour appliquer des contraintes proches de celles que subissent les tissus *in vivo*. Par exemple, dans le cas des cellules cardiaques, sensibles aux contraintes mécaniques cycliques,

notre dispositif pourrait appliquer des stress oscillants contrôlés avec précision, tant dans la fréquence, la forme que l'intensité, afin d'étudier leur réponse sous des conditions mécaniques physiologiques.

### 4.2.3 Perspectives théoriques et conceptuelles

Enfin, des avancées théoriques pourraient enrichir la modélisation des phénomènes observés, notamment par le développement du modèle poroviscoélastique présenté dans le chapitre 3. Une première étape consisterait à construire un modèle véritablement poroviscoélastique, en intégrant une loi de comportement viscoélastique pour le calcul des déformations poroélastiques de la langue. Un tel modèle pourrait fournir une description plus réaliste des comportements mécaniques observés et à notre connaissance aucun modèle de ce type n'a encore jamais été développé, ce qui représenterait une contribution substantielle à la littérature.

Un second aspect, en lien avec les développements expérimentaux, serait de comparer les déformations prédites par le modèle avec les déformations mesurées expérimentalement. Cela pourrait être réalisé par un suivi précis des déformations cellulaires grâce à des méthodes type PIV (Particle Image Velocimetry), permettant de valider ou d'ajuster le modèle théorique en fonction des résultats obtenus. Bien que certains essais aient déjà été réalisés dans cette direction, ils nécessitent des améliorations méthodologiques pour obtenir des résultats suffisamment précis et exploitables.

# Annexe A

## Annexes

### A.1 Dispositif pour contrôle de l'environnement

Une variante de dispositif permet de modifier l'environnement chimique autour des sphéroïdes. Cette modification repose sur l'ajout de deux canaux périphériques supplémentaires (cf. figure A.1), spécifiquement conçus pour introduire ou évacuer différents milieux autour des sphéroïdes immobilisés dans la puce.

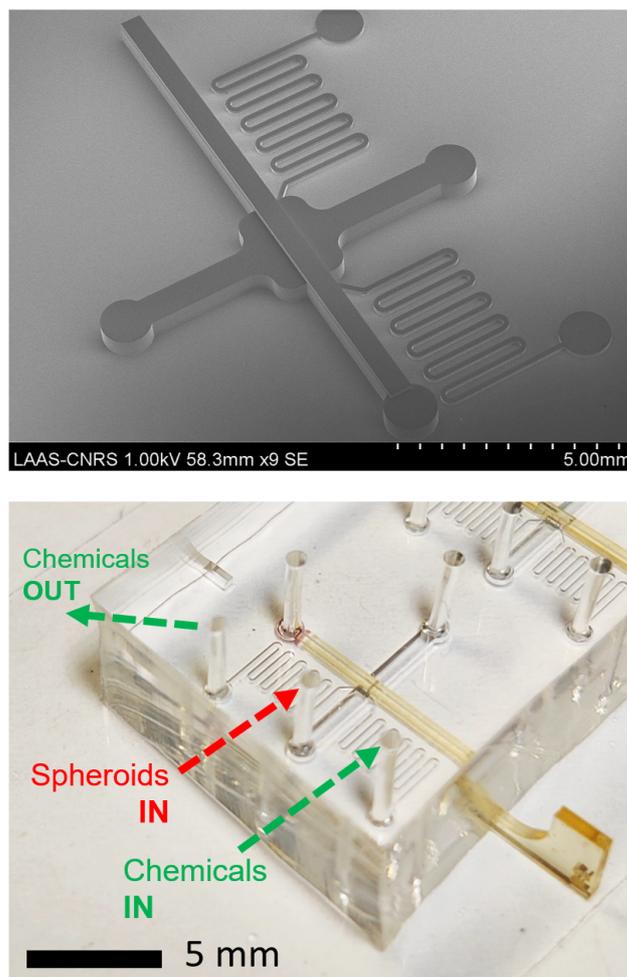


FIGURE A.1 – Image de microscopie électronique à balayage du moule utilisé pour fabriquer la variante du dispositif, accompagnée d'une vue complète de la puce avec la tige insérée. Le canal principal permet l'introduction des sphéroïdes, tandis que le changement d'environnement chimique est assuré par les canaux secondaires.

Par le contrôle de la pression appliquée dans ces canaux, il est possible de générer un flux transversal, permettant ainsi d'introduire divers réactifs ou marqueurs directement dans l'environnement immédiat du sphéroïde (cf. figure A.2). Cette capacité à alterner les milieux de façon ciblée est particulièrement utile pour étudier les réactions cellulaires à des variations d'environnement rapides.

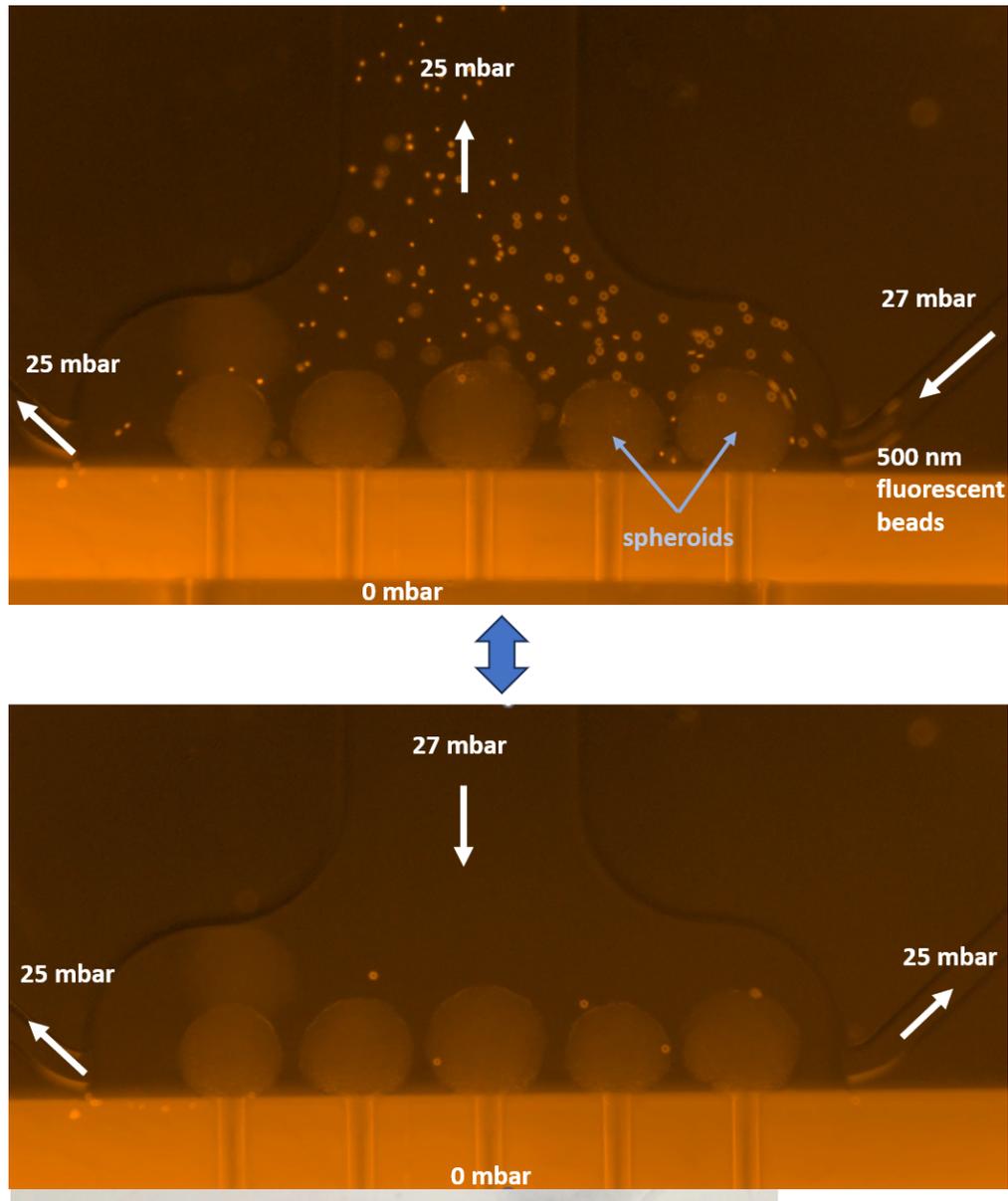


FIGURE A.2 – Image de microscopie en fluorescence montrant l'arrivée de billes fluorescentes dans l'environnement des sphéroïdes immobilisés contre les pipettes, grâce au contrôle des quatre pressions. Une seconde image illustre le rinçage des billes par l'entrée principale, démontrant la capacité de ce système à moduler dynamiquement l'environnement chimique.

Cette puce se révèle également précieuse pour quantifier la diffusion de diverses espèces chimiques au sein des sphéroïdes. En effet, grâce à ce dispositif, il est possible de suivre dès les premiers instants la progression de molécules, telles que des nanoparticules ou des agents fluorescents, depuis les couches externes jusqu'aux couches internes du sphéroïde. En analysant l'intensité lumineuse émise par ces agents diffusants, on peut mesurer leur pénétration et répartition au sein du sphéroïde, permettant ainsi de caractériser leurs propriétés de diffusion.

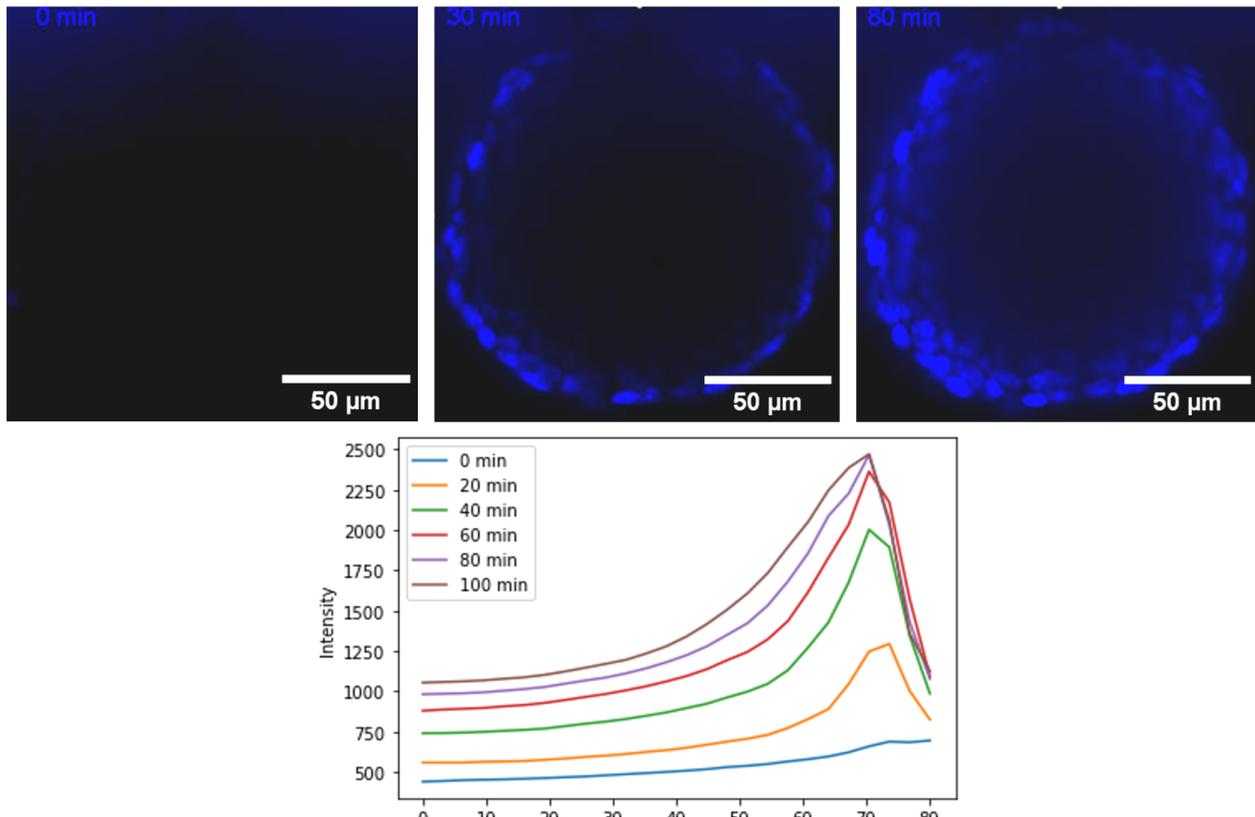


FIGURE A.3 – Image en microscopie confocale montrant la pénétration du Hoechst dans un sphéroïde capturé dès les premiers instants grâce à ce dispositif. Courbe représentant la progression des fluorophores dans le tissu au cours du temps.

## A.2 Dispositif pour cellule unique

Nous avons développé des puces microfluidiques permettant la réalisation d'AMP (aspiration par micropipette) sur cellule unique. Pour ce faire, nous avons microfabriqué des tiges munies de pipettes de diamètre compris entre 5 et 10 μm. La fabrication de ces pipettes s'est avérée complexe, mais nous avons réussi à réaliser une preuve de concept, illustrée sur la figure A.4. Toutefois, il apparaît que des améliorations sont encore nécessaires, notamment pour optimiser la qualité optique, qui reste insuffisante dans l'état actuel.

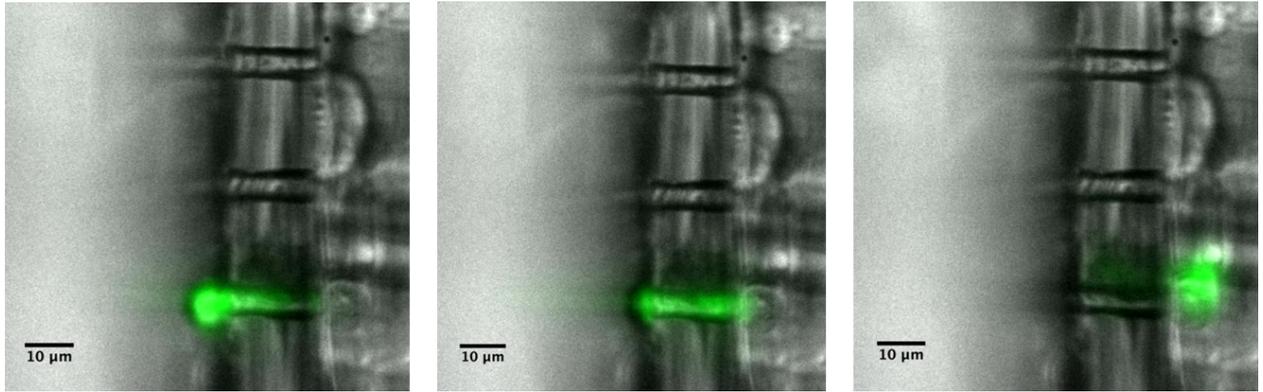


FIGURE A.4 – Superposition d’images de microscopie en champ clair et en fluorescence montrant une cellule A338, dont le cytoplasme a été marqué en vert, aspirée par notre dispositif adapté à l’échelle cellulaire (pipette de 5  $\mu\text{m}$ )

### A.3 Mesure AFM sur Sphéroïde

Afin de sonder l’élasticité des cellules en surface d’un sphéroïde, nous avons réalisé des mesures par microscopie à force atomique (AFM).

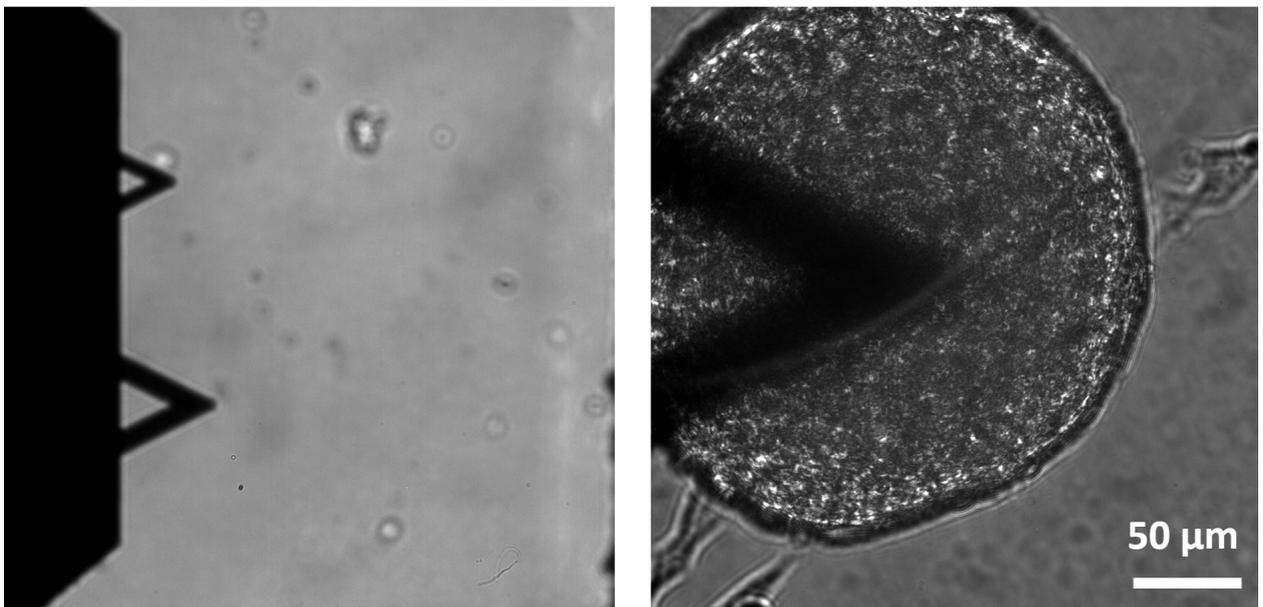
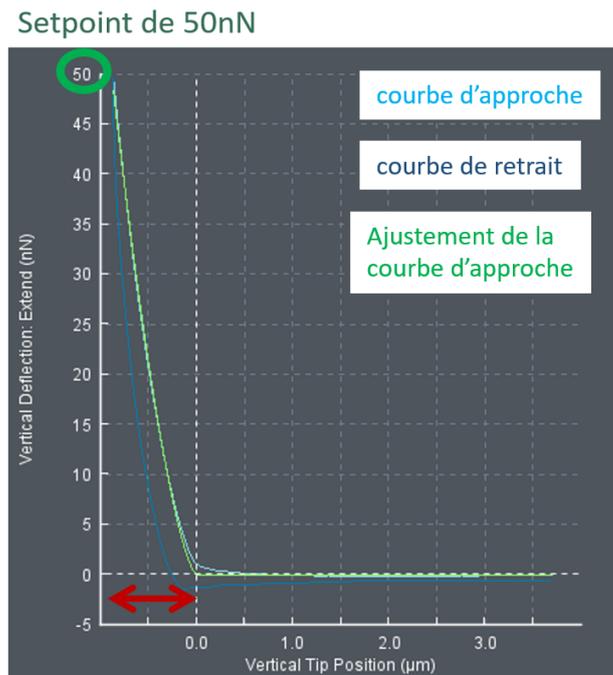


FIGURE A.5 – Image du sphéroïde fixé sur la surface, avec le cantilever positionné au-dessus.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des cantilevers sans pointe (tipless) présentant une surface de contact de taille comparable à celle d’une cellule (environ 20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ ), permettant de mesurer les modules de Young des cellules situées à la surface du sphéroïde. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure A.6.



1 $\mu\text{m}$  d'indentation

essai	Module de Young [Pa]
1	1097
2	5814
3	6730
4	1189
5	1295
6	1484
7	2575
<b>MOYENNE</b>	<b>2883</b>

FIGURE A.6 – Courbes d'approche et de retrait obtenues lors de la mesure AFM, avec ajustement de la courbe d'approche pour la détermination du module de Young. Le tableau présente les valeurs des modules de Young mesurées sur plusieurs essais, illustrant une variabilité notable, mais cohérente avec les valeurs obtenues par AMP.

Ensuite, nous avons utilisé une pointe pyramidale plus fine, permettant de visualiser la topographie de la surface d'un sphéroïde et de mesurer l'élasticité à l'échelle subcellulaire. Ces résultats sont présentés dans la Figure A.7.

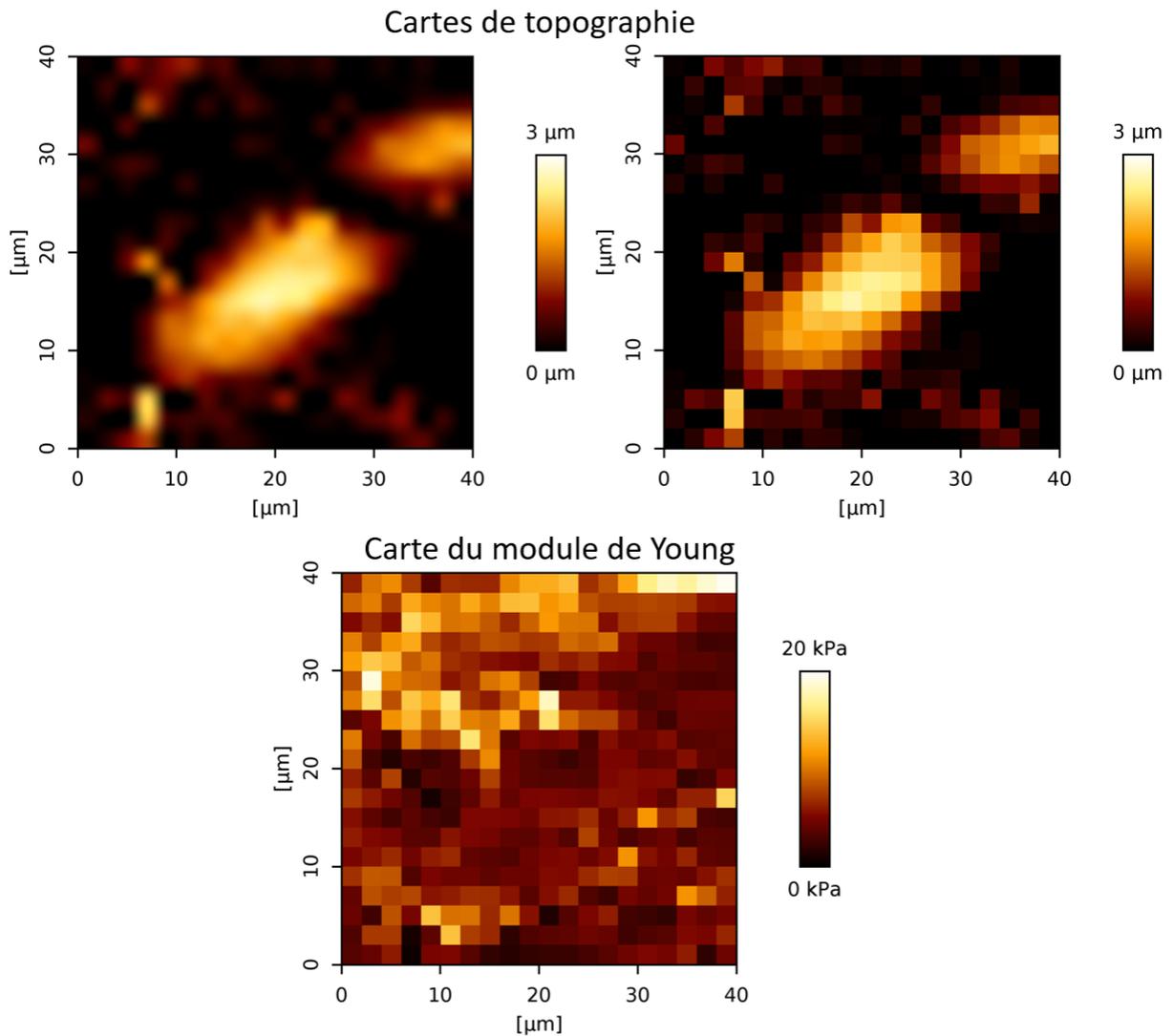


FIGURE A.7 – Mapping de la surface du sphéroïde, accompagné de la cartographie de l'élasticité obtenue avec une pointe pyramidale. Cette cartographie révèle l'hétérogénéité des propriétés mécaniques au sein de la zone analysée.

## A.4 Pression d'aspiration triangulaire et analyse de Fourier

Afin de sonder plus efficacement la réponse des sphéroïdes sous excitation sinusoïdale forcée, nous avons exploré l'application de pressions d'aspiration non sinusoïdales, en particulier de formes triangulaires. Ce type de forçage permet de stimuler plusieurs harmoniques simultanément, offrant ainsi une perspective plus complète sur la réponse du sphéroïde à diverses fréquences. La réponse obtenue avec ce forçage triangulaire est illustrée dans la figure suivante.

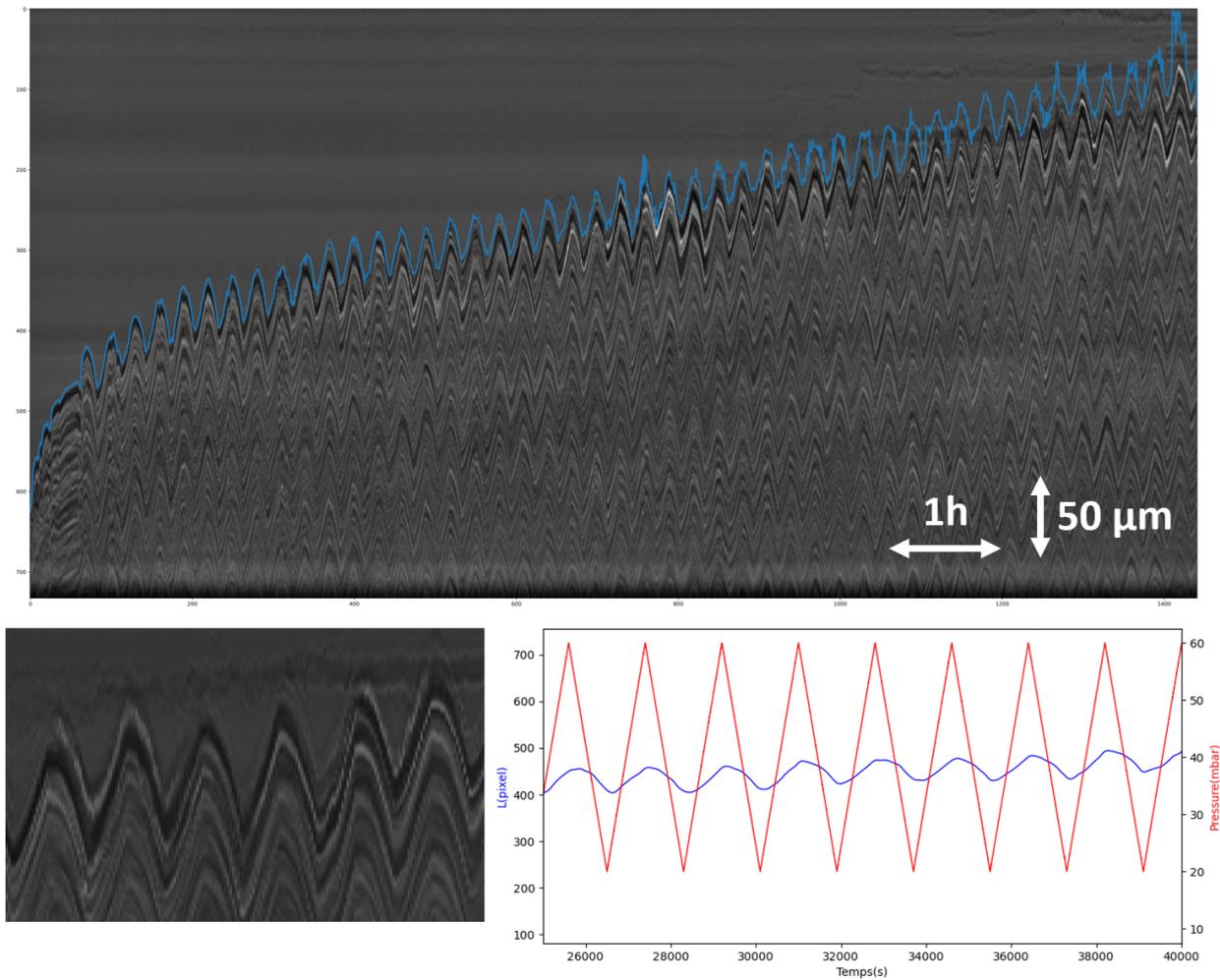


FIGURE A.8 – Réponse du sphéroïde à un forçage triangulaire, illustrant les effets de la viscoélasticité qui modifie la forme attendue de la réponse.

En raison des propriétés viscoélastiques du sphéroïde, chaque harmonique présente une réponse distincte, ce qui modifie la forme de la réponse globale, la rendant non strictement triangulaire. Pour mieux comprendre cette déformation, nous avons effectué une analyse spectrale de Fourier de la réponse du sphéroïde, présentée dans la Figure A.9.

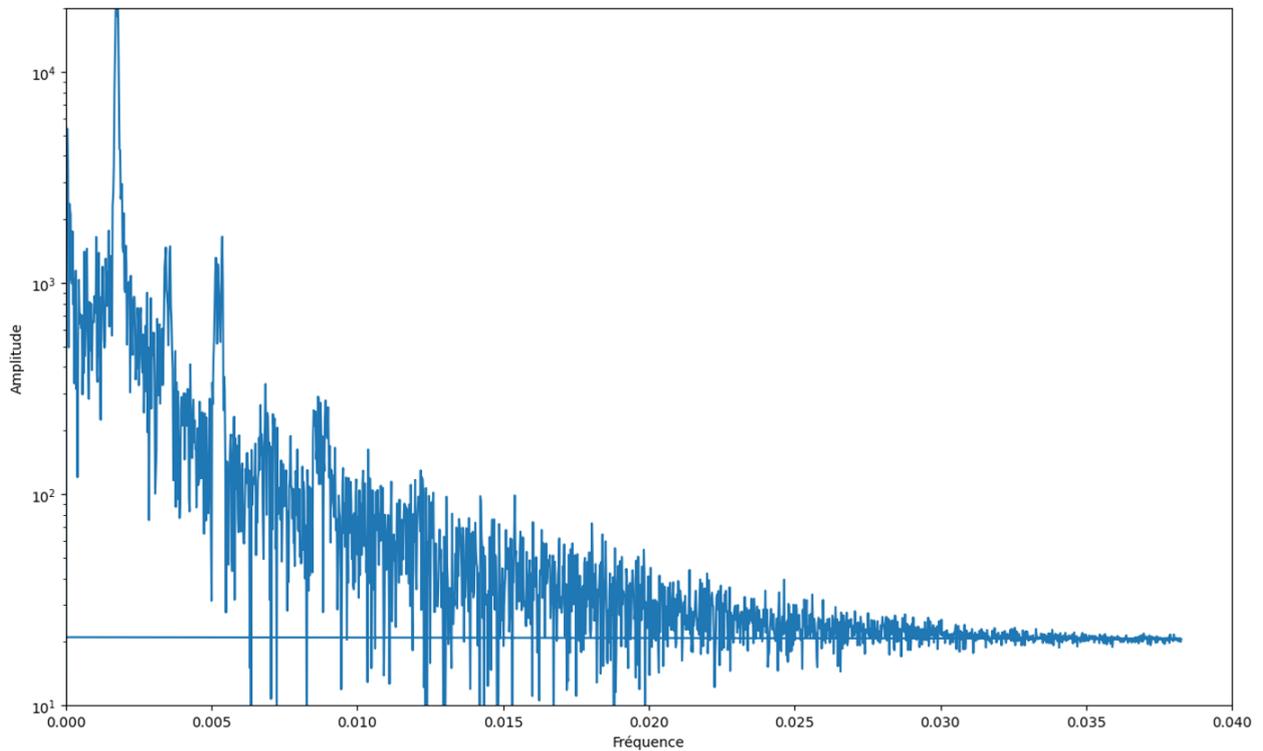


FIGURE A.9 – Spectre de Fourier de la réponse du sphéroïde sous excitation triangulaire, montrant un signal dominé par le bruit en raison de la faible répétition des excitations.

Cependant, la nécessité de limiter le nombre de répétitions de l'excitation pour préserver l'intégrité du sphéroïde a entraîné un faible rapport signal/bruit dans le spectre obtenu, rendant l'analyse de Fourier difficilement exploitable dans ces conditions.

## A.5 Fluorescence des tigettes

Nous avons souhaité quantifier précisément la fluorescence des tigettes afin de déterminer quels fluorophores sont les plus compatibles avec notre dispositif. Pour cela, nous avons réalisé une cartographie de fluorescence 2D à l'aide d'un fluorimètre Fluorolog 3 de Horiba.

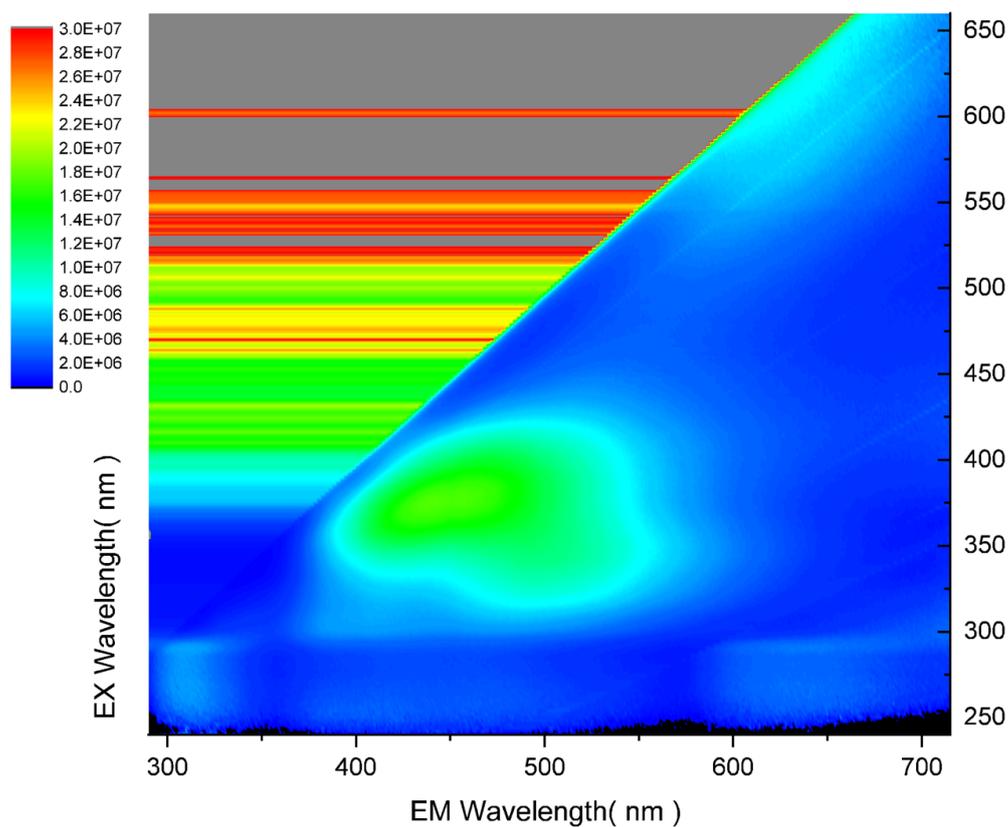


FIGURE A.10 – Caractérisation par spectroscopie de fluorescence des films secs (SUEx) des SMPs. Un signal significatif est observé pour les longueurs d'onde d'émission de 400-520 nm, lorsque les SMPs sont illuminés avec des longueurs d'onde de 340-430 nm.

## A.6 Formation de sphéroïdes grâce à un tampon imprimé en 3D

Pour structurer des coussins d'agarose permettant la formation de sphéroïdes, nous avons développé des tampons imprimés en 3D par stéréolithographie. Ces tampons sont conçus pour créer des empreintes spécifiques dans des plaques 6 puits.

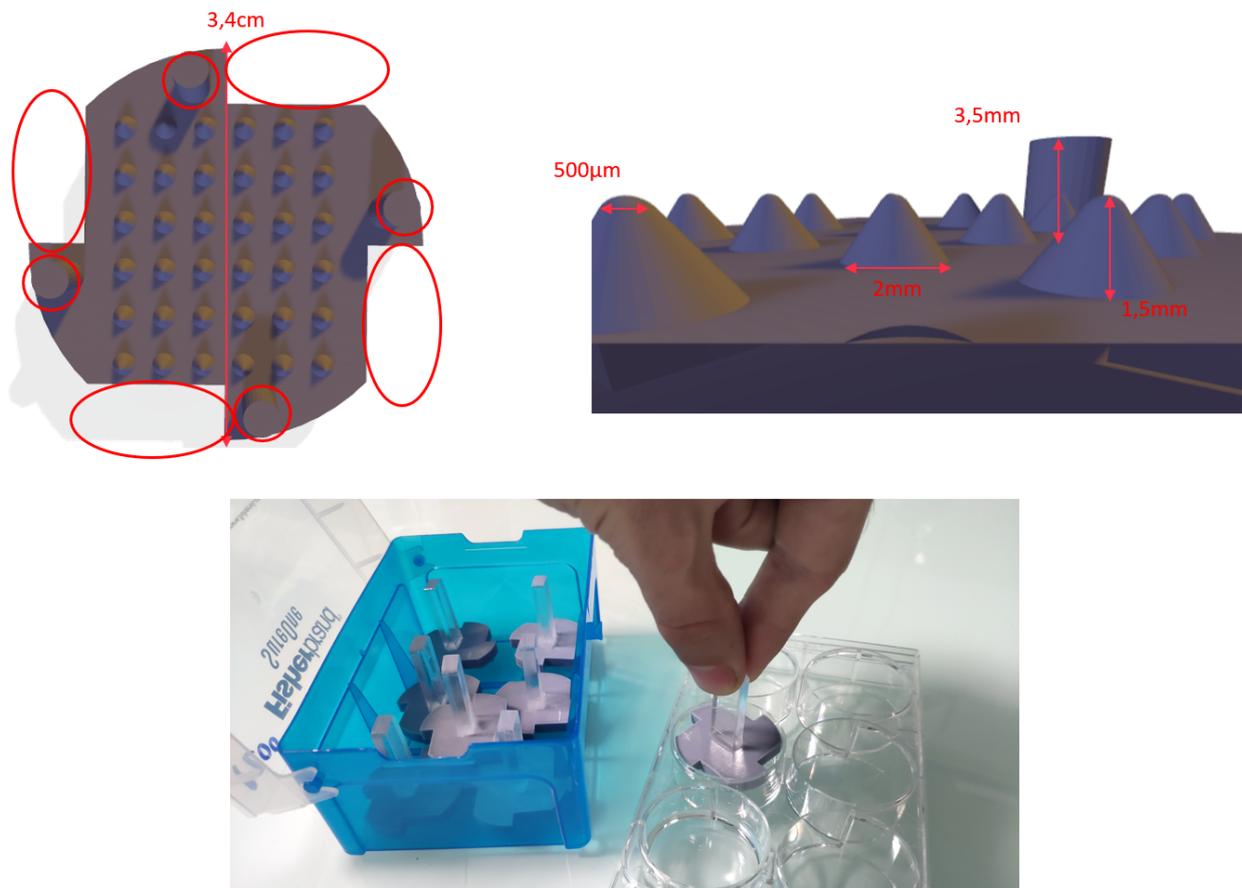


FIGURE A.11 – Schémas 3D des tampons imprimés ainsi qu’une photographie illustrant l’insertion des tampons dans les puits d’une plaque pour structurer l’agarose.

Une solution contenant les cellules en suspension est versée dans les puits de la plaque, dans lesquels un coussin d’agarose structuré a été préalablement formé à l’aide des tampons. Sous l’effet de la gravité, les cellules se sédimentent au fond de chaque puits et, au bout d’une vingtaine d’heures, elles s’agrègent pour former un sphéroïde bien défini.

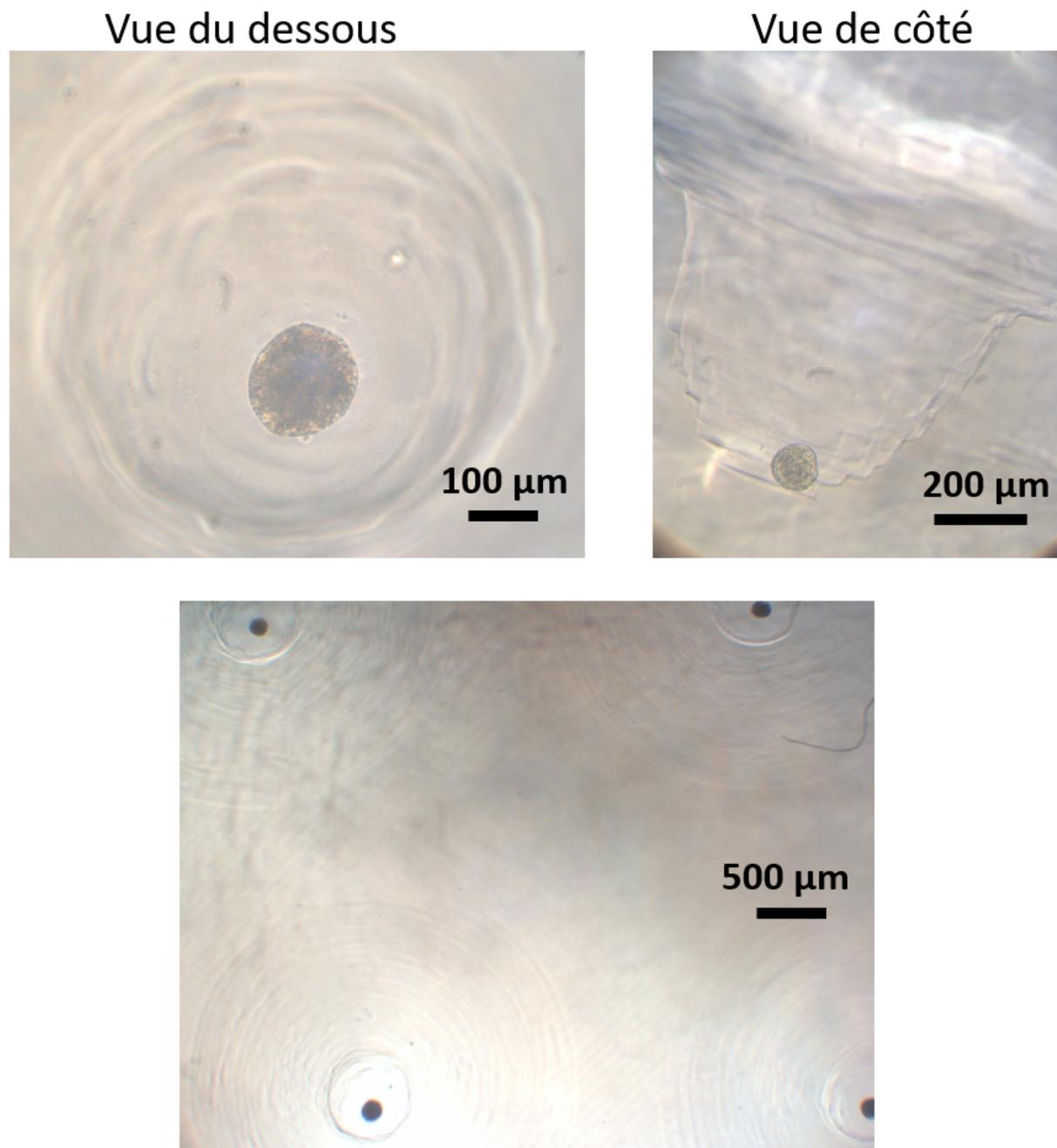


FIGURE A.12 – Images de microscopie des sphéroïdes dans les puits structurés en agarose. Vue de dessus et vue de côté montrant le positionnement du sphéroïde au fond du puits.

## A.7 Dispositif pour l'insertion précise des tiges

Afin d'assurer une insertion contrôlée et précise des tiges dans la puce microfluidique, nous avons développé un dispositif spécialisé. tout en offrant la possibilité de surveiller le processus en temps réel avec un microscope inversé, ce qui est impossible lors d'une insertion manuelle. Grâce à cette méthode, la précision d'alignement est estimée à environ 20 µm,

nettement supérieure aux plus de 100  $\mu\text{m}$  obtenus avec une insertion manuelle.



FIGURE A.13 – Image d'un dispositif conçu pour l'insertion précise de la tigette à l'intérieur de la puce.

## A.8 Mesure de tension de surface

### Coalescence de Sphéroïdes

La fusion de sphéroïdes permet d'étudier les propriétés mécaniques de ces agrégats multicellulaires. Lorsque deux sphéroïdes sont placés en contact, ils commencent à fusionner de manière analogue à des gouttes liquides, phénomène guidé par la tension de surface et freiné par la viscosité du matériau. Ce processus de fusion permet d'évaluer le rapport entre ces deux grandeurs.

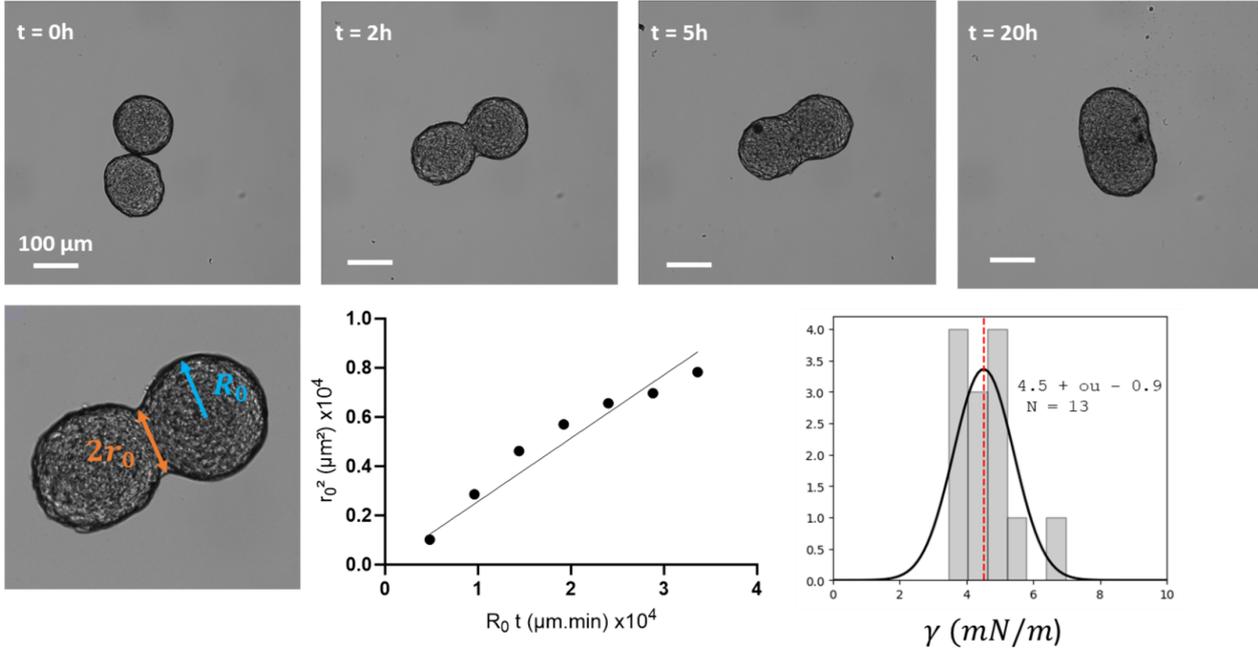


FIGURE A.14 – Séquence temporelle montrant la fusion de deux sphéroïdes A338 placés dans un puits de culture. (b) Évolution temporelle de la taille de la zone de contact entre les sphéroïdes. (c) Histogramme de la tension de surface déduite, selon l'équation A.1, avec une viscosité fixée à  $\eta = 1,2 \cdot 10^6 Pa \cdot s$ .

La fusion de ces agrégats multicellulaires est modélisée par l'équation A.1 (issue de Oriola, 2022), qui relie la dynamique du rayon de la zone de contact entre les deux sphéroïdes ( $r_0$ ) aux paramètres rhéologiques :

$$\left(\frac{r_0}{R_0}\right)^2 = 2^{2/3}(1 - e^{-t/\tau}), \quad \text{avec} \quad \tau = 2^{2/3}R_0\frac{\eta}{\gamma} \quad (\text{A.1})$$

Pour des temps courts ( $t \ll \tau$ ), le développement limité de cette équation permet d'estimer le rapport  $\gamma/\eta$  à partir du comportement linéaire de  $r_0^2$  en fonction de  $t$  :

$$\Rightarrow \text{pour } t \ll \tau \text{ on a : } r_0^2 \sim \frac{\gamma}{\eta} R_0 t.$$

Ces expériences menées sur des sphéroïdes issus de la lignée A338 nous ont permis de mesurer une tension de surface  $\gamma \sim 5 mN/m$ .

### Mesure de la pression seuil

Nous avons également réalisé des mesures de tension de surface en étudiant le régime où des pressions d'aspiration  $\Delta P$  inférieures à la pression critique  $\Delta P_c$  sont appliquées. Pour

cela, nous avons développé un nouveau design de pipette (cf. figure A.15) permettant une meilleure visualisation de l'entrée de la pipette et de ses bords.

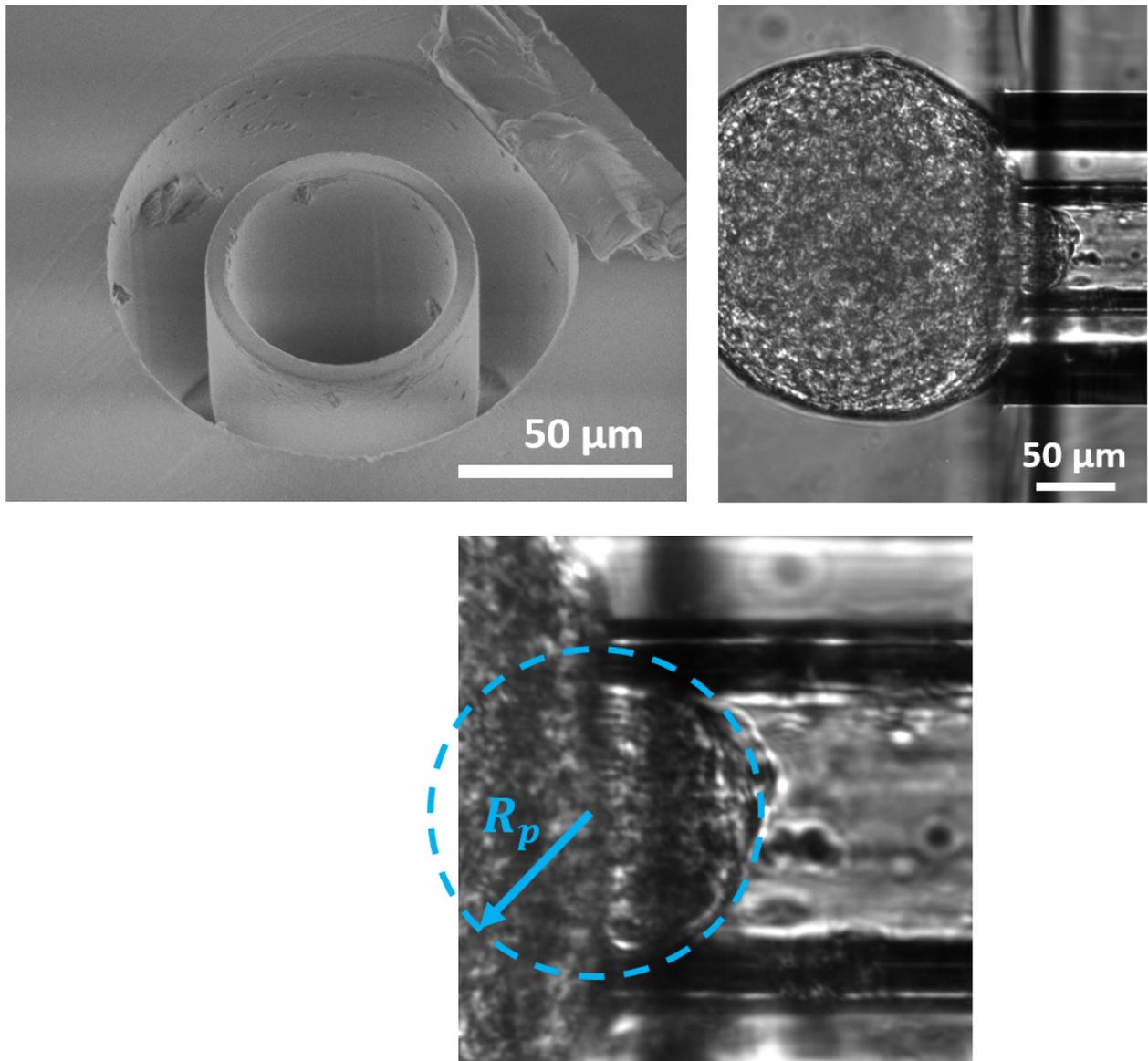


FIGURE A.15 – Image de microscopie électronique à balayage du nouveau design de pipette. Ce design permet d'éviter l'apparition de deux zones sombres sur les bords de la pipette. Image de microscopie montrant un sphéroïde déformé de  $R_p$ .

Nous avons ensuite effectué des paliers de pression de 30 minutes, augmentant la pression de 0,5 mbar à chaque palier. Cela nous a permis de déterminer la pression à partir de laquelle le sphéroïde se déforme au-delà de  $R_p$  et commence à pénétrer dans la pipette. Cette mesure permet de déterminer  $\Delta P_c$  (à 0,5 mbar près) et d'en déduire la tension de surface. Bien que cette étude soit semi-quantitative, nous sommes parvenus à mesurer des tensions de surface proches de 10 mN/m.



**Titre :** Étude de la rhéologie de tissus biologiques 3D et développement d'une technologie microfluidique

**Mots clés :** Viscoélasticité, Microfluidique, Sphéroïdes, Rhéologie, Poroélasticité

**Résumé :** Les tissus biologiques présentent des propriétés mécaniques complexes, à la frontière entre solides élastiques et fluides visqueux. Ces propriétés émergent à l'échelle multicellulaire, en raison des interactions et des réarrangements dynamiques des cellules et de la matrice extracellulaire. La compréhension de ces caractéristiques rhéologiques est cruciale pour des processus biologiques tels que la morphogenèse, la cicatrisation et la progression tumorale.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai considérablement amélioré la technique d'aspiration par micropipette en l'intégrant dans une puce microfluidique innovante. Cette technologie permet de caractériser la rhéologie des tissus de manière plus efficace, en augmentant le débit expérimental tout en offrant un contrôle précis de l'environnement physicochimique pendant les expériences.

Grâce à cette méthode, j'ai exploré les propriétés viscoélastiques de tissus modèles en 3D et étudié les liens entre ces propriétés et leurs origines microscopiques.

En combinant des expériences d'aspiration oscillante, des simulations numériques et des modèles théoriques avancés, ces travaux ont mis en évidence le rôle crucial des écoulements interstitiels dans la mécanique des tissus, soulignant ainsi l'importance de la poroélasticité.

Enfin, l'application de cette technique à des modèles biologiques plus complexes, tels que des organoïdes corticaux ou des tissus embryonnaires de vertébrés, a permis de générer de nouveaux résultats et de contribuer à l'étude des mécanismes fondamentaux en biologie du développement.

**Title:** Study of the rheology of 3D biological tissues and development of a microfluidic technology

**Key words:** Viscoelasticity, Microfluidics, Spheroids, Rheology, Poroelasticity

**Abstract:** Biological tissues exhibit complex mechanical properties at the interface between elastic solids and viscous fluids. These properties emerge at the multicellular level through dynamic interactions and rearrangements among cells and the extracellular matrix. Understanding these rheological characteristics is crucial for various biological processes such as morphogenesis, wound healing, and tumor progression.

In the course of my thesis, I significantly enhanced the micropipette aspiration technique by integrating it into an innovative microfluidic chip. This technology enables more efficient tissue rheology characterization by increasing experimental throughput, while simultaneously providing precise control of the physicochemical environment during experiments.

Using this method, I investigated the viscoelastic properties of 3D model tissues and explored the links between these properties and their microscopic origins.

By combining oscillatory aspiration experiments, numerical simulations, and advanced theoretical models, this work has underscored the vital role of interstitial flows in tissue mechanics, thereby highlighting the importance of poroelasticity.

Finally, applying this technique to more complex biological models, such as cortical organoids or vertebrate embryonic tissues, has produced novel findings and contributed to our understanding of fundamental mechanisms in developmental biology.

