



# **Mesure par microscopie holographique numérique des propriétés viscoélastiques des cellules entières**

**Mémoire**

**Philippe Bilodeau**

**Maîtrise en physique - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Mesure par microscopie holographique numérique des propriétés viscoélastiques des cellules entières**

**Mémoire**

**Philippe Bilodeau**

Sous la direction de:

Pierre Marquet, directeur de recherche  
Erik Bélanger, codirecteur de recherche

# Résumé

L'étude des propriétés viscoélastiques des cellules entières par microscopie optique permet de soustraire de l'information unique sur les caractéristiques des cellules. Il est d'autant plus pertinent d'analyser ces propriétés tout au long de la maturation des cellules en culture pour en extraire de l'information sur le développement ainsi que sur la santé de celles-ci. Cependant, la grande majorité des techniques d'imagerie nécessite l'ajout d'un agent de marquage, alors que les méthodes permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques cellulaires sont d'autant plus invasives. L'emploi de la microscopie holographique numérique est proposé, car cette méthode permet d'imager en temps réel des cellules en culture sans technique de marquage et d'en tirer des données quantitatives. De plus, la microscopie holographique numérique permet d'observer à l'échelle nanoscopique des déformations induites sur ces cellules, sans contact physique entre les cellules et un instrument externe.

Le but de ce projet est de développer des tests en écoulement cisailé permettant d'obtenir les propriétés viscoélastiques des cellules entières de façon précise et non invasive. Les réponses en déformation des cellules, face à la contrainte induite par le fluide en mouvement, sont ensuite interprétées par des modèles viscoélastiques auxquels les propriétés, telles que les constantes de rigidité et de viscosité, sont extraites pour toute la culture simultanément.

Les résultats ont montré que les tests en écoulement cisailé permettent de mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules entières de façon non invasive. Une différence significative a été observée entre les propriétés des cellules NIH 3T3, HEK 293T/17 et des neurones. La constante de rigidité  $E_1$ , ainsi que la constante de viscosité  $\eta_2$  des modèles Standard et Burgers sont des propriétés viscoélastiques des cellules entières permettant la distinction de ces types cellulaires.

# Abstract

The study of viscoelastic properties of whole-cell by optical microscopy allows one to obtain unique information on cell features. It is all the more important to assess those properties all along cultured cell maturation to extract information on its development and health. However, a vast majority of imaging techniques require a marking agent, whilst methods to measure viscoelastic properties are equally invasive. The use of digital holographic microscopy is proposed, since this method allows to image cell culture in real-time without a marking technique and provides quantitative images. Moreover, digital holographic microscopy provides screening deformation at nanoscopic scale induced on cells, without physical contact between the cells and an external instrument.

The goal of this project is to develop shear flow assays allowing precise and non-invasive measurements of whole-cell viscoelastic properties. Cell deformation responses caused by the fluid shear stress are interpreted by viscoelastic models where rigidity and viscosity constants are extracted for the whole cell culture simultaneously.

Results have shown that shear flow assays allow non-invasive whole-cell measurements of viscoelastic properties. A significant difference between cell properties of NIH 3T3, HEK 293T/17 and neurons have been found. The rigidity constant  $E_1$  and the viscosity constant  $\eta_2$  from Standard and Burgers models are viscoelastic properties to be used to discriminate those cell type.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des sigles</b>	<b>x</b>
<b>Liste des symboles</b>	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xiii</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Théorie</b>	<b>5</b>
1.1 Cellule . . . . .	5
1.1.1 Membrane cellulaire . . . . .	7
1.1.2 Cytosquelette . . . . .	8
1.2 Propriétés viscoélastiques cellulaires . . . . .	9
1.3 Méthodes pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules . . . . .	12
1.4 Microscopie holographique numérique . . . . .	13
1.5 Mécanique des fluides . . . . .	17
1.6 Obtention des propriétés viscoélastiques cellulaires . . . . .	21
<b>2 Méthodologie</b>	<b>28</b>
2.1 Caractérisation de la chambre d'imagerie à écoulement cisailé . . . . .	28
2.1.1 Chambre d'imagerie à écoulement cisailé . . . . .	28
2.1.2 Vélocimétrie par localisation de particules en deux dimensions . . . . .	31
2.1.3 Simulation d'écoulement cisailé . . . . .	35
Modélisation de l'écoulement . . . . .	35
Analyse des simulations d'écoulement . . . . .	37
2.2 Préparation des cultures de cellules . . . . .	41
2.2.1 NIH 3T3 . . . . .	42
2.2.2 HEK 293T/17 . . . . .	43
2.2.3 Globule rouge . . . . .	44

2.2.4	Neurone . . . . .	44
2.3	Montage pour test en écoulement cisailé . . . . .	45
2.4	Algorithme d'autofocus . . . . .	46
2.5	Analyse par QP-DHM du déplacement du centre de masse cellulaire lors d'un test en écoulement cisailé . . . . .	48
2.5.1	Conditions d'expérimentation . . . . .	48
2.5.2	Image de phase quantitative obtenue par QP-DHM lors d'un test en écoulement cisailé . . . . .	49
2.6	Traitement des images de phase pour calculer le centre de masse des cellules . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Résultats expérimentaux et analyse</b>	<b>55</b>
3.1	Fonction d'ajustement de courbe . . . . .	55
3.1.1	Identification des paramètres connus . . . . .	56
3.1.2	Structure de la fonction d'ajustement de courbe . . . . .	57
3.2	Prédiction de la réponse en déformation pour un SFA sur des cellules en culture . . . . .	60
3.2.1	Test en écoulement cisailé en déformation . . . . .	60
3.2.2	Test en écoulement cisailé en déformation-relaxation . . . . .	62
3.3	Propriétés viscoélastiques cellulaires à différentes contraintes appliquées . . . . .	65
3.4	Mesure des propriétés viscoélastiques des cellules entières . . . . .	70
3.4.1	Étude des populations cellulaires selon les modèles viscoélastiques . . . . .	70
3.4.2	Comparaison des propriétés viscoélastiques de types cellulaires . . . . .	74
	<b>Conclusion</b>	<b>81</b>
<b>A</b>	<b>Annexe</b>	<b>83</b>
A.1	Microbilles . . . . .	83
A.2	Protocole pour la solution de Tween des microbilles hydrophobes en polyéthylène . . . . .	84
A.3	Vélocimétrie par localisation de particules . . . . .	86
A.4	Protocole de sous-culture des NIH 3T3 . . . . .	87
A.5	Protocole de sous-culture des HEK 293T/17 . . . . .	88
A.6	Pièce personnalisée imprimée en 3D . . . . .	89
A.7	Solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité . . . . .	90
	<b>Bibliographie</b>	<b>91</b>

# Liste des tableaux

2.1	Dimensions spécifiées par le fabricant de la chambre d'imagerie à écoulement cisailé PFC-1 ProFlow. . . . .	30
2.2	Dimensions mesurées de la chambre d'imagerie d'écoulement cisailé PFC-1 ProFlow. . . . .	30
2.3	Comparaison entre les spécifications du fabricant et des simulations obtenues pour les contraintes de cisaillement à 10 $\mu\text{m}$ de la base de la chambre d'imagerie. . . . .	39
2.4	Indice de réfraction moyen des cellules. . . . .	53
3.1	Propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 selon les modèles viscoélastiques pour un SFA en déformation. Les valeurs présentées proviennent de la solution ayant la plus faible valeur de la fonction de coût et l'erreur associée est l'intervalle de confiance sur la solution. La cellule encadrée est présentée à la figure 3.3. . . . .	62
3.2	Propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 selon les modèles viscoélastiques pour un SFA en déformation-relaxation. Les valeurs présentées proviennent de la solution ayant la plus faible valeur de la fonction de coût et l'erreur associée est l'intervalle de confiance sur la solution. La cellule encadrée est présentée à la figure 3.4. . . . .	65
3.3	Propriétés viscoélastiques des cellules entières obtenues par QP-DHM pour un SFA en déformation-relaxation. Les valeurs des propriétés sont les valeurs moyennes de la population avec la déviation standard associée. . . . .	78
A.1	Microbilles utilisées pour la vélocimétrie par localisation de particules dans l'eau. Le diamètre des microbilles est tout aussi important que la densité dans le cas de tests en écoulement cisailé. . . . .	83

# Liste des figures

1.1	Structure d'une cellule eucaryote. . . . .	6
1.2	Images d'un neurone et d'une cellule endothéliale obtenue par QP-DHM. . . . .	6
1.3	Fonctions principales de la membrane cellulaire. . . . .	7
1.4	Schéma d'une membrane cellulaire composée d'une bicouche de phospholipides. . . . .	8
1.5	Structure du cytosquelette d'une cellule fibroblaste NIH 3T3 de souris. . . . .	9
1.6	Illustration des différentes méthodes pour obtenir les propriétés viscoélastiques cellulaires. . . . .	13
1.7	Schéma d'un montage de microscopie holographique numérique. . . . .	15
1.8	Front d'onde plan traversant un corps transparent. . . . .	15
1.9	Schéma de l'obtention des images de phase et d'intensité par microscope holographique numérique. . . . .	16
1.10	La DHM permet de mesurer une déformation cellulaire induite par un écoulement cisailé. . . . .	17
1.11	Représentation matérielle d'un fluide. . . . .	19
1.12	Profils de vitesse d'un écoulement non visqueux et visqueux et profil de cisaillement résultant d'un écoulement visqueux dans un tube. . . . .	19
1.13	Longueur d'entrée dans laquelle l'effet du cisaillement ralentit l'écoulement aux parois et l'écoulement pleinement développé suivant cette région. . . . .	20
1.14	Écoulement d'un fluide réel dans une section rectangulaire appelé écoulement de Poiseuille. . . . .	22
1.15	Le comportement élastique et visqueux d'un matériau est représenté respectivement par un ressort et un piston. . . . .	23
1.16	Modèles viscoélastiques représentant la réponse en déformation d'un matériel sous l'effet d'une contrainte constante . . . . .	23
2.1	Chambre d'imagerie à écoulement cisailé commerciale PFC-1 ProFlow de Warner Instruments. . . . .	29
2.2	Représentation des contraintes de cisaillement maximales à la base de la chambre PFC-1 ProFlow. . . . .	30
2.3	Image d'un écoulement avec microbilles intégrées dans la chambre PFC-1 ProFlow. . . . .	32
2.4	PTV avec des microbilles <i>Polystyrene Blue</i> de diamètre 100 $\mu\text{m}$ et de densité 1.06 $\text{g/cm}^3$ . . . . .	33
2.5	PTV avec des microbilles <i>Red Polystyrene</i> de diamètre 30 $\mu\text{m}$ et de densité 1.06 $\text{g/cm}^3$ . . . . .	34
2.6	PTV avec des microbilles <i>Violet Polyethylene</i> de diamètre 30 $\mu\text{m}$ et de densité 1.005 $\text{g/cm}^3$ . . . . .	35
2.7	Modélisation 3D de la chambre d'imagerie à écoulement cisailé PFC-1 ProFlow de Warner Instruments. . . . .	37



2.8	Profils de vitesse et de cisaillement en 2 . . . . .	38
2.9	Profil de cisaillement à 10 $\mu\text{m}$ de la base de la chambre d'imagerie à différents débits en fonction de la position dans la chambre. . . . .	39
2.10	Résultats de la simulation à 1 mL/min avec les dimensions mesurées de la chambre d'imagerie à 21°C. . . . .	40
2.11	Résultats de la simulation à 8 mL/min avec les dimensions mesurées de la chambre d'imagerie à 21°C. . . . .	41
2.12	Profils de vitesse et de cisaillement pour les simulations complétées avec les dimensions mesurées de la chambre d'imagerie et les conditions d'expérimentation des tests en écoulement cisailé . . . . .	42
2.13	Images de phase reconstruites numériquement avec une même distance de reconstruction, avant et suivant l'application d'un débit. . . . .	47
2.14	Images de phase reconstruites numériquement à l'aide d'un algorithme d'autofocus, avant et suivant l'application d'un débit. . . . .	48
2.15	Signal de phase pour des cellules HEK 293T/17 avant l'application d'un débit. Objectif : 20x. . . . .	50
2.16	Différence du signal de phase d'une cellule HEK 293T/17 sans et avec un débit appliqué. . . . .	50
2.17	Image de la différence de phase à 3 mL/min pour des cellules HEK 293T/17 et NIH 3T3. . . . .	51
2.18	Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d'un SFA sur une cellule HEK 293T/17. . . . .	52
2.19	Modélisation approximative d'une cellule HEK 293T/17. . . . .	53
3.1	Comparaison des fonctions de coût selon les paramètres du modèle Bg. . . . .	58
3.2	Propriétés viscoélastiques d'une cellule NIH 3T3 pour différentes valeurs initiales. . . . .	59
3.3	Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d'un SFA en déformation sur une cellule NIH 3T3. . . . .	62
3.4	Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d'un SFA en déformation-relaxation sur une cellule NIH 3T3. . . . .	64
3.5	Déplacement du centre de masse d'une cellule NIH 3T3 à différentes valeurs de contrainte appliquée d'un SFA en déformation . . . . .	66
3.6	Déplacement du centre de masse d'une cellule NIH 3T3 à différentes valeurs de contrainte appliquée d'un SFA en déformation-relaxation. . . . .	67
3.7	Propriétés viscoélastiques cellulaires obtenues à différentes valeurs de contrainte appliquée d'un SFA en déformation. . . . .	68
3.8	Propriétés viscoélastiques cellulaires obtenues à différentes valeurs de contrainte appliquée d'un SFA en déformation-relaxation. . . . .	70
3.9	Population des propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 obtenues avec le modèle St . . . . .	71
3.10	Population des propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 obtenues avec le modèle Bg . . . . .	72
3.11	Population des propriétés viscoélastiques de cellules HEK 293T/17 obtenues avec le modèle St . . . . .	73
3.12	Population des propriétés viscoélastiques de cellules HEK 293T/17 obtenues avec le modèle de Bg . . . . .	74
3.13	Population des propriétés viscoélastiques de neurones corticaux primaires de rat obtenues avec le modèle St . . . . .	75

3.14	Population des propriétés viscoélastiques de neurones corticaux primaires de rat obtenues avec le modèle de Bg . . . . .	76
3.15	Constantes de rigidité $E_1$ et $E_2$ des cellules NIH 3T3, HEK 293T/17 et neurales déterminées par le modèle St . . . . .	77
3.16	Constantes de viscosité $\eta_1$ des cellules NIH 3T3, HEK 293T/17 et neurales déterminées par le modèle St . . . . .	77
3.17	Constantes de rigidité $E_1$ et $E_2$ des cellules NIH 3T3, HEK 293T/17 et neurales déterminées par le modèle Bg . . . . .	78
3.18	Constantes de viscosité $\eta_1$ des cellules NIH 3T3, HEK 293T/17 et neurales déterminées par le modèle Bg. . . . .	79
A.1	Trajectoires des microbilles de 30 $\mu m$ tracées avec TrackMate (a) sans utiliser de filtres et (b) avec l'ajout de filtres sur les trajectoires. Les lignes de courant conservées sont celles ayant la meilleure qualité et la plus grande distance. . . . .	86
A.2	Base adaptant la chambre PFC-1 ProFlow de Warner Instruments au microscope holographique numérique T1000 de Lyncée Tec. La pièce est réalisée avec SOLIDWORKS et conçue avec une imprimante 3D. . . . .	89
A.3	Exemple d'une solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité causée principalement par des données expérimentales bruitées. Les modèles ne sont pas ajustés sur toute la courbe pour tenter d'atténuer l'erreur reliée aux données. . . . .	90
A.4	Exemple d'une solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité causée principalement par un déplacement du centre de masse augmentant suite au relâchement de la contrainte. Les modèles ne sont pas ajustés sur toute la courbe pour tenter d'atténuer l'erreur reliée aux données. . . . .	90

## Liste des sigles

Sigle	Définition (FR)	Définition (EN)
AFM	Microscopie à force atomique	Atomic Force Microscopy
Bg	de Burgers	-
DHM	Microscopie holographique numérique	Digital Holographic Microscopy
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HEK 293T/17	Cellule embryonnaire rénale humaine	-
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites	Induced Pluripotent Stem Cell
KV	de Kelvin-Voigt	-
Mx	de Maxwell	-
NIH 3T3	Fibroblastes de tissus embryonnaires de souris	-
PTV	Vélocimétrie par localisation de particules	Particle Tracking Velocimetry
QP-DHM	Imagerie de phase par microscopie holographique numérique	Quantitative Phase Imaging by Digital Holographic Microscopy
SFA	Test en écoulement cisailé	Shear Flow Assay
SFC	Chambre d'imagerie à écoulement cisailé	Shear Flow Chamber
St	Standard	-

## Liste des symboles

Symbole	Définition
$A$	Aire (m <sup>2</sup> )
$D$	Diamètre (m)
$D_H$	Diamètre hydraulique (m)
$E$	Constante de rigidité (N/m)
$F$	Contrainte en une dimension (force) (N)
$g$	Vecteur de gravité (m/s <sup>2</sup> )
$h_{cellule}$	Hauteur d'une cellule (m)
$\bar{h}_{cellule}$	Hauteur moyenne d'une cellule (m)
$H$	Hauteur de la SFC (m)
$l_e$	Longueur d'entrée (m)
$m$	Masse (g)
$n$	Nombre de cellules
$n_{cellule}$	Indice de réfraction d'une cellule
$n_{milieu}$	Indice de réfraction du milieu de perfusion
$\bar{n}_{cellule}$	Indice de réfraction moyen d'une cellule
$p$	Résultat du U test de Mann-Whitney
$P$	Périmètre de la section d'écoulement (m)
$Q$	Débit (mL/min)
$r_{COM}$	Déplacement du centre de masse (m)
$Re$	Nombre de Reynolds
$t$	Temps (s)
$t_1$	Temps où une contrainte constante est relâchée (s)
$t_f$	Temps final (s)
$t_i$	Temps initial (s)
$T$	Température (°C)
$u$	Vitesse d'un écoulement (m/s)
$\mathbf{u}$	Vecteur de vitesse d'un écoulement (m/s)
$W$	Largeur de la SFC (m)
$\Delta x_{COM}$	Déplacement du centre de masse en x (m)
$x$	Coordonnée en x d'un pixel
$\Delta y_{COM}$	Déplacement du centre de masse en y (m)
$y$	Coordonnée en y d'un pixel
$z$	Coordonnée de la hauteur dans la SFC (m)

Symbole	Définition
$\varepsilon$	Déformation
$\varepsilon_P$	Déformation du piston
$\varepsilon_R$	Déformation du ressort
$\varepsilon_T$	Déformation totale
$\tau$	Contrainte de cisaillement (Pa)
$\tau_{base}$	Contrainte de cisaillement à la base (Pa)
$\rho$	Masse volumique (kg/m <sup>3</sup> )
$\phi, \Phi$	Phase (rad)
$\lambda$	Longueur d'onde (m)
$\eta$	Constante de viscosité (Ns/m)
$\mu$	Viscosité dynamique (Pa.s)
$\sigma$	Contrainte en deux dimensions (Pa)
$\sigma_0$	Contrainte en deux dimensions constante à $t = 0$ (Pa)
$\sigma_P$	Contrainte du piston (Pa)
$\sigma_R$	Contrainte du ressort (Pa)
$\sigma_T$	Contrainte totale (Pa)

# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon projet de maîtrise et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de recherche, Dr. Pierre Marquet, ainsi que mon codirecteur de recherche, Erik Bélanger, pour leur patience, leur disponibilité et surtout leurs précieux conseils qui ont contribué à faire avancer mon projet avec motivation. Ce projet n'aurait pas été le même sans votre aide.

Je tiens à remercier également mes parents, ma soeur, ma famille, mes amis et tout particulièrement Antoine, Pauline et Théo pour m'avoir épaulé et apporté un support moral et intellectuel tout au long de mon projet.

Un remerciement tout spécial à ma copine Sabryna qui a su m'écouter et qui a été présente pour moi dans les moments plus difficiles. Merci d'avoir su m'encourager et soutenu durant ces deux années. Ton support m'a été d'une grande aide et je t'en remercie. Surtout, merci de partager mon quotidien (♪).

# Introduction

Les cellules sont une partie intégrante du fonctionnement des êtres vivants. Les cellules eucaryotes ont plusieurs fonctions et utilités dans un système biologique. Ces fonctions et utilités sont dictées par leur matériel génétique contenu dans le noyau cellulaire. Parmi ces fonctions, les cellules peuvent se diviser, effectuer la biosynthèse des protéines et effectuer la transduction de signaux. Elles ont aussi des fonctions mécaniques de manière à ce que leur intégrité structurale demeure intacte et qu'elles résistent aux conditions extérieures de leur environnement. Ces fonctions sont gérées principalement par la membrane cellulaire et le cytosquelette. La membrane cellulaire est composée d'une bicouche formée de phospholipides qui sépare le cytoplasme de la cellule de l'environnement extérieur. Ainsi, elle protège la cellule de son environnement et permet l'échange sélectif d'ions et de molécules organiques. Le cytosquelette, pour sa part, est l'ensemble de la cellule composé des polymères organiques qui lui prodigue des propriétés mécaniques. L'étude des structures subcellulaires, tels que les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires qui constituent le cytosquelette, a permis d'améliorer grandement la compréhension des fonctions de la cellule et a été bénéfique pour plusieurs domaines de la science.

En analysant les fonctions des cellules, des études ont permis de détecter des cellules saines de celles malades. Il a été montré, notamment, que les globules rouges d'une personne atteinte de malaria montraient une déformabilité plus faible que les globules rouges sains [1]. Une déformabilité faible a pour effet de ralentir le déplacement des globules rouges dans le corps, puisqu'à certains endroits, les globules subissent une déformation élastique à 100% de leur taille initiale pour traverser les capillaires étroits et retournent à leur forme initiale ensuite [2]. C'est un des nombreux exemples de l'importance des propriétés viscoélastiques des cellules dans leur fonctionnement. De ce fait, l'étude de la constante de rigidité ( $E$ ) est impérative pour discerner un écart entre les globules sains et malades. Par ailleurs, l'étude de la constante de viscosité ( $\eta$ ) peut révéler de l'information intéressante sur l'état des cellules et mérite d'être poursuivie (sections 1.2 et 1.6). La connaissance approfondie de ces propriétés permettra de distinguer une cellule ayant un fonctionnement normal d'une cellule malade où certaines fonctions sont affectées. Pour mieux comprendre les bases du fonctionnement du matériel biologique, des études approfondies sur la déformation et la dynamique structurelle des cellules vivantes sont indispensables.

À partir des années 80, de nombreux groupes de recherches ont développé des méthodes et ins-

truments permettant d'extraire les propriétés viscoélastiques des cellules [3] en appliquant une force, de l'ordre du piconewton ( $10^{-12}$  N), provoquant une déformation, de l'ordre du nanomètre ( $10^{-9}$  m), aux cellules [3]. De cette manière, une déformation est induite sur la cellule et la réponse de cette dernière à différentes forces permet d'en retirer de l'information sur son comportement viscoélastique. Certaines méthodes consistent à sonder localement la cellule à l'aide d'instruments, comme la microscopie à force atomique [4], les pinces optiques [5] et la cytoindentation [6], alors que d'autres consistent à sonder tout le corps cellulaire, comme c'est le cas avec l'aspiration par micropipette [7] et les dispositifs optiques d'étirement [8]. De ce fait, les méthodes développées et utilisées actuellement pour obtenir les propriétés viscoélastiques des cellules ne sont pas parfaites. Elles permettent, certes, d'extraire les propriétés mécaniques, mais de manière invasive, par exemple par indentation, où un outil nécessite d'être en contact direct avec la cellule. De plus, des techniques comme la pince optique emploient un procédé expérimental fastidieux qui ne s'effectue que sur une seule cellule à la fois.

Une déformation cellulaire peut être induite par une compression, une traction, une rotation ou un cisaillement, mais comme chaque type cellulaire est différent, allant de sa forme à son environnement privilégié, il est difficile d'utiliser une seule méthode pour analyser tous les types cellulaires et en comparer les résultats. Cela nécessite, selon la technique employée, que les cellules soient retirées de leur environnement pour être analysées, ce qui impacte négativement leur fonctionnement. Puisque les globules rouges s'écoulent dans le corps de façon indépendante, il est possible que l'étude de leurs propriétés viscoélastiques ne soit pas influencée par la méthode utilisée. Certes, il se peut qu'une obstruction causée par des globules en aval dans un capillaire impacte le déplacement d'un second, mais habituellement ils ne dépendent pas les uns sur les autres pour se déplacer ou s'envoyer des signaux comme le font les neurones et les cellules en culture. Ces dernières se développent en culture et leur fonctionnement dépend grandement des cellules les entourant et de leur environnement. Ainsi, une méthode non invasive ne nécessitant pas de retirer les cellules de leur environnement est de mise pour l'étude des cellules en culture.

Une méthode non invasive permettant d'induire une déformation à une population de cellule, tout en les conservant dans leur environnement, se nomme *shear flow assay* ou test en écoulement cisailé (SFA). En appliquant un écoulement fluide dans l'environnement des cellules, le fluide applique une contrainte de cisaillement sur l'ensemble des cellules simultanément, résultant en une déformation. Cette méthode est utilisée depuis les années 70 pour déformer des globules rouges et analyser leur réponse à une contrainte de cisaillement [9; 10; 11]. En modifiant le débit du fluide entrant, il est possible d'induire des déformations dont l'intensité varie proportionnellement en fonction du débit. Par contre, les résultats obtenus dans ces études ne sont que qualitatifs puisque les images sont obtenues par microscopie à contraste de phase. Seules les mesures de la forme de la cellule peuvent en être soutirées. Or, d'autres méthodes permettant d'acquérir des résultats quantitatifs se sont développées au détriment du maintien des cellules dans leur environnement. Depuis les années 2000, une forte croissance de l'intérêt et du progrès envers la microscopie holographique numérique (DHM) [12] offre la possibilité d'obtenir des résultats quantitatifs sur les cellules tout en utilisant la méthode de



déformation cellulaire par écoulement cisailé. La DHM s'appuie sur la différence d'indice de réfraction entre la cellule et son milieu, ainsi que la hauteur de la cellule pour créer le contraste dans une image. Il n'y a donc aucun agent de marquage utilisé en DHM pour analyser les cellules. En utilisant ces deux méthodes conjointement, il est possible d'induire de façon non invasive une déformation à l'échelle nanométrique sur des cellules en culture, tout en obtenant des images quantitatives qui permettent de détecter la déformation [13; 14]. La réponse des cellules à la déformation induite peut ensuite être représentée par la rhéologie, plus précisément la viscoélasticité, qui signifie qu'un matériau possède des propriétés élastiques et visqueuses. Les résultats sont ainsi analysés par des modèles théoriques consistant en un nombre fini de ressorts linéaires (caractéristique élastique) et de pistons (caractéristique visqueuse) [15; 16; 17]. La cellule est considérée se comporter comme un matériau viscoélastique et la courbe de réponse en déformation théorique est utilisée pour obtenir ses propriétés viscoélastiques ( $E$  et  $\eta$ ) [13; 14; 18].

À l'aide de la DHM et des SFA, ainsi que de l'avènement des cellules souches pluripotentes induites [19], l'analyse des propriétés viscoélastiques des cellules en culture telles que les neurones dérivés de patients devient un enjeu envisageable. Cela permet de faire avancer davantage la recherche dans le domaine des neurosciences, puisque les cellules souches pluripotentes induites sont une alternative aux cellules souches embryonnaires. Par une simple biopsie de la peau chez un patient, il est possible, par différents procédés, d'obtenir tous les types cellulaires du corps humain, dont les neurones [20]. Cela offre la chance d'étudier des cultures cellulaires du système nerveux provenant directement de patients atteints de maladies psychiatriques, par exemple. Ces troubles psychiatriques majeurs tels que la schizophrénie, le trouble bipolaire et la dépression majeure récurrente représentent un lourd fardeau pour les gens qui en sont atteints, et leur entourage. À ce jour, comme ces maladies demeurent incurables une fois le diagnostic clinique posé, il devient important de pouvoir détecter de façon précoce un risque de développer ces troubles dès l'enfance. En effet, il a été montré que les cellules souches neurales et les neurones dérivés de gens atteints de schizophrénie avaient des différences au niveau de leur physiologie [21]. À cet effet, la combinaison de toutes ces techniques permettra une meilleure compréhension des processus neurodéveloppementaux des patients atteints de grandes maladies psychiatriques.

Le but de ce projet est de développer des tests rhéologiques sur des cellules en culture permettant d'obtenir leurs propriétés viscoélastiques de façon non invasive. Une déformation cellulaire, quantifiable par DHM, est induite par l'application d'un écoulement cisailé sur des cellules adhérentes, et ce, sans contact avec un instrument externe. Les réponses en déformation des cellules, face aux contraintes de cisaillement, sont ensuite traduites en un modèle viscoélastique par lequel les propriétés, telles que les constantes de rigidité et de viscosité, sont extraites pour toute la culture simultanément. En outre, cette nouvelle approche combinant la DHM et les tests rhéologiques pour l'obtention des propriétés viscoélastiques permettra de caractériser les cellules de manière non invasive à l'aide d'une approche particulièrement innovante. L'étude subséquente des propriétés des cellules entrainera une compréhension approfondie de leur développement et facilitera l'identification de possibles disparités entre

les propriétés des cellules.

# Chapitre 1

## Théorie

### 1.1 Cellule

Il existe deux types de cellules : les cellules procaryotes (unicellulaires) et les cellules eucaryotes (unicellulaires ou multicellulaires). Ces dernières sont caractérisées par la présence d'un noyau contenant le matériel génétique de la cellule. Les cellules végétales et animales sont des cellules eucaryotes et seront davantage décrites, car elles sont utilisées dans ce projet<sup>1</sup>. Les cellules sont des structures biologiques capables de se dupliquer et de se réparer par elles-mêmes de manière à s'adapter ou résister à leur environnement [22]. Cela est possible grâce aux multiples molécules contenues à l'intérieur de chacune des cellules par la membrane cellulaire, comme imagé à la figure 1.1.

La membrane cellulaire entoure le cytoplasme, qui lui, occupe la grande majorité du volume cellulaire. Comme dit précédemment, un noyau est présent à l'intérieur du cytoplasme, ce qui caractérise la cellule eucaryote. De plus, d'autres structures existent dans le cytoplasme et sont généralement classées en deux groupes. Les organelles sont les structures du cytoplasme ayant au moins une membrane distincte les entourant. Parmi celles-ci, on dénombre la mitochondrie, le chloroplaste et le reticulum endoplasmique. Les structures n'ayant pas de membranes forment des régions où des fonctions spécifiques de la cellule sont effectuées. Par exemple, le cytosquelette est formé de fibres servant au maintien de la structure et de la forme de la cellule. Certaines de ces structures (1.1) seront décrites davantage dans les sous-sections subséquentes. De plus, la figure 1.1 est affichée seulement à titre indicatif pour illustrer les différentes structures de la cellule, car chaque type cellulaire adopte une composition et une forme unique. En effet, les cellules varient énormément en taille, en apparence et en fonction. Par exemple, une cellule neurale possède des axones et des dendrites qui lui permettent de transmettre des signaux électriques aux autres neurones environnants (figure 1.2a), alors que les cellules endothéliales adoptent une forme allongée et compacte les unes entre les autres pour contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins (figure 1.2b).

Fondamentalement, l'utilité des cellules chez les organismes vivants est de contribuer à l'homéo-

---

1. Par la suite, lorsque sera mentionné une *cellule*, c'est de la cellule eucaryote qu'il sera traité.

stasie, qui s'explique par l'état d'équilibre dynamique des paramètres nécessaires à la vie chez un organisme vivant. Il existe donc une régulation des paramètres importants dans le système pour assurer sa survie, par exemple l'eau chez l'être humain. Ainsi, des structures physiques et physiologiques permettent que toutes les cellules soient approvisionnées en eau adéquatement. Un léger déséquilibre et cela peut provoquer un choc osmotique chez les cellules. Dans un système en santé, il y a régulation de la circulation du sang, du taux de sucre, de l'apport en ions et autres. Par contre, lorsqu'il y a dérégulation de ces paramètres et que le système s'éloigne de l'homéostasie, des maladies peuvent se développer. Il est donc impératif d'analyser les fonctions des cellules pour comprendre ou éviter le déséquilibre de l'homéostasie.

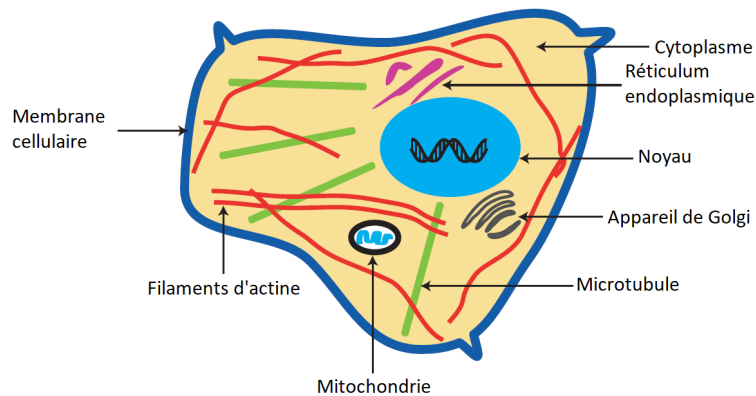
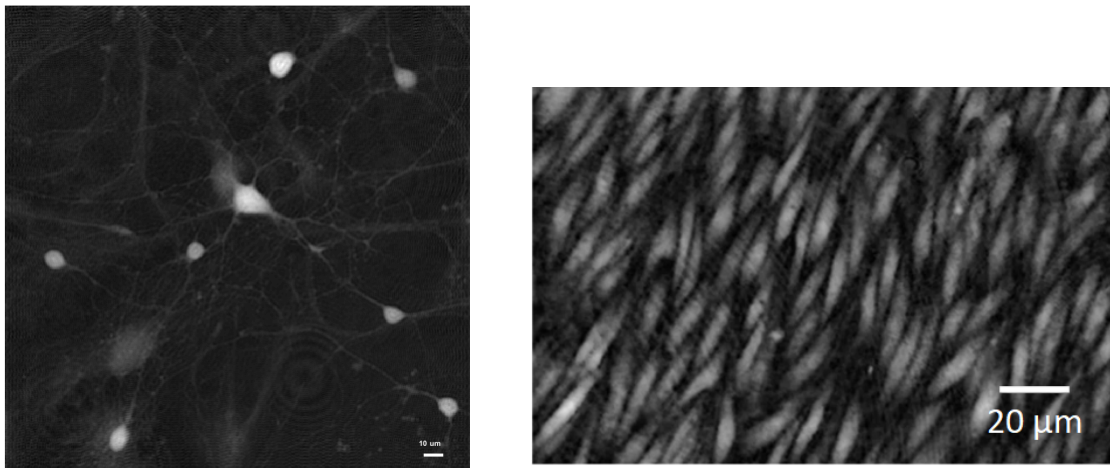


FIGURE 1.1 – Structure d'une cellule eucaryote. Image adaptée de Bao et al. [23].



(a)

(b)

FIGURE 1.2 – (a) Image d'un neurone et (b) d'une cellule endothéliale imagés par QP-DHM. Image de la cellule endothéliale tirée de Odenthal-Schnittler et al. [24].

### 1.1.1 Membrane cellulaire

Tous les types cellulaires sont composés d'au moins une membrane cellulaire [22; 25; 26], cela leur permet de protéger les composants chimiques nécessaires à leur survie de l'environnement extérieur. Cette membrane est donc essentielle pour qu'une cellule ou un organisme soit considéré vivant, puisque s'il ne peut contenir son noyau, ses protéines et ses molécules dans un ensemble, il est voué à ne pas pouvoir proliférer. La fonction de la membrane cellulaire va au-delà d'un simple intermédiaire entre l'environnement et l'intérieur de la cellule (figure 1.3). En fait, elle permet aussi l'apport en nutriments, ainsi que l'expulsion des déchets de la cellule. Ce sont les protéines dans la membrane qui permettent ce transfert, car certaines permettent le passage de petites molécules et d'ions spécifiques. Chacune des protéines agit donc comme un transporteur ou un canal pour un type d'ion ou de molécule spécifique. Or, il y a des protéines dans la membrane agissant en tant que récepteurs pour informer la cellule des changements dans l'environnement, de manière à réagir adéquatement. De plus, la membrane possède des propriétés mécaniques qui lui permettent de se déformer, de bouger ou de croître sans se rompre. Par exemple, lors de la croissance de la cellule, sa membrane s'allonge et ajoute à sa membrane des molécules de façon à s'élargir sans se briser. De ce fait, la membrane cellulaire occupe des fonctions primordiales à la santé d'une cellule et participe au bon fonctionnement d'un organisme.

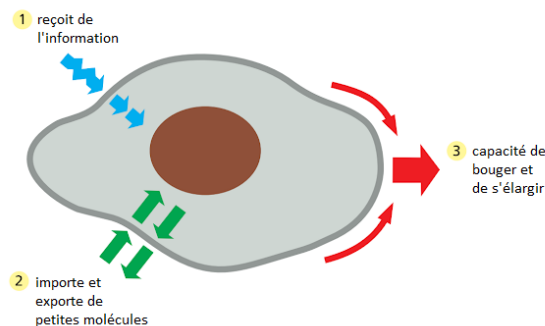


FIGURE 1.3 – Fonctions principales de la membrane cellulaire. Image adaptée de Alberts et al. [22].

La membrane cellulaire est composée de deux couches continues de molécules lipidiques (phospholipides) dans lesquelles des protéines sont présentes (figure 1.4). Cette bicouche agit comme barrière pour la plupart des cellules solubles dans l'eau. Les phospholipides formant la membrane sont constitués d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Ces comportements sont très importants pour les cellules vivant dans des milieux aqueux, puisque le cytoplasme et l'environnement contiennent de l'eau. C'est pour cette raison que la membrane est formée d'une bicouche de phospholipides où les têtes hydrophiles sont en contact avec l'eau et les queues hydrophobes forment l'intérieur de la membrane. Dues à leur polarité, les têtes hydrophiles sont attirées vers les milieux aqueux et les queues vers elles-mêmes, formant ainsi la bicouche qui est présentée sous un schéma à la figure 1.4. En outre, la membrane adopte toujours une forme continue, car si elle n'est pas fermée, les queues hydrophobes seront en contact avec le milieu aqueux et seront repoussées jusqu'au moment où les limites de la bicouche se rejoignent. Une fois cet équilibre atteint, la bicouche peut toujours être

flexible et se plier. C'est ce qui donne les propriétés mécaniques importantes à la membrane cellulaire.

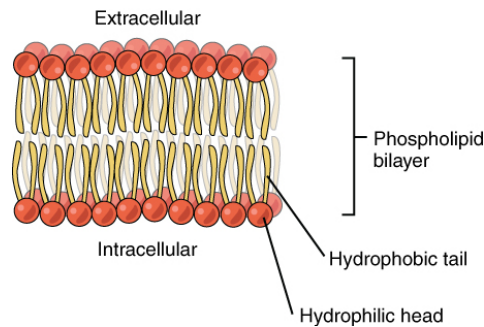


FIGURE 1.4 – Schéma d'une membrane cellulaire composée d'une bicouche de phospholipides. Image adaptée de Stax [25].

### 1.1.2 Cytosquelette

Dans une cellule, le cytosquelette est l'ensemble des protéines formant des filaments pouvant être fixées sur les parois de la membrane cellulaire ou du noyau [22]. Cela prodigue à la cellule son intégrité structurelle et sa résistance aux forces mécaniques [3]. Les protéines en filaments du cytosquelette se distinguent en trois groupes : les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires. Ces trois protéines filamenteuses peuvent être observées à la figure 1.5.

Les microtubules sont des fibres rigides en forme de tube creux, composés de polymères de tubulines, ce qui fait d'eux les composants les plus rigides du cytosquelette. Ils permettent à la cellule de résister aux forces de compression et de tension qu'elle subit. De ce fait, la cellule peut regagner sa forme initiale suite à un choc ou une force. De plus, les microtubules sont importants lors de la division cellulaire, ou mitose, puisqu'ils se réorganisent de manière à former le fuseau mitotique lors de la division cellulaire.

Les microfilaments, ou filaments d'actine, sont plus flexibles due à leur forme hélicoïdale et sont principalement retrouvés dans les fibres musculaires. Ils sont composés de polymères de protéines d'actine G qui aide au mouvement de la cellule et qui lui donne sa structure. Ils sont acteurs dans la contraction musculaire, du maintien de la forme cellulaire, du transport intracellulaire et de la division de la cellule lors de la mitose. Les microfilaments sont une structure importante chez tous les types de cellules eucaryotes.

Pour ce qui est des filaments intermédiaires, ils ont aussi la caractéristique d'être très résistants permettant à la cellule de résister à des forces de traction excessives et forment la structure du noyau de la cellule. Leur composition est variée : kératine, desmine, vimentine, lamina nucléaire et neurofilaments. De plus, ils favorisent l'ancrage des organites dans la cellule.

Autrement dit, le cytosquelette est un réseau de plusieurs types de protéines filamenteuses ayant un impact sur plusieurs fonctions de la cellule. Il donne la forme, la motilité et la résistance aux forces

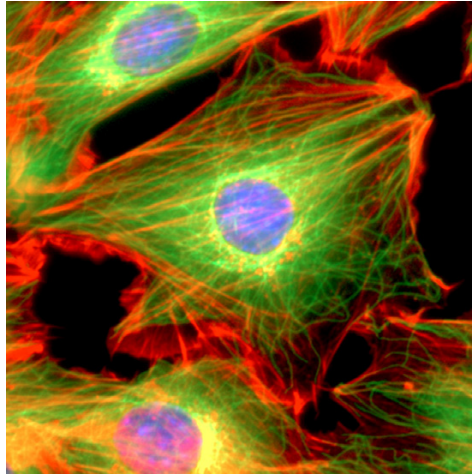


FIGURE 1.5 – Structure du cytosquelette d’une cellule fibroblaste NIH 3T3 de souris. Les microtubules sont marqués en vert, les microfilaments en rouge et le noyau en bleu, autour duquel les filaments intermédiaires se situent (lamines). Image tirée de Suresh [3].

externes aux cellules. Il joue aussi un rôle important lors de la division cellulaire, ainsi que pour la prolifération des cellules et la régulation de l’expression génétique.

## 1.2 Propriétés viscoélastiques cellulaires

Les propriétés viscoélastiques des cellules sont des indicateurs importants sur la santé de celles-ci [27]. En effet, une modification dans la fonction de la cellule causée par des procédés biochimiques provenant d’une maladie, par exemple, peut affecter ses propriétés viscoélastiques. Que ce soit par des procédés physiologiques ou pathophysiologiques, les propriétés viscoélastiques des cellules sont fréquemment affectées.

Tout d’abord, plusieurs études sur les globules rouges ont montré que la rigidité de leur membrane est influencée par plusieurs facteurs [28; 29; 13]. En fait, elle est sensible à tout changement dans leur environnement. Des tests de déformabilité *in vitro* ont été effectués sur une population de globules rouges dans lesquels ils traversent des canaux de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre, forçant une déformation cellulaire d’environ 100% [28]. En diminuant la température dans le milieu physiologique à une température ambiante, le temps nécessaire aux globules rouges pour traverser les mêmes canaux augmente. Une perte de déformabilité est observée lorsque la température du milieu descend sous 37°C. Aussi, il a été montré que les propriétés visqueuses de la membrane dominent la façon dont s’écoule un globule [28]. De plus, cette même équipe a étudié la dynamique de globules rouges de patients atteints de drépanocytose, une maladie génétique affligeant la conformation de l’hémoglobine. Les globules rouges atteints sont facilement identifiables par leur forme allongée et rigide. Cette maladie peut causer des manifestations vasculo-occlusives dues aux propriétés viscoélastiques affectées des globules rouges. Ayant une faible déformabilité comparativement aux globules rouges sains, il a été observé que les globules rouges falciformes engendrent davantage d’obstructions dans des structures

inspirées de capillaires [30]. Par ailleurs, ces cas d'obstructions ont augmenté de 40% suite à la baisse de la concentration d'oxygène dans le milieu. Sous cette condition d'hypoxie ( $< 5\% O_2$ ), les propriétés viscoélastiques des globules rouges sont, à un plus haut degré, altérées. En outre, les conditions expérimentales dans lesquelles les cellules sont analysées sont des paramètres pouvant influencer leurs propriétés viscoélastiques.

D'autres maladies infectieuses comme la malaria ont des effets d'autant plus drastiques sur les propriétés viscoélastiques des globules rouges. Les globules rouges affectés par la *Plasmodium falciparum*, un parasite humain de la malaria, voient leur rigidité grandement altérée. Il a été montré par des tests analogues au paragraphe précédent, que la vitesse de passage des globules rouges dans une structure favorisant leur déformation, était plus lente chez les globules atteints de malaria en stage de développement avancé [29]. Il est intéressant de remarquer que la diminution de la déformabilité n'apparaît pas soudainement au moment de l'infection, mais plutôt se détériore à partir de ce moment. Une diminution de la valeur d'indice de réfraction a aussi été remarquée par l'imagerie de phase quantitative lors des différents stades de l'infection [31]. La mesure du module de cisaillement ( $G$ ) effectuée par pince optique indique une rigidité de membrane supérieure dans les derniers stades de développement du parasite à celle d'un globule rouge en santé [31].

Par ailleurs, l'âge des globules rouges est aussi un facteur influençant la rigidité de leur membrane. En effet, les réticulocytes sont plus volumineux que les globules rouges matures et démontrent une rigidité supérieure. Il a été démontré qu'ils se déplaçaient à environ 60% de la vitesse des globules rouges matures sous des conditions de déformabilité élevée [29]. Par contre, la déformabilité d'une cellule ne peut être utilisée comme seul et unique potentiel biomarqueur [29], une étude plus approfondie sur les propriétés des cellules et des données plus quantifiables que simplement la vitesse des cellules traversant un capillaire sont nécessaires.

D'autre part, il a été observé que les propriétés viscoélastiques d'autres types cellulaires varient au cours du développement et lors de l'apparition de maladies. En effet, les cellules cancéreuses voient leur cytosquelette altéré, dû à un changement de la proportion des protéines favorisant la liaison de l'actine, ainsi que par le changement des fonctions cellulaires [32; 33]. Ces études ont observé un écart entre les valeurs du module de Young (comportement élastique) des cellules saines face aux cellules cancéreuses. De plus, il est noté que l'écart entre ces valeurs augmente lors du développement de la maladie [33]. En outre, une diminution du module d'élasticité est remarquée chez des cellules humaines épithéliales tumorales lors du traitement à un lipide bioactif présent en grande quantité chez des personnes atteintes du cancer de l'ovaire [34], alors que les propriétés viscoélastiques des fibroblastes sont altérées tout au long de leur transformation causée par un cancer [35]. Il a été montré que cette transformation cause des dérèglements sur l'organisation du cytosquelette, une diminution de la surface qu'occupe une cellule et une carence en fibres d'actine. En outre, toutes les cellules transformées deviennent plus souples que les cellules normales [35].

Cependant, l'étude de l'élasticité d'une cellule n'est pas le seul indicateur de sa santé. En fait,



l'étude de la viscosité informe sur la fonction du cytoplasme de la cellule [36; 37; 38; 32]. Ainsi, la viscosité d'une cellule lui prodigue ses caractéristiques qui s'apparentent à celles d'un fluide. Ces propriétés proviennent de l'intérieur de la cellule ou en partie du cytosquelette [37]. Il a été observé que, suivant la déformation d'une cellule, l'apparition de dissipation visqueuse par cette dernière est due à son comportement visqueux. De plus, une forte composante visqueuse est observée, lors de tests en traction, alors que la force uniaxiale diminue exponentiellement suite à l'application d'une force initiale [37]. À cet effet, les propriétés visqueuses peuvent varier sans toutefois que celles élastiques varient dans certaines maladies [27; 37]. Le comportement visqueux d'une cellule peut aussi être remarqué suite à une déformation qui lui est appliquée. La cellule tente de retrouver sa forme initiale, dû à ses propriétés élastiques, mais ce retour ne se complète pas instantanément, il prend un certain temps. C'est ce qu'on appelle le temps de relaxation et il est influencé par la viscoélasticité de la cellule. Les propriétés visqueuses de cette dernière peuvent créer une déformation plastique, ou permanente, sur le corps cellulaire. À la fin du temps de relaxation, une forme cellulaire différente de la forme initiale pourra être observée. Dans ce cas, la viscosité cellulaire est donc supérieure à son élasticité. En général, la cellule retourne à sa forme initiale suivant un comportement exponentiel, dans lequel ses propriétés élastiques jouent un rôle, alors qu'une déformation permanente du corps cellulaire est causée par ses propriétés visqueuses. Il est donc clair que si l'un ou l'autre des comportements est affecté négativement, le caractère viscoélastique de la cellule est affecté. Conséquemment, l'analyse de ses propriétés viscoélastiques peut informer sur la santé de celle-ci. D'ailleurs, il a été possible d'évaluer ces propriétés sur des neurones vivants par élastographie et par microscopie à force atomique dans les dernières années [39]. Avec l'avènement des iPSCs et la DHM, cela ouvre la porte à l'étude neurologique des propriétés viscoélastiques cellulaires pour les maladies psychiatriques. En outre, il a été montré que la maladie d'Alzheimer affecte les cellules neurales lors de leur développement [40]. De plus, l'étude des propriétés visqueuses de l'hippocampe d'une souris atteinte d'Alzheimer indique des propriétés relativement plus faibles que chez des contrôles, alors que les propriétés élastiques sont plus basses en début de développement, mais augmentent au cours du développement. De ce fait, les propriétés viscoélastiques de chaque type cellulaire sont sensibles à certains changements les entourant. Il est donc plausible d'affirmer que ces propriétés pourraient différer chez des personnes ayant développé une maladie psychiatrique.

D'après des résultats obtenus chez des schizophrènes ayant des symptômes négatifs, des chercheurs étudiant la membrane des globules rouges ont posé l'hypothèse d'une plus faible concentration dans la membrane de certains types d'acides aminés [41; 42]. Parmi eux, les concentrations faibles en acide arachidonique et docosahexaénoïque font partie de l'hypothèse de la membrane cellulaire chez les personnes atteintes de schizophrénie [41; 42]. Ainsi, cette hypothèse stipule que les acides gras polyinsaturés sont aberrants suite au développement de la schizophrénie [42]. Ces acides gras sont connus pour octroyer la fluidité de la membrane cellulaire. Conséquemment, la rigidité de la membrane cellulaire est plus élevée et peut influencer les fonctions des protéines, des récepteurs, des canaux ioniques et la conformation de la cellule [42]. Il a aussi été observé chez les fibroblastes de personnes schizophrènes, des changements sur l'adhésion des cellules, ainsi que sur leur croissance

[41]. À cet effet, il est impératif d'étudier les propriétés viscoélastiques, en plus du comportement viscoélastique des cellules, pour comprendre davantage leur fonctionnement face aux pathologies, à leur environnement et à leur développement.

### 1.3 Méthodes pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules

L'analyse des propriétés viscoélastiques cellulaires est essentielle pour acquérir une meilleure compréhension des cellules. Par contre, dû à la forme et la composition des cellules, les méthodes utilisées doivent être très précises. En effet, pour obtenir les propriétés viscoélastiques d'une cellule, une déformation doit être induite et ensuite mesurée. Les méthodes nécessaires pour analyser ces propriétés doivent produire des forces de l'ordre du piconewton ( $10^{-12}\text{N}$ ), tout en mesurant une déformation résultante de l'ordre du nanomètre ( $10^{-9}\text{m}$ ) [43; 44]. Cela est maintenant possible grâce, entre autres, aux technologies telles que les céramiques piézoélectriques et la microfabrication de la pointe d'un microscope à force atomique (AFM).

Il existe une multitude de méthodes pour extraire les propriétés mécaniques des cellules, mais elles ne partagent pas toutes les mêmes avantages. Certaines permettent d'appliquer un grand intervalle de forces sur le corps cellulaire, alors que d'autres permettent d'analyser parallèlement plusieurs cellules en même temps. D'ailleurs, des méthodes permettent d'obtenir les propriétés viscoélastiques cellulaires locales, à l'endroit même où la force est appliquée, alors que d'autres permettent d'obtenir les propriétés viscoélastiques du corps cellulaire entier [43].

La microscopie à force atomique (figure 1.6a) est une méthode ayant une très grande résolution spatiale qui permet de sonder localement la cellule sur une grande plage de forces [4; 43]. Elle utilise une pointe de l'ordre du micromètre pour tapoter la cellule et la déformer. Selon le déplacement de cette pointe et de la force appliquée, il est possible de mesurer précisément l'élasticité de la cellule à ce point. Or, la technique ne permet pas d'analyser rapidement plusieurs cellules et le temps pour échantillonner tout le corps cellulaire est long.

Une seconde méthode consiste à déplacer une bille micrométrique attachée à la membrane d'une cellule et d'utiliser un laser hautement focalisé pour piéger et déplacer la bille (figure 1.6d) [5]. De cette façon, le déplacement de la bille provoque une déformation de la cellule qui peut être mesurée et ainsi obtenir ses propriétés. Cette méthode offre une bonne sensibilité et une bonne résolution spatiale tout en permettant d'acquérir des données plus rapidement qu'en AFM, mais nécessite d'intégrer un matériel dans la cellule, ce qui peut l'affecter directement [43; 44]. D'autres méthodes emploient l'utilisation de billes, mais comportent toutes le même inconvénient (figure 1.6b). De plus, la position à laquelle les billes se positionnent sur la cellule et la géométrie de l'interaction entre la cellule et la bille ne sont pas contrôlées [43].

Des méthodes plus invasives et séparant la cellule de son environnement, comme l'aspiration par micropipette (figure 1.6g) ou les microplaques (figure 1.6e), sont aussi utilisées dans le domaine [43].

Par contre, elles nécessitent une certaine préparation pour mesurer une seule cellule, causant un faible rendement sur les résultats obtenus.

En utilisant l'imagerie de phase par DHM (QP-DHM), il est possible de combiner avec les SFAs pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules en culture. En effet, la méthode par écoulement cisailé (figure 1.6h) est non invasive pour les cellules, permet de les conserver dans leur environnement et permet d'obtenir un grand nombre de données par seconde [13; 24; 14; 45]. Cette méthode permet d'induire des forces de l'ordre du nano au piconewton à une population de cellule sans utiliser un instrument externe entrant en contact avec la cellule. De ce fait, il est possible d'obtenir un intervalle de contraintes de cisaillement permettant une déformation pour chaque type cellulaire. Ces tests d'écoulement cisailé ont été effectués sur des globules rouges [9; 11], des fibroblastes [46], des cellules cancéreuses [13; 14], des cellules endothéliales [47] et des ostéocytes [45]. Parmi ces études, une déformation cellulaire est mesurable pour une étendue de contrainte de cisaillement allant de 0.1 Pa à 1 Pa. Par conséquent, cette échelle est utilisée pour choisir les conditions d'expérimentation pour des tests sur des cellules en culture, à l'aide de l'équation 1.9 en page 19. En mesurant les dimensions de la chambre d'imagerie utilisée ( $W$  et  $H$ ), de la viscosité du liquide ( $\mu$ ), le débit d'entrée pour les expériences peut être modifié pour atteindre ces valeurs de cisaillement sur les cellules. De ce fait, l'imagerie de phase quantitative permet d'observer ces déformations à une échelle nanométrique et de mesurer la réponse en déformation de façon analogue aux méthodes présentées précédemment.

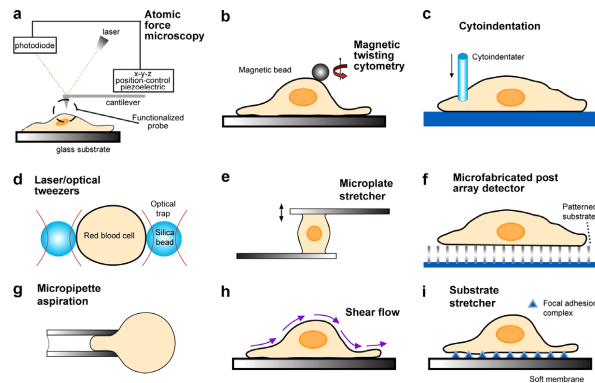


FIGURE 1.6 – Illustration des différentes méthodes pour obtenir les propriétés viscoélastiques cellulaires. Image tirée de Suresh [3]

## 1.4 Microscopie holographique numérique

La DHM est une technique de plus en plus utilisée pour l'imagerie cellulaire. En effet, elle permet d'obtenir des images de phase quantitatives des cellules en n'employant aucun agent de marquage [12; 48; 49; 50; 51; 13; 52]. La DHM fait usage du matériel cellulaire comme agent de contraste et donc révèle de l'information sur la cellule entière<sup>2</sup>.

2. Dans ce mémoire, un microscope holographique numérique en transmission est utilisé et ce type de microscope sera traité pour l'entièreté du présent document.

La microscopie holographique numérique repose sur les mêmes principes qu'un interféromètre. En effet, un des premiers designs de DHM était basé sur un interféromètre Mach-Zender [12]. La différence étant que la DHM est un interféromètre imageant, faisant usage de l'imagerie à contraste de phase et de l'holographie numérique.

L'imagerie à contraste de phase est une technique permettant d'imager des corps transparents sans agent de marquage à l'aide d'une source de lumière [49]. Le front d'onde de la source de lumière est déformé lorsqu'il traverse un corps cellulaire, ce qui induit un délai de phase dans le front d'onde. Il a été montré que ce délai de phase peut servir de contraste dans l'image [53]. L'information sur la phase de la lumière est transformée de manière à pouvoir détecter les variations par une caméra. Cette technique se nomme microscopie à contraste de phase et est, encore aujourd'hui, largement utilisée en biologie pour l'imagerie cellulaire. Par contre, son inconvénient majeur est qu'elle ne fournit que des données qualitatives. Les images obtenues ne peuvent être analysées quantitativement de façon analogue à la microscopie conventionnelle.

Un interféromètre, quant à lui, permet l'enregistrement de données quantitatives provenant de la phase ou de l'amplitude de la lumière. En utilisant une source de lumière cohérente monochromatique, un laser, il est possible de créer une figure d'interférence dans laquelle les composantes en phase et en amplitude peuvent être retrouvées. Ce principe est utilisé pour la DHM. Comme indiqué à la figure 1.7, la source laser est d'abord séparée par un cube séparateur en deux faisceaux. L'un d'eux sert de faisceau référence et ne traverse pas l'échantillon, alors que le faisceau objet traverse l'échantillon, ainsi qu'un objectif de microscope dans le cas d'un microscope holographique numérique. Les deux faisceaux sont alors recombinaés par un second cube séparateur en introduisant un petit angle entre les faisceaux. De ce fait, ils interfèrent pour créer un hologramme numérique, la figure d'interférence, qui peut être enregistré par une caméra CCD [54]. Ce dernier contient l'information en intensité et en phase quantitative de l'échantillon étudié (figure 1.8). Par la suite, des algorithmes numériques permettent la reconstruction de cet hologramme de façon à extraire une image en intensité et une image quantitative à contraste de phase (figure 1.9). De plus, il existe des méthodes numériques permettant d'effectuer un autofocus des hologrammes et de grandement améliorer la qualité des images obtenues [55; 56; 57; 58]. L'imagerie de phase quantitative peut être effectuée par d'autres techniques de microscopie, mais est communément appelée *Quantitative Phase Imaging* et est en forte croissance en biologie [59; 60; 61; 31; 62; 48; 45].

La microscopie holographique numérique est basée sur l'interférence entre le faisceau référence (**R**) et le faisceau objet (**O**). À la sortie du montage, leur interférence crée un hologramme dont l'intensité a la forme suivante :

$$I_H(x,y) = |\mathbf{R}|^2 + |\mathbf{O}|^2 + \mathbf{R}^*\mathbf{O} + \mathbf{R}\mathbf{O}^*. \quad (1.1)$$

L'hologramme est enregistré à l'aide d'une caméra CCD, donc il est acquis par les pixels de la caméra (dimensions de  $N \times N$  pixels). Cela résulte en un échantillonnage spatial 2D de l'hologramme.

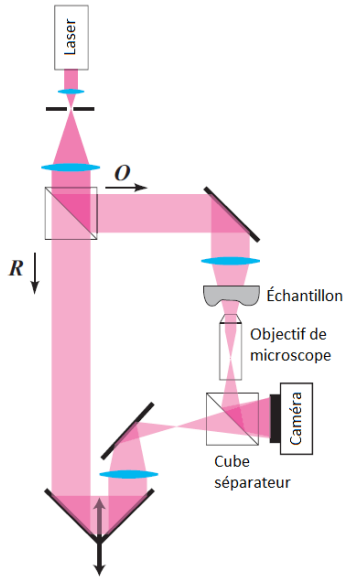


FIGURE 1.7 – Schéma d'un montage de microscopie holographique numérique. Image adaptée de Lyncée Tec.

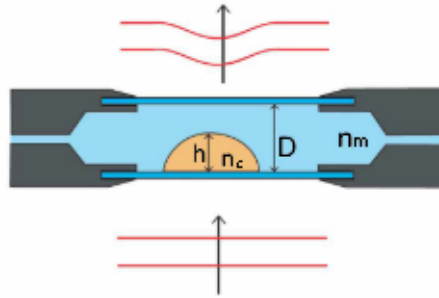


FIGURE 1.8 – Front d'onde plan traversant un corps transparent qui induit un délai dans la phase et déforme le front d'onde. Image tirée de Rappaz et al. [52]

Son intensité devient

$$I_H(k, l) = I_H(x, y) \text{rect} \left( \frac{x}{L}, \frac{y}{L} \right) \times \sum_k^N \sum_l^N \delta(x - k\Delta x, y - l\Delta y) \quad (1.2)$$

où  $k$  et  $l$  sont des nombres entiers allant de  $-N/2$  à  $N/2$  et  $N$  est le nombre de pixels de la caméra sur sa longueur. La largeur des pixels de la caméra en  $x$  et en  $y$  correspond à  $\Delta x$  et  $\Delta y$  respectivement.

Une fois acquis par la caméra, l'hologramme peut être utilisé pour extraire la phase et l'intensité de l'hologramme numérique. Cette étape est souvent appelée la reconstruction de l'hologramme numérique. Pour ce faire, il faut effectuer le produit de l'intensité de l'hologramme numérique  $I_H(k, l)$  par un front d'onde de référence numérique  $\mathbf{R}_D$  :

$$\mathbf{R}_D(k, l) = A_R \exp \left[ i \frac{2\pi}{\lambda} (k_x k \Delta x + k_y l \Delta y) \right] \quad (1.3)$$

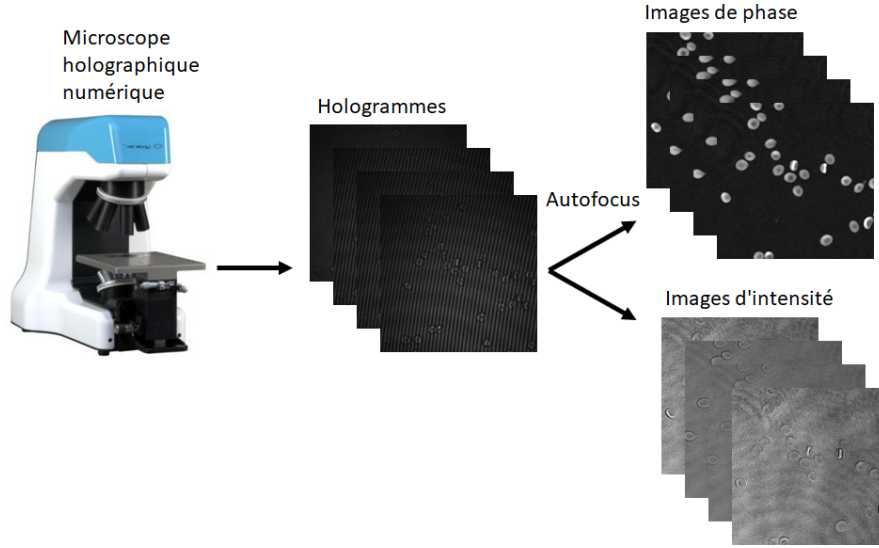


FIGURE 1.9 – Schéma de l'obtention des images de phase et d'intensité par microscope holographique numérique. Les hologrammes numériques sont enregistrés pour former un vidéo de l'expérience, lors d'une acquisition avec un microscope holographique numérique. Chacun d'entre eux est ensuite reconstruit numériquement pour en extraire l'information en phase et en intensité du champ de vue.

Ce front d'onde doit ressembler le plus possible au front d'onde du faisceau référence. La multiplication résulte au front d'onde numérique transmis par l'hologramme :

$$\Psi(k\Delta x, l\Delta y) = \mathbf{R}_D(k, l)I_H(k, l) = \mathbf{R}_D|\mathbf{R}|^2 + \mathbf{R}_D|\mathbf{O}|^2 + \mathbf{R}_D\mathbf{R}^*\mathbf{O} + \mathbf{R}_D\mathbf{R}\mathbf{O}^* \quad (1.4)$$

où  $A_R$  est l'amplitude du front d'onde,  $k_x$  et  $k_y$  les composantes du vecteur d'onde et  $\lambda$  la longueur d'onde du laser utilisé. Les deux premiers termes à droite de l'équation 1.4 proviennent de l'ordre zéro de diffraction, le troisième à l'image *twin* et le quatrième à l'image réelle. L'angle introduit entre les faisceaux référence et objet permet de séparer ces trois termes les uns des autres pour être en mesure de les extraire sans qu'ils ne s'affectent entre eux lors de la reconstruction.

Le front d'onde numérique  $\Psi(k\Delta x, l\Delta y)$  est enregistré dans le plan de l'hologramme ; il doit donc être propagé numériquement jusqu'au plan image. Il est propagé numériquement au plan image par propagation de Fresnel à une distance  $d$ . Le front d'onde numérique propagé dans le plan image est donné par

$$\Psi(m\Delta\xi, n\Delta\eta) = A \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (m^2\Delta\xi^2 + n^2\Delta\eta^2) \right] \times FFT \left\{ \mathbf{R}_D(k, l)I_H(k, l) \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (k^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2) \right] \right\}_{m,n} \quad (1.5)$$

où  $m$  et  $n$  sont des nombres entiers ( $-N/2 \leq (m, n) \leq N/2$ ) représentant les pixels de l'image,  $\Delta\xi$  et  $\Delta\eta$  sont les dimensions des pixels dans le plan image et  $A$  est donné par  $\exp(2\pi id/\lambda)/(i\lambda d)$ . De ce résultat, il est possible d'obtenir les images en intensité (équation 1.6a) et les images à contraste de

phase quantitatives (équation 1.6b).

$$I(m,n) = Re[\Psi(m,n)]^2 + Im[\Psi(m,n)]^2, \quad (1.6a)$$

$$\phi(m,n) = \arctan\left(\frac{Im[\Psi(m,n)]}{Re[\Psi(m,n)]}\right) \quad (1.6b)$$

La microscopie holographique numérique mesure la différence de chemin optique (OPD) dans un échantillon. Cela a pour avantage d'atteindre une échelle nanométrique sur l'observation dans l'image de phase de déformations de l'échantillon. Dans le cas d'une étude sur des cellules, ces dernières sont placées dans une chambre d'imagerie dans laquelle un liquide de perfusion est utilisé pour garder les cellules en vie (figure 1.10). Pour ce type d'échantillon à imager, la mesure obtenue sur les images de phase quantitative est donnée par :

$$\Delta\phi(x,y) = \frac{2\pi}{\lambda}(n_{cellule}(x,y) - n_{milieu}) h_{cellule}(x,y) \quad (1.7)$$

où  $n_{cell}(x,y)$  est l'indice de réfraction de la cellule,  $n_{milieu}$  l'indice de réfraction du milieu dans la chambre d'imagerie et  $h_{cellule}(x,y)$  la hauteur de la cellule. De ce fait, pour une étude biologique, la valeur du signal de phase à chaque pixel varie en fonction de la hauteur de la cellule et de son indice de réfraction (figure 1.10).

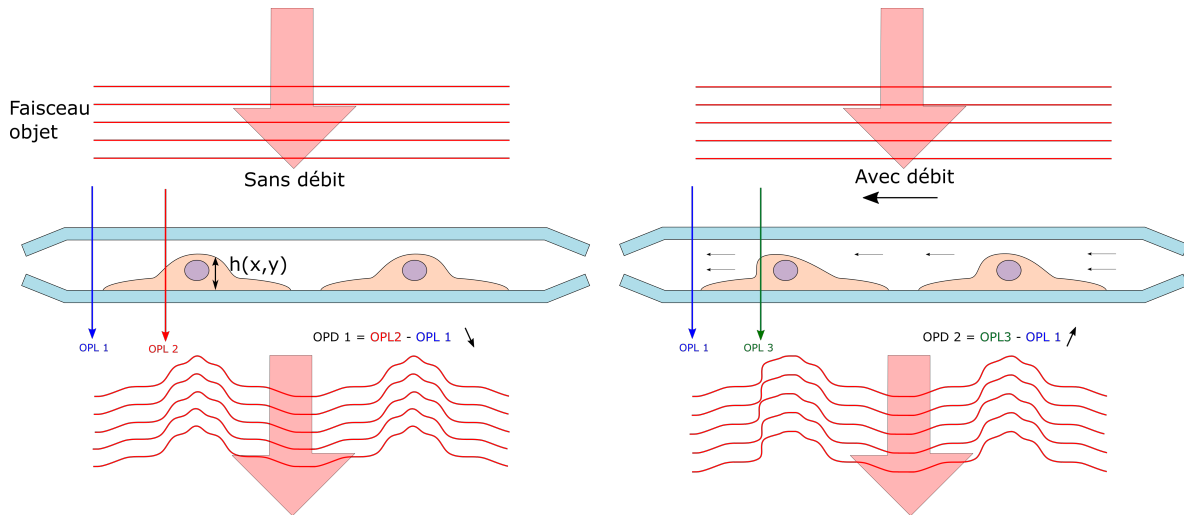


FIGURE 1.10 – La DHM permet de mesurer une déformation cellulaire induite par un écoulement cisailé. La valeur de chaque pixel de l'image de phase varie en fonction de la hauteur de la cellule à ce pixel et de la différence d'indice de réfraction à ce pixel entre la cellule et le milieu. Lorsqu'une déformation est induite sur une cellule, la valeur du pixel varie et la déformation peut être mesurée.

## 1.5 Mécanique des fluides

La mécanique des fluides est la science de l'écoulement des fluides. Elle englobe l'étude des fluides en mouvement ou au repos. Cette étude relate des forces appliquées sur le fluide, les forces que celui-ci génère et son développement dans le temps. Encore aujourd'hui, cette branche de la science

est toujours en évolution, surtout concernant l'étude de la turbulence. Pour ce mémoire, la statique des fluides et la turbulence ne seront pas expliquées en détail, mais les termes seront employés à titre qualitatif.

Pour bien comprendre le comportement d'un fluide, il est souvent représenté comme étant un ensemble de particules de petite taille (infinitésimale) qui peuvent se déplacer indépendamment l'une de l'autre selon des lignes de courant. Comme illustré à la figure 1.11, les particules de fluides ont des vitesses différentes selon leur position dans la section de l'écoulement. Cet ensemble de particules indépendantes, le fluide, peut se déformer, est libre de s'écouler et adopte la forme du contenant dans lequel il est placé.

Un fluide peut prendre la forme d'un liquide ou d'un gaz, mais est catégorisé selon s'il est un fluide newtonien ou non newtonien. Un fluide newtonien a une constante de viscosité qui varie seulement qu'avec la température, alors que les fluides non newtoniens ont une constante qui peut varier selon la force qui lui est appliquée ou de sa vitesse. Les fluides newtoniens comprennent tous les liquides s'apparentant à l'eau et tous les gaz. D'autre part, les fluides non newtoniens englobent par exemple le sang, la crème, les gels ou la mayonnaise.

En outre, les fluides newtoniens peuvent être compressibles ou incompressibles. Un fluide incompressible signifie que sa densité demeure constante, c'est le cas des liquides. En effet, le volume qu'occupe un liquide ne peut être réduit sous l'effet d'une pression extérieure. Par ailleurs, les gaz, eux, sont des fluides compressibles puisque leur volume peut être réduit par une pression externe faisant augmenter leur densité. Ainsi, lorsqu'une étude s'intéresse à l'écoulement d'un liquide, faire l'hypothèse que l'écoulement est incompressible, donc la masse volumique du fluide  $\rho$  est constante, permet des simplifications dans les calculs.

Une des caractéristiques importantes d'un fluide est sa viscosité. Dans l'étude d'un écoulement, si la viscosité du fluide est prise en considération, il s'agit d'un fluide réel. Par contre, lorsqu'on omet la viscosité de manière à simplifier les calculs, le fluide est dit parfait. Cela est de grande importance pour les hypothèses à poser en début d'étude. En considérant un fluide réel, cela indique que l'écoulement se développera avec frottement dans son milieu. Les résultats seront certes plus ardues à obtenir, mais seront plus près de la réalité. Ainsi, la viscosité indique la capacité d'un fluide à s'écouler. Si un fluide est très visqueux, les forces internes seront plus fortes et sa vitesse d'écoulement plus faible. Cependant, un fluide ayant une faible viscosité s'écoulera plus facilement et rapidement. La figure 1.12 illustre la différence entre le profil de vitesse d'un écoulement visqueux dans un tube et celui d'un écoulement où la viscosité n'est pas considérée. Par conséquent, en considérant la viscosité du fluide qui s'écoule dans le tube, des conditions d'écoulement s'ajoutent. Puisque le tube ne bouge pas, le fluide doit atteindre une vitesse tangente aux parois nulle, de sorte que le tube demeure immobile. De ce fait, la vitesse d'écoulement doit passer d'une vitesse maximale au centre du tube à une vitesse nulle aux parois. Cela explique la forme parabolique du profil de vitesse de l'écoulement (figure 1.12). Un gradient de vitesse est présent dans le tube selon la direction radiale, ce qui n'est pas le cas pour un



écoulement non visqueux. Ceci dit, le gradient de vitesse induit un profil de cisaillement à l'intérieur du tube suivant l'équation de la contrainte de cisaillement :

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} \quad (1.8)$$

où  $\mu$  est la viscosité dynamique du fluide,  $u$  est le profil de vitesse,  $t$  le temps et  $y$  la position en hauteur dans la section de l'écoulement. Cet écoulement est aussi appelé un écoulement cisailé. De plus, une contrainte de cisaillement maximale  $\tau_{base}$  est obtenue aux parois du tube, où le gradient de vitesse est maximal, alors qu'une contrainte de cisaillement nulle est atteinte au centre du tube (figure 1.12). Pour une section rectangulaire, le profil de vitesse n'est pas symétrique comme une section circulaire (tube). L'équation de la contrainte de cisaillement demeure la même, mais il est possible d'approximer la contrainte de cisaillement maximale à la base de la section ( $\tau_{base}$ ). L'équation de la contrainte de cisaillement maximale pour un conduit de section rectangulaire est la suivante :

$$\tau_{base} = \mu \left. \frac{\partial u}{\partial y} \right|_{base} \approx \frac{6\mu Q}{WH^2} \quad (1.9)$$

où  $Q$  est le débit,  $W$  et  $H$  sont respectivement la largeur et la hauteur de la section rectangulaire.

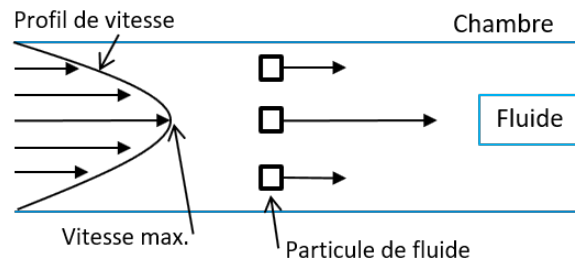


FIGURE 1.11 – Représentation matérielle d'un fluide. Un fluide peut être représenté par un ensemble de particules de taille infinitésimale qui peuvent se déplacer indépendamment. Pour un écoulement visqueux dans un tube, la vitesse des particules diffère selon leur position dans le tube.

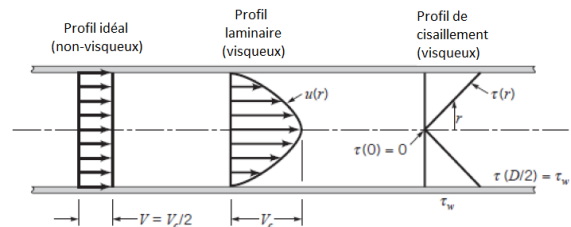


FIGURE 1.12 – Profils de vitesse d'un écoulement non visqueux et visqueux, ainsi que le profil de cisaillement résultant d'un écoulement visqueux dans un tube. Dans un écoulement visqueux, il y a une condition de non-glissement aux parois du tube, une vitesse nulle de l'écoulement aux parois est nécessaire. La variation de vitesse induit des forces de cisaillement dans l'écoulement. Image adaptée de Munson et al. [63].

Pour étudier un écoulement, il est important de modéliser les paramètres de cette étude préalablement. Tout d'abord, le nombre de Reynolds est un paramètre sans dimension qui permet, principalement, de déterminer si l'écoulement étudié est laminaire ou turbulent. Il est calculé selon le ratio des

forces inertielles sur les forces visqueuses par :

$$Re = \frac{\rho Q D_H}{\mu A} \quad (1.10)$$

où  $\rho$  est la densité du fluide,  $A$  l'aire de la section traversée et  $D_H$  le diamètre hydraulique donné par  $D_H = 4A/P$ , avec  $P$  le périmètre de la section. Un nombre de Reynolds  $\ll 1$  indique que l'écoulement est dominé par des forces visqueuses (écoulement de Stokes), alors qu'un  $Re > 2400$  est dominé par des forces inertielles et la transition vers le turbulent est très rapide [63]. De ce fait, il est possible de savoir si l'écoulement étudié sera laminaire ou turbulent avant de l'expérimentation.

Un deuxième paramètre important à l'étude d'un écoulement est appelé la longueur d'entrée et emploie le nombre de Reynolds. La longueur d'entrée correspond à la longueur parcourue par l'écoulement avant qu'il ne devienne complètement développé. Durant cette distance, l'écoulement et son profil de vitesse évoluent. Dépassé cette distance, le profil de vitesse demeure stable, car l'effet du cisaillement aux parois a modifié le profil de vitesse sur la longueur d'entrée (figure 1.13). Pour un écoulement laminaire ( $1 < Re < 2400$ ), la longueur d'entrée est donnée par :

$$l_e = 0.06 Re D_H \quad (1.11)$$

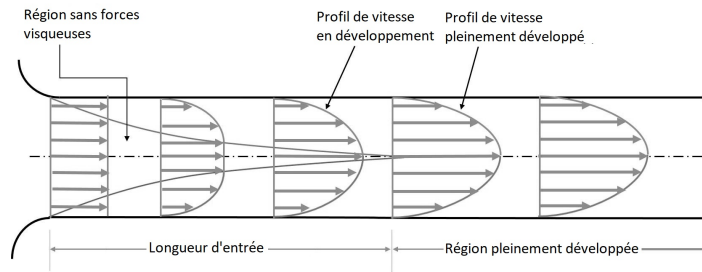


FIGURE 1.13 – Longueur d'entrée dans laquelle l'effet du cisaillement ralentit l'écoulement aux parois et l'écoulement pleinement développé suivant cette région. Image tirée de Cengel and Cimbala [64].

La longueur d'entrée, ainsi que le nombre de Reynolds sont nécessaires pour effectuer la simulation numérique d'un écoulement. Les simulations permettent de faire varier tous les paramètres d'une étude et d'obtenir un résultat près de la réalité sans avoir à effectuer ces tests en laboratoire. Par contre, elles peuvent nécessiter un très long temps de calcul et demander une grande quantité de mémoire à un ordinateur. Par conséquent, il est important de faire des hypothèses simplificatrices sur l'étude à simuler pour réduire sa complexité.

Pour l'étude d'un écoulement cisailé, un logiciel de simulation tente de trouver la solution à deux équations : l'équation de continuité et l'équation de Navier-Stokes. Par méthode itérative, il est possible de converger à la solution avec une précision satisfaisante, surtout dans le cas d'un écoulement laminaire. L'équation de continuité est donnée par :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \rho(\nabla \cdot \mathbf{u}) = 0 \quad (1.12)$$

et l'équation de Navier-Stokes par :

$$\rho \underbrace{\left( \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} \right)}_{\text{Forces inertielles}} = \underbrace{-\nabla p}_{\text{Forces de pression}} + \underbrace{\mu \left( \nabla^2 \mathbf{u} + \frac{1}{3} \nabla (\nabla \cdot \mathbf{u}) \right)}_{\text{Forces visqueuses}} + \underbrace{\rho \mathbf{g}}_{\text{Forces externes}} \quad (1.13)$$

Ces équations comportent plusieurs termes qui représentent des caractéristiques de l'écoulement ou de son développement dans le temps. Dans ce mémoire, l'écoulement étudié est un écoulement cisailé incompressible stationnaire. Pour ce type d'écoulement, il est possible de simplifier les équations à résoudre de manière à réduire le temps de calcul tout en conservant la véracité des résultats.

Tout d'abord, un écoulement incompressible signifie que le fluide est un liquide dont le volume demeure constant, donc que sa densité demeure constante dans le temps. Cela permet d'affirmer que le changement de densité dans le temps est nul  $\partial \rho / \partial t = 0$ . L'équation de continuité devient

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (1.14)$$

et la divergence de  $\mathbf{u}$  est donc nulle. Dans l'équation de Navier-Stokes (équation 1.13),  $\nabla \cdot \mathbf{u}$  apparaît dans les forces visqueuses et ce terme est lui aussi nul.

Deuxièmement, lorsqu'une étude est dite stationnaire, cela signifie que l'écoulement demeure constant dans le temps. De ce fait, tous les termes  $\partial / \partial t$  sont nuls, puisqu'ils indiquent une variation temporelle. Le terme  $\partial \mathbf{u} / \partial t$  est donc égal à zéro.

Troisièmement, pour un écoulement dont la hauteur de la section est relativement petite, de l'ordre du mm, il peut être avantageux de négliger la force provenant de la gravité ( $\rho \mathbf{g} = 0$ ). L'équation de Navier-Stokes à solutionner devient :

$$\rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{u} \quad (1.15)$$

Finalement, pour bien représenter l'écoulement cisailé, une condition de non-glissement sur toutes les parois du modèle doit être instaurée de manière à considérer les effets du cisaillement, comme il est possible d'observer à la figure 1.14.

Ces simplifications permettent de réduire grandement la complexité du problème à solutionner, sans toutefois s'éloigner des résultats attendus, car les termes omis ci-haut ont des valeurs négligeables pour ce type d'écoulement.

## 1.6 Obtention des propriétés viscoélastiques cellulaires

L'obtention des propriétés viscoélastiques cellulaires est effectuée à l'aide de la DHM et de la méthode par écoulement cisailé. De cette façon, il est possible d'imager des cellules en culture dans leur environnement, d'induire une déformation optimale et de manière non invasive. En employant la DHM, aucun agent de marquage n'est nécessaire pour observer les cellules sous le microscope et elle

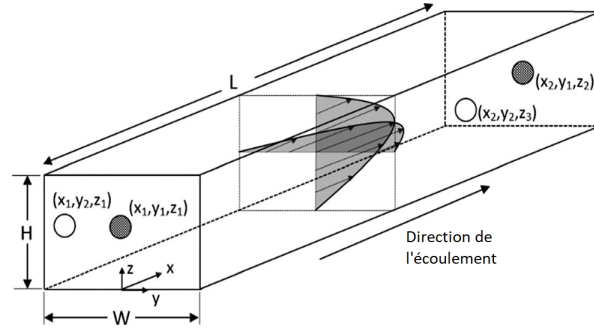


FIGURE 1.14 – Écoulement d’un fluide réel dans une section rectangulaire appelé écoulement de Poiseuille. Les deux formes paraboliques de la vitesse d’écoulement sont superposées et il est possible d’observer la vitesse maximale du fluide au centre de la section. Image tirée de Winer et al. [65].

permet d’analyser des déformations nanométriques sur les cellules. De plus, les tests par écoulement cisailé permettent d’appliquer une contrainte de cisaillement contrôlée sur une population de cellules.

Pour représenter la réponse en déformation de la cellule à une contrainte de cisaillement constante, la rhéologie est employée. Cette théorie consiste en l’étude de la résistance des matériaux à des contraintes appliquées. Cela inclut aussi la théorie des matériaux viscoélastiques. Cette dernière stipule qu’un matériau viscoélastique sous l’effet d’une contrainte constante appliquée se déforme selon un comportement élastique (figure 1.15a) et un comportement visqueux (figure 1.15b). Ces deux comportements sont représentés théoriquement par deux objets de la vie courante : un ressort avec une constante de rappel  $E$  et un piston rempli d’huile de viscosité  $\eta$ .

Le ressort représente une déformation instantanée en réponse à une contrainte constante, alors que le piston représente une déformation plus lente et linéaire temporellement. Lorsque la contrainte est relâchée, le ressort retourne à sa position initiale instantanément due à sa constante de rappel. Par ailleurs, le comportement visqueux de l’huile ne permet pas au piston de retourner à sa position initiale et demeure déformé de façon permanente. En intégrant ces deux comportements en un même modèle, un modèle viscoélastique, il est possible de représenter la réponse expérimentale d’un matériau viscoélastique se déformant sous une contrainte (figure 1.16). D’après ses propriétés viscoélastiques (section 1.2), la cellule est vue comme un matériau viscoélastique et sa réponse en déformation peut être approximée par la théorie des matériaux viscoélastiques.

Les équations des modèles viscoélastiques proviennent toutes de la loi de Hooke pour un matériau élastique ou visqueux. La loi de Hooke est basée sur la relation proportionnelle entre une contrainte appliquée  $\sigma$  et la déformation  $\varepsilon$  du matériau étudié. La contrainte appliquée est obtenue par  $\sigma = F \cdot A$ , où une force  $F$  est appliquée sur une aire  $A$ . La loi de Hooke pour des matériaux purement élastique est la suivante :

$$\sigma_R = E \varepsilon_R \quad (1.16a)$$

$$\varepsilon_R = \sigma_R / E \quad (1.16b)$$

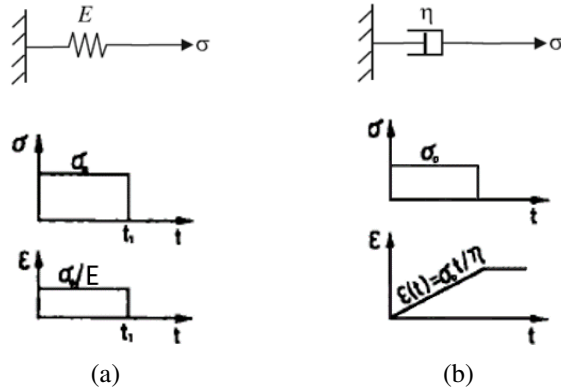


FIGURE 1.15 – Le comportement élastique et visqueux d’un matériau est représenté respectivement par (a) un ressort et (b) un piston. Conjointement, ils permettent de représenter un matériau viscoélastique. Leur courbe de déformation  $\epsilon$  en réponse à une contrainte  $\sigma$  constante permet d’observer le comportement instantané (élastique) du ressort et celui linéaire (visqueux) du piston. Images tirées de N. Findley et al. [15] et Skrzypek and Ganczarski [66].

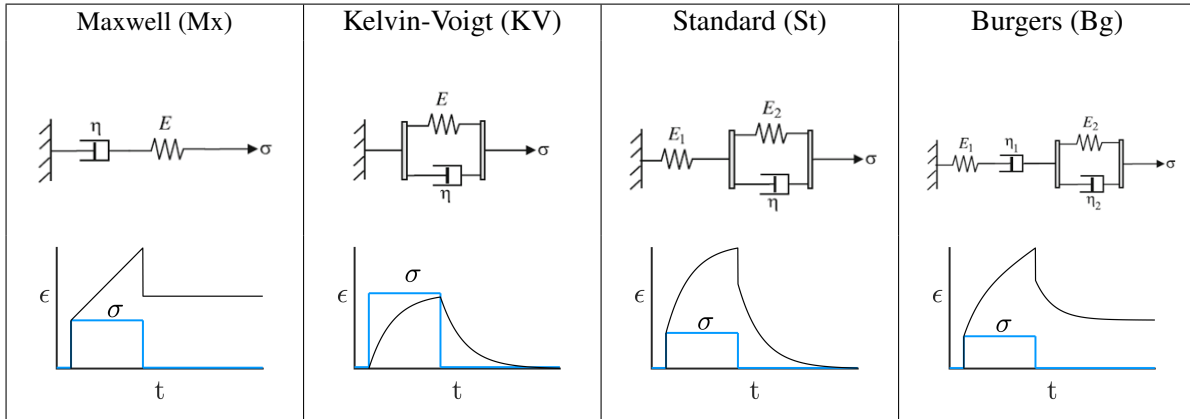


FIGURE 1.16 – Modèles viscoélastiques représentant la réponse en déformation d’un matériel sous l’effet d’une contrainte constante  $\sigma$  et la relaxation suite au relâchement de la contrainte. Images des modèles tirés de Skrzypek and Ganczarski [66].

où  $E$  ( $\text{N/m}^2$ ) est le module de Young,  $\sigma_R$  la contrainte et  $\epsilon_R$  la déformation reliée au ressort (figure 1.15a). Cette équation dicte le comportement du ressort présenté précédemment (figure 1.15a).

Pour ce qui est d’un matériau purement visqueux, représenté par un piston rempli d’huile (figure 1.15b), sous une contrainte  $\sigma_P$ , son comportement est donné par l’équation suivante :

$$\sigma_P = \eta \frac{d\epsilon_P}{dt} \quad (1.17a)$$

$$(1.17b)$$

où  $\eta$  ( $\text{Ns/m}^2$ ) est la viscosité du matériau,  $\sigma_P$  la contrainte et  $\epsilon_P$  la déformation reliée au piston (figure 1.15b).

Avec ces équations, des modèles plus complexes peuvent être obtenus. Par exemple, en plaçant

en série un ressort et un piston, le modèle de Maxwell (Mx) à la figure 1.16 est obtenu. Dans ce cas, la déformation totale des deux objets  $\varepsilon_T$ , sous une contrainte  $\sigma$ , est la somme de la déformation du ressort  $\varepsilon_R$  et du piston  $\varepsilon_P$

$$\varepsilon_T = \varepsilon_R + \varepsilon_P \quad (1.18)$$

En effectuant la dérivée de cette équation et à l'aide des équations 1.16 et 1.17, il est possible d'obtenir l'équation différentielle représentant le modèle Mx. En supposant une contrainte constante  $\sigma$  ( $\dot{\sigma} = 0$ ) appliquée au temps  $t = 0$  et une condition initiale  $\varepsilon(t = 0) = \sigma_0/E$  représentant la déformation instantanée du ressort, l'équation de la réponse en déformation d'une contrainte constante du modèle Mx est obtenue :

$$\dot{\varepsilon}_T = \dot{\varepsilon}_R + \dot{\varepsilon}_P \quad (1.19a)$$

$$\dot{\varepsilon}_T = \frac{\dot{\sigma}}{E} + \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.19b)$$

$$\boxed{\varepsilon(t) = \sigma_0 \left( \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta} \right)} \quad (1.20)$$

Pour ce qui est du modèle de Kelvin-Voigt (KV), un ressort et un piston sont placés en parallèle (figure 1.16). Dans cet arrangement, ce sont les contraintes  $\sigma_R$  et  $\sigma_P$  qui s'additionnent pour donner la contrainte totale  $\sigma_T$ , puisqu'une contrainte appliquée à l'ensemble du modèle se répartira sur les deux objets :

$$\sigma_T = \sigma_R + \sigma_P \quad (1.21)$$

où, en substituant les équations 1.16 et 1.17 et en supposant une contrainte constante, l'équation devient l'équation différentielle non homogène représentant le modèle KV :

$$\dot{\varepsilon} + \frac{E}{\eta} \varepsilon = \frac{\sigma_0}{\eta} \quad (1.22)$$

L'équation peut être résolue par séparation de variable dont la forme de la solution est :

$$\varepsilon(t) = C \exp\left(-\frac{E}{\eta}t\right) + \frac{\sigma_0}{E}. \quad (1.23)$$

Avec comme condition initiale une déformation nulle à  $t = 0$  ( $\varepsilon(0) = 0$ ), puisque la déformation instantanée du ressort est ralentie par le piston. La déformation est ainsi plus graduelle dans ce modèle. Cette condition permet d'obtenir la valeur de  $C$  et la réponse en déformation du modèle KV est la suivante :

$$\boxed{\varepsilon(t) = \frac{\sigma_0}{E} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{E}{\eta}t\right) \right]} \quad (1.24)$$

En utilisant la même approche, il est possible d'obtenir les deux modèles restants de la figure 1.16, le modèle Standard (St) et le modèle de Burgers (Bg). On obtient les équations suivantes pour la réponse en déformation pour le modèle St :

$$\frac{\eta E_1}{E_1 + E_2} \dot{\varepsilon} + \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} \varepsilon = \sigma + \frac{\eta}{E_1 + E_2} \dot{\sigma} \quad (1.25)$$

$$\varepsilon(t) = \sigma_0 \left[ \frac{1}{E_1} + \frac{1}{E_2} - \frac{1}{E_2} \exp\left(-\frac{E_2}{\eta} t\right) \right] \quad (1.26)$$

et pour le modèle Bg :

$$\frac{\eta_1 \eta_2}{E_2} \ddot{\varepsilon} + \eta_1 \dot{\varepsilon} = \frac{\eta_1 \eta_2}{E_1 E_2} \ddot{\sigma} + \left( \frac{\eta_1}{E_1} + \frac{\eta_1}{E_2} + \frac{\eta_2}{E_2} \right) \dot{\sigma} + \sigma \quad (1.27)$$

$$\varepsilon(t) = \sigma_0 \left\{ \frac{1}{E_1} + \frac{t}{\eta_1} + \frac{1}{E_2} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{E_2}{\eta_2} t\right) \right] \right\} \quad (1.28)$$

Ces équations (1.20, 1.24, 1.26 et 1.28) représentent la réponse en déformation lorsqu'une contrainte constante  $\sigma_0$  est appliquée à  $t = 0$ . De plus, lorsque cette contrainte est relâchée, un comportement de relaxation unique définit chacun des modèles. Les équations de relaxation des modèles sont calculées en additionnant deux fois l'équation de déformation, une avec contrainte  $\sigma_0$  appliquée et la seconde avec contrainte  $-\sigma_0$  appliquée à  $t = t_1$ . La somme de ces contraintes résulte en une contrainte nulle au temps  $t_1$  ce qui permet d'obtenir l'équation de relaxation du modèle. Une fois calculé, le modèle est défini pour un comportement déformation-relaxation. Pour le modèle Mx, en appliquant une contrainte  $-\sigma_0$  au temps  $t_1$ , l'équation 1.20 devient :

$$\varepsilon(t) = -\sigma_0 \left( \frac{1}{E} + \frac{t - t_1}{\eta} \right) \quad (1.29)$$

En sommant l'équation de déformation et de relaxation, l'équation de la relaxation du modèle pour une contrainte  $\sigma_0$  retirée au temps  $t_1$  est donnée par :

$$\varepsilon(t > t_1) = \frac{\sigma_0 t_1}{\eta} \quad (1.30)$$

De façon analogue, l'équation de relaxation pour KV est :

$$\varepsilon(t > t_1) = \frac{\sigma_0}{E} \exp\left(-\frac{E}{\eta} t\right) \left[ \exp\left(\frac{E}{\eta} t_1\right) - 1 \right] \quad (1.31)$$

le modèle St :

$$\varepsilon(t > t_1) = \frac{\sigma_0}{E_1} \exp\left(-\frac{E_2}{\eta} t\right) \left[ \exp\left(\frac{E_2}{\eta} t_1\right) - 1 \right] \quad (1.32)$$

et le modèle de Bg :

$$\varepsilon(t > t_1) = \sigma_0 \left[ \frac{t_1}{\eta_1} + \frac{1}{E_2} \left\{ \exp\left(-\frac{E_2}{\eta_2} t\right) \left[ \exp\left(\frac{E_2}{\eta_2} t_1\right) - 1 \right] \right\} \right] \quad (1.33)$$

Les données obtenues par les tests par écoulement cisailé sur les cellules en culture imagées par DHM peuvent être modélisées par ces équations. Cependant, en ajoutant le comportement relaxation lors du test d'écoulement, cela permet de représenter entièrement un test rhéologique [43]. En outre, cela permet de contraindre l'optimisation des modèles lors de l'ajustement aux données expérimentales. De cette façon, les propriétés viscoélastiques cellulaires sont extraites d'un modèle rhéologique

adoptant la même forme que les données expérimentales de manière robuste. Ces données expérimentales sont calculées à partir des images à contraste de phase acquises durant un test d'écoulement cisailé sur des cellules. Pour mesurer la réponse en déformation d'une cellule face à la contrainte de cisaillement induite par le débit de l'écoulement, il est nécessaire d'analyser le centre de masse des cellules tout au long du test. De ce fait, l'analyse du déplacement du centre de masse permet d'utiliser les équations des modèles viscoélastiques en une dimension pour représenter les données expérimentales. Par conséquent, les unités de  $E$  et de  $\eta$  deviennent respectivement (N/m) et (Ns/m), alors que la contrainte  $\sigma_0$  appliquée devient  $F/l$ , où  $F$  est la force appliquée et  $l$  la longueur initiale de l'objet. De plus, on sait que  $\varepsilon$  représente la déformation de l'objet et peut être représenté comme  $\varepsilon = \Delta l/l$ . L'équation 1.16 devient alors, en une dimension,

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l} = \frac{F}{l} \frac{1}{E} \quad (1.34a)$$

$$\Delta l = r_{COM} = \frac{F}{E} \quad (1.34b)$$

dans laquelle  $\Delta l$  est représenté sous la forme du déplacement du centre de masse du matériau  $r_{COM}$ . Ainsi, les équations des modèles sont utilisées en posant  $\varepsilon(t)$  comme  $r_{COM}$  et  $\sigma_0$  comme  $f/l$ .

Le centre de masse d'un objet, dans ce cas-ci en deux dimensions dans l'image  $(x, y)$ , est calculé selon :

$$\vec{r}_{COM}(t) = \frac{\sum_i m_i x_i}{\sum m} \hat{x} + \frac{\sum_i m_i y_i}{\sum m} \hat{y}. \quad (1.35)$$

En imagerie à contraste de phase, comme expliqué dans la section 1.4, la valeur du signal de phase dans une cellule varie en fonction de son indice de réfraction et de sa hauteur (équation 1.6b). Par conséquent, il est convenable de poser que l'intensité du signal de phase est proportionnel à la masse sèche de la cellule. De cette façon, le centre de masse pondéré est calculé par le signal de phase. La masse d'une cellule dépend de l'aire de chacun des pixels, ainsi que de la hauteur de la cellule à ce pixel  $h_{cellule}(x, y)$ . Par contre, lors du calcul du centre de masse, ces dépendances sont annulées de sorte que :

$$\vec{r}_{COM}(t) = \frac{\sum_i \phi(x_i, y_i, t) x_i}{\sum \phi(x, y, t)} \hat{x} + \frac{\sum_i \phi(x_i, y_i, t) y_i}{\sum \phi(x, y, t)} \hat{y} \quad (1.36)$$

où  $x_i, y_i$  sont les dimensions des pixels et  $\vec{r}_{COM}(t)$  le vecteur du centre de masse pondéré. Le déplacement du centre de masse pondéré est obtenu par la différence entre  $\vec{r}_{COM}$  au temps  $t$  et au temps  $t = 0$ . L'équation du déplacement du centre de masse pondéré par la valeur du signal de phase est donné par :

$$\vec{r}_{COM}(t) = \Delta x_{COM}(t) \hat{x} + \Delta y_{COM}(t) \hat{y} \quad (1.37a)$$

$$|\vec{r}_{COM}(t)| = \sqrt{\Delta x_{COM}(t)^2 + \Delta y_{COM}(t)^2} \quad (1.37b)$$

où  $|\vec{r}_{COM}(t)|$  est la norme du vecteur du déplacement du centre de masse. Le déplacement du centre de masse d'une cellule peut alors être représenté par un des modèles viscoélastiques à une dimension. Ces modèles, en particulier le modèle St (figure 1.16), ont déjà été utilisés pour représenter la réponse



en déformation des cellules selon différentes méthodes d'obtention des propriétés viscoélastiques [37; 18; 67; 3; 43; 4; 68; 69; 13; 14]. Une fois un des modèles ajusté à un degré de précision élevé au déplacement du centre de masse, les propriétés viscoélastiques de la cellule  $E$  et  $\eta$  sont extraites de l'équation du modèle. Ainsi, ces propriétés viscoélastiques peuvent être comparées à travers différents types cellulaires, notamment pour évaluer leur rigidité et leur viscosité sous différentes conditions physiologiques ou pathologiques.

## Chapitre 2

# Méthodologie

Ce chapitre traite des résultats menant à l'analyse approfondie des tests en écoulement cisailé présentée au chapitre 3. Ce présent chapitre contient l'information sur les techniques, les instruments et les méthodes utilisées pour en arriver aux premiers résultats des tests en écoulement cisailé, *shear flow assays* (SFAs). Par conséquent, ce chapitre compile la méthodologie, ainsi que les résultats et l'analyse s'y rattachant.

### 2.1 Caractérisation de la chambre d'imagerie à écoulement cisailé

Pour effectuer les SFAs sur des cellules, l'auteur a opté pour une chambre d'imagerie à écoulement cisailé commerciale, *shear flow chamber* (SFC), permettant d'imager les cellules avec l'imagerie de phase par microscopie holographique numérique. Cette section traite de la caractérisation complète de l'écoulement à l'intérieur de la chambre. La caractérisation est effectuée en comparant l'analyse de particules en écoulement et les simulations numériques de l'écoulement.

#### 2.1.1 Chambre d'imagerie à écoulement cisailé

Le choix de la chambre d'imagerie est important pour les tests d'écoulement cisailé, puisque chaque SFC a des dimensions différentes, influençant directement l'écoulement. La SFC est choisie en fonction des dimensions de l'enceinte (endroit où les cellules sont présentes), de la laminarité de l'écoulement et de l'intervalle de contraintes de cisaillement applicable. Or, il a été montré que plusieurs chambres d'imagerie commerciales ne performant pas au même niveau qu'elles sont présu-mées [70; 71]. Certaines démontrent une disparité entre les valeurs de la contrainte de cisaillement théoriques et expérimentales. D'autres démontrent différents types d'écoulement à l'intérieur de la chambre. Ces aspects doivent être étudiés pour s'assurer de bien comprendre et contrôler l'écoulement. Il est primordial de caractériser la SFC choisie, de manière à utiliser ses dimensions réelles et les conditions d'expérimentation propres aux SFAs.

La laminarité de l'écoulement est un paramètre essentiel au choix de la chambre d'imagerie, car

un écoulement turbulent est excessivement difficile à modéliser et prévoir. En présence de turbulence, l'écoulement évolue constamment et il devient ardu de déterminer les contraintes de cisaillement par le profil de vitesse (éq. 1.8). Au contraire, un écoulement laminaire évolue toujours de la même façon. Lorsque l'écoulement atteint son état stationnaire, les résultats sont identiques. Par conséquent, il importe de s'assurer que l'écoulement de la SFC est laminaire aux débits appliqués lors des SFAs.

La SFC choisie est une chambre développée et caractérisée pour limiter les lacunes des SFC commerciales actuelles [70; 71]. Cette SFC a été développée par un groupe de recherche de l'université Case Western Reserve et commercialisée par Warner Instruments [72]. La chambre PFC-1 ProFlow de Warner Instruments (figure 2.1) a été conçue pour répondre aux conditions citées précédemment. La forme de son enceinte offre un grand champ de vue dans lequel le profil de vitesse est régulier. De plus, le ratio élevé entre la largeur et la hauteur de la section transversale de l'enceinte entraîne le profil de cisaillement à adopter la forme d'un plateau et résulte en une zone de contraintes de cisaillement constantes, comme illustré à la figure 2.2. En fait, plus de 92% de la surface observable de la fenêtre supérieure est affecté par la contrainte de cisaillement souhaitée à 2.5% d'erreur [72]. L'enceinte de la chambre est définie par un joint en silicone de qualité médicale d'une épaisseur de 250  $\mu\text{m}$  (figure 2.1). Deux lamelles de verre (lamelle supérieure :  $\varnothing 15$  mm et inférieure :  $\varnothing 25$  mm) sont utilisées pour refermer la SFC sur ce joint en silicone et l'étanchéifier. Le design de la chambre permet un contrôle spatial et temporel accru de l'écoulement et est discuté en détail dans la section 2.1.3. Les dimensions du manufacturier de la SFC commerciale PFC-1 ProFlow sont affichées dans le tableau 2.1. Par contre, après avoir mesuré la SFC, les dimensions du joint en silicone ne concordent pas avec celles du manufacturier. Les dimensions mesurées de la SFC sont affichées au tableau 2.2. Cet aspect est détaillé dans la section 2.1.3.

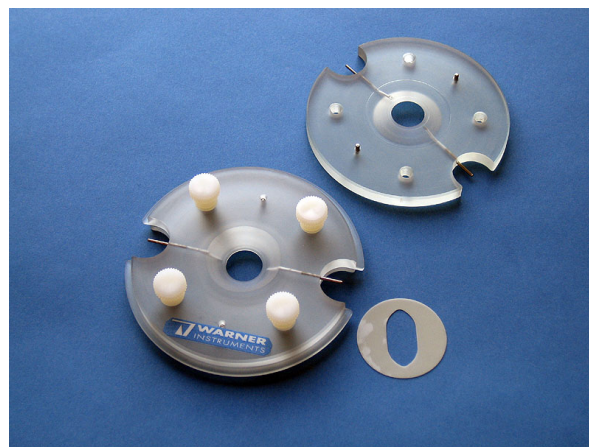


FIGURE 2.1 – Chambre d'imagerie à écoulement cisailé commerciale PFC-1 ProFlow de Warner Instruments. Un joint en silicone de qualité médicale est placé à droite de la chambre. Image tirée de Warner Instruments.

Comme discuté à la section 1.5, les contraintes de cisaillement induites par le fluide dépendent des dimensions de la section dans laquelle il s'écoule. La plupart des SFC ont une enceinte de sec-

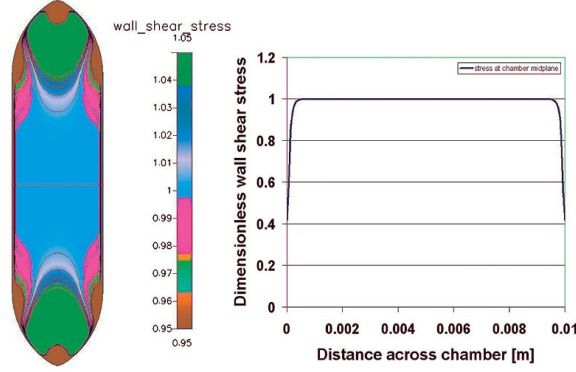


FIGURE 2.2 – Représentation du profil de cisaillement à la base de la chambre PFC-1 ProFlow. La contrainte de cisaillement demeure identique sur la grande majorité de la largeur de l’enceinte de la chambre.

Tableau 2.1 – Dimensions spécifiées par le fabricant de la chambre d’imagerie à écoulement cisailé PFC-1 ProFlow.

Dimension	Mesure	Dimension	Mesure
Longueur joint en silicone	22.0 mm	Fenêtre supérieure	12.5 mm
Largeur joint en silicone	10.4 mm	Fenêtre inférieure	19.0 mm
Épaisseur joint en silicone	250 $\mu\text{m}$	Lamelle supérieure	$\varnothing 15$ mm
Volume de l’enceinte	47.5 $\mu\text{L}$	Lamelle inférieure	$\varnothing 25$ mm
Diamètre intérieur des tubes	0.67 mm		

Tableau 2.2 – Dimensions mesurées de la chambre d’imagerie d’écoulement cisailé PFC-1 ProFlow.

Dimension	Mesure	Dimension	Mesure
Longueur joint en silicone	22.3 mm	Fenêtre supérieure	12.5 mm
Largeur joint en silicone	9.6 mm	Fenêtre inférieure	19.0 mm
Épaisseur joint en silicone	250 $\mu\text{m}$	Lamelle supérieure	$\varnothing 15$ mm
Volume de l’enceinte	46.1 $\mu\text{L}$	Lamelle inférieure	$\varnothing 25$ mm
Diamètre intérieur des tubes	0.67 mm		

tion rectangulaire. De ce fait, connaissant les dimensions de l’enceinte de la chambre, il est possible d’obtenir, avec l’équation 1.9, les contraintes de cisaillement maximales applicables selon le débit appliqué. À partir des données obtenues de la littérature à la section 1.3, les contraintes de cisaillement à appliquer sur les cellules doivent être de 0.1 et 1 Pa. Avec les dimensions de la chambre (tableau 2.1) et en utilisant la viscosité de l’eau à température ambiante ( $\mu_{21^\circ\text{C}} \approx 0.001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ), il est possible d’obtenir les débits approximatifs nécessaires à appliquer pour satisfaire l’intervalle de contraintes dans cette SFC. En considérant l’équation de la contrainte de cisaillement maximale  $\tau_{base}$  approximée à la base de la chambre, on obtient :

$$Q \approx \frac{WH^2\tau_{base}}{6\mu} = \frac{(10.4 \cdot 10^{-3} \text{ m})(250 \cdot 10^{-6} \text{ m})^2(0.1 \text{ à } 1.0 \text{ Pa})}{6 \cdot (0.001 \text{ Pa}\cdot\text{s})} = 0.65 \text{ à } 6.5 \text{ mL}/\text{min} \quad (2.1)$$

Cet intervalle approximatif est obtenu pour s’assurer qu’il ne nécessite pas d’appliquer des débits

considérables pour atteindre les contraintes souhaitées. Par contre, il est essentiel d'analyser le comportement de l'écoulement suivant cet intervalle, puisque la plupart des cellules sont analysées dans cet intervalle lors des SFAs. Les simulations numériques permettent ensuite de valider plus précisément la correspondance entre le débit et la contrainte de cisaillement appliquée par le fluide sur les cellules.

L'assemblage de la chambre d'imagerie est effectué suivant les instructions fournies dans le manuel de l'utilisateur. Ce dernier contient la relation entre la contrainte de cisaillement à une hauteur de  $10\ \mu\text{m}$  de la base de la SFC en fonction du débit appliqué dans celle-ci. Par contre, ces données sont obtenues par simulation à une température de  $310\ \text{K}$  ( $36.85\ ^\circ\text{C}$ ), alors que les expériences effectuées dans ce mémoire sont réalisées à des températures ambiantes d'environ  $294.15\ \text{K}$  ( $21\ ^\circ\text{C}$ ). Ainsi, puisque les propriétés du fluide varient en fonction de la température, cette variation affecte d'autant plus les valeurs de contraintes de cisaillement obtenues. Par conséquent, des simulations à température ambiante sont nécessaires et sont présentées à la section 2.1.3.

### 2.1.2 Vélométrie par localisation de particules en deux dimensions

La vélocimétrie par localisation de particules, *particle tracking velocimetry* (PTV), en deux dimensions est une méthode permettant de visualiser et analyser un écoulement en laboratoire. La PTV consiste à placer des microbilles de plastique ayant un petit diamètre dans l'écoulement à étudier et d'analyser leur déplacement. La technique se base sur la représentation matérielle d'un fluide, vu comme un ensemble de particules matérielles infinitésimales qui se déforment et se propagent le long des lignes de courant de l'écoulement (figure 2.3). Ces lignes de courant représentent le vecteur de vitesse instantané de l'écoulement et sont tangentes à sa direction. Par ailleurs, l'écoulement doit être stationnaire pour que les trajectoires des microbilles correspondent aux lignes de courant. Si l'écoulement varie dans le temps, ces lignes diffèrent des trajectoires des microbilles [63]. De plus, la densité des billes doit s'apparenter à celle du fluide, de sorte qu'elles représentent le mieux possible les particules de fluides. Des billes à densité trop élevée ou trop basse par rapport au fluide entraînent les billes à flotter ou à couler dans la SFC. En intégrant des billes de densité égale à celle du fluide, les billes s'écoulent selon les lignes de courant et il devient possible d'analyser correctement leur trajectoire. Cela permet d'étudier la forme des lignes de courant et la laminarité de la SFC et de comparer ces résultats avec les simulations numériques à différents débits.

Le montage de PTV consiste en une caméra Grasshopper3 installée au-dessus de la chambre d'imagerie PFC-1 ProFlow. La chambre d'imagerie est reliée par des tubes à une pompe péristaltique Scientifica avec laquelle la valeur du débit entrant peut être changée. Les vidéos de l'écoulement avec microbilles sont enregistrés avec le logiciel FlyCapture. Ces vidéos sont enregistrés à 193 images par seconde de sorte que le déplacement des billes entre chaque image soit le plus petit possible. Ainsi, la localisation des microbilles est facilement réalisable entre chaque image. Le déplacement des billes est tracé à chaque instant, de sorte que la trajectoire complète soit obtenue pour chaque bille. Un déplacement trop grand des billes entre chaque image, dû à une faible fréquence d'acquisition, peut

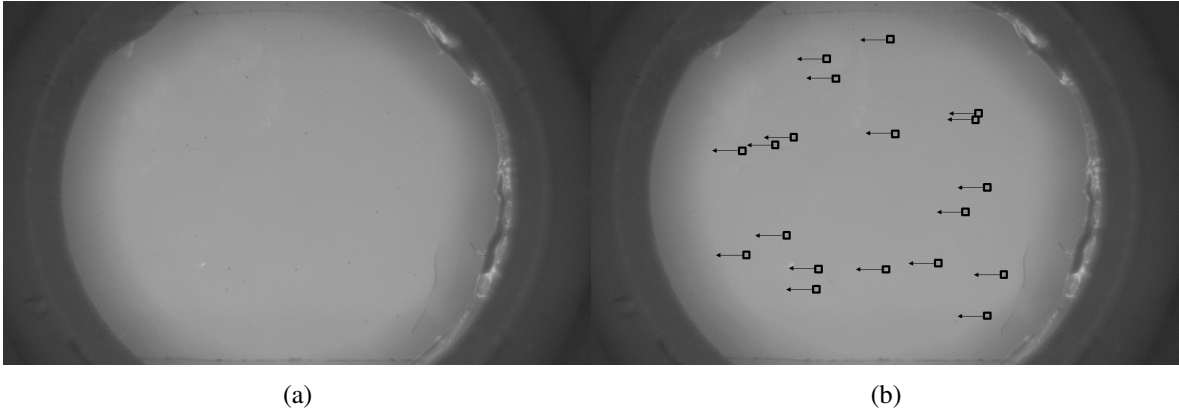


FIGURE 2.3 – (a) Image d'un écoulement avec microbilles intégrées dans la chambre PFC-1 ProFlow. Les microbilles ayant une densité près de celle du fluide s'écoulent selon les lignes de courant de l'écoulement. (b) Ces microbilles peuvent être vues comme des particules matérielles de petite taille du fluide.

causer des erreurs d'identification des billes.

Les microbilles sont intégrées dans une solution de suspension pour les rendre solubles dans l'eau. Le protocole pour la préparation de la solution de suspension est décrit à la section A.2 de l'annexe. Une fois suspendues dans la solution, elles sont incorporées à l'eau et s'écoulent de façon similaire. Par la suite, les lignes de courant sont estimées des trajectoires parcourues par les microbilles à travers le champ de vue de la SFC. Les trajectoires sont tracées avec le *plugin* Trackmate compris dans le logiciel Fiji [73]. Ce *plugin* comprend plusieurs paramètres permettant de personnaliser l'algorithme de détection des microbilles. Par exemple, pour localiser avec précision les billes de  $30\ \mu\text{m}$ , un filtre médian (*median filter*) est utilisé. Il permet d'éviter que l'algorithme identifie des saletés de la même taille que les billes. Avec le montage, les billes de  $30\ \mu\text{m}$  sont acquises sur environ 6.5 pixels de diamètre. Cette valeur est utilisée comme seuil de détection pour la taille recherchée. De plus, une valeur limite (*threshold*) de 1.4 est utilisée pour distinguer les microbilles du fond. Une région d'intérêt est choisie de sorte que seule l'aire de la fenêtre supérieure soit analysée (voir figure A.1 en annexe). Aussi, il peut être utile d'effectuer une moyenne en intensité sur toutes les images d'une acquisition et de soustraire cette image moyenne à l'acquisition. Par conséquent, tout ce qui est immobile dans le champ de vue de la caméra est supprimé et seules les billes en mouvement demeurent. Cela facilite l'algorithme, conçu pour détecter des particules de couleurs blanches. De plus, l'algorithme de détection des trajectoires favorisé est le *LinearMotion LAP tracker*, puisqu'il comble efficacement les écarts de déplacements des billes entre chaque image en PTV. Or, il est à noter qu'il devient difficile pour l'algorithme de localiser les microbilles lorsqu'une trop forte concentration de billes est intégrée dans l'écoulement. Les billes sont mal identifiées et les trajectoires résultantes ne représentent plus les lignes de courant. Pour terminer, les trajectoires sont empilées sur une même image pour être comparées aux lignes de courant (figures 2.4 à 2.6).

Tous les tests de vélocimétrie par localisation de particules sont effectués avec de l'eau à tem-

pérature ambiante ( $\rho = 0.998 \text{ g/cm}^3$ ). Les liquides de perfusion utilisés avec les cellules possèdent sensiblement les mêmes propriétés que l'eau. Les différentes microbilles utilisées ont une densité s'apparentant à celle de l'eau ( $\approx 1.000 \text{ g/cm}^3$ ), car il est essentiel que les billes adoptent le comportement de particules de fluides. Leurs propriétés sont affichées au tableau A.1. Pour déterminer le type de microbilles à utiliser pour caractériser la chambre d'imagerie, elles ont été testées à des débits allant de 0.5 à 2 mL/min. À ces faibles débits, les forces visqueuses ont le même impact que les forces inertielles et les problèmes reliés à la densité ou la taille des billes sont davantage mis en lumière.

Tout d'abord, les billes *Polystyrene Blue* avec un diamètre d'environ  $100 \mu\text{m}$  et une densité de  $1.06 \text{ g/cm}^3$  sont testées dans la chambre d'imagerie. Des problèmes surgissent dû au grand diamètre des billes faces aux petits diamètres des tubes ( $0.67 \text{ mm}$ ). Plusieurs billes restent piégées dans le système et n'entrent pas dans la chambre d'imagerie, mais obstruent l'écoulement. Par ailleurs, les billes réussissant à traverser la chambre n'atteignent pas une vitesse raisonnable. Principalement, le déplacement des billes est affecté par les parois de la chambre, car, à  $100 \mu\text{m}$ , elles ne sont seulement que deux fois et demie plus petites que la hauteur de l'enceinte de la chambre. De plus, les billes ne traversent pas la chambre en son milieu pour la même raison (figure 2.4). Il est possible de conclure qu'à cette taille, peu importe leur densité, les billes ne peuvent s'apparenter à des particules de fluides dans la SFC.

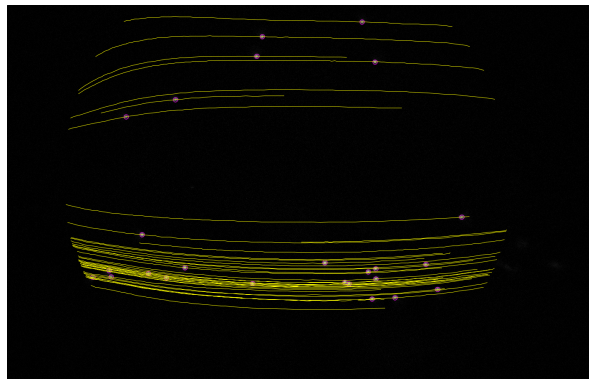


FIGURE 2.4 – PTV avec des microbilles *Polystyrene Blue* de diamètre  $100 \mu\text{m}$  et de densité  $1.06 \text{ g/cm}^3$ . La taille des billes est trop grande pour représenter adéquatement l'écoulement dans la SFC et les billes sont prédisposées à coller les parois de la chambre. La direction de l'écoulement est de droite à gauche.

Par la suite, les microbilles *Red Polystyrene* avec un diamètre de  $30 \mu\text{m}$  sont testées. Ayant la même densité que les *Polystyrene Blue*, les problèmes reliés à la taille sont évalués en premier lieu. Avec des billes plus de trois fois plus petites, les obstructions dans les tuyaux du système ne se produisent pas de manière aussi nuisible pour l'écoulement. Il en résulte un plus grand nombre de microbilles traversant la chambre d'imagerie comme on peut le voir à la figure 2.5. En effet, un plus grand nombre de trajectoires est obtenu, d'autant plus que les billes s'écoulent uniformément dans l'enceinte de la chambre. Ainsi, la taille des billes est un des facteurs limitants pour adopter le comportement du fluide. Par contre, les microbilles se déplacent lentement par rapport au débit

entrant. Cela est dû à l'écart en densité entre les billes et l'eau trop élevé. Ces dernières sont enclines à couler au fond de la SFC et cet effet est remarqué par leur vitesse réduite. En s'approchant des parois, le frottement est de plus en plus élevé et ralentit leur écoulement. Tout de même, il est possible d'observer la laminarité de l'écoulement et les lignes de courant parallèles entre elles au centre de la chambre d'imagerie.

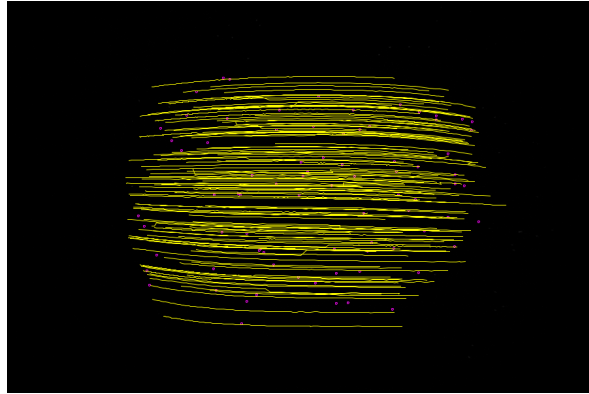


FIGURE 2.5 – PTV avec des microbilles *Red Polystyrene* de diamètre  $30\ \mu\text{m}$  et de densité  $1.06\ \text{g/cm}^3$ . La taille des billes permet de bien représenter l'écoulement dans la SFC, mais la densité trop élevée des billes les entraîne à s'écouler près de la base de la chambre. La direction de l'écoulement est de droite à gauche.

Finalement, les microbilles *Violet Polyethylene* avec un diamètre de  $30\ \mu\text{m}$  ont une densité plus près de l'eau, à  $1.005\ \text{g/cm}^3$ . Ce type de microbilles offre les meilleurs résultats pour la caractérisation de la chambre d'imagerie. En effet, les billes s'écoulent plus rapidement que les précédentes et présentent un éventail de vitesses. Cela concorde avec le profil de vitesse quadratique attendu dans une section rectangulaire en fonction de la hauteur de la SFC. Aussi, on observe à la figure 2.6 la laminarité de l'écoulement, ainsi que des lignes de courant parallèles entre elles et avec la direction du débit entrant (de droite à gauche de l'image).

En outre, il est préférable d'utiliser des billes ayant un diamètre le plus petit possible, pour une meilleure analyse. Par contre, avec le présent montage, les billes de  $30\ \mu\text{m}$  sont acquises sur environ 6 pixels de la caméra. Un diamètre deux fois plus petit devient alors problématique pour la visualisation des microbilles. De plus, le prix des microbilles augmente rapidement en diminuant le diamètre dû aux contraintes de fabrication. Par conséquent, sachant que la chambre d'imagerie est principalement utilisée pour des débits allant de  $0.5$  à  $8\ \text{mL/min}$ , un diamètre de  $30\ \mu\text{m}$  est satisfaisant pour caractériser l'écoulement avec une certaine précision. De ce fait, les billes *Violet Polyethylene* sont utilisées pour l'analyse de l'écoulement pour leur densité presque équivalente à celle de l'eau et leur taille optimale pour le montage.



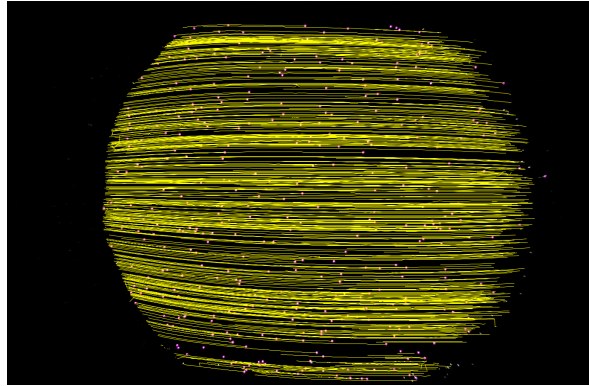


FIGURE 2.6 – PTV avec des microbilles *Violet Polyethylene* de diamètre  $30\ \mu\text{m}$  et de densité  $1.005\ \text{g/cm}^3$ . La taille et la densité des billes constituent une combinaison permettant de représenter efficacement les particules de fluide et caractériser l'écoulement dans la SFC. La direction de l'écoulement est de droite à gauche.

### 2.1.3 Simulation d'écoulement cisailé

#### Modélisation de l'écoulement

La modélisation en trois dimensions de la SFC comprend les tubes en entrée et en sortie et l'enceinte de la chambre d'imagerie (figure 2.7a). Deux modélisations de la SFC sont nécessaires pour la caractériser. La première consiste à utiliser les dimensions de la chambre fournies par le fabricant. Cette modélisation est utilisée pour obtenir les résultats des simulations du manuel de l'utilisateur et s'assurer d'une modélisation identique. Une fois les résultats concluants, les paramètres de la modélisation sont réutilisés pour la simulation de la seconde modélisation. Cette deuxième modélisation consiste à utiliser les dimensions réelles mesurées de la SFC PFC-1 ProFlow. Ainsi, les résultats sont comparés avec les résultats obtenus par PTV. Ensuite, les paramètres de la modélisation peuvent être agencés aux conditions d'expérimentation lors des SFAs, de manière à calculer les contraintes de cisaillement attendues. Comme cité précédemment, ces deux modélisations sont nécessaires, car les dimensions dénotées dans le tableau 2.1 ne sont pas identiques à celles mesurées. La modélisation de la SFC, ainsi que la simulation de l'écoulement, sont réalisées à l'aide du logiciel COMSOL Multiphysics et du module CFD.

La modélisation de la chambre d'imagerie selon les spécifications du fabricant est réalisée de telle sorte qu'elle soit utilisée pour confirmer les résultats, tout d'abord par le logiciel de simulation et, ensuite par la vélocimétrie par localisation de particules. D'un côté, les résultats du fabricant sont obtenus à une température physiologique d'environ  $37^\circ\text{C}$  (310 K), alors que ceux obtenus par PTV sont obtenus à une température de  $21^\circ\text{C}$  (294.15 K). Par conséquent, la constante de viscosité dynamique  $\mu$  de l'eau varie entre les deux simulations. Cette dernière a une influence sur tout l'écoulement et donc sur le profil de cisaillement. De ce fait, ce paramètre influence les résultats et nécessite que la simulation soit effectuée séparément pour ces conditions. La viscosité dynamique de l'eau à  $37^\circ\text{C}$  est d'environ  $0.001\ \text{Pa}\cdot\text{s}$ , alors qu'à  $21^\circ\text{C}$  elle est de  $0.000984\ \text{Pa}\cdot\text{s}$ . La densité du fluide varie,

elle aussi, en fonction de la température. Dans ce cas, la densité de l'eau utilisée par le manufacturier est d'environ  $996 \text{ kg/m}^3$  à  $37^\circ\text{C}$ , alors que la valeur utilisée à  $21^\circ\text{C}$  est de  $999 \text{ kg/m}^3$ . Finalement, avec les dimensions du tableau 2.1, le nombre de Reynolds est calculé pour la modélisation suivant les spécifications du manufacturier à l'entrée du tube et dans la section rectangulaire de l'enceinte de la chambre,

$$Re_{tube} = \frac{\rho Q D_H}{\mu A} = \frac{(996 \text{ kg/m}^3)(1 \text{ à } 10 \text{ mL/min})(2 \cdot 0.67 \text{ mm})}{(0.001 \text{ Pa.s})(\pi \cdot [0.67 \text{ mm}]^2)} = 31.55 \text{ à } 315.5 \quad (2.2a)$$

$$Re_{enceinte} = \frac{(996 \text{ kg/m}^3)(1 \text{ à } 10 \text{ mL/min})(2/[10.4 \text{ mm} + 0.25 \text{ mm}])}{(0.001 \text{ Pa.s})} = 3.12 \text{ à } 31.2 \quad (2.2b)$$

et pour la modélisation suivant les mesures réelles de la chambre d'imagerie utilisée,

$$Re_{tube} = \frac{(999 \text{ kg/m}^3)(1 \text{ à } 10 \text{ mL/min})(2 \cdot 0.67 \text{ mm})}{(0.000984 \text{ Pa.s})(\pi \cdot [0.67 \text{ mm}]^2)} = 32.16 \text{ à } 321.6 \quad (2.3a)$$

$$Re_{enceinte} = \frac{(999 \text{ kg/m}^3)(1 \text{ à } 10 \text{ mL/min})(2/[9.6 \text{ mm} + 0.25 \text{ mm}])}{(0.000984 \text{ Pa.s})} = 3.44 \text{ à } 34.4 \quad (2.3b)$$

où les nombres de Reynolds sont calculés au tube d'entrée et dans l'enceinte de la SFC respectivement. Comme vu à la section 1.5, les écoulements modélisés sont laminaires, car leur nombre de Reynolds est inférieur à 2400. Par conséquent, la mesure de la longueur d'entrée peut être calculée de ces valeurs, pour le tube et l'enceinte respectivement,

$$l_{e_{tube}} = 0.06 \cdot Re \cdot D_H = 1.268 \text{ à } 12.68 \text{ mm} \quad (2.4a)$$

$$l_{e_{enceinte}} = 0.091 \text{ à } 0.91 \text{ mm} \quad (2.4b)$$

et avec les dimensions mesurées,

$$l_{e_{tube}} = 1.292 \text{ à } 12.92 \text{ mm} \quad (2.5a)$$

$$l_{e_{enceinte}} = 0.10 \text{ à } 1.0 \text{ mm} \quad (2.5b)$$

À chaque changement de section parcourue par l'écoulement, la longueur d'entrée varie. Dans ce cas, la longueur d'entrée dans les tubes peut atteindre près de 13 mm à haut débit, mais dans l'enceinte de la chambre, elle n'est que de 1 mm à ce même débit. Ceci permet d'affirmer que l'écoulement est développé au milieu de la SFA, car le centre de la chambre est situé à environ 5 mm de l'entrée.

Pour les deux modélisations d'écoulement, les mêmes études de mécanique des fluides sont employées. On considère un écoulement laminaire et stationnaire, qui demeure constant dans le temps. En effet, il est possible de s'assurer que l'écoulement analysé est bel et bien laminaire en calculant le nombre de Reynolds aux débits minimal et maximal (équation 1.10). De plus, l'écoulement dans la SFC demeure constant, puisque les paramètres de l'étude ne varient dans le temps, en posant une température ambiante constante, et est considéré incompressible. Avec les calculs réalisés précédemment, la simulation ne nécessite pas de modèle pour simuler la turbulence puisque  $Re$  est toujours  $< 2400$ . Une condition de non-glissement est posée sur toutes les parois du modèle. À la lumière de ce

qui précède, la simulation de l'écoulement dans la SFC consiste à résoudre les équations 1.14 et 1.15 de la section 1.5 à l'aide du module CFD de COMSOL.

Le logiciel COMSOL résout les simulations par la méthode des éléments finis. Ainsi, un maillage personnalisé, basé sur la mécanique des fluides, est construit pour représenter le modèle de la chambre (figure 2.7a). Le maillage de la chambre est séparé en trois parties dans lesquelles la taille du maillage est différente. Il est possible d'observer le maillage complet à la figure 2.7b. Tout le maillage est réalisé avec des prismes triangulaires (*Free Tetrahedral*). Tout d'abord, les tubes sont modélisés avec des éléments de taille *Fine*, de manière à obtenir un nombre convenable d'éléments le long des tubes malgré leur petit diamètre. Ensuite, l'enceinte de la chambre est modélisée avec un maillage plus fin, de taille *Finer*, pour obtenir un nombre adéquat d'éléments pour les résultats. Par contre, de manière à uniformiser le maillage dans la section intermédiaire de la chambre, cette dernière est séparée en une forme rectangulaire. Finalement, les couches limites sont modélisées séparément pour les tubes et l'enceinte, car un plus grand nombre de couches est nécessaire dans l'enceinte pour assurer des résultats précis. À cet effet, six couches limites sont modélisées dans les tubes et treize pour le reste de la chambre. Le maillage final pour la chambre d'imagerie utilisée consiste en 475 068 éléments de domaine (*domain elements*), 33 626 éléments de limites (*boundary elements*) et 1267 éléments de bord (*edge elements*).

Le solveur utilisé pour résoudre les équations sur COMSOL est le solveur direct PAR-DISO avec une tolérance relative de  $1 \cdot 10^{-5}$ . Ce solveur est préféré à un solveur itératif pour son temps de calcul inférieur et pour sa meilleure convergence aux résultats. Les résultats obtenus par les deux solveurs ont été comparés et ils se sont avérés atteindre des solutions identiques. Ainsi, selon sa préférence, le lecteur peut opter pour l'un ou l'autre des solveurs.

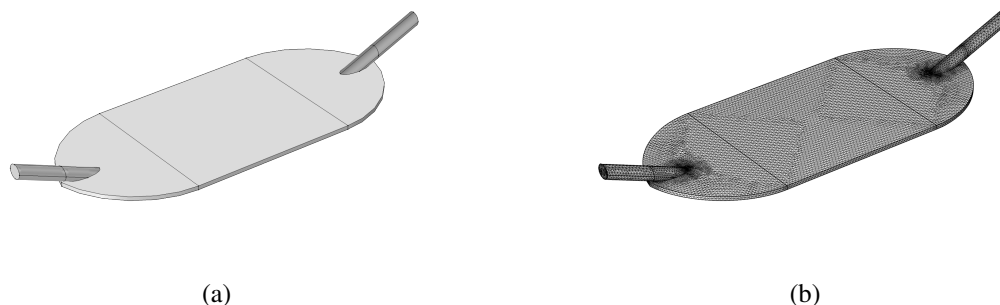


FIGURE 2.7 – (a) Modélisation 3D de la SFC PFC-1 ProFlow de Warner Instruments. (b) Maillage de la SFC utilisé pour les simulations avec le logiciel COMSOL.

### Analyse des simulations d'écoulement

Les modélisations de la SFC sont simulées de 0.5 à 10 mL/min, de manière à analyser le comportement du profil de vitesse et de cisaillement sur un grand éventail de conditions. Par contre, l'analyse

suivante est basée principalement sur les débits minimal et maximal utilisés lors des SFAs (1 et 8 mL/min).

Dans cette section, les profils de vitesse et de cisaillement sont tracés en fonction de la largeur de la chambre d'imagerie. Ainsi, le profil de vitesse, représenté par la ligne rouge à la figure 2.8a, est analysé à mi-hauteur dans la chambre ( $z = 125 \mu\text{m}$ ). À cette hauteur, le profil de vitesse maximal est observé. Du côté du profil de cisaillement, deux profils sont considérés selon la largeur de la chambre : un sur la base de la chambre ( $z = 0 \mu\text{m}$ ), représenté par la ligne rouge à la figure 2.8b, et un à  $10 \mu\text{m}$  ( $z = 10 \mu\text{m}$ ) de la base. Ce dernier permet d'analyser le cisaillement appliqué sur des cellules ayant une hauteur de  $10 \mu\text{m}$  et de comparer aux résultats du fabricant.

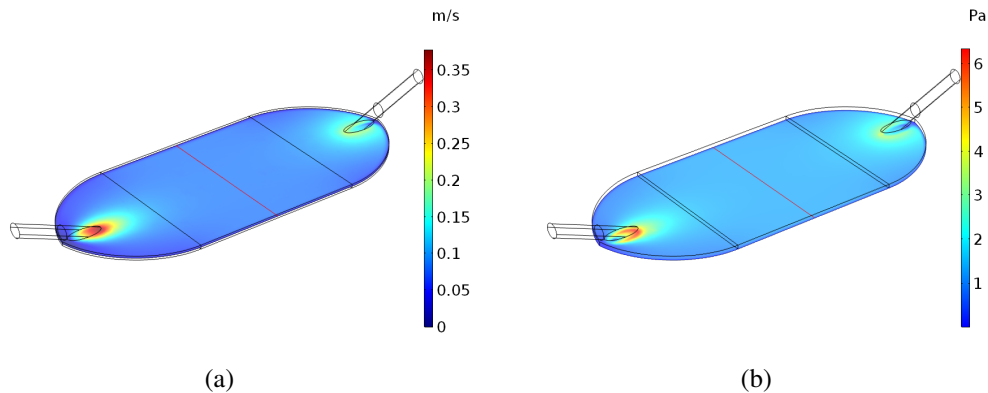


FIGURE 2.8 – (a) Profil de vitesse en 2D à mi-hauteur de la chambre d'imagerie ( $z = 125 \mu\text{m}$ ) obtenu par simulation de l'écoulement. La ligne rouge représente l'emplacement où le profil de vitesse est analysé dans l'écoulement. (b) Profil de cisaillement en 2D à la base de la chambre d'imagerie ( $z = 0 \mu\text{m}$ ) obtenu par simulation de l'écoulement. La ligne rouge représente l'emplacement où le profil de cisaillement est analysé dans l'écoulement. Un second profil de cisaillement à une hauteur de  $10 \mu\text{m}$  est analysé.

Il est primordial de modéliser la chambre d'imagerie selon les spécifications du fabricant pour s'assurer que les paramètres de l'étude sont bien établis. En obtenant des résultats semblables à ceux spécifiés, les paramètres de l'étude peuvent être utilisés avec certitude pour obtenir les contraintes de cisaillement reliées aux dimensions de la SFC. Dans le manuel de l'utilisateur, une conversion est fournie pour obtenir la contrainte de cisaillement à une hauteur de  $10 \mu\text{m}$  de la base de la chambre en fonction du débit appliqué. Cette conversion dicte que l'application d'un débit de 1 mL/min résulte en une contrainte de cisaillement de 0.15279 Pa à  $10 \mu\text{m}$  de la base. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 2.3. Ces valeurs sont comparées aux résultats des simulations pour valider la modélisation. De plus, il est attendu que la courbe de la contrainte de cisaillement maximale sur la largeur de la chambre adopte la même forme que celle présentée par le fabricant à la figure 2.2. Par contre, ce sont les seules données à disposition pour comparer les simulations réalisées par le fabricant.

Tout d'abord, la première modélisation est effectuée et les résultats de la simulation sont comparés avec ceux du fabricant. Le profil de cisaillement à une hauteur de  $10 \mu\text{m}$  de la base de la

chambre est le paramètre d'intérêt (figure 2.8b). Les simulations sont effectuées à différents débits, allant de 0.5 à 8 mL/min, pour s'assurer que l'intervalle trouvé en 2.1 soit analysé. Les profils de cisaillement à 10  $\mu\text{m}$  sont portés en graphiques à la figure 2.9. Il est possible de voir que la forme de la courbe est de la même que celle attendue et assurée par le manufacturier (figure 2.2). Dû à sa faible hauteur et sa grande largeur, les dimensions de l'enceinte de la SFC permettent d'obtenir un profil de cisaillement pratiquement constant sur toute sa largeur. Les simulations le confirment d'autant plus.

Par la suite, les valeurs théoriques de la contrainte de cisaillement, obtenues de la conversion, sont comparées pour chaque débit d'écoulement simulé. La valeur moyenne de la contrainte de cisaillement est calculée pour la section constante de la courbe. Ces données sont affichées au tableau 2.3 pour des débits de 0.5, 1, 2, 6.5 et 8 mL/min. En comparant les données des simulations à celles théoriques, on remarque que les contraintes de cisaillement sont identiques en considérant l'erreur sur la mesure. Par conséquent, la modélisation effectuée représente adéquatement la chambre d'imagerie décrite par le manufacturier. Ainsi, les paramètres de la modélisation peuvent être employés pour réaliser les simulations selon les dimensions mesurées de la SFC pour la comparaison avec les résultats de PTV.

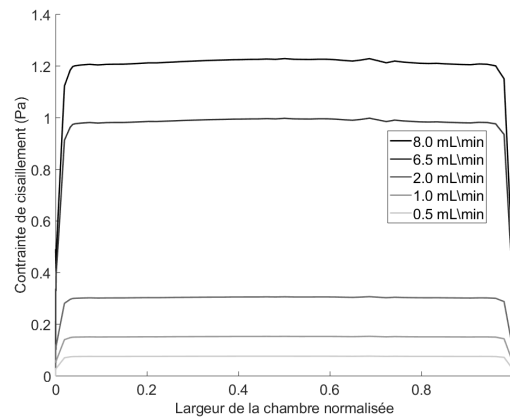


FIGURE 2.9 – Profil de cisaillement à 10  $\mu\text{m}$  de la base de la chambre d'imagerie à différents débits en fonction de la position dans la chambre.

Tableau 2.3 – Comparaison entre les spécifications du manufacturier et des simulations obtenues pour les contraintes de cisaillement à 10  $\mu\text{m}$  de la base de la chambre d'imagerie.

Débit (mL/min)	Contrainte de cisaillement à 10 $\mu\text{m}$ (Pa)	
	Warner Instruments	Simulation
0.5	0.076395	$0.0760 \pm 0.0004$
1.0	0.15279	$0.1521 \pm 0.0008$
2.0	0.30558	$0.304 \pm 0.002$
6.5	0.993135	$0.989 \pm 0.006$
8.0	1.22232	$1.217 \pm 0.008$

Ensuite, les simulations sont comparées aux analyses de vélocimétrie par localisation de particules. Le but est de s'assurer que les lignes de courant dans les simulations soient représentées de

la même façon par les microbilles dans l'écoulement de la SFC. De ce fait, l'écoulement doit être laminaire dans les deux cas. Les débits à 1 mL/min et à 8 mL/min sont comparés entre les résultats de PTV et ceux des simulations aux figures 2.10 et 2.11 respectivement. Dans les deux cas, on remarque la cohérence entre les résultats simulés et expérimentaux. Les lignes de courant adoptent des lignes parallèles à la direction de l'écoulement sur le champ de vue ce qui démontre le comportement laminaire de l'écoulement sur l'intervalle de débits étudié. De plus, sur ces mêmes figures sont présents les profils de vitesse de l'écoulement sur la largeur de la chambre à  $z = 125 \mu\text{m}$  (figures 2.10c et 2.11c). Comme expliqué ci-haut, le profil a une forme en plateau dû aux dimensions de l'enceinte de la chambre. Une section rectangulaire ayant un rapport élevé de sa largeur sur sa hauteur ne donne pas lieu à un profil de forme parabolique. Le profil est donc abrupt près des parois et atteint rapidement une vitesse maximale constante sur la largeur de la SFC. C'est pour cette raison que le profil de cisaillement atteint, lui aussi, un plateau à la base de la chambre (figures 2.10d et 2.11d).

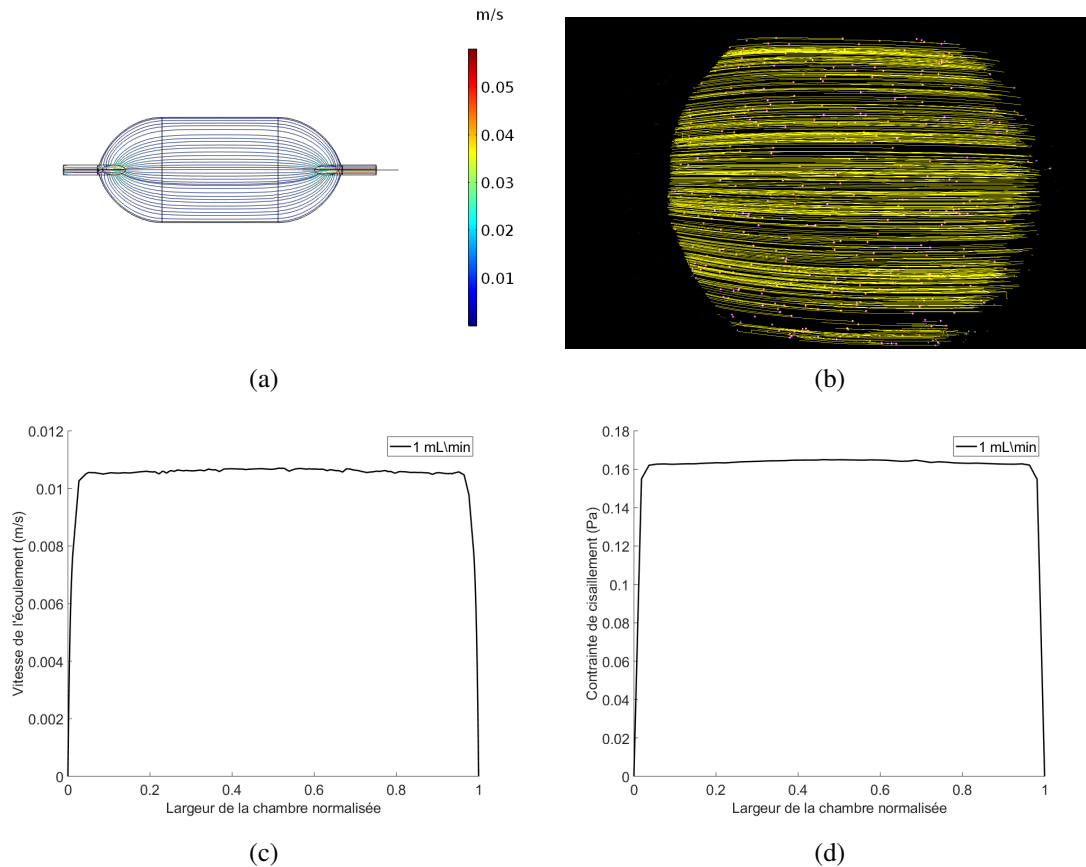


FIGURE 2.10 – Résultats de la simulation à 1 mL/min avec les dimensions mesurées de la SFC. (a) Lignes de courant obtenues par simulation de l'écoulement. (b) PTV avec microbilles de  $30 \mu\text{m}$  ( $\rho = 1.005 \text{ g/cm}^3$ ). (c) Profil de vitesse à  $z = 125 \mu\text{m}$ . (d) Profil de cisaillement à  $z = 0 \mu\text{m}$ . Le fluide est approximé à de l'eau à  $21^\circ\text{C}$  ( $\rho = 999 \text{ kg/m}^3$ ,  $\mu = 9.84 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ).

Finalement, avec une modélisation appropriée de la chambre d'imagerie, les résultats des simulations sont utilisés avec confiance pour l'analyse des cellules, pour le débit correspondant. Pour les

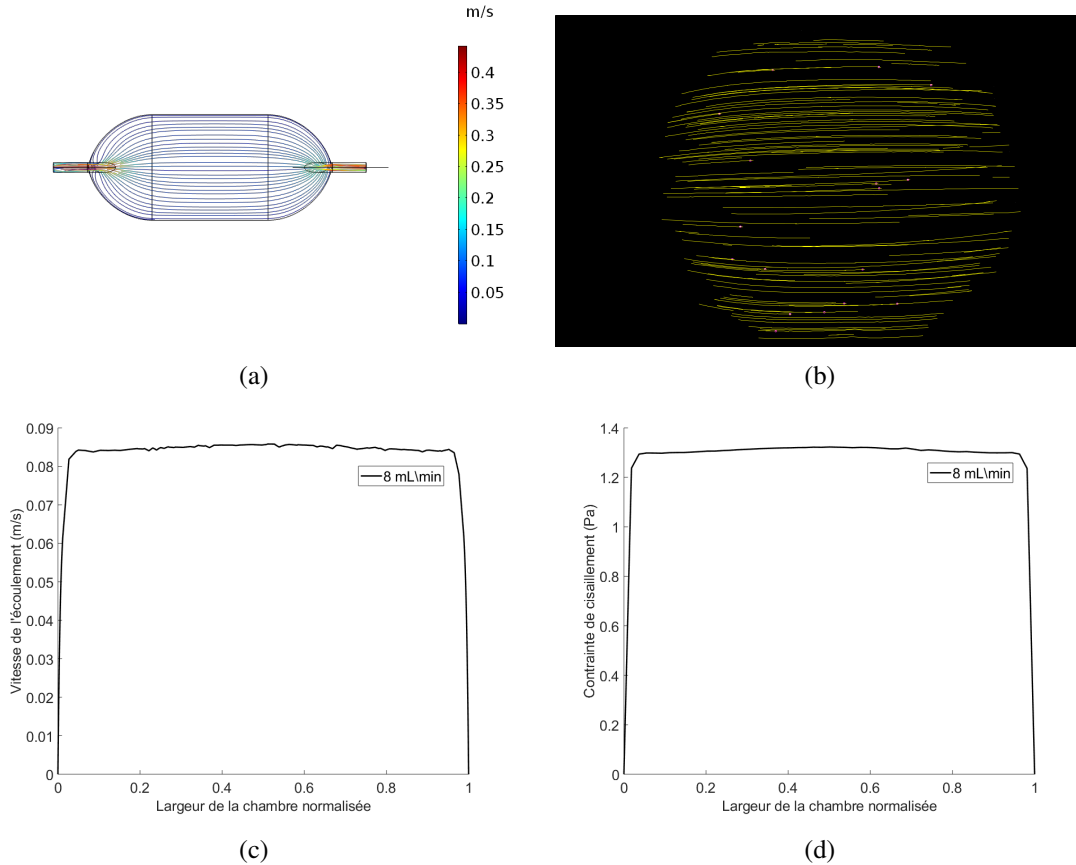


FIGURE 2.11 – Résultats de la simulation à 8 mL/min avec les dimensions mesurées de la SFC. (a) Lignes de courant obtenues par simulation de l'écoulement. (b) PTV avec microbilles de  $30 \mu\text{m}$  ( $\rho = 1.005 \text{ g/cm}^3$ ). (c) Profil de vitesse à  $z = 125 \mu\text{m}$ . (d) Profil de cisaillement à  $z = 0 \mu\text{m}$ . Le fluide est approximé à de l'eau à  $21^\circ\text{C}$  ( $\rho = 999 \text{ kg/m}^3$ ,  $\mu = 9.84 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ).

SFAs sur des cellules en culture, les propriétés du liquide de perfusion sont posées comme étant celles de l'eau à cette même température, puisque leur viscosité est pratiquement identique. La composition du liquide ne comprend aucune solution pouvant altérer la viscosité dramatiquement, de sorte que l'hypothèse soit fautive. Ainsi, les résultats affichés aux figures 2.10 et 2.11 englobent le bassin de résultats possible pour les tests en écoulement cisailé sur des cellules en culture (figure 2.12).

## 2.2 Préparation des cultures de cellules

Les types cellulaires utilisés dans ce projet sont différents et nécessitent des protocoles uniques à suivre pour assurer une croissance optimale des cellules. Cette section traite des conditions de culture des cellules en préparation aux SFAs. Une fois leur croissance terminée, ces cellules sont placées sur des lamelles de 25 mm de diamètre et incubées pour un certain temps. Après quoi, la SFC peut être assemblée avec les lamelles recouvertes de cellules pour effectuer les SFAs. Il est à noter que des lamelles de verre ou de quartz sont choisies selon les débits employés lors des SFAs. Pour les cellules

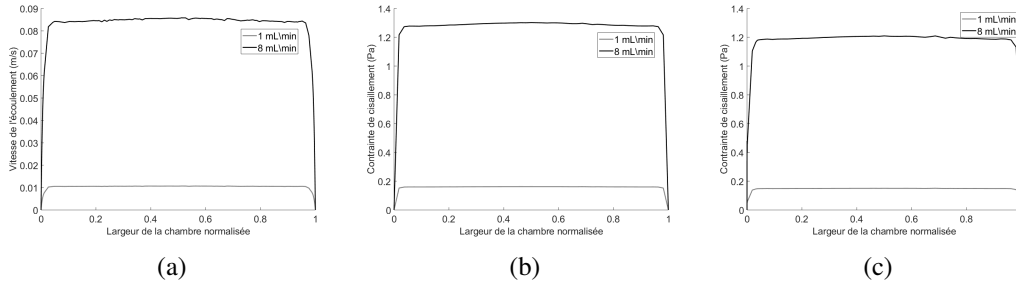


FIGURE 2.12 – (a) Profils de vitesse ( $z = 125 \mu\text{m}$ ) et (b-c) de cisaillement ( $z = 0 \mu\text{m}$  et  $z = 10 \mu\text{m}$ ) pour les simulations complétées avec les dimensions mesurées de la chambre d’imagerie et les conditions d’expérimentation des tests en écoulement cisailé.

NIH 3T3, des lamelles de quartz sont utilisées, car elles sont plus rigides, alors que pour les HEK 293T/17, les globules rouges et les neurones ce sont des lamelles de verre.

### 2.2.1 NIH 3T3

Les cellules NIH 3T3 utilisées proviennent de tissus embryonnaires de souris. Ce type cellulaire est choisi, car il est considéré comme adhérent. Autrement dit, ces cellules ont la propriété d’adhérer par elles-mêmes à leur environnement, sans *coating*. Ce sont des fibroblastes, ainsi elles adoptent une forme allongée, aplatie et fusiforme [22; 46].

Pour la culture, les cellules NIH 3T3 sont placées dans un milieu composé principalement de Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) à haute teneur en glucose, avec L-glutamine et sans pyruvate de sodium (NaPyr) (Corning<sup>TM</sup> 10017CV). Les volumes sont donnés pour une flasque de  $75 \text{ cm}^2$ . À cela est ajouté 5 mL de glutagrow (Corning<sup>TM</sup> 25015CI), 5 mL de NaPyr (Gibco<sup>TM</sup> LS11360070), 5 mL d’antibiotique-antimitotique (Gibco<sup>TM</sup> LS15240062) et du sérum de veau bovin avec supplément de fer (10%) (VWR 10158-358). Les cellules sont incubées à  $37^\circ\text{C}$  dans une atmosphère à 95% d’air et une concentration de dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  de 5%.

Pour éviter une trop grande confluence des cellules en culture, une étape de sous-culture est réalisée deux fois par semaine pour conserver la confluence à 80% ou moins. Le protocole pour la sous-culture est affiché en annexe à la section A.4 pour consultation.

Pour l’étude des cellules NIH 3T3 dans la chambre d’imagerie, les cellules sont étalées sur des lamelles de quartz suite à leur croissance. Les lamelles sont placées à l’intérieur de plaques à six puits pour ensuite ajouter les cellules. De manière à obtenir un nombre de cellules élevé dans le champ de vue du microscope, sans toutefois avoir une forte confluence, 150 000 cellules sont placées par puits et incubées pour environ 20 heures. Ainsi, les cellules s’adaptent à leur environnement et adoptent leur forme allongée et aplatie. En attendant moins de 20 heures, un moins grand nombre de cellules ont le temps d’adhérer aux lamelles. Pour ce qui est de la densité cellulaire, 150 000 cellules par puits est optimal pour avoir un intermédiaire entre un faible nombre de cellules par champ de vue et une



confluence trop élevée, nuisant à leur développement. La solution de perfusion utilisée durant les tests est une solution iso-osmotique ressemblant au milieu DMEM.

Les cellules NIH 3T3 sont imagées avec le microscope holographique numérique en transmission de Lyncée Tec avec un objectif 20x. Dues à leur taille, certaines cellules occupent une plus grande surface que le champ de vue avec un objectif de 40x. L'objectif 20x permet d'observer quatre à cinq cellules par champ de vue avec la densité cellulaire mentionnée précédemment.

### 2.2.2 HEK 293T/17

Les cellules HEK 293T/17 sont des cellules embryonnaires rénales humaines. Ce sont des cellules épithéliales et possèdent donc des propriétés adhérentes lors de leur croissance. Tout comme les cellules NIH 3T3, elles ne nécessitent pas de *coating* pour qu'elles adhèrent à leur environnement.

Pour la culture, les cellules HEK 293T/17 sont placées dans un milieu composé principalement de DMEM à haute teneur en glucose, avec L-glutamine et sans NaPyr (Corning™ 10017CV). Les volumes sont donnés pour une flasque de 75 cm<sup>2</sup>. À cela est ajouté 5 mL de glutagrow (Corning™ 25015CI), 5 mL de NaPyr (Gibco™ LS11360070), 5 mL d'antibiotique-antimitotique (Gibco™ LS15240062) et 50 mL de sérum de veau foetal avec supplément de fer (10%) (VWR, Premium Grade FBS #97068-085). Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 95% d'air et une concentration de dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> de 5%. Le protocole pour la sous-culture est affiché en annexe à la section A.5 pour consultation.

Pour l'étude des cellules HEK 293T/17 dans la chambre d'imagerie, les cellules sont étalées sur des lamelles de borosilicate (25 mm) suite à leur croissance. Les lamelles sont placées à l'intérieur de plaques à six puits pour ensuite ajouter les cellules. De manière à obtenir un nombre de cellules élevé dans le champ de vue du microscope, sans toutefois avoir une forte confluence, 384 000 cellules sont placées par puits et incubées pendant environ 20 heures. Ainsi, les cellules ont le temps de s'adapter à leur environnement et d'adhérer aux lamelles. Par contre, certaines cellules peuvent se diviser durant cette période. Une attention particulière doit être portée à ce point, de sorte que l'analyse soit effectuée sur des cellules étant au même stade de développement. En attendant moins de 20 heures, un moins grand nombre de cellules ont le temps d'adhérer aux lamelles. Par contre, il est important de noter que les cellules HEK 293T/17 ont un temps de division rapide. Avec ce temps d'attente, il est fort probable d'observer des cellules étant en processus de division. Ces dernières se comportent différemment des cellules ayant terminé leur division. Tout comme les cellules NIH 3T3, une densité de 384 000 cellules par puits est optimale pour avoir un intermédiaire entre un faible nombre de cellules par champ de vue et une confluence trop élevée, nuisant à leur développement. Les solutions de perfusion utilisées durant les tests sont une solution DMEM (Corning™ 10017CV) ou une solution iso-osmotique ressemblant au milieu DMEM.

Les cellules HEK 293T/17 sont, elles aussi, imagées avec le microscope holographique numérique en transmission de Lyncée Tec avec un objectif 20x. L'objectif 20x permet d'observer plusieurs

cellules dans un même champ de vue avec la densité cellulaire mentionnée précédemment.

### 2.2.3 Globule rouge

Les globules rouges sont les cellules permettant le transport de l'oxygène. Ils possèdent des propriétés élastiques impressionnantes avec lesquelles une forte déformation de leur corps et un retour à l'état initial sont possibles. C'est un type cellulaire intéressant pour optimiser la méthode de déformation par écoulement cisailé, car ils sont facilement accessibles. Ils sont utilisés pour développer la méthode des SFAs et ses étapes. Par contre, ces cellules ne possèdent pas de propriétés adhérentes et nécessitent l'emploi d'un agent favorisant l'adhésion aux lamelles.

Pour la culture des globules rouges, une procédure est suivie pour extraire les globules rouges du sang, puisque le sang contient aussi du plasma, des globules blancs et des plaquettes. Le plasma a un impact néfaste sur le signal en DHM, car il est composé de lipides, et il est important de s'assurer que seuls les globules sont déposés sur les lamelles. Une fois ce protocole réalisé, les lamelles de verre sont déposées dans une solution de 0.01 % poly-L-ornithine pendant la nuit. La poly-L-ornithine est une chaîne synthétique d'acides aminés favorisant l'adhésion des globules rouges aux lamelles de verre. Le jour de l'expérience, les lamelles sont enlevées de la solution de poly-L-ornithine et asséchées. Ensuite, 105  $\mu\text{L}$  de dilution de sang est ajouté sur chacune des lamelles de 25 mm. Un temps d'attente minimal de 1 heure est nécessaire pour qu'une grande majorité des globules s'attachent à la poly-L-ornithine. La solution de perfusion utilisée pour les tests en écoulement cisailé est une solution HEPA.

Les globules rouges sont imagés avec le microscope holographique numérique en transmission de Lyncée Tec avec un objectif 40x. L'objectif 40x est nécessaire pour imager les cellules avec une taille convenable.

### 2.2.4 Neurone

Les neurones sont des cellules nerveuses constituant la base du système nerveux. Ils peuvent être excités par un courant électrique et communiquent entre eux par ce même moyen. Leur étude est encore jeune, mais primordiale à la compréhension du développement des maladies psychiatriques. À cet effet, des neurones corticaux primaires de rat sont utilisés pour l'étude des neurones dans ce projet.

Pour la culture des neurones primaires de rat, une procédure est complétée pour extraire du cortex disséqué les neurones de rat. Ces derniers sont des rats postnataux âgés de 0 à 1 jour P0 (Sprague Dawley), comme décrit dans le protocole en [74]. Les neurones sont déposés sur des lamelles de borosilicate (25 mm) qui ont été préalablement recouvertes de poly-D-lysine, une matrice extracellulaire facilitant l'adhésion des cellules aux lamelles. La densité moyenne de cellules déposées est de 1.5 à 2 millions de cellules par  $\text{cm}^2$ . Par la suite, les neurones sont cultivés pendant deux semaines dans le milieu Neurobasal supplémenté de B27 (LS21103049, Gibco<sup>TM</sup>). Ils sont maintenus à une température de 37°C dans une atmosphère à 95% d'air et 5% de  $\text{CO}_2$ .

Pour l'étude des neurones, ils sont analysés au jour 14 de leur développement sur la même lamelle où ils se sont développés. La solution de perfusion pour les tests en écoulement cisailé est une solution tamponnée avec de l'HEPES, d'une osmolarité similaire au milieu Neurobasal.

Les neurones corticaux primaires de rat sont imagés avec le microscope holographique numérique en transmission de Lyncée Tec avec un objectif 20x.

## 2.3 Montage pour test en écoulement cisailé

Le microscope holographique numérique T1000 est un microscope commercial de Lyncée Tec. Il est composé d'un laser monochromatique avec une longueur d'onde de 666 nm. L'acquisition des hologrammes numériques s'effectue avec le logiciel Koala et une caméra CCD permettant de faire des acquisitions jusqu'à 193 images par seconde. La fréquence d'images acquises peut être modifiée à l'aide du logiciel pour réduire la taille des vidéos enregistrés.

La SFC est installée sur le microscope à l'aide d'une plaque adaptée à la chambre et au microscope. La plaque fournie avec la chambre n'est pas compatible avec le microscope et une nouvelle a dû être conçue. La forme de la chambre d'imagerie fait en sorte que les cellules ne peuvent être au plan focal sans que les objectifs du microscope touchent à la plateforme. Ainsi, une plaque adaptée à la chambre d'imagerie a été dessinée sur SOLIDWORKS et imprimée en 3D (figure A.2 en annexe) pour pallier ce problème.

Les SFAs sont réalisés avec une pompe à seringue Legato 180. Cette pompe permet d'entrer le débit voulu et un moteur est activé pour appuyer sur une seringue à la vitesse appropriée. De ce fait, un débit précis et constant est atteint avec cet instrument. Une seringue de 60 mL en plastique est utilisée pour toutes les expériences conjointement avec des tubes pour relier la pompe à la chambre d'imagerie et la chambre d'imagerie au contenant de rejet.

La pompe à seringue prend un certain temps à atteindre son régime permanent lorsque le débit est appliqué. Donc, le débit n'est pas appliqué instantanément dans le système. Cela n'est pas souhaité, car les modèles viscoélastiques utilisés dans l'analyse des SFAs (section 1.2) sont basés sur l'application d'une contrainte instantanée. Par conséquent, une valve en T est placée à la sortie de la seringue, de sorte que le système ait deux sorties. La première sortie est utilisée pour jeter le liquide de perfusion hors du système jusqu'au moment où la pompe atteint son régime permanent. Après quoi, la valve est tournée pour que la pompe perfuse dans la seconde sortie, branchée à la chambre d'imagerie. Ayant déjà atteint le débit demandé dans la première sortie, la pompe perfuse donc instantanément le débit voulu dans la chambre d'imagerie au moment où la valve est tournée. De cette façon, aucune pression supplémentaire n'est appliquée dans le système, ce qui peut nuire à l'étanchéité du système lors d'une variation de pression. Autrement dit, une contrainte de cisaillement instantanée et constante est appliquée dans la chambre d'imagerie dès que le liquide est perfusé de la première à la deuxième sortie.

## 2.4 Algorithme d'autofocus

La microscopie holographique numérique permet la reconstruction numérique des hologrammes acquis par une caméra CCD. En effet, comme expliqué à la section 1.4, l'hologramme numérique doit être propagé numériquement à une distance  $d$ , de sorte que l'image de phase reconstruite soit au plan focal. De ce fait, les images de phase peuvent être analysées quantitativement. Par contre, il a été montré qu'un hologramme numérique n'ayant pas été propagé à son vrai plan focal produit des données fautives sur l'image de phase quantitative reconstruite [75]. Autrement dit, il est primordial de s'assurer que la distance de propagation choisie résulte au vrai plan focal de l'image.

Avec le logiciel Koala, chaque acquisition d'hologrammes est reconstruite à une distance de propagation la plus près du plan focal choisie à l'oeil par l'utilisateur. Ainsi, le critère de sélection sur l'image de phase est basé sur la clarté des cellules, en tentant de s'éloigner des images floues. Or, même avec la plus grande attention portée sur ce critère, il se peut que la distance choisie ne tombe pas exactement au plan focal. La tâche devient rapidement fastidieuse lorsque plusieurs hologrammes doivent être reconstruits à des distances différentes. De plus, au cours d'une expérience, il est possible qu'un léger déplacement du plan focal se produise en cours d'acquisition. Dans ce cas, la distance de propagation doit être ajustée à chaque instant de l'acquisition pour contrebalancer l'effet du déplacement du plan focal.

Parallèlement, lors de SFAs, il s'est avéré que les hologrammes acquis n'étaient pas tous au même plan focal. En effet, lorsque le débit est nul en début de SFA, les hologrammes peuvent être reconstruits à une distance identique. Or, lorsque le débit est appliqué dans la chambre, un déplacement du plan focal est observé sur tous les types cellulaires analysés, mais le déplacement du plan focal est flagrant pour les globules rouges. Il est possible de voir cette différence sur la qualité de l'image de phase avec et sans débit à la figure 2.13. L'éloignement du plan focal lors d'un SFA est causé par la force qu'applique le fluide en accélération dans la SFC. Le fluide applique des pressions internes sur les lamelles inférieures et supérieures et cela a comme effet de légèrement déformer ces dernières. De ce fait, les cellules s'éloignent du plan focal et la distance de propagation doit être modifiée à plusieurs reprises.

Pour ces raisons, une méthode permettant d'automatiser la détection de la distance de propagation adéquate est implémentée dans la procédure de reconstruction des hologrammes numériques. En fait, cette méthode permet d'assurer que les images de phase obtenues soient reconstruites au vrai plan focal, de ce fait exprimant des données exactes. Cet algorithme utilise la variance de l'image d'intensité reconstruite comme métrique pour identifier la distance de propagation requise [75]. L'hologramme est reconstruit en une image d'intensité à plusieurs distances de reconstruction et la variance de l'image d'intensité est mesurée simultanément. Cette métrique permet d'atteindre le critère de netteté en  $z$  tout en demandant un faible temps de calcul [75]. De ce fait, l'algorithme recherche la distance de reconstruction résultant en la plus faible variance sur l'image d'intensité. Une fois la distance optimale identifiée, seules les images d'intensité et de phase à cette distance de propagation

sont enregistrées. Ainsi, cet algorithme permet de reconstruire chaque hologramme à une distance distincte des autres. De plus, l'algorithme d'autofocus permet de contrer les variations en qualité d'image causée par les aptitudes de l'utilisateur lors de la reconstruction manuelle des hologrammes.

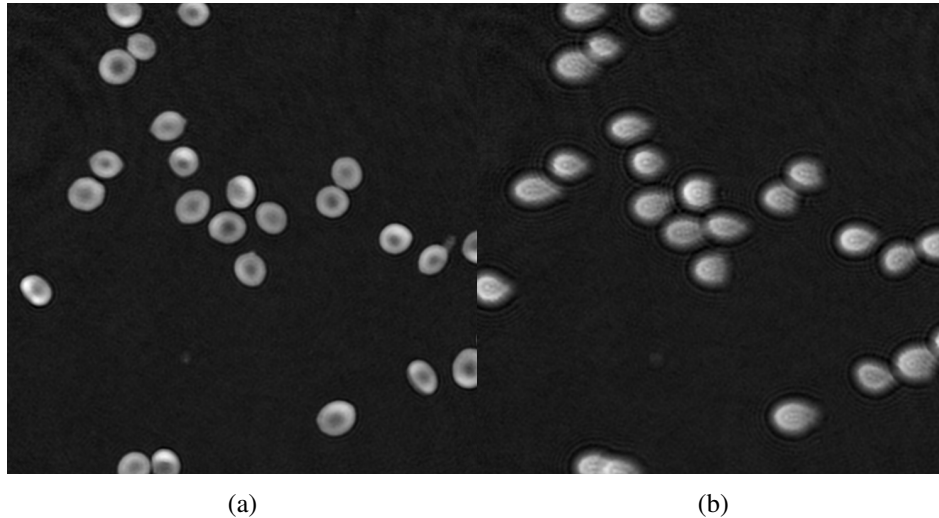


FIGURE 2.13 – Images de phase reconstruites numériquement avec une même distance de reconstruction, (a) avant et (b) suivant l'application d'un débit ( $Q = 4 \text{ mL/min}$ ). Un éloignement du plan focal apparaît lors des tests en écoulement cisailé résultant en des images hors foyer. Ces dernières ne peuvent être analysées par la suite. La direction de l'écoulement est de droite à gauche. Objectif : 40x.

Lors d'un test d'écoulement cisailé sur des globules rouges, l'effet du déplacement du plan focal est drastique (figure 2.14). Au moment même où le débit est appliqué, la distance de propagation numérique doit être modifiée. En implémentant l'algorithme d'autofocus, l'acquisition, qui s'éloigne graduellement du plan focal une fois le débit appliqué, est reconstruite au vrai plan focal à chaque image (figure 2.14). Par conséquent, les mesures tirées des cellules, telles que son aire et la phase à chaque pixel, sont exactes. De ce fait, l'emploi d'un algorithme d'autofocus est essentiel à l'analyse du déplacement du centre de masse des cellules qui est détaillé au chapitre suivant.

Une seconde option est employée pour atténuer le déplacement du plan focal lors des tests en écoulement cisailé à haut débit ( $> 4 \text{ mL/min}$ ). Lors de ces tests, les lamelles de verre sont remplacées par des lamelles de quartz. Les lamelles de quartz sont plus fragiles que les lamelles de verre, mais possèdent une plus grande rigidité. Cela leur permet de moins se déformer à des débits analogues. Ainsi, pour des cellules nécessitant une plus grande contrainte de cisaillement pour les déformer, telles que les NIH 3T3, des lamelles de quartz sont utilisées pour les fenêtres inférieures et supérieures de la chambre pour diminuer le déplacement du plan focal causé par le débit nécessaire élevé. Toutefois, un déplacement du plan focal lors des tests en écoulement cisailé est toujours observé, ce qui justifie d'autant plus l'emploi de l'algorithme d'autofocus.

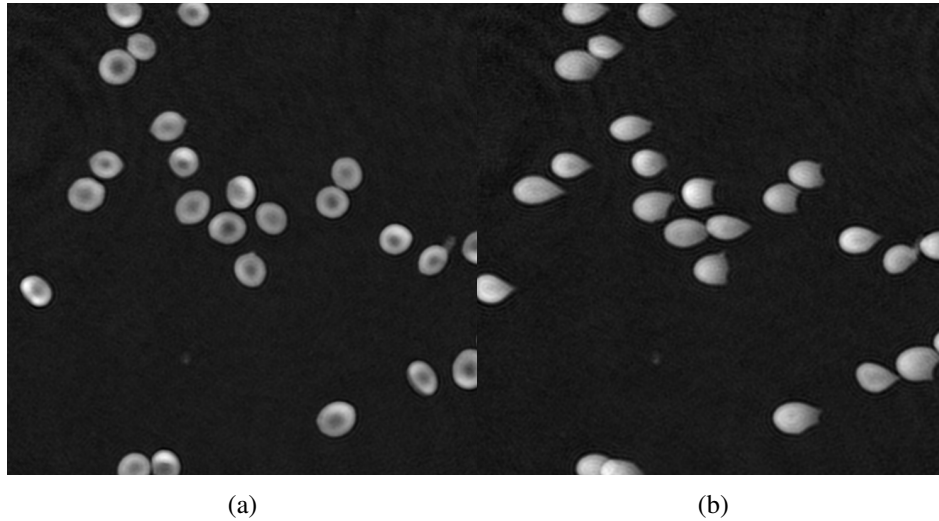


FIGURE 2.14 – Images de phase reconstruites numériquement à l’aide d’un algorithme d’autofocus, (a) avant et (b) suivant l’application d’un débit ( $Q = 4 \text{ mL/min}$ ). Différentes distances de reconstructions sont nécessaires pour les images obtenues en test d’écoulement cisailé. Les images sont toutes reconstruites au bon plan focal. La direction de l’écoulement est de droite à gauche. Objectif : 40x.

## 2.5 Analyse par QP-DHM du déplacement du centre de masse cellulaire lors d’un test en écoulement cisailé

### 2.5.1 Conditions d’expérimentation

Lors d’un test en écoulement cisailé sur des cellules, plusieurs paramètres doivent être définis avant d’entreprendre l’expérience. Tout d’abord, pour un test complet de déformation-relaxation, les temps de déformation et de relaxation doivent être choisis selon leur propre comportement. En déformation, la cellule est déformée et atteint un degré de déformation relié au temps d’application de la contrainte et de la contrainte elle-même. Par contre, en relaxation, la cellule retourne à un état qui varie en fonction de la durée de la déformation. Ainsi, la relaxation nécessite un long temps d’acquisition pour observer ce comportement, car la cellule atteint un état stable lorsque  $t \rightarrow \infty$ . Par conséquent, l’acquisition consiste en 15 secondes pour la déformation ( $Q > 0 \text{ mL/min}$ ) et environ 45 secondes et plus pour la relaxation ( $Q = 0 \text{ mL/min}$ ). De plus, une durée de 3 secondes précède la déformation permettant d’obtenir le centre de masse de la cellule à son état initial.

Par la suite, il faut s’assurer d’utiliser une fréquence d’acquisition d’hologrammes permettant une visualisation efficace des déplacements du centre de masse. Avec la caméra CCD, une fréquence de 193 images par seconde est atteignable. Or, il est possible de diminuer cette valeur à 48 images par seconde et tout de même obtenir des acquisitions appropriées. De plus, cela permet de réduire la taille des acquisitions, réduisant le temps de calcul pour les étapes subséquentes.

Ensuite, le nombre d’hologrammes acquis fait varier la longueur de la période de relaxation, puisque la période de déformation des cellules est fixée à 15 secondes de manière à pouvoir compa-

rer les résultats entre les types cellulaires. Principalement, le nombre d'hologrammes par acquisition varie de 3000 à 4000 hologrammes. À 48 images par seconde, cela permet d'atteindre un temps de relaxation convenable pour observer le retour à l'état initial des types cellulaires étudiés.

Finalement, le débit employé pour les tests en écoulement cisailé influence le déplacement du centre de masse des cellules. Il importe qu'il soit choisi convenablement pour chaque type cellulaire, puisque certains types démontrent une résistance accrue face à la contrainte de cisaillement appliquée. Cet aspect est traité plus en détail dans la section suivante.

### **2.5.2 Image de phase quantitative obtenue par QP-DHM lors d'un test en écoulement cisailé**

Les hologrammes numériques acquis lors des tests sont reconstruits à l'aide de l'algorithme d'autofocus pour obtenir les images de phase quantitative. Chaque image de phase quantitative est représentée en radian, correspondant au délai de phase induit par l'échantillon (figure 2.15). On remarque une forte valeur du signal de phase au centre des cellules où leur hauteur est la plus élevée.

Une image de la différence du signal de phase est calculée en effectuant la différence entre une image de phase au temps  $t$  et l'image au temps  $t = 0$  de l'acquisition. Cette image peut faciliter la visualisation de l'évolution du signal de phase au cours du test d'écoulement cisailé. Ainsi, par l'équation 1.7, une différence du signal de phase positive sur la surface de la cellule indique une augmentation de la hauteur de la cellule ou une réorganisation cellulaire causant un changement de l'indice de réfraction à ce pixel. Comme il est possible de voir à la figure 2.16b, après l'application du débit, on remarque une augmentation du signal de phase en aval de la cellule et une diminution en amont. La déformation cellulaire est faible pour la plupart des cellules, mais décelable. Par ailleurs, une différence de signal de phase nulle indique qu'aucune déformation n'est engendrée par le fluide en mouvement. Une différence du signal de phase non nulle est importante, car elle est utilisée pour calculer le centre de masse des cellules à chaque instant d'un SFA. D'autre part, l'aire initiale des corps cellulaires est délimitée sur les figures 2.15 et 2.16b et est utilisée pour analyser la déformation cellulaire lors des SFAs. Il est intéressant de noter qu'un déplacement de la phase apparaît dans les zones délimitant l'aire initiale des cellules suite à l'application d'un débit. En fait, les variations dans la différence de phase ne dépassent pas les zones délimitées par l'aire initiale des cellules. Cela peut indiquer deux phénomènes : son matériel cellulaire s'est déformé comme souhaité ou la cellule s'est déplacée légèrement en réponse à la contrainte de cisaillement. Ces phénomènes sont traités plus en détail dans le chapitre suivant.

Par contre, il a été remarqué que, pour un même débit, une déformation est observée chez les cellules HEK 293T/17, alors qu'aucune n'est présente chez les cellules NIH 3T3 (figure 2.17). De ce fait, le débit de l'écoulement est ajusté pour les types cellulaires, de sorte qu'un déplacement du centre de masse des cellules soit présent. Ainsi, les cellules HEK 293T/17 et les neurones sont déformés sous un débit allant de 1 à 3 mL/min et les cellules NIH 3T3 sous un débit allant de 5 à 8 mL/min.

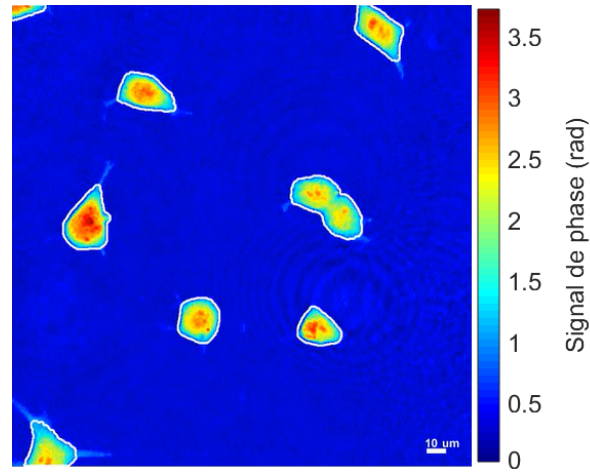


FIGURE 2.15 – Signal de phase pour des cellules HEK 293T/17 avant l’application d’un débit. Objectif : 20x.

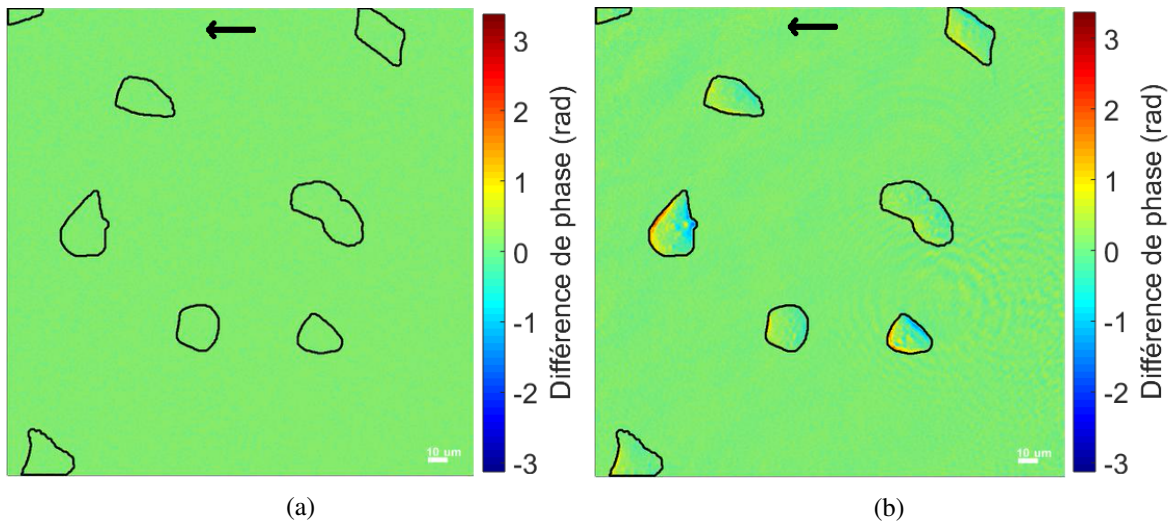


FIGURE 2.16 – Différence du signal de phase d’une cellule HEK 293T/17 dans des conditions (a) sans écoulement cisailé et (b) avec un écoulement cisailé ( $Q = 3.75 \text{ mL/min}$ ). Le déplacement du signal de phase est calculé par la différence entre une image au temps  $t$  et une image au temps initial. Une augmentation de la phase est présente en aval de la cellule, alors qu’une diminution est observée en amont. Cette différence de phase représente une déformation du corps cellulaire causée par le fluide de perfusion en mouvement. La direction de l’écoulement est indiquée par la flèche. Objectif : 20x.

## 2.6 Traitement des images de phase pour calculer le centre de masse des cellules

Suite à la reconstruction des hologrammes numériques, les images de phase quantitatives sont corrigées et traitées à l’aide d’un logiciel (CellProfiler). Premièrement, les acquisitions sont inspectées pour toute image saturant le signal de phase ou ayant des débris cellulaires interférant avec les cellules. Ces images sont supprimées et ne font pas partie de l’analyse. Deuxièmement, le fond des images est



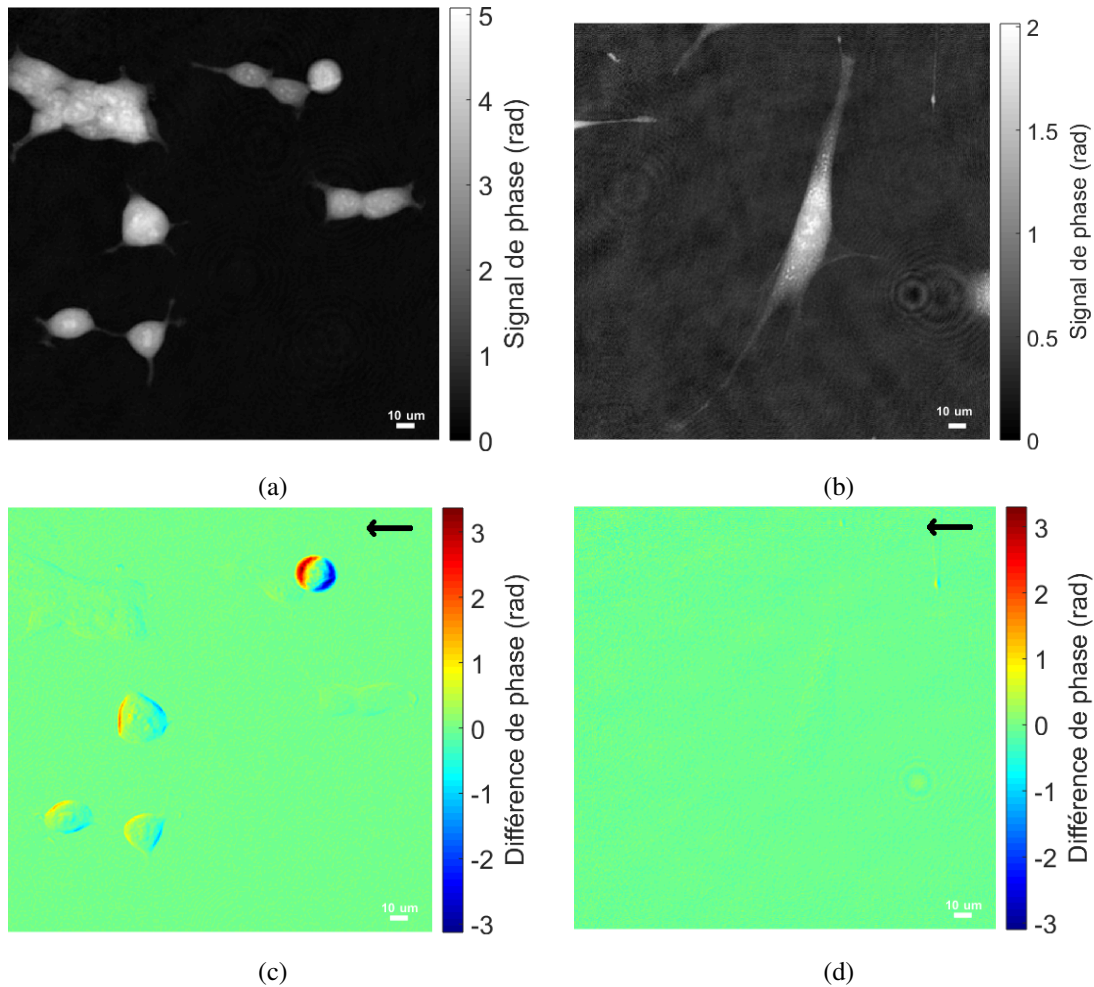


FIGURE 2.17 – Images de phase de cellules (a) HEK 293T/17 et (b) NIH 3T3. Différence de phase sous un écoulement cisaillé ( $Q = 3 \text{ mL/min}$ ) pour des cellules (c) HEK 293T/17 et (d) NIH 3T3. Une déformation est visible pour les cellules HEK 293T/17, mais aucune pour les cellules NIH 3T3. Un débit plus élevé est nécessaire pour déformer les fibroblastes. La direction de l'écoulement est indiquée par la flèche. Objectif : 20x.

corrigé avec le logiciel, de sorte qu'il soit le plus constant possible sur tout le champ de vue. Un fond incliné ou irrégulier peut produire des valeurs erronées du signal de phase. Troisièmement, les cellules sont segmentées avec le logiciel, de manière à extirper l'information unique à chaque cellule. La segmentation des cellules génère des masques numériques qui sont employés pour calculer la surface, la hauteur et le centre de masse des cellules. Ces paramètres sont utilisés pour effectuer une analyse propre à chaque cellule.

Une fois la segmentation complétée, le centre de masse pondéré par le signal de phase est calculé. En utilisant l'équation 1.36 et les masques numériques obtenus pour chaque cellule, le centre de masse pondéré est calculé à l'intérieur du masque. Le centre de masse est normalisé par rapport à la médiane du fond de l'image, de manière à régulariser les données à travers une acquisition contenant

des fluctuations du signal de phase. Le déplacement du centre de masse pondéré est calculé selon l'équation 1.37b. Dans ce cas-ci, le centre de masse en  $x$  et en  $y$  est soustrait à la moyenne du centre de masse initial en  $x$  et en  $y$  pour les 3 premières secondes du SFA. Cela résulte en une valeur initiale beaucoup plus stable et représentative de l'état initial de la cellule, car les données fluctuent autour d'une valeur. Une fois toutes ces étapes réalisées, la courbe du déplacement du centre de masse d'une cellule lors d'un SFA, affichée à la figure 2.18, est adoucie par une méthode de *robust locally weighted scatter plot smooth (rflowess)* dans MATLAB, de façon à se débarrasser des fluctuations rapides des données. Dans cette figure, le SFA sur une cellule HEK 293T/17 consiste en une déformation cellulaire de 3 secondes, sans relaxation du corps cellulaire. Il est possible de voir que le déplacement du centre de masse avant l'application de la contrainte demeure nul, si l'on considère le bruit sur la mesure comme une erreur expérimentale. À l'application de la contrainte, un déplacement abrupt du centre de masse se produit et continue de croître plus lentement par la suite. La forme de la courbe est semblable à celle des modèles viscoélastiques, présentés à la section 1.6, ce qui permet de croire que les paramètres viscoélastiques de la cellule peuvent être extraits. Cet aspect est détaillé plus en profondeur dans le chapitre suivant.

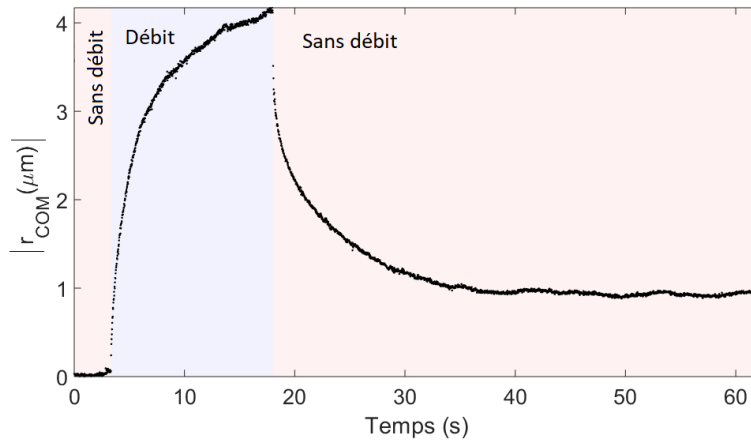


FIGURE 2.18 – Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d'un SFA sur une cellule HEK 293T/17.

Pour effectuer l'étude des propriétés viscoélastiques des cellules entières, il importe d'obtenir des mesures sur la forme de la cellule analysée. En effet, l'aire de la surface et la hauteur de la cellule sont nécessaires au calcul de la force appliquée par le fluide sur celle-ci. Par conséquent, avec l'équation 1.7, il est possible d'obtenir une modélisation approximative de la forme du corps cellulaire (figure 2.19a). En isolant la hauteur de la cellule dans l'équation et avec l'hypothèse d'une différence d'indice de réfraction homogène entre la cellule et le milieu, on obtient la hauteur moyenne de la cellule à chaque pixel dans l'image de phase :

$$\bar{h}_{cellule}(x,y) = \frac{\Delta\phi(x,y) \lambda}{2\pi (\bar{n}_{cellule} - \bar{n}_{milieu})} = \frac{\Delta\phi(x,y)\lambda}{2\pi\Delta\bar{n}} \quad (2.6)$$

avec  $\bar{n}_{milieu}$  l'indice de réfraction de la solution de perfusion ( $\bar{n} = 1.332$ ) et  $\bar{n}_{cellule}$  l'indice de réfraction

moyen de la cellule. L'indice de réfraction moyen des cellules a été trouvé par réfractométrie [76] et est affiché au tableau 2.4. De cette manière, il est possible de calculer la moyenne de tous les  $\bar{h}_{cellule}(x,y)$  pour obtenir la hauteur moyenne de la cellule entière  $\bar{h}_{cellule}$ .

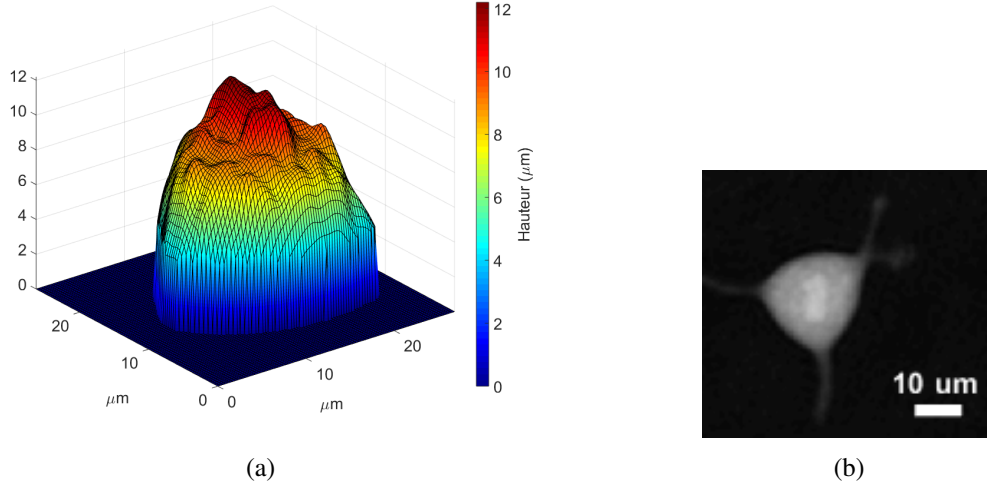


FIGURE 2.19 – (a) Modélisation approximative d'une (b) cellule avec l'hypothèse que  $\bar{n}_{milieu} = 1.332$  et  $\bar{n}_{cellule} = 1.3637$  et l'équation 2.6. L'aire de la surface de la cellule et la hauteur moyenne de la cellule sont obtenues par cette modélisation. La cellule a une aire de surface de  $512 \pm 9 \mu\text{m}^2$  et une hauteur moyenne de  $8.03 \mu\text{m}$  sur l'image.

Tableau 2.4 – Indice de réfraction moyen des cellules.

Cellule	$\bar{n}_{cellule}$
NIH 3T3	1.3660
HEK 293T/17	1.3637
Neurone	1.3672

Par la suite, la hauteur moyenne de la cellule est utilisée pour déterminer la contrainte de cisaillement appliquée à cette hauteur, d'après les résultats des simulations obtenus précédemment. Ici, on fait l'hypothèse d'une variation linéaire de la contrainte de cisaillement en fonction de la hauteur dans la SFC. Autrement dit, puisque la contrainte de cisaillement est nulle au centre de la SFC et maximale à sa surface, une relation linéaire est utilisée pour calculer la contrainte de cisaillement à une hauteur  $z$  :

$$\tau_{z=\bar{h}_{cellule}} = -\frac{\tau_{base} \cdot \bar{h}_{cellule}}{(H/2)} + \tau_{base} \quad (2.7)$$

Ainsi, la contrainte de cisaillement utilisée dans l'analyse du chapitre suivant est propre à la cellule étudiée. Par conséquent, une contrainte plus élevée est appliquée sur une cellule ayant une plus petite taille, car elle est plus près de la base de la SFC. Pour terminer, cela permet une étude et des résultats adaptés directement à la cellule entière étudiée lors d'un SFA. Dans le chapitre suivant, il est expliqué

que la méthode de mesure des propriétés viscoélastiques fait usage de ces mesures pour déterminer les paramètres des modèles viscoélastiques préalablement à l'application d'une fonction d'ajustement de courbe. De ce fait, l'interprétation des données expérimentales par les modèles viscoélastiques est basée sur une physique adaptée de la cellule.

## Chapitre 3

# Résultats expérimentaux et analyse

Ce chapitre est consacré à l'analyse des données expérimentales prédites par les modèles viscoélastiques. Dans le chapitre précédent, il est expliqué que les tests en écoulement cisailé permettent d'obtenir le déplacement du centre de masse des cellules en fonction du temps. À l'intérieur de ce chapitre, ces résultats sont interprétés avec les modèles viscoélastiques présentés à la section 1.6. Ces modèles prédisent une réponse en déformation distincte et leurs caractéristiques respectives sont détaillées dans les sections suivantes. Une portion du groupe de données des cellules NIH 3T3 est utilisée pour effectuer le développement de la méthode. Par la suite, l'entièreté des données pour les types cellulaires est utilisée pour l'étude des propriétés viscoélastiques. En résumé, ce chapitre traite de la métrologie derrière la prédiction numérique des données expérimentales par les modèles viscoélastiques dans le but d'extraire les propriétés viscoélastiques de cellules entières.

### 3.1 Fonction d'ajustement de courbe

Une fonction d'ajustement de courbe est utilisée pour prédire les courbes expérimentales avec les modèles viscoélastiques théoriques (section 1.6). La fonction est réalisée principalement avec le *Optimization Toolbox* de MATLAB. Les équations des modèles viscoélastiques possèdent plusieurs valeurs inconnues qui nécessitent d'être déterminées pour prédire correctement la réponse en déformation d'une cellule. Par exemple, pour prédire une courbe expérimentale d'un SFA en déformation-relaxation avec le modèle St, les paramètres suivants sont requis :  $F$ ,  $t_1$ ,  $E_1$ ,  $E_2$  et  $\eta_1$ . Cela résulte en une recherche de 5 paramètres pour la fonction d'ajustement de courbe, ce qui donne un grand nombre de degrés de liberté à la fonction et augmente le nombre de solutions locales et globales possibles dans l'équation à résoudre. Les propriétés viscoélastiques de la cellule étudiée ( $E$ ,  $\eta$ ) sont extraites de ces équations, ainsi il est impératif de réduire l'erreur reliée à la fonction d'ajustement. En fait, le nombre de variables à déterminer par la fonction doit être diminué, de manière à ce que le bassin de solutions aux équations diminue. Pour ce faire, certaines connaissances et mesures expérimentales sont employées pour déterminer ces variables.

### 3.1.1 Identification des paramètres connus

Tout d'abord, la variable  $t_1$  lors des SFAs en déformation-relaxation est déterminée facilement par l'utilisateur. En analysant les courbes obtenues, il est simple d'identifier le moment auquel la valve est tournée et que le débit devient nul. Sur la courbe de réponse en déformation, le temps  $t_1$  correspond au moment où la pente en  $|r_{COM}|$  est négative. Cela permet de réduire d'un le nombre de variables à trouver pour tous les modèles viscoélastiques. Une attention particulière est portée pour déterminer  $t_1$ , car les équations des modèles viscoélastiques sont distinctes. L'équation pour la section de relaxation prédit, pour la plupart des modèles au temps  $t_1$ , une relaxation instantanée en fonction de  $E_1$ . Ce comportement nécessite d'être bien représenté, puisqu'il dicte grandement la forme de la courbe et les propriétés élastiques des cellules. Autrement dit, un mauvais choix de  $t_1$  résulte en des résultats fautifs causés uniquement par cette variable.

Par la suite, la force  $F$ , présente dans toutes les équations des modèles viscoélastiques, est calculée par l'aire des cellules et le profil de cisaillement de l'écoulement. Cette force est appliquée sur chacune des cellules lors d'un SFA et varie en selon la forme de la cellule. En effet,

$$F = \tau_{z=\bar{h}_{cellule}} \cdot A_{surface} \quad (3.1)$$

où  $A_{surface}$  est l'aire de la surface de la cellule et  $\tau_{z=\bar{h}_{cellule}}$  la contrainte de cisaillement appliquée par le fluide à la hauteur moyenne de la cellule  $\bar{h}_{cellule}$ . Il est à noter que la force  $F$  est appelée et considérée comme la contrainte instantanée appliquée aux cellules pour la suite du chapitre. Ici, on suppose que la contrainte de cisaillement est appliquée sur la cellule à sa hauteur moyenne et l'aire affectée par la contrainte est l'aire de la surface de la cellule en contact avec le fluide. Pour obtenir ces deux paramètres, la forme de la cellule doit être déterminée par l'équation 2.6. Ensuite, avec l'équation 2.7, la hauteur moyenne, déterminée avec la forme de la cellule, permet de calculer la contrainte de cisaillement  $\tau_{z=\bar{h}_{cellule}}$  appliquée sur la cellule en question. Avec la modélisation de la cellule, l'aire de la surface de la cellule est mesurée par une méthode de somme de segments reliant les pixels de la cellule. La longueur de ces segments est multipliée par la largeur du pixel pour obtenir l'aire représentée par le segment. Cette méthode est exécutée selon différents angles d'approche de l'image de la cellule pour améliorer la qualité de la mesure. Les mesures sont moyennées et l'erreur sur la mesure est la déviation standard. Par conséquent, puisque la valeur de  $A_{surface}$  et de  $\tau_{z=\bar{h}_{cellule}}$  est calculée individuellement pour chaque cellule, la valeur de la force associée est unique à sa morphologie.

Finalement, une dernière connaissance est appliquée à la fonction d'ajustement de courbes pour réduire le nombre de variables à déterminer. Une borne est établie sur les variables représentant le comportement viscoélastique ( $E$  et  $\eta$ ). En effet, en se basant sur la science des matériaux et des résultats à ce sujet dans la littérature, on peut contraindre les variables  $E$  et  $\eta$  à l'ensemble des valeurs positives. Ainsi, l'ensemble des variables pouvant être utilisées par la fonction diminue de deux.

Il est à noter que les courbes pourraient être analysées, de manière à ce que les paramètres  $E$  et  $\eta$  soient grossièrement déterminés pour davantage contraindre la fonction. Par contre, le choix de ne pas analyser les courbes préalablement a été pris pour ne pas favoriser une meilleure convergence pour un

modèle plutôt qu'un autre. Cela aurait pu avoir comme effet de rendre un modèle meilleur, seulement car les paramètres sont plus aisément calculables par la courbe expérimentale.

### 3.1.2 Structure de la fonction d'ajustement de courbe

La fonction d'ajustement de courbe consiste à utiliser les équations des modèles viscoélastiques pour interpréter les données expérimentales. Pour ce faire, les données à interpréter avec les modèles débutent à  $t \approx 3$  secondes dans l'acquisition, où ce temps est déterminé par l'utilisateur de la même façon que  $t_1$ . Ce temps, à  $t \approx 3$  secondes, correspond au moment auquel le débit est appliqué dans la SFC et est appelé le temps initial pour la suite. Pour déterminer les variables du modèle prédisant la courbe, les fonctions *lsqcurvefit* et *fmincon* sont employées. La première fonction est une fonction d'ajustement de courbe, pour un problème non linéaire à résoudre, basée sur la méthode des moindres carrés. La seconde permet d'entrer une fonction de coût quelconque à minimiser avec bornes sur les variables. Pour commencer, on détermine une première solution approximative avec *lsqcurvefit*. En connaissant  $F$  et  $t_1$ , une valeur aléatoire positive est attribuée à chacune des variables  $E$  et  $\eta$  de l'équation du modèle. Ces valeurs initiales sont utilisées pour s'approcher d'une solution satisfaisante aux données. Par contre, la fonction de coût de *lsqcurvefit* n'est pas celle recherchée. C'est pourquoi la fonction *fmincon* est employée par la suite. Une fonction de coût propre à l'étude est utilisée pour contraindre la fonction selon deux hypothèses posées sur la solution recherchée. La première consiste à imposer le modèle à recouper la valeur de  $|r_{COM}|$  à  $t_1$ . Sans cette restriction, les solutions prédisent une réponse en déformation plus faible qu'attendu. De ce fait, la fonction de coût est lourdement pénalisante lorsque l'équation en déformation ( $t < t_1$ ) n'adopte pas les données expérimentales jusqu'à  $t_1$ . La deuxième hypothèse consiste à imposer le modèle à la dernière donnée expérimentale acquise ( $t = t_{final}$ ). Cette contrainte est importante pour représenter du début à la fin le déplacement du centre de masse de la cellule. En ne recoupant pas la dernière donnée, le modèle est vu comme essayer de prédire un comportement fautif. De ce fait, la fonction de coût est lourdement pénalisante lorsque la solution ne croise pas la dernière donnée expérimentale. De plus, cette fonction de coût pénalise la somme des erreurs quadratiques entre les données expérimentales et le modèle.

Sur la figure 3.1, la fonction de coût décrite ci-haut (courbe noire) est comparée avec cette même fonction avec erreur quadratique (courbe bleue), ainsi que la fonction de coût basée sur la méthode des moindres carrés utilisée par *lsqcurvefit* (courbe rouge). La valeur des fonctions de coût est analysée en variant les valeurs des paramètres à déterminer ( $E$  et  $\eta$ ) pour le modèle Burgers. Ce dernier comporte quatre paramètres ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $\eta_1$  et  $\eta_2$ ) et permet donc de visualiser la sensibilité de tous les paramètres. On remarque que les trois fonctions convergent relativement aisément à une seule solution par paramètre. Or, en analysant la forme des courbes, il est possible de conclure que les valeurs initiales utilisées pour les paramètres peuvent résulter en une non-convergence, dû au fait que les courbes atteignent des plateaux à certaines valeurs. Les fonctions d'optimisation sont basées sur des méthodes par gradient pour déterminer une solution et il est difficile à s'extraire d'un plateau puisque son gradient nul. Ainsi, l'étape permettant de trouver une solution rapide sert à éviter de rencontrer ce

problème pour la plupart des itérations. Par contre, il est possible de voir que les solutions déterminées par les fonctions de coût ne sont pas identiques, par exemple avec le paramètre  $\eta_2$ . En effet, la fonction de coût personnalisée et celle avec erreur quadratique atteignent une seconde solution possible, ce qui satisfait l'objectif de cette fonction. On obtient une seconde solution qui certes peut exprimer une plus haute erreur sur les données expérimentales sur toute la courbe, mais qui respecte les points cruciaux du comportement en déformation d'une cellule.

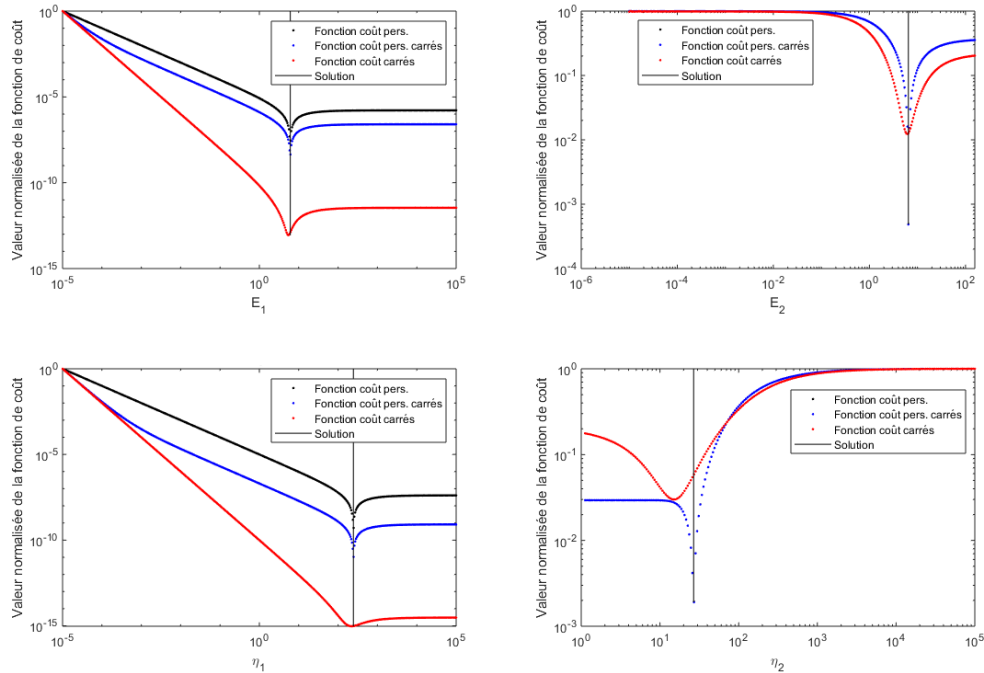


FIGURE 3.1 – Comparaison des fonctions de coût selon les paramètres du modèle Bg ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $\eta_1$  et  $\eta_2$ ). La fonction de coût personnalisée (noir et bleu) permet d'atteindre une seconde solution que celle atteinte avec la fonction de coût de *lsqcurvefit*. En contraignant le modèle à recouper les résultats à  $t = t_1$  et à la fin de l'acquisition, les courbes obtenues représentent convenablement les réponses en déformation des cellules. La courbe de la fonction de coût personnalisée (noir) est identique à celle de la fonction de coût personnalisée avec erreur quadratique lorsqu'elle n'apparaît pas sur les graphiques.

La fonction de coût est minimisée avec *fmincon* dont les valeurs initiales se basent sur les solutions trouvées avec le solveur non-linéaire. Les valeurs trouvées avec le solveur non-linéaire sont multipliées par une valeur aléatoire entre 0.5 et 2 avant d'être utilisées comme valeurs initiales avec *fmincon*. Cette étape de randomisation est appliquée de manière à éviter d'atteindre une solution identique à chaque itération exclusivement due aux valeurs initiales. Les propriétés viscoélastiques d'une cellule NIH 3T3 obtenues à différentes valeurs initiales avec le modèle Bg sont présentées à la figure 3.2. Chaque itération correspond à une valeur initiale distincte utilisée dans la fonction de coût. Les barres d'erreurs sur les valeurs sont représentées par l'intervalle de confiance à 95 % sur les valeurs trouvées. L'intervalle de confiance encadre la valeur estimée avec 95% de confiance. Ainsi,



la valeur est présente dans l'intervalle de confiance 19 fois sur 20. Les paramètres nuls sur la figure représentent une non-convergence de la fonction d'ajustement à cette itération. On remarque que pour les paramètres  $E_1$ ,  $E_2$  et  $\eta_1$ , les paramètres obtenus sont constants selon les itérations effectuées. Une faible variation est présente entre les paramètres, mais la majorité des solutions aboutissent aux mêmes paramètres. Or, le paramètre  $\eta_2$  est variable selon les valeurs initiales et ce problème est observé sur toutes les cellules analysées. Son comportement est difficile à expliquer. Dû à la variation du paramètre  $\eta_2$  dans le modèle Bg, il ne sera pas analysé dans les sections suivantes.

Une fois la solution trouvée, la valeur de la fonction de coût est gardée en mémoire et ce procédé est répété à 50 reprises pour tenter d'identifier une meilleure solution par de différentes valeurs initiales. La solution préservée est celle ayant la fonction de coût la plus basse et donc qui respecte le mieux les contraintes posées. Un procédé analogue est effectué pour les quatre modèles viscoélastiques.

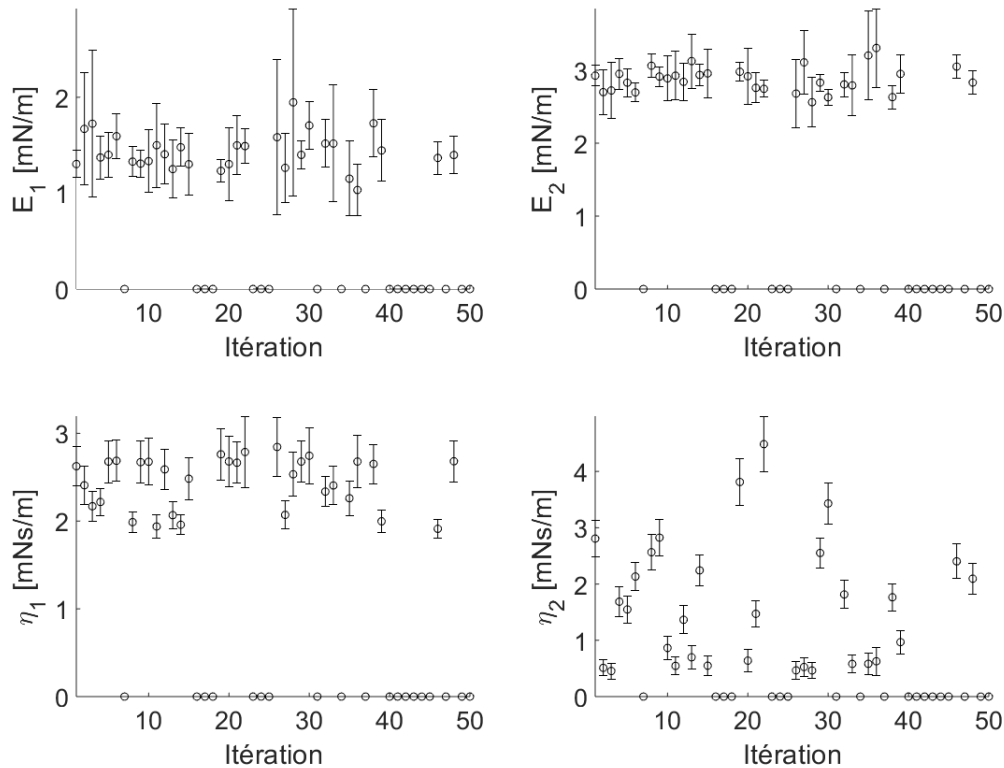


FIGURE 3.2 – Propriétés viscoélastiques d'une cellule NIH 3T3 résultantes de différentes valeurs initiales avec la fonction d'ajustement de courbe pour le modèle Bg en déformation-relaxation. Pour les paramètres  $E_1$ ,  $E_2$  et  $\eta_1$ , les valeurs sont constantes selon les itérations effectuées, peu importe la valeur initiale utilisée. Le paramètre  $\eta_2$  est variable et son comportement est difficile à expliquer. Les valeurs nulles représentent une non-convergence de la fonction d'ajustement à cette itération.  $\tau = 1.43$  Pa.

## 3.2 Prédiction de la réponse en déformation pour un SFA sur des cellules en culture

Dans cette section, le comportement des modèles viscoélastiques face aux données expérimentales de SFA est étudié. Tout d'abord, une approche est entamée pour évaluer la prédiction des résultats lors d'une déformation seulement ( $t \leq t_1$ ). Par la suite, l'étude du comportement des modèles est réalisée en ajoutant la relaxation du corps cellulaire suite au relâchement de la contrainte ( $t > t_1$ ). Ces deux approches permettent, certes d'obtenir les variables représentant les propriétés viscoélastiques des cellules ( $E$  et  $\eta$ ), mais les résultats ne sont pas prédits également, puisque les équations à ajuster diffèrent. La courbe en déformation se terminant à  $t = t_1$ , seule une équation est nécessaire par modèle viscoélastique pour représenter les résultats, alors que la courbe en déformation-relaxation est représentée par deux équations. Ces deux équations comportent les mêmes variables à déterminer, ce qui contraint le nombre de solutions possibles et peut mener à des solutions différentes dans les deux approches.

Pour obtenir les propriétés viscoélastiques cellulaires avec un SFA et les comparer avec d'autres types cellulaires, il est important d'analyser le comportement des modèles viscoélastiques pour choisir celui le mieux adapté à l'étude. Cette section détaille le comportement de chacun face à des réponses en déformation distinctes. Les résultats présentés dans cette section proviennent de SFA sur des cellules NIH 3T3.

### 3.2.1 Test en écoulement cisailé en déformation

Les tests en écoulement cisailé consistent à appliquer une contrainte pendant 15 secondes et de prédire seulement cette déformation par les équations viscoélastiques à  $t \leq t_1$ . Dans ce cas,  $t_1$  correspond à la fin de l'acquisition, puisque la partie en relaxation n'est pas considérée. Ces équations sont utilisées dans la fonction d'ajustement avec fonction de coût basée uniquement sur la méthode des moindres carrés. Les courbes des modèles viscoélastiques présentées subséquentement sont celles minimisant le mieux la fonction de coût. De plus, les résultats suivants présentent la courbe d'une cellule NIH 3T3, pour simplifier les graphiques, mais les conclusions peuvent être tirées sur la majorité de la population cellulaire analysée.

Le résultat du déplacement du centre de masse lors d'un SFA en déformation est affiché à la figure 3.3a en noir. Les courbes des modèles viscoélastiques sont affichées en couleur : Mx (gris), KV (rouge), St (bleu) et Bg (vert). De plus, chacun des modèles est affiché individuellement sur les données expérimentales à la figure 3.3b. À première vue, tous les modèles prédisent la réponse en déformation de la cellule, mis à part le modèle de Mx. Ce dernier prédit une réponse instantanée trop élevée, lorsque la contrainte est appliquée. Toutefois, la réponse en déformation semble montrer une déformation instantanée que les modèles St et de Bg prédisent. De plus, le modèle Mx ne recoupe pas les dernières données de l'acquisition. Pour ce qui est du modèle de KV, ce dernier prédit aussi la courbe expérimentale en déformation, mais ne comporte pas de déformation instantanée au temps

initial ( $t \approx 3$  s). Cela est dû à l'arrangement des objets (ressort et piston) représentant le modèle. En effet, la déformation instantanée prédite par Mx, St et Bg est possible grâce au ressort seul placé en série ( $E_1$ ) dans chacun de leur modèle. En analysant leur équation en déformation ( $t \leq t_1$ ) au temps initial, la déformation ne dépend que de  $E_1$ . Or, pour le modèle KV, ce ressort est positionné en parallèle avec un piston. Ce dernier influence la déformation du modèle à partir du temps initial, alors que pour les modèles Mx, St et Bg, le(s) piston(s) influence(nt) la déformation seulement plus tard après que la contrainte soit appliquée. Or, pour une réponse en déformation présentant une déformation instantanée au temps initial, les modèles Mx, St et Bg sont outillés pour prédire les résultats. Dans ce cas-ci, la courbe expérimentale ne présente pas une forte déformation instantanée au temps initial et est donc bien prédite par le modèle KV. En effet, ce dernier prédit mieux la courbe en déformation que le modèle Mx pouvant prédire une déformation instantanée.

En observant la réponse en déformation expérimentale, on remarque que cette dernière n'atteint pas un plateau à la fin de l'acquisition. En fait, le gradient à ce point est positif et certains modèles peinent à représenter ce comportement. C'est le cas de KV et de St qui prédisent une réponse en déformation atteignant un plateau suite à l'application d'une contrainte constante. Ce comportement provient du fait que leur modèle consiste en un seul piston positionné en parallèle avec un ressort. Cet arrangement fait en sorte que la déformation du modèle atteint un équilibre dû à la déformation conjointe du ressort et du piston. Un piston en série, comme dans les modèles Mx et Bg, a l'effet d'une déformation augmentant sans cesse sous une contrainte constante. Or, dans le cas de KV et St, le comportement du piston est limité par le comportement du ressort, qui lui, prédit une déformation atteignant un plateau après un certain temps. Par conséquent, pour la courbe expérimentale à la figure 3.3, les modèles Mx et Bg représentent le mieux le comportement en déformation de la cellule en fin d'acquisition.

Somme toute, c'est le modèle Bg qui prédit le mieux la réponse en déformation de cette cellule, car il représente une faible déformation instantanée, ainsi qu'une déformation qui croît dans le temps. De plus, en analysant la forme de la courbe du modèle, il est possible de voir qu'elle adopte les résultats tout au long de l'acquisition. Ce qui n'est pas le cas pour les trois autres modèles. En effet, les courbes des modèles KV et St terminent à des valeurs constantes, plus basses que les données expérimentales. Cela démontre l'importance d'utiliser une fonction de coût personnalisée pour contraindre la fonction d'ajustement à atteindre une solution qui recoupe ces dernières valeurs (section 3.1.2). De plus, on remarque un léger écart entre les résultats et la courbe de ces deux modèles, passant sous ou au-dessus des résultats autour de  $t = 4$  s et  $t = 9$  s.

Les propriétés d'un groupe de cellules NIH 3T3 sont affichées dans le tableau 3.1 avec leur erreur respective. L'erreur sur les valeurs est représentée par l'intervalle de confiance à 95 % sur les valeurs trouvées. De ces données, il est possible de voir que le paramètre ayant la plus forte erreur est  $E_1$ , sauf pour le modèle KV, probablement dû au fait que  $E_1$  participe à la forme globale du modèle et non pas de la déformation instantanée des autres modèles. L'erreur sur ce paramètre est intéressante puisque  $E_1$  modifie l'allure des courbes des modèles. Une courbe ayant un  $E_1$  élevé,

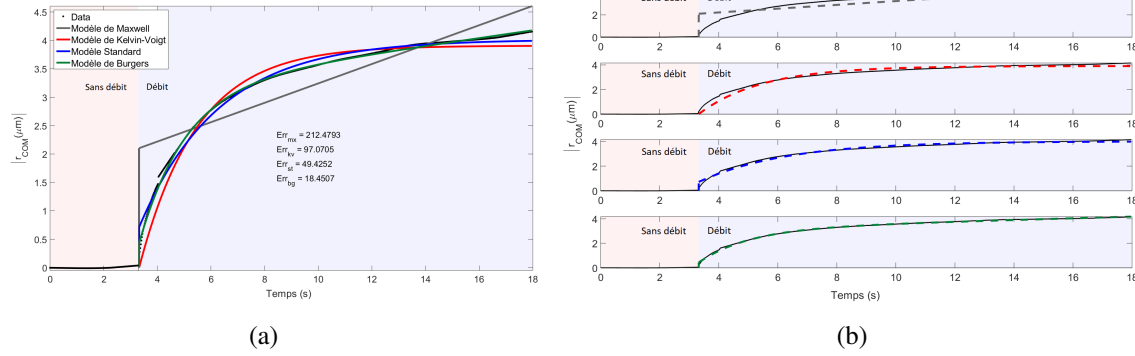


FIGURE 3.3 – Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d’un SFA en déformation sur une cellule NIH 3T3. (a) Les modèles viscoélastiques représentant la réponse en déformation suite à l’application d’une contrainte instantanée prédisent la courbe expérimentale et (b) sont affichés individuellement avec la courbe expérimentale.  $\tau = 1.43$  Pa.

signifiant une faible déformation instantanée, a tendance à adopter une forme plutôt adoucie et donc les paramètres visqueux  $\eta$  dictent davantage la forme de la courbe. Visuellement, les courbes des modèles représentent bien les résultats expérimentaux, mais la précision des paramètres s’y rattachant est à améliorer. En effet, les modèles KV, St et Bg prédisent les courbes expérimentales, mais il est difficile de choisir un modèle en particulier pouvant comparer différents types de réponses en déformation. En fait, les propriétés obtenues des modèles varient pour chacun des modèles et il ne semble pas qu’avec un SFA en déformation, le comportement d’un modèle en particulier se démarque des autres. C’est pour cette raison que, comme discuté à la section 1.2, une partie en relaxation est ajoutée aux SFAs de sorte que l’acquisition se poursuive après avoir relâché la contrainte de cisaillement. Cela contraint les modèles à deux équations pour un même nombre de variables. La section suivante aborde l’analyse des SFAs en déformation-relaxation.

Tableau 3.1 – Propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 selon les modèles viscoélastiques pour un SFA en déformation. Les valeurs présentées proviennent de la solution ayant la plus faible valeur de la fonction de coût et l’erreur associée est l’intervalle de confiance sur la solution. La cellule encadrée est présentée à la figure 3.3.

Cellule	Maxwell		Kelvin-Voigt		Standard			Burgers			
	$E_1$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$E_2$ [mN/m]	$\eta_2$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$E_2$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$\eta_2$ [mNs/m]
1	2.7 ± 0.2	37 ± 4	1.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1	11 ± 2	1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	22 ± 2	1.6 ± 0.1	193 ± 10	1.9 ± 0.1
2	4.5 ± 0.4	39 ± 4	1.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	9.2 ± 0.7	2.0 ± 0.1	4.9 ± 0.3	15 ± 5	2.6 ± 0.2	99 ± 10	3.3 ± 0.4
3	3.2 ± 0.1	124 ± 12	2.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	12 ± 2	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2	32 ± 7	2.9 ± 0.1	248 ± 14	1.4 ± 0.1
4	4.3 ± 0.5	35 ± 3	1.5 ± 0.1	3.6 ± 0.1	13 ± 2	1.7 ± 0.1	4.3 ± 0.2	200 ± 95	1.8 ± 0.1	175 ± 18	3.0 ± 0.1
5	4.5 ± 0.3	14.1 ± 0.4	0.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2	12 ± 5	0.8 ± 0.1	4.9 ± 0.4	8 ± 1	0.8 ± 0.2	145 ± 221	7.1 ± 0.5
6	0.9 ± 0.1	5.9 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	15.6 ± 0.7	0.8 ± 0.1
7	2.9 ± 0.3	41 ± 4	1.5 ± 0.1	0.1 ± 0.1	10.9 ± 0.9	1.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	10 ± 2	1.9 ± 0.1	245 ± 56	2.3 ± 0.3
8	1.5 ± 0.1	11.2 ± 0.5	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	5.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	17.4 ± 0.6	3.1 ± 0.3
9	2.1 ± 0.2	29 ± 2	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	5.7 ± 0.3	4.0 ± 0.5	1.9 ± 0.1	60 ± 3	2.2 ± 0.3

### 3.2.2 Test en écoulement cisailé en déformation-relaxation

Dans cette section, les courbes des modèles viscoélastiques sont ajustées sur un SFA en déformation-relaxation. De plus, la fonction de coût utilisée contraint la solution à recouper la valeur à  $t = t_1$

et celle en fin d'acquisition. De cette façon, les résultats sont ajustés de sorte à respecter proprement le comportement de la cellule tout au long du SFA.

Il importe d'ajouter des paramètres au SFA permettant de contraindre davantage les modèles. Ainsi, l'ajout de la relaxation au SFA a comme effet de contraindre les modèles à résoudre deux équations contenant les mêmes variables ( $E$  et  $\eta$ ). Par conséquent, une solution adéquate consiste à prédire le comportement en déformation sans toutefois négliger la relaxation qui s'ensuit. Le résultat du déplacement du centre de masse lors d'un SFA en déformation-relaxation est affiché à la figure 3.4a en noir. Ce résultat provient de la même cellule à la figure 3.3, ce qui permet d'analyser l'influence de la relaxation sur les solutions des modèles viscoélastiques. De plus, comme précédemment, les modèles viscoélastiques ayant la fonction de coût la plus faible sont affichés ensemble et individuellement aux figures 3.4a et 3.4b, respectivement.

En comparant les courbes des modèles de la figure 3.4a à celles de la figure 3.3a, on remarque une forte disparité entre la forme des courbes. Il y a une forte disparité entre les courbes en déformation ( $t \leq t_1$ ), alors que le modèle KV n'adopte plus la courbe expérimentale. On remarque qu'en ajoutant la relaxation au SFA, une solution idéale est difficilement atteinte par KV dû à son comportement non instantané. Le modèle, devant respecter les contraintes de la fonction de coût, peine à représenter la forme globale de la réponse en déformation des cellules. De plus, ce modèle prédit un retour à une déformation initiale nulle ( $|r_{COM}| = 0$ ) à  $t \rightarrow \infty$ , ce qui n'est pas le cas pour la plupart des cellules analysées.

La déformation instantanée au temps initial, causée par  $E_1$  dans les modèles Mx, St et Bg, est aussi présente, lorsque la contrainte est relâchée, sous forme de relaxation instantanée ( $t = t_1$ ). Selon les équations des modèles, la relaxation instantanée de  $|r_{COM}|$  est de même amplitude que celle au temps initial. De plus, on remarque que la déformation instantanée des données expérimentales est plus soudaine, et donc mieux représentée, lorsque la contrainte est relâchée que lorsqu'elle est appliquée. Ainsi, en ajoutant la relaxation, les courbes des modèles expriment une plus grande déformation instantanée au temps initial de manière à prédire celle à  $t = t_1$ .

Pour le modèle Mx, une amélioration est observée sur la forme globale de la courbe, compte tenu de la simplicité de ce modèle. Il semble que la fonction de coût plus contraignante favorise une solution plus souhaitable pour Mx que celle obtenue à la figure 3.3.

De plus, il est intéressant de noter, qu'avec l'ajout de la relaxation, le modèle St résulte en des courbes similaires à celle du modèle Mx. Pour cette cellule, on remarque tout de même une différence en fin d'acquisition, alors que la pente de la courbe est négative et non constante. En fait, ces deux modèles sont près d'être les mêmes en considérant leur arrangement. En négligeant le second ressort  $E_2$  dans le modèle St, le modèle Mx est obtenu. Cela explique qu'il est possible que ces deux courbes adoptent la même forme dans certains cas où  $E_2$  est négligeable. Par contre, cela se produit seulement pour des réponses en déformation ne retournant pas à la déformation initiale nulle. Dans d'autres cas, le modèle St adopte une forme plus complexe que Mx.

Le modèle Bg, quant à lui, prédit mieux la courbe sur toute l'acquisition, même avec l'ajout de la relaxation. Étant le modèle le plus complexe des quatre, avec quatre paramètres à déterminer, il peut s'adapter facilement à différentes réponses en déformation expérimentales. Ici, le modèle prédit bien la déformation et la relaxation, car la cellule ne retourne pas à son état initial suite à l'application de la contrainte. Or, le modèle Bg prédit pauvrement les réponses en déformation retournant à un état initial, l'inverse du modèle St. Ainsi, à première vue, le modèle Bg semble le meilleur choix pour obtenir et comparer les propriétés viscoélastiques cellulaires, mais le modèle St peut, dans un cas où la réponse en déformation retourne à un état initial, toutefois être le choix nécessaire.

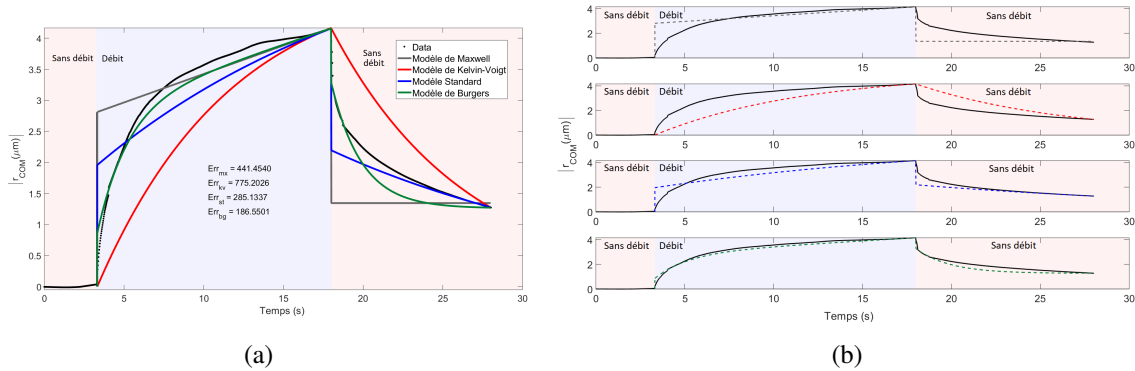


FIGURE 3.4 – Déplacement du centre de masse en fonction du temps lors d'un SFA en déformation-relaxation sur une cellule NIH 3T3. (a) Les modèles viscoélastiques représentant la réponse en déformation suite à l'application d'une contrainte instantanée prédisent la courbe expérimentale et (b) sont affichés individuellement avec la courbe expérimentale.  $\tau = 1.43$  Pa.

Le tableau 3.2 contient les propriétés viscoélastiques du même groupe de cellules NIH 3T3 qu'au tableau 3.1 pour des SFAs en déformation-relaxation. Ainsi, il est possible de comparer les données entre elles et l'erreur associée. Tout d'abord, il est possible de voir que l'erreur sur le paramètre  $E_1$  a grandement diminué comparativement aux valeurs obtenues en déformation seulement. Cela est principalement dû à la deuxième déformation instantanée ( $t = t_1$ ) dans l'acquisition à prédire. Celle-ci est plus abrupte que la déformation instantanée initiale et est donc plus aisément prédite par les modèles viscoélastiques. L'explication précédente de cet aspect est confirmée par les données du tableau 3.2. De plus, on remarque que l'erreur sur la plupart des paramètres est d'autant plus basse que les résultats en déformation seulement. Or, les valeurs propriétés viscoélastiques trouvées sont différentes et ne peuvent être comparées. Cette disparité entre les résultats n'indique pas que les données sont incorrectes. Au contraire, cela indique que les deux méthodes donnent des résultats pouvant être comparés selon la même méthode seulement. Par conséquent, un SFA en déformation résulte en des résultats viables pour tous les modèles présentés, alors qu'un SFA en déformation-relaxation contraint les modèles davantage et améliore les valeurs, mais favorise les modèles plus complexes tels que St et Bg.

Tableau 3.2 – Propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 selon les modèles viscoélastiques pour un SFA en déformation-relaxation. Les valeurs présentées proviennent de la solution ayant la plus faible valeur de la fonction de coût et l'erreur associée est l'intervalle de confiance sur la solution. La cellule encadrée est présentée à la figure 3.4.

Cellule	Maxwell		Kelvin-Voigt		Standard			Burgers			
	$E_1$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$E_2$ [mN/m]	$\eta_2$ [mNs/m]	$E_1$ [mN/m]	$E_2$ [mN/m]	$\eta_1$ [mNs/m]	$\eta_2$ [mNs/m]
1	1.6 ± 0.1	94 ± 5	1.2 ± 0.1	5.7 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.5	65 ± 7	4.0 ± 0.3	2.6 ± 0.2	101 ± 5	2.5 ± 0.5
2	2.7 ± 0.1	65 ± 2	1.2 ± 0.1	8.5 ± 0.7	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	43 ± 4	7 ± 2	4.3 ± 0.7	66 ± 2	3.0 ± 1.0
3	3.1 ± 0.1	135 ± 5	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1	173 ± 2	22 ± 7	3.5 ± 0.4	140 ± 4	0.7 ± 0.2
4	1.8 ± 0.1	144 ± 14	1.5 ± 0.1	6.6 ± 0.4	3.4 ± 0.3	2.5 ± 0.1	17 ± 2	3.9 ± 0.4	3.3 ± 0.3	151 ± 24	5 ± 2
5	1.5 ± 0.1	25.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1	8.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	14.1 ± 0.3	7.7 ± 0.6	1.7 ± 0.1	25.9 ± 0.3	7.4 ± 0.4
6	0.4 ± 0.1	12.7 ± 0.6	0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	5.2 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	13.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1
7	1.6 ± 0.1	178 ± 21	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	2.2 ± 0.1	5.4 ± 0.4	5.0 ± 0.5	2.4 ± 0.1	194 ± 20	3.3 ± 0.4
8	0.7 ± 0.1	21.3 ± 0.5	0.3 ± 0.1	3.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	9.0 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	21.6 ± 0.2	4.4 ± 0.2
9	1.7 ± 0.1	37.0 ± 0.7	0.6 ± 0.1	10.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1	18.4 ± 0.9	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.6	37.1 ± 0.7	4.6 ± 1.7

### 3.3 Propriétés viscoélastiques cellulaires à différentes contraintes appliquées

Une seconde méthode pour comparer les SFAs en déformation versus ceux en déformation-relaxation est approchée. Les équations des modèles viscoélastiques permettant de prédire les réponses en déformation des cellules ont toutes un point en commun. Toutes sont linéairement proportionnelles au paramètre connu  $F$ , la contrainte constante appliquée, décrit par l'équation 3.1. Ainsi, cet aspect est utilisé pour étudier davantage le comportement des deux types de SFA présentés à la section précédente. Le paramètre  $F$  est proportionnel à la contrainte de cisaillement  $\tau$  de l'écoulement, alors que cette dernière est proportionnelle au débit appliqué dans la SFC, selon l'équation 1.9. Par conséquent, la contrainte appliquée ( $F$ ) est linéairement proportionnelle au débit appliqué dans la SFC. De ce fait, il est possible d'utiliser cette relation pour analyser le comportement des modèles viscoélastiques. En effet, en augmentant le débit, seul le paramètre  $F$  augmente de façon analogue dans les réponses en déformation. Cela résulte seulement en une augmentation de l'amplitude de la courbe expérimentale. Ainsi, théoriquement, il est attendu que les propriétés viscoélastiques d'une cellule demeurent identiques à différents débits appliqués lors d'un SFA.

Des SFAs sur un même champ de vue et une même cellule à différents débits sont effectués en déformation (figure 3.5) et en déformation-relaxation (figure 3.6). En conservant le même champ de vue, les mêmes cellules sont analysées. Ainsi, seule l'amplitude des courbes est affectée par la variation du débit. C'est effectivement le cas observé aux figures 3.5 et 3.6, alors qu'une augmentation du débit résulte en une augmentation de l'amplitude de la courbe du déplacement du centre de masse. Ces figures présentent les résultats des SFAs sur la même cellule HEK 293T/17.

De plus, on remarque à la figure 3.6 que le déplacement du centre de masse de la cellule ne retourne pas à une valeur nulle. Il est intéressant de noter que le déplacement du centre de masse de la cellule retourne environ à la même valeur, peu importe la contrainte appliquée. Cela est probablement relié au comportement de la cellule, puisque d'autres cellules analysées agissent de cette façon. Or, d'autres résultats, non affichés dans ce papier, montrent que le déplacement du centre de masse augmente après s'être stabilisé suite au relâchement de la contrainte.

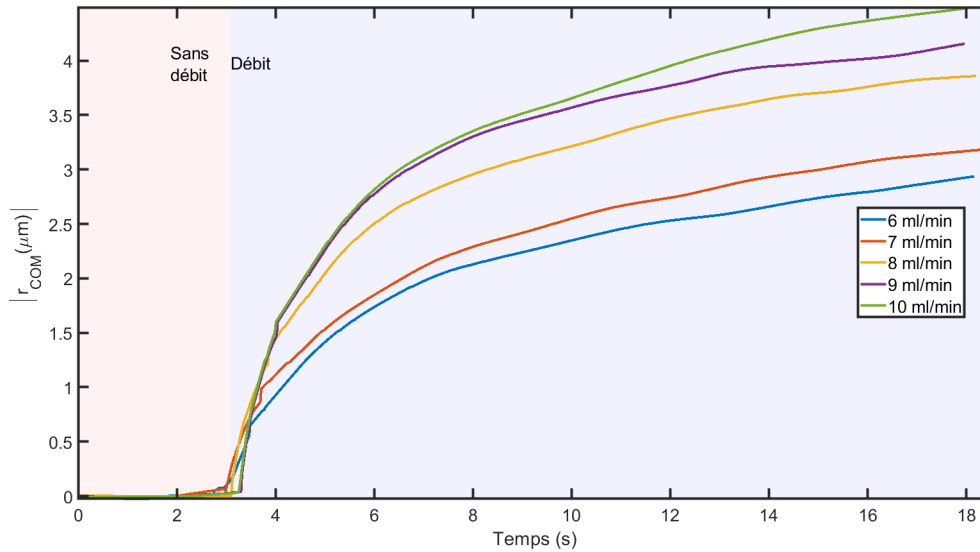


FIGURE 3.5 – Déplacement du centre de masse d’une cellule NIH 3T3 à différentes valeurs de contrainte appliquée d’un SFA en déformation. La forme des courbes demeure identique en variant la contrainte appliquée ; seule l’amplitude varie de manière sensiblement proportionnelle avec la valeur de la contrainte. Les contraintes de cisaillement associées aux débits à  $Q = [6, 7, 8, 9, 10]$  mL/min sont respectivement  $\tau = [0.95, 1.11, 1.27, 1.43, 1.59]$  Pa.

Après avoir prédit les courbes avec les modèles viscoélastiques, les propriétés viscoélastiques résultantes pour le modèle St et Bg sont portés en graphique aux figures 3.7a et 3.7b en déformation et 3.8a et 3.8b en déformation-relaxation. Ici, deux types cellulaires sont analysés. La cellule HEK 293T/17 est affichée en bleu sur les figures précédentes. Cette cellule est analysée à des débits de 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 mL/min, alors que les cellules NIH 3T3 des figures 3.5 et 3.6 sont analysées à des débits de 6, 7, 8, 9 et 10 mL/min. Ainsi, 5 valeurs de paramètres identiques sont attendues pour chacun des paramètres selon la relation expliquée ci-haut. L’erreur sur les valeurs est l’intervalle de confiance à 95% associée à la solution obtenue. Des paramètres ont été enlevés des graphiques par souci de clarté, puisqu’ils comportaient une erreur élevée et leur valeur plus de 5 fois les autres. C’est le cas de la cellule HEK 293T/17 en SFA en déformation où deux solutions avec le modèle Bg menaient à des paramètres aberrants face aux autres solutions. Cet aspect est parfois relié à des erreurs numériques dans la fonction d’ajustement de courbe, alors que cette dernière respecte difficilement les contraintes désignées dans la fonction de coût. Or, à certaines occasions, un fort intervalle de confiance apparaît dans les solutions lorsque les données expérimentales sont bruitées. La fonction d’ajustement de courbe ne permet pas d’atteindre une solution précise et cause ces données et intervalles aberrants. Or, ce problème ne surgit pas autant avec les SFAs en déformation-relaxation. En effet, seule une solution a été omise pour la cellule NIH 3T3 (jaune). Or, puisque l’acquisition à ce débit s’est avérée problématique avec les deux modèles analysés, il est probable que le problème provienne de l’acquisition et non d’une mauvaise prédiction par les modèles. D’un autre côté, la cellule NIH 3T3, exprimée par la courbe orange, présente des résultats intéressants. En effet, ces paramètres déterminés demeurent les



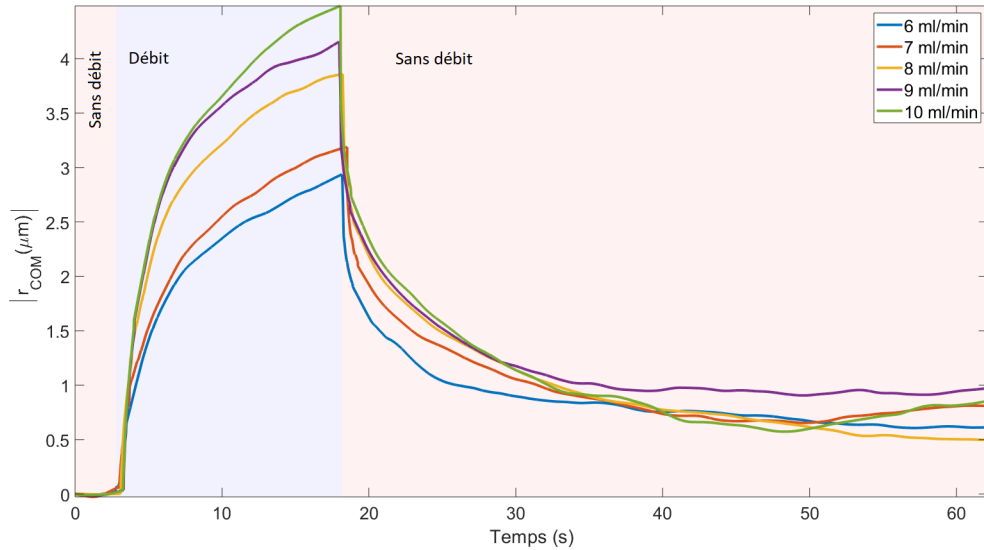


FIGURE 3.6 – Déplacement du centre de masse d’une cellule NIH 3T3 à différentes valeurs de contrainte appliquée d’un SFA en déformation-relaxation. La forme des courbes demeure identique en variant la contrainte appliquée; seule l’amplitude varie de manière sensiblement proportionnelle avec la valeur de la contrainte. Les contraintes de cisaillement associées aux débits à  $Q = [6, 7, 8, 9, 10]$  mL/min sont respectivement  $\tau = [0.95, 1.11, 1.27, 1.43, 1.59]$  Pa.

mêmes, considérant l’erreur sur la mesure, pour la plupart des paramètres et modèles.

Somme toute, utiliser des SFAs à plusieurs débits permet d’observer la sensibilité des prédictions par les modèles en fonction des courbes expérimentales. Il est possible de remarquer que pour une même cellule, il est difficile d’obtenir exactement les mêmes propriétés viscoélastiques selon le débit du SFA. En effet, certaines courbes expérimentales sont plus difficiles à prédire en utilisant la fonction de coût personnalisée et nécessitent d’augmenter ou réduire le poids des aspects pénalisant la valeur de la fonction. De plus, il a été observé qu’un léger changement sur la valeur de  $t_1$  a des conséquences importantes sur les résultats. Comme expliqué en début de chapitre, il est primordial de déterminer précisément ce paramètre avant de débiter l’analyse. L’instauration d’une technique automatique pour les SFAs permettrait de régler ce problème en éliminant l’erreur liée au choix de  $t_1$  par l’utilisateur. En fait, avec un montage automatique, il serait possible d’entrer numériquement  $t_1$ , de sorte que la valve reliée à la SFC se referme à ce moment. Ainsi, la valeur de  $t_1$  serait toujours exacte et réduirait la sensibilité des solutions. Par contre, il importe de continuer à essayer de régler les différents problèmes reliés à cette méthode, car elle permettrait d’atteindre des valeurs beaucoup plus précises sur chacune des propriétés viscoélastiques, comme il est possible de voir avec la cellule NIH 3T3 (orange) aux figures 3.7a à 3.8b. Par exemple, les constantes de rigidité  $E_2$  des modèles St et Bg sont identiques pour les 5 débits différents. Ici, leur intervalle de confiance est déjà bas, mais dans un cas où une cellule avait des valeurs stables selon les débits, cette méthode permettrait de grandement améliorer la précision sur les propriétés viscoélastiques.

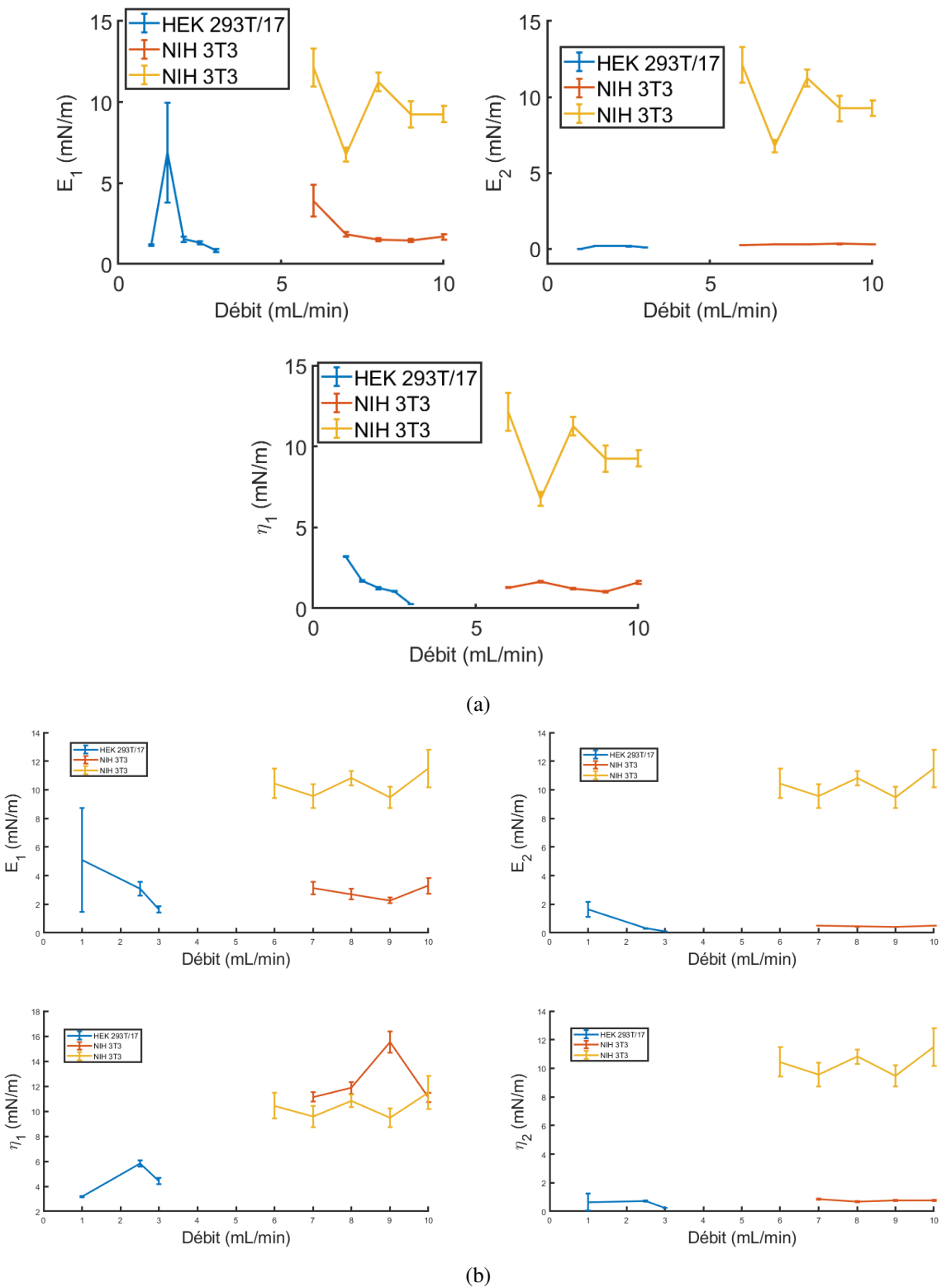
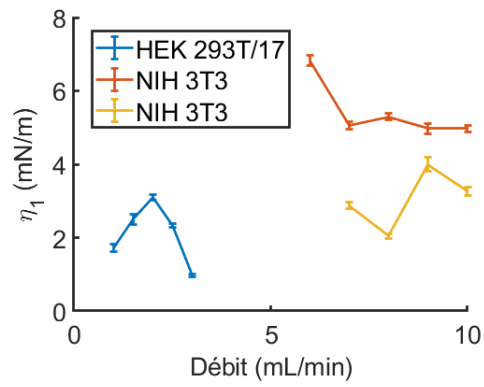
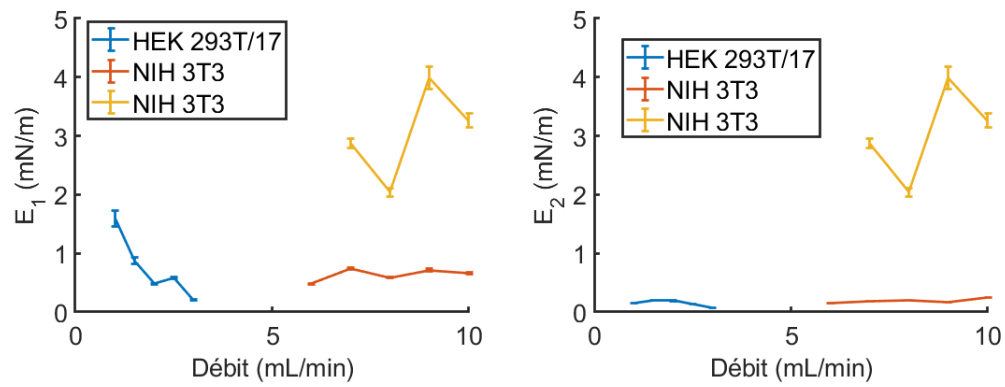
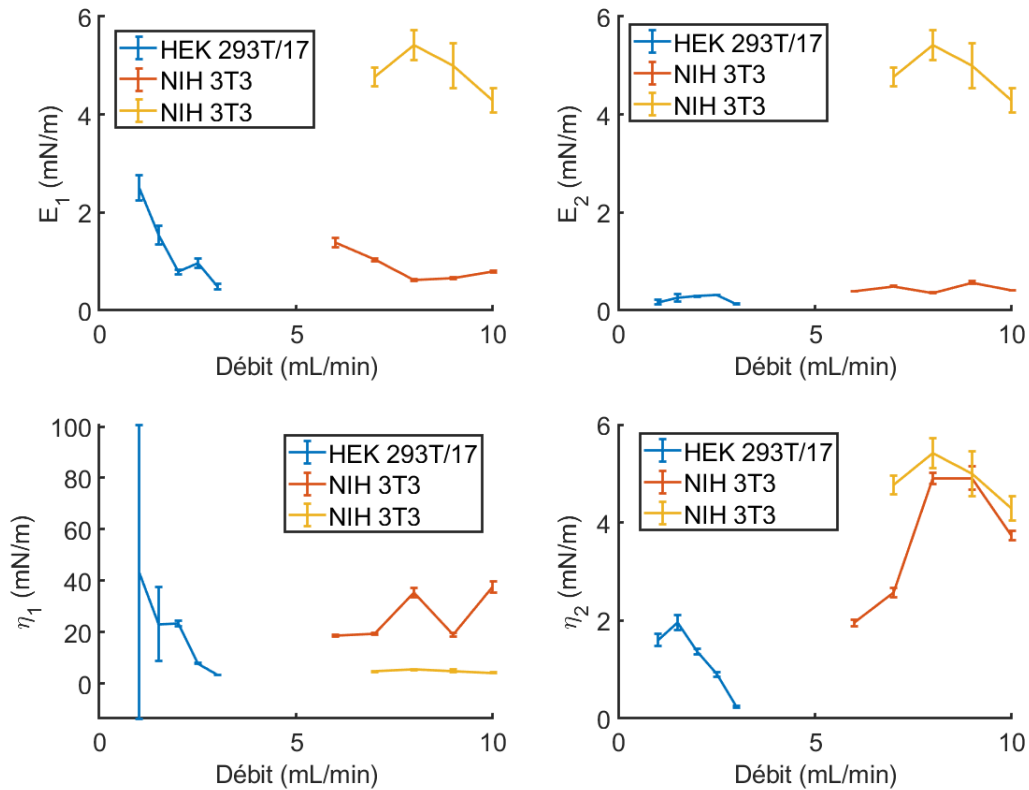


FIGURE 3.7 – Propriétés viscoélastiques de trois cellules obtenues à différentes valeurs de contrainte appliquée d'un SFA en (a) déformation avec le modèle St et (b) le modèle Bg. L'intervalle de confiance est représenté par les barres d'erreur.



(a)



(b)

FIGURE 3.8 – Propriétés viscoélastiques de trois cellules obtenues à différentes valeurs de contrainte appliquée d’un SFA en (a) déformation-relaxation avec le modèle St et (b) le modèle Bg. L’intervalle de confiance est représenté par les barres d’erreur.

### 3.4 Mesure des propriétés viscoélastiques des cellules entières

#### 3.4.1 Étude des populations cellulaires selon les modèles viscoélastiques

Cette section traite des propriétés viscoélastiques cellulaires obtenues par SFA en déformation-relaxation. Le SFA en déformation-relaxation est favorisé pour effectuer la comparaison des propriétés, car la méthode offre une erreur plus faible sur les résultats et des valeurs plus représentatives. De plus, elle résulte en une représentation plus adéquate des courbes du déplacement du centre de masse grâce à la fonction de coût. Les modèles St et Bg sont préférés pour l’analyse des populations des cellules. Les courbes expérimentales sont prédites de meilleure façon par ces modèles en partie grâce à un modèle plus complexe et une physique plus riche et adaptée aux comportements des cellules. Or, un de ces paramètres ne fait partie de l’analyse pour le modèle Bg,  $\eta_1$ , puisqu’il montre une trop grande variation à l’intérieur des populations étudiées des cellules. Autrement dit, l’étude des populations compare les propriétés viscoélastiques  $E_1$ ,  $E_2$  et  $\eta_2$  pour le modèle Bg et  $E_1$ ,  $E_2$  et  $\eta_1$  pour le modèle St.

Tout d’abord, la population de chacun des types cellulaires est analysée en comparant chacune des propriétés viscoélastiques entre elles. Pour les cellules NIH 3T3, les graphiques de comparaison sont affichés aux figures 3.9 et 3.10 pour le modèle St et Bg respectivement. Pour les cellules HEK 293T/17, ils sont affichés aux figures 3.11 et 3.12 pour le modèle St et Bg respectivement. Pour les neurones corticaux primaires de rat, les graphiques sont affichés aux figures 3.13 et 3.14 pour le modèle St et Bg respectivement. Chacun des points portés en graphique représente les propriétés viscoélastiques d’une cellule. Ces graphiques sont analysés pour déterminer certains groupes de la population pouvant se démarquer. Ainsi, on considère que ces groupes englobent des cellules représentant de mêmes propriétés viscoélastiques. De plus, en recherchant un groupe plus dense de la population, on s’assure d’analyser un groupe exprimant un comportement plus commun pour ce type cellulaire. Par conséquent, les groupes sont déterminés manuellement en tâchant d’identifier un groupe de la population ayant une faible variance sur les propriétés viscoélastiques. Sur les figures précédentes, le groupe de la population conservé est exprimé par des cercles pleins, alors que les cellules omises pour le reste de l’étude sont exprimées par des cercles ouverts.

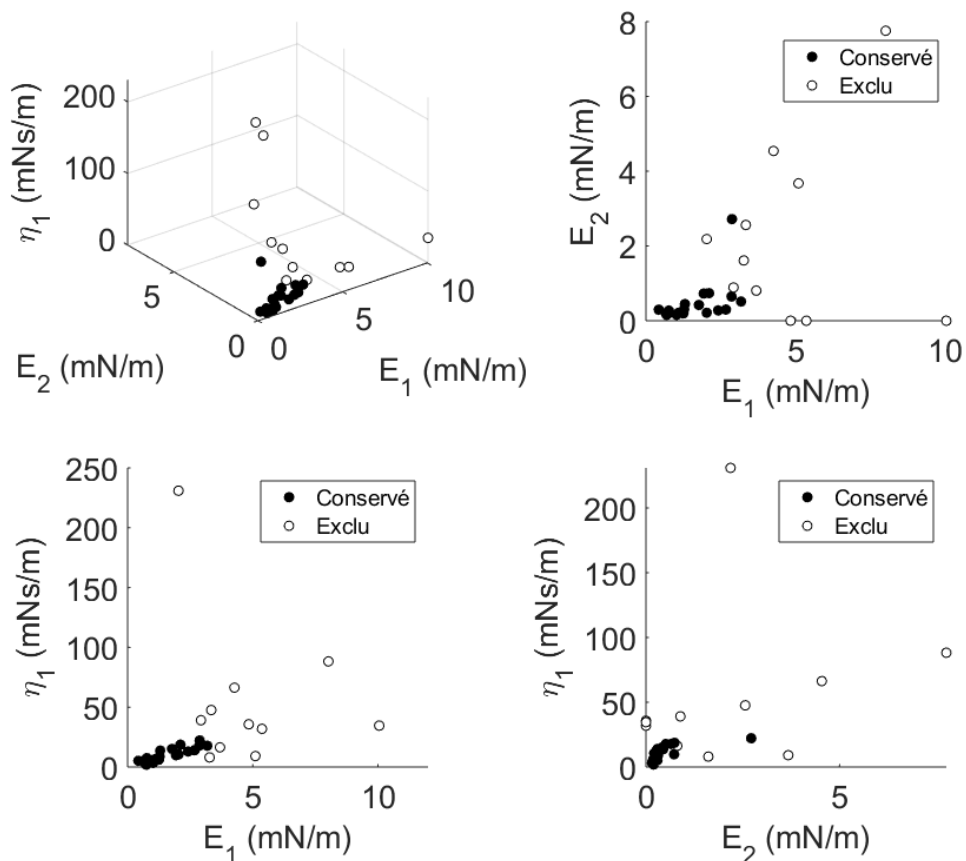


FIGURE 3.9 – Population des propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 obtenues avec le modèle St ( $n = 30$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 15$ ), alors que les données en noir sont exclues de l’étude.

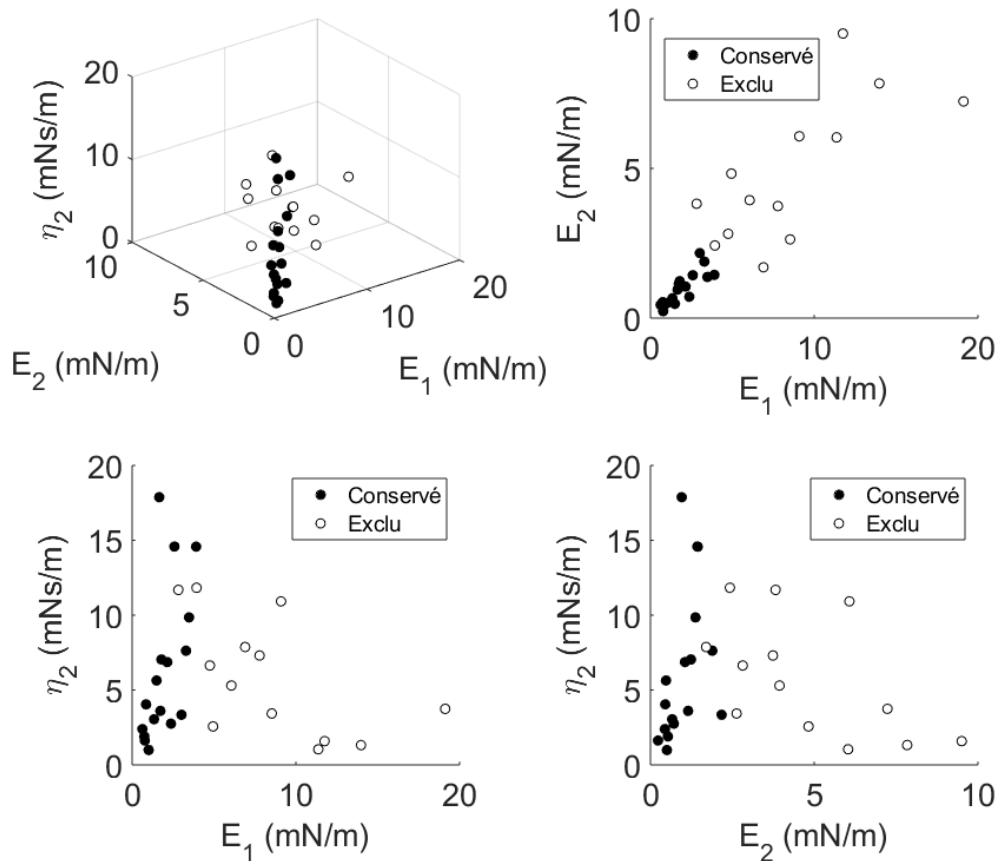


FIGURE 3.10 – Population des propriétés viscoélastiques de cellules NIH 3T3 obtenues avec le modèle de Bg ( $n = 30$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 15$ ), alors que les données en noir sont exclues de l'étude.

Pour les cellules NIH 3T3, le groupe le plus dense avec le modèle St est trouvé en comparant  $\eta_1$  avec  $E_1$ . Le groupe englobe les cellules ayant une constante de viscosité  $\eta_1 < 60$  mNs/m et une constante de rigidité  $E_1 < 4.8$  mN/m. Pour le modèle Bg, il est plus difficile d'identifier un groupe en particulier se démarquant, donc le choix est déterminé sur la comparaison des constantes de rigidité. En effet, un groupe délimité par  $E_2 < 6$  mN/m et  $E_1 < 10$  mN/m est observé.

Pour les cellules HEK 293T/17, le premier groupe avec le modèle St est identifié entre  $\eta_1 < 5$  mNs/m et  $E_1 < 1$  mN/m. Par contre, on remarque que le choix du groupe n'aurait pu être déterminé par la comparaison des autres propriétés dans ce modèle, puisque les données sont dispersées. Avec le modèle Bg, le choix de conserver presque l'entièreté de la population, puisqu'il est difficile de discerner un groupe de propriétés viscoélastiques en particulier. Ainsi, le groupe conservé est basé principalement sur le choix effectué avec le modèle St.

Pour les neurones, l'identification d'un groupe avec le modèle St est effectuée en comparant

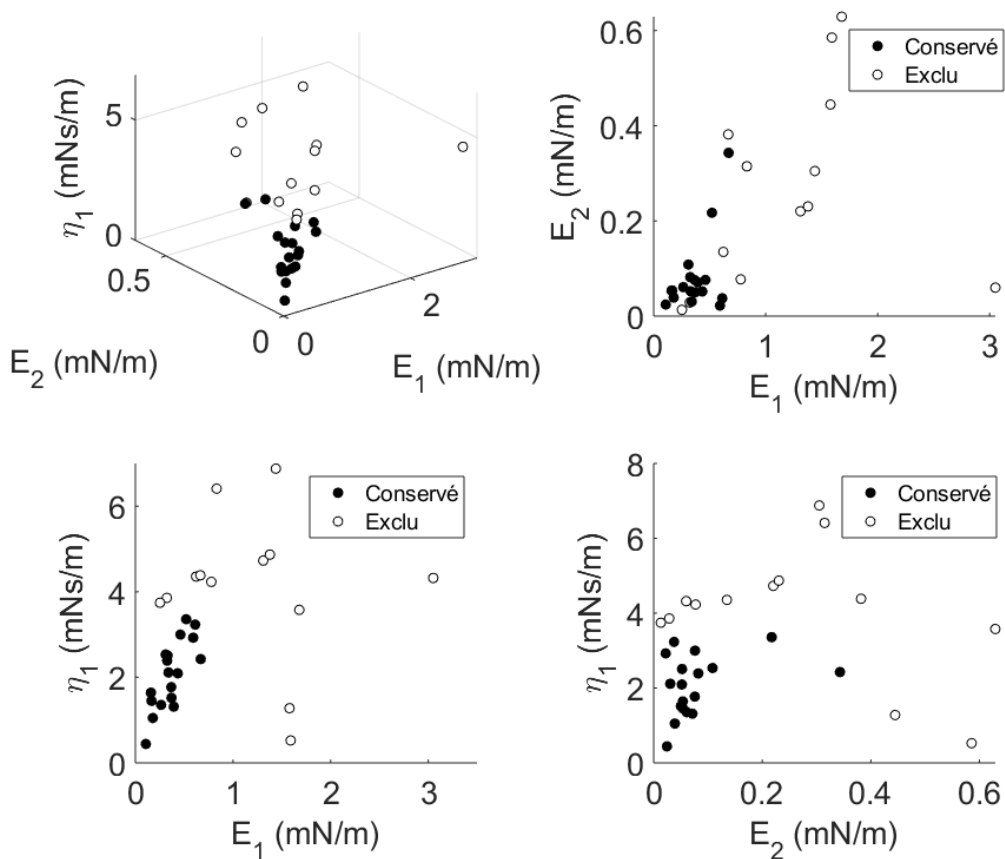


FIGURE 3.11 – Population des propriétés viscoélastiques de cellules HEK 293T/17 obtenues avec le modèle St ( $n = 31$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 14$ ), alors que les données en noir sont exclues de l'étude.

les paramètres  $E_1$  et  $E_2$ . Ce groupe est délimité par une valeur de  $E_2 < 0.2$  mN/m et une valeur de  $E_1 < 0.5$  mN/m. Il importe de préciser que le groupe aurait pu être déterminé en comparant les autres paramètres du modèle et néanmoins identifier le même ensemble de cellules. Pour ce qui est du groupe déterminé avec le modèle Bg, il s'agit d'un choix simple, puisqu'une grande partie de la population se retrouve densément avec des propriétés viscoélastiques de  $E_1 < 0.6$  mN/m,  $E_2 < 0.6$  mN/m et  $\eta_2 < 2$  mNs/m.

Par la suite, seules les cellules ayant été conservées dans les deux modèles font partie d'une population plus restreinte. Cette dernière représente donc un groupe de propriétés plus commun pour chaque type cellulaire. La courbe du déplacement du centre de masse de chacune des cellules n'est pas présentée, mais une analyse qualitative des solutions pour chaque cellule a été effectuée. Il s'est avéré que l'identification des groupes de propriétés permet de s'affranchir des modèles prédisant mal la courbe expérimentale. En effet, en observant la courbe des modèles provenant des cellules ayant été mises de côté à l'étape précédente, il a été remarqué que ces courbes n'auraient pas été conservées

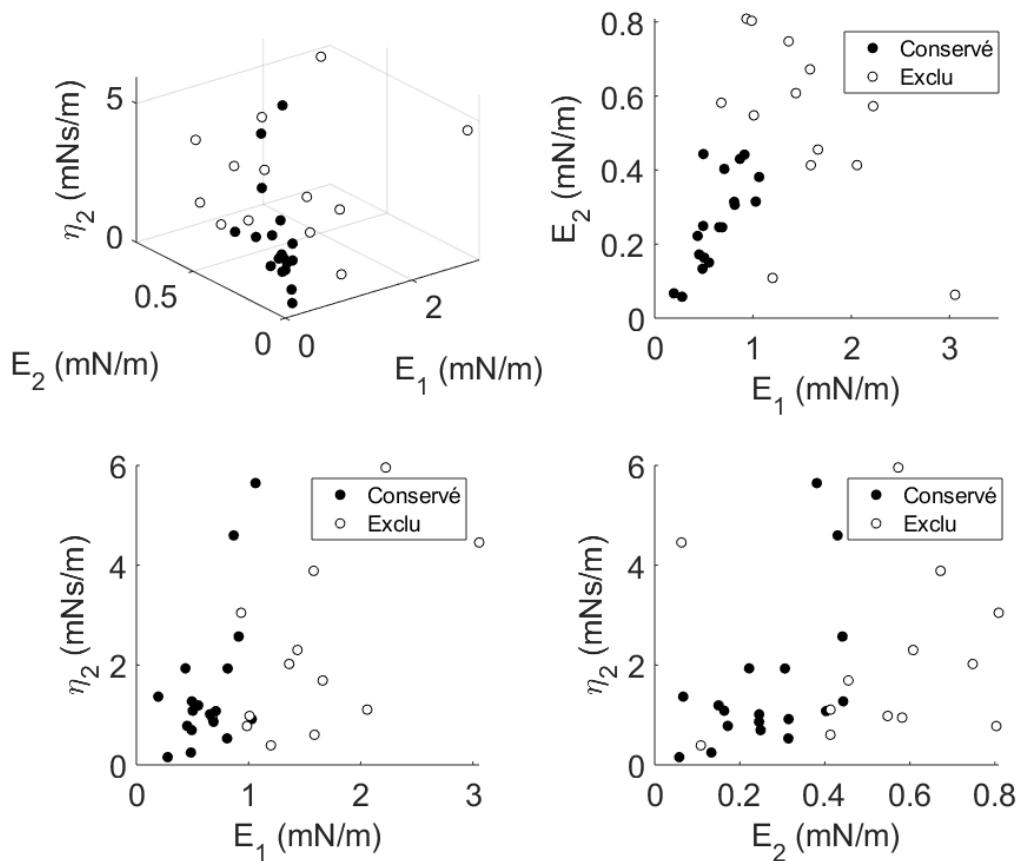


FIGURE 3.12 – Population des propriétés viscoélastiques de cellules HEK 293T/17 obtenues avec le modèle de Bg ( $n = 31$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 14$ ), alors que les données en noir sont exclues de l'étude.

dû à leur piètre prédiction des données. Ainsi, la suite de l'analyse ne comprend que les solutions aux modèles respectant la fonction de coût, ainsi qu'une certaine qualité d'ajustement de courbe. De plus, il importe d'ajouter que ces solutions qui prédisent mal les données sont présentes principalement lorsque les données elles-mêmes sont très bruitées. On remarque de fortes variations du déplacement du centre de masse sur ces courbes. Malgré une opération d'adoucissement des données. Des exemples sont présentés en annexe à la section A.7. Autrement dit, la qualité des données expérimentales, ainsi que la qualité des solutions aux modèles sont favorisées pour l'analyse des propriétés viscoélastiques des cellules entières.

### 3.4.2 Comparaison des propriétés viscoélastiques de types cellulaires

À la section précédente, la population de cellules étudiée est réduite de sorte à conserver seulement les cellules exprimant un comportement similaire. Ces petits groupes pour les trois types cellulaires sont comparés dans cette section avec le modèle St et Bg. Ces modèles sont choisis, car ils



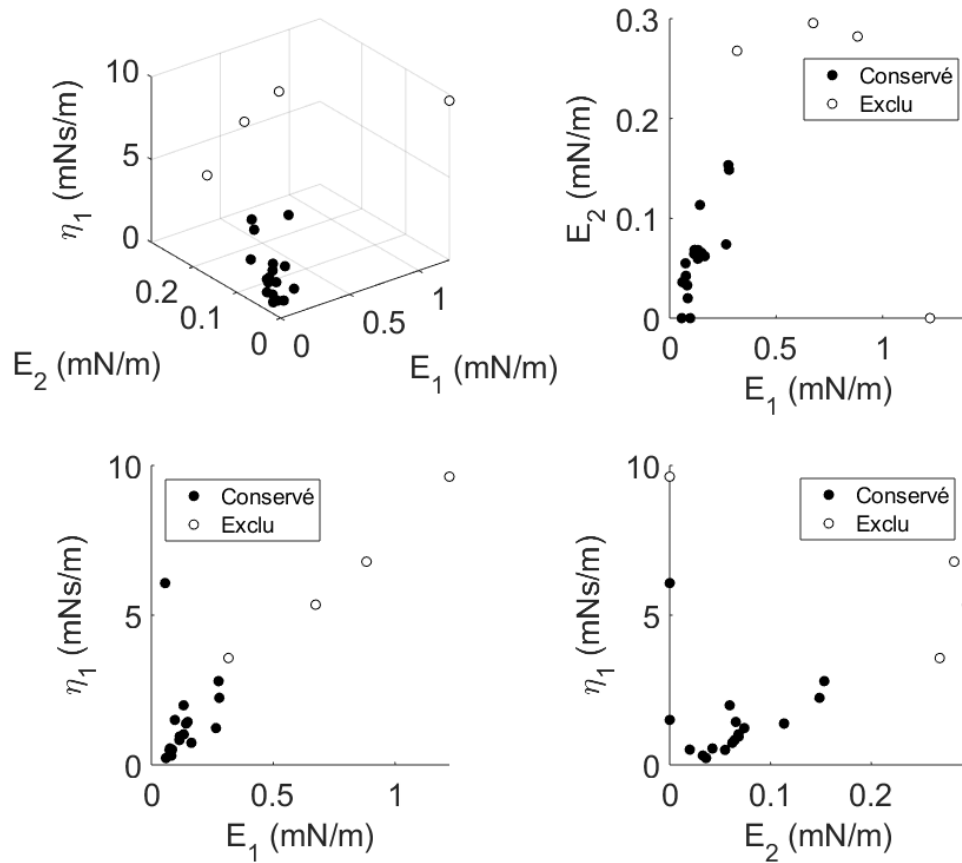


FIGURE 3.13 – Population des propriétés viscoélastiques de neurones corticaux primaires de rat obtenues avec le modèle St ( $n = 21$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 17$ ), alors que les données en noir sont exclues de l'étude.

expliquent relativement bien tout type de réponse en déformation-relaxation. En effet, le modèle St permet de représenter un déplacement du centre de masse d'une cellule retournant à une valeur nulle, alors que le modèle Bg prédit plutôt un déplacement du centre de masse ne retournant jamais à sa valeur initiale. Le modèle Mx n'est pas assez complexe et adapté à la physique des données pour être utilisé pour l'étude. Le modèle KV, quant à lui, ne peut représenter de déformation instantanée. Avec des SFAs en déformation seulement, ce dernier prédit bien les données, mais c'est en ajoutant la partie relaxation, dans laquelle la déformation instantanée est bien définie, que le modèle est moins performant que les autres. Par conséquent, cette section consiste à comparer les constantes de rigidité  $E$  et de viscosité  $\eta$  déterminées par les modèles St et Bg pour les populations des trois types cellulaires présentées à la section précédente.

Les figures 3.15 à 3.18 présentent les résultats des propriétés viscoélastiques des cellules NIH 3T3 ( $n = 15$ ), des cellules HEK 293T/17 ( $n = 14$ ) et des neurones ( $n = 17$ ). Les constantes de rigidité  $E_1$  et  $E_2$  prédites par le modèle St sont affichées à la figure 3.15, alors que les constantes de viscosité  $\eta_1$

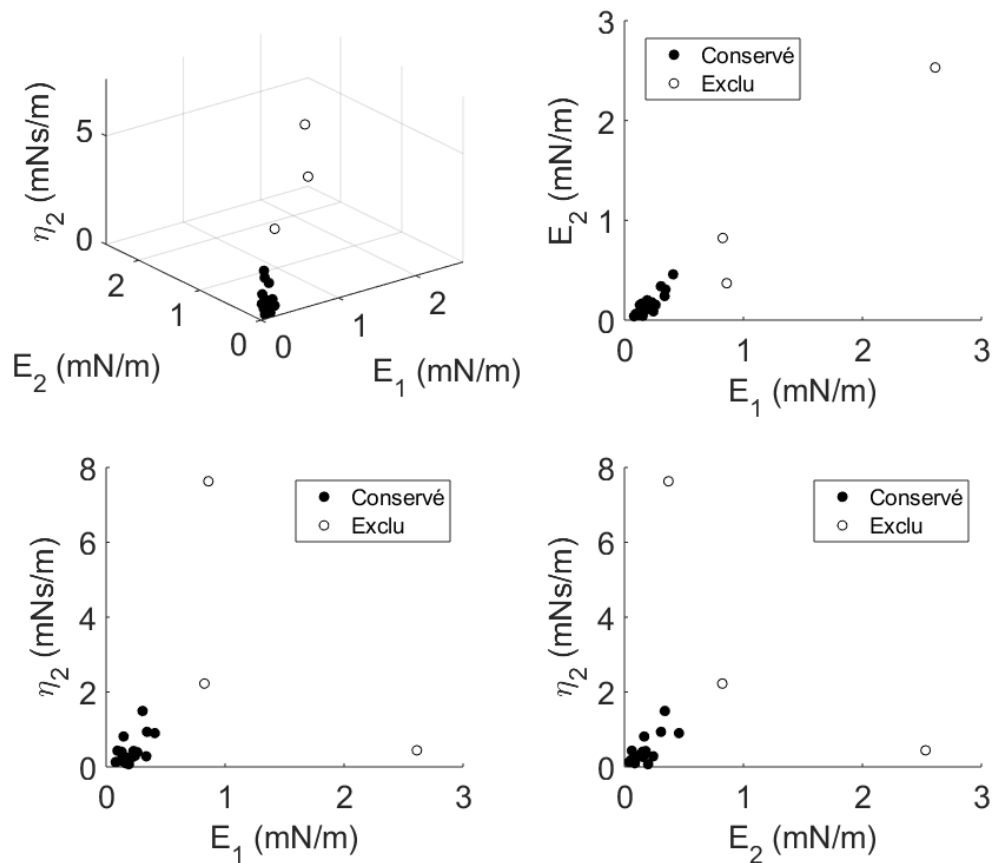


FIGURE 3.14 – Population des propriétés viscoélastiques de neurones corticaux primaires de rat obtenues avec le modèle de Bg ( $n = 21$ ). Le groupe, plus dense, de la population se retrouvant en bleu est conservé ( $n = 17$ ), alors que les données en noir sont exclues de l'étude.

le sont à la figure 3.16. La valeur affichée de la constante est la moyenne des valeurs de la population et les barres d'erreurs consistent en la déviation standard des valeurs de la population. La comparaison des paramètres entre les cellules est effectuée par le test U statistique de Mann-Whitney. Ce test est choisi pour déterminer la valeur  $p$  statistique puisque les distributions des paramètres n'adoptent pas une distribution normale. Ainsi, sur les figures, une valeur de  $p \leq 0.05$  est exprimée par une étoile. Une valeur de  $p \leq 0.01$  est indiquée par deux étoiles, alors qu'une valeur inférieure à 0.001 est exprimée avec trois étoiles. Par conséquent, ce test permet d'affirmer une différence significative entre deux types cellulaires pour la constante  $E$  ou  $\eta$  visée. Or, il est inscrit le sigle *n.s.* pour exprimer une différence non significative entre les types cellulaires.

Ensuite, sur les figures 3.17 et 3.18, on remarque une différence entre les valeurs moyennes des constantes de rigidité et de viscosité pour les types cellulaires. En effet, les cellules NIH 3T3 ont une constante de rigidité  $E_1$  avec le modèle Bg de  $(1.7 \pm 0.9)$  mN/m, les cellules HEK 293T/17 une valeur de  $(0.6 \pm 0.2)$  mN/m et les neurones primaires corticaux de rats une valeur de  $(0.20 \pm$

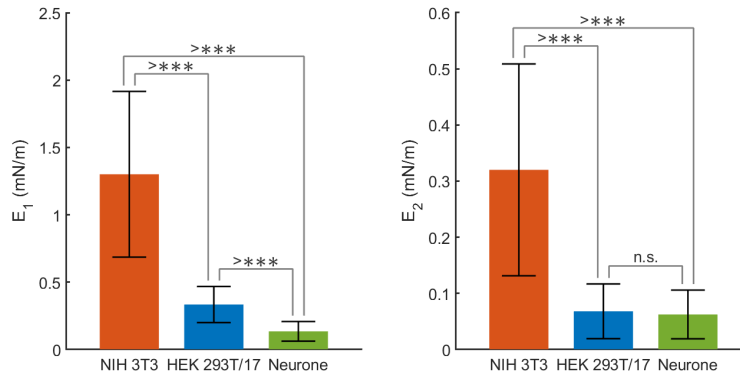


FIGURE 3.15 – Constantes de rigidité  $E_1$  et  $E_2$  des cellules NIH 3T3 ( $n = 15$ ), HEK 293T/17 ( $n = 14$ ) et neurales ( $n = 17$ ) déterminées par le modèle St. Les constantes  $E_1$  sont significativement différentes (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.001$ ) entre les types cellulaires observés. La constante de rigidité  $E_2$  ne permet pas de distinguer les cellules HEK 293T/17 des neurones. Les valeurs affichées sont les valeurs moyennes des constantes avec la déviation standard associée à la population.

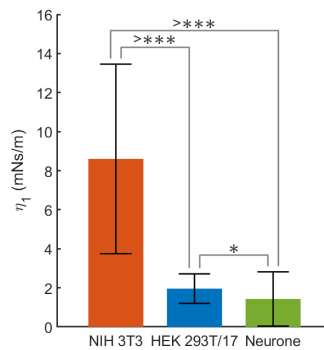


FIGURE 3.16 – Constantes de viscosité  $\eta_1$  des cellules NIH 3T3 ( $n = 15$ ), HEK 293T/17 ( $n = 14$ ) et neurales ( $n = 17$ ) déterminées par le modèle St. Les constantes sont significativement différentes (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.01$ ) entre les types cellulaires observés. Les valeurs affichées sont les valeurs moyennes des constantes avec la déviation standard associée à la population.

0.08) mN/m. Les autres constantes sont affichées au tableau 3.3 En fait, avec le modèle Bg, toutes les constantes viscoélastiques, sauf  $\eta_1$ , ont permis de distinguer significativement les types cellulaires (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.05$ ). Le paramètre  $\eta_1$ , comme discuté dans la section précédente, varie beaucoup, même au sein d'un même type cellulaire, donc il était attendu que ce paramètre ne permette pas la distinction des cellules. Par ailleurs, les constantes de rigidité  $E_1$  et de viscosité  $\eta_2$  du modèle Bg sont celles favorisées pour leur distinction plus significative des cellules HEK 293T/17 et des neurones.

Tout d'abord, en analysant la figure 3.15, on remarque une grande différence entre les valeurs moyennes de la constante de rigidité  $E_1$  pour les types cellulaires. Effectivement, les cellules NIH 3T3 ont une constante de rigidité  $E_1$  avec le modèle St de  $(1.3 \pm 0.6)$  mN/m, les cellules HEK 293T/17 une

Tableau 3.3 – Propriétés viscoélastiques des cellules entières obtenues par QP-DHM pour un SFA en déformation-relaxation. Les valeurs des propriétés sont les valeurs moyennes de la population avec la déviation standard associée.

Cellule	Modèle Standard			Modèle de Burgers			
	$E_1$	$E_2$	$\eta_1$	$E_1$	$E_2$	$\eta_1$	$\eta_2$
	[mN/m]	[mN/m]	[mNs/m]	[mN/m]	[mN/m]	[mNs/m]	[mNs/m]
NIH 3T3 (n=15)	1.3 ± 0.6	0.3 ± 0.1	9 ± 4	1.7 ± 0.9	0.9 ± 0.5	40 ± 33	6 ± 5
HEK 293T/17 (n=14)	0.3 ± 0.1	0.07 ± 0.05	2.0 ± 0.8	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1	8 ± 8	1.3 ± 1.0
Neurone (n=17)	0.14 ± 0.07	0.06 ± 0.04	1.4 ± 1.3	0.20 ± 0.08	0.14 ± 0.09	5 ± 3	0.4 ± 0.3

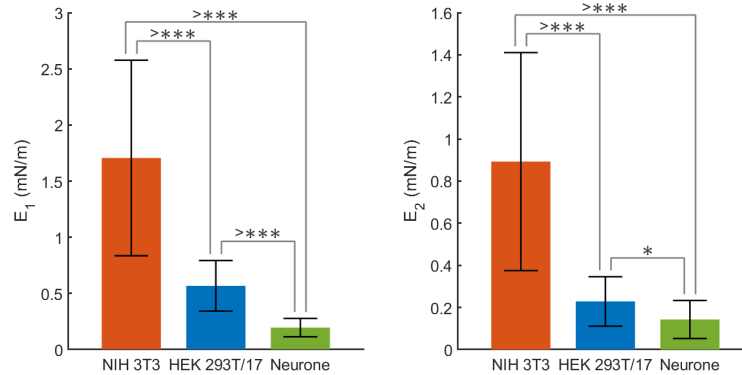


FIGURE 3.17 – Constantes de rigidité  $E_1$  et  $E_2$  des cellules NIH 3T3 (n = 15), HEK 293T/17 (n = 14) et neurales (n = 17) déterminées par le modèle Bg. Les constantes  $E_1$  sont significativement différentes (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.001$ ) entre les types cellulaires observés. La constante de rigidité  $E_2$  permet aussi de distinguer les cellules de façon significative (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.01$ ). Les valeurs affichées sont les valeurs moyennes des constantes avec la déviation standard associée à la population.

valeur de  $(0.3 \pm 0.1)$  mN/m et les neurones primaires corticaux de rats une valeur de  $(0.14 \pm 0.07)$  mN/m. Les constantes obtenues sont affichées au tableau 3.3. Par conséquent, les valeurs moyennes ne se recoupent pas en considérant l'erreur sur les mesures. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater une différence significative (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.001$ ) entre les types cellulaires pour ce paramètre. De plus, les valeurs de  $E_1$  démontrent un comportement espéré chez les fibroblastes, qui est d'observer une plus grande rigidité ( $E_1$  plus élevé) par rapport aux autres types de cellules. En effet, dû à leur forme, les NIH 3T3 sont beaucoup plus stables dans leur environnement et sont difficilement déformables. Cela explique aussi la nécessité d'effectuer les SFAs à de hauts débits pour observer une déformation de ce type cellulaire. Par ailleurs, il est possible de remarquer une forte erreur sur la valeur moyenne des NIH 3T3. Cette large erreur est constatée à toutes les valeurs moyennes de paramètres chez les fibroblastes et est principalement causée par les données expérimentales. En effet, puisque ces cellules sont difficiles à déformer, il arrive que le déplacement du centre de masse atteigne tout juste la précision de la QP-DHM. De ce fait, les données obtenues sont plutôt bruitées et causent leur prédiction par les modèles viscoélastiques à être moins précise. Pour les HEK 293T/17 et les neurones, l'échelle de la déformation cellulaire n'est pas limitée par la précision de la méthode, donc une erreur

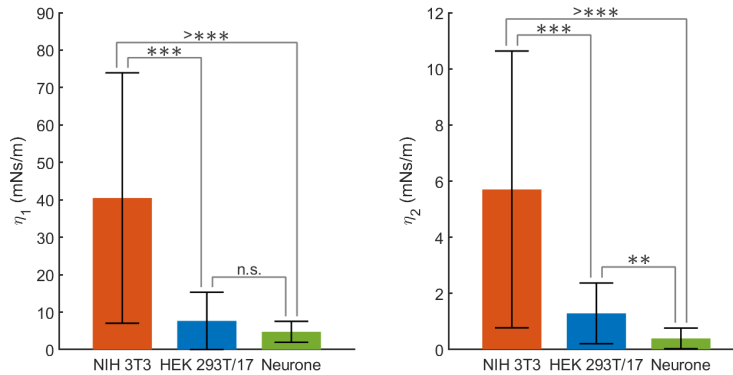


FIGURE 3.18 – Constantes de viscosité  $\eta_1$  des cellules NIH 3T3 ( $n = 15$ ), HEK 293T/17 ( $n = 14$ ) et neurales ( $n = 17$ ) déterminées par le modèle Bg. Les constantes  $\eta_2$  sont significativement différentes (Mann-Whitney test U,  $p \leq 0.005$ ) entre les types cellulaires observés. La constante de rigidité  $\eta_1$  ne permet pas de distinguer les cellules HEK 293T/17 des neurones. Les valeurs affichées sont les valeurs moyennes des constantes avec la déviation standard associée à la population.

plus faible est observée sur les constantes  $E$  et  $\eta$ . De surcroît, on observe une différence significative dans la constante de rigidité  $E_1$  entre les cellules HEK 293T/17 et les neurones corticaux primaires de rat ( $p < 0.005$ ) avec le modèle St. Or, il n'est toutefois pas possible de tirer une même conclusion pour le paramètre  $E_2$ , car les valeurs sont pratiquement identiques pour les cellules HEK 293T/17 et les neurones. D'un autre côté, la constante de viscosité  $\eta_1$  permet, quant à elle, de distinguer les trois types cellulaires ( $p < 0.005$ ) à l'aide du modèle St (figure 3.16). Somme toute, il est possible d'utiliser la constante de rigidité  $E_1$  obtenue des modèles St et Bg pour faire la distinction entre les types cellulaires. De plus, la constante de viscosité s'avère être un second choix pour distinguer les types cellulaires. Ainsi, ces deux propriétés viscoélastiques du modèle St peuvent être utilisées conjointement pour améliorer la rigueur de la distinction.

Finalement, les valeurs présentées au tableau 3.3 montrent de fortes déviations standards sur les valeurs des constantes  $\eta$  pour les deux modèles. Ainsi, comme expliqué précédemment, la constante de viscosité  $\eta_1$  du modèle Bg varie beaucoup et ce résultat est attendu. Toutefois, il est intéressant de noter que les constantes de viscosité  $\eta_1$  du modèle St et  $\eta_2$  du modèle Bg proviennent, dans l'arrangement du modèle (figure 1.16), d'un piston localisé au même endroit, en parallèle avec le ressort de constante de rigidité  $E_1$ . En analysant les valeurs, on remarque une certaine similarité entre  $\eta_1$  du modèle St et  $\eta_2$  du modèle Bg pour cette raison. De plus, la même conclusion peut être tirée pour la constante de rigidité  $E_1$  permettant de prédire la déformation instantanée des cellules. En effet, en considérant la déviation standard sur les mesures, on remarque que les valeurs sont les mêmes. Cela indique que la méthode employée est d'autant plus efficace pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules, car elle parvient à retrouver les mêmes valeurs à travers les modèles. Il est à noter que seule  $E_1$ , dans ce cas, représente exactement le même comportement en déformation pour les deux modèles. Ainsi, une étude plus approfondie sur les constantes de viscosité est nécessaire pour

s'assurer que  $\eta_1$  du modèle St et  $\eta_2$  du modèle Bg représentent bel et bien la même propriété du modèle.

À la lumière de ce qui précède, les types cellulaires étudiés peuvent être distingués par l'étude des propriétés viscoélastiques  $E_1$  avec le modèle St et Bg. En effectuant un SFA en déformation-relaxation, on obtient une meilleure précision sur les solutions aux modèles viscoélastiques atteintes par la fonction d'ajustement de courbe. Ainsi, les données acquises lors du SFA contraignent davantage les solutions possibles et réduisent l'intervalle de confiance sur les paramètres  $E$  et  $\eta$ . De plus, une comparaison entre les constantes de rigidité et de viscosité, pour un type cellulaire, permet d'observer une population dans laquelle des groupes de données plus denses sont présents. Ainsi, l'identification et l'utilisation de ces groupes pour l'analyse permet d'améliorer la distinction des cellules par leurs propriétés viscoélastiques. Par conséquent, cette méthode s'est avérée offrir des résultats concluants pour distinguer trois types cellulaires en mesurant leurs propriétés viscoélastiques de la cellule entière, et ce, sans agent de marquage ni instruments pour sonder la cellule.

# Conclusion

Dans ce mémoire, une étude rigoureuse sur l'obtention des propriétés viscoélastiques des cellules entières par SFA a montré l'efficacité de cette technique à distinguer les cellules par leurs propriétés telles que la constante de rigidité. Le tout a été réalisé de façon non invasive et sans agent de marquage avec la QP-DHM. Cette technique de microscopie a permis d'obtenir des images de phase quantitative avec lesquelles une déformation cellulaire peut être observée lorsqu'induite par un écoulement cisailé. Ainsi, il est possible de mesurer le déplacement du centre de masse des cellules tout au long d'un SFA et d'utiliser cette métrique pour interpréter les modèles viscoélastiques. Or, les modèles étudiés nécessitent de déterminer de 2 à 4 variables avec une fonction d'ajustement de courbe. Par conséquent, plusieurs méthodes ont été entreprises pour tenter d'améliorer la précision des solutions obtenues, diminuer le nombre de degrés de liberté et limiter le nombre de solutions possibles.

Tout d'abord, le type de SFAs favorisé consiste à induire une déformation cellulaire pendant un certain temps et d'ensuite relâcher la contrainte. Cela a comme avantage de contraindre les modèles à deux réponses physiques : en déformation et en relaxation. Il a été montré que les SFAs en déformation-relaxation permettent d'atteindre une meilleure précision sur les propriétés viscoélastiques extraites des modèles. De plus, de meilleures solutions ont été obtenues lorsque les modèles sont contraints à des points cruciaux sur la courbe expérimentale (à  $t_1$  et à  $t_f$ ). Pour une même cellule, il a été possible de retrouver des propriétés viscoélastiques identiques selon différents débits appliqués lors des SFAs, une approche qui améliore grandement la précision des solutions.

Ensuite, pour s'assurer de résultats adaptés au comportement des cellules, des étapes de caractérisation de la méthode ont été effectuées. L'écoulement dans la SFC a été caractérisé de manière à constater la laminarité de l'écoulement à des débits de 1 à 8 mL/min. De plus, des simulations numériques de l'écoulement ont été réalisées à cet intervalle de débits, pour obtenir les profils de cisaillement de l'écoulement. De cela, il est possible d'attribuer une valeur de contrainte de cisaillement propre à la hauteur moyenne de la cellule étudiée. Cette hauteur moyenne est obtenue des images de phase en QP-DHM en faisant l'hypothèse d'un indice de réfraction moyen de la cellule et un indice de réfraction moyen du milieu. Ainsi, certains paramètres de l'étude ont été déterminés préalablement à l'utilisation d'une fonction d'ajustement de courbe pour adapter le mieux possible la physique des résultats aux solutions à atteindre. D'ailleurs, il est à noter que la fonction d'ajustement peut rapidement devenir la plus grande source d'erreur dans la méthode si tous les paramètres de l'expérience

ne sont pas définis adéquatement ou si les données expérimentales sont trop bruitées. De ce fait, il demeure toujours des améliorations à implémenter à cette fonction pour qu'elle prédise des solutions exprimant correctement le comportement des cellules lors de SFAs.

Somme toute, la méthode de mesure des propriétés a permis de montrer des différences significatives entre trois types cellulaires (NIH 3T3, HEK 293T/17 et neurone) sur les propriétés viscoélastiques des modèles Standard et Burgers. Les résultats ont été obtenus sur la portion la plus dense de la population cellulaire. Ainsi, il serait intéressant d'analyser une plus grande population de neurones, par exemple, et tenter d'observer si différents groupes se profilent dans les données obtenues. De surcroît, il importe de poursuivre l'analyse du comportement des modèles viscoélastiques, de façon à intégrer le plus de connaissances dans la fonction d'ajustement de courbe. Cette méthode ouvre donc la porte à l'étude des propriétés viscoélastiques des neurones de manière non invasive, tout en conservant ces derniers dans leur environnement. De plus, avec les iPSCs, il serait possible et intéressant d'étudier les propriétés viscoélastiques de neurones dérivés de patients atteints de grandes maladies psychiatriques. Une comparaison avec des contrôles pourrait permettre de déceler de faibles disparités entre ces deux populations. Plus particulièrement, avec une méthode davantage développée offrant une meilleure précision sur les propriétés, il serait même envisageable de l'utiliser comme outil de dépistage de grandes maladies psychiatriques par l'étude des neurones dérivés.



# Annexe A

## Annexe

### A.1 Microbilles

Tableau A.1 – Microbilles utilisées pour la vélocimétrie par localisation de particules dans l'eau. Le diamètre des microbilles est tout aussi important que la densité dans le cas de tests en écoulement cisailé.

Nom	Diamètre ( $\mu m$ )	Densité ( $g/cm^3$ )	Matériel	Compagnie	# Catalogue
Polystyrene Blue	90.0 - 105.0	1.06	Polystyrène	Spherotech	PPB-1000-5
Red Polystyrene	30	1.06	Polystyrène	Phosphorex	1030KR
Violet Polyethylene	27 - 32	1.005	Polyéthylène	Cospheric	VIOPMS-1.00

## A.2 Protocole pour la solution de Tween des microbilles hydrophobes en polyéthylène

### 1. Général

Le but du protocole est de décrire la procédure pour préparer une solution de Tween pour utiliser avec des produits comme les microbilles et d'autres matériaux hydrophobes qui nécessitent d'être suspendus dans une solution aqueuse. Ce protocole décrit les étapes pour préparer cette solution aqueuse à 0.1% de Tween par masse.

### 2. Matériel

- Contenant
- Eau déionisée
- Plaque chauffante
- Thermomètre
- Tween80
- Balance
- Pipette
- Mélangeur à immersion

### 3. Préparer la solution

- Remplir le contenant pour faire la solution avec le volume souhaité d'eau dé-ionisée et le placer sur la plaque chauffante.
- Porter l'eau à ébullition et laisser à cette température pour environ 5 minutes.
- Pendant que l'eau bout, utiliser une balance précise et une pipette pour mesurer 0.1 gram de Tween pour chaque 100 mL d'eau utilisée (Ex. 1500 mL d'eau résulte en 1.5g de Tween).
- Ajouter lentement la quantité mesurée de Tween à l'eau bouillante et mélanger avec le mélangeur pour environ 30 secondes.
- Lorsque terminée, la solution est claire et uniforme (Attendre que la température diminue et que les bulles disparaissent avant d'utiliser la solution).

### 4. Utiliser la solution de Tween pour suspendre les microbilles

- Utiliser un flacon de 2.5 mL et y ajouter 0.5g des microbilles utilisées (Note : Il est possible que la quantité de microbilles soit trop grande pour les besoins de la PTV. Une quantité de 0.1g et moins est amplement suffisante pour les besoins).
- Utiliser une pipette pour déposer 2.0 mL de la solution 0.1% de Tween préparée préalablement sur les microbilles.
- Peser chacun des flacons pour s'assurer que les solutions de microbilles et Tween ont toutes un poids égal pour balancer l'étape dans la centrifugeuse.

- Refermer les flacons.
- Centrifuger pour 5 à 10 minutes pour mouiller les microbilles et les intégrer à la solution.

Source : [https://www.cospheric.com/tween\\_solutions\\_density\\_marker\\_beads.htm](https://www.cospheric.com/tween_solutions_density_marker_beads.htm)

### A.3 Vélométrie par localisation de particules

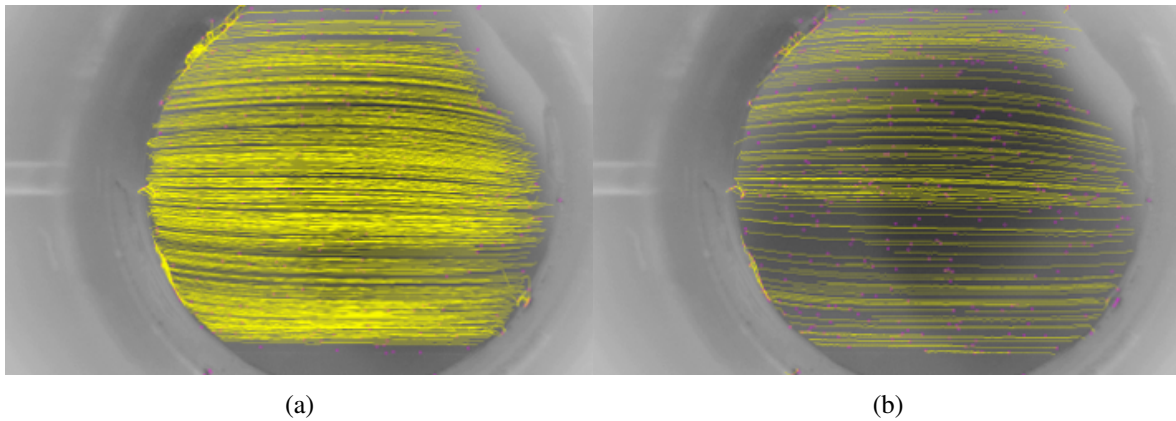


FIGURE A.1 – Trajectoires des microbilles de  $30 \mu m$  tracées avec TrackMate (a) sans utiliser de filtres et (b) avec l'ajout de filtres sur les trajectoires. Les lignes de courant conservées sont celles ayant la meilleure qualité et la plus grande distance.

## A.4 Protocole de sous-culture des NIH 3T3

### Sous-culture

Les volumes sont donnés pour une flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Augmenter ou diminuer la quantité de milieu dissociant nécessaire proportionnellement pour les contenants de culture à taille différente. Enlever le milieu de culture. Rincer brièvement la couche de cellules avec du DPBS pour enlever toute trace de sérum qui contient un inhibiteur de trypsine. Ajouter 1 mL de solution de Trypsine-EDTA à la flasque et observer les cellules sous le microscope jusqu'à ce que la couche de cellule se disperse (environ 5 minutes). Note : Pour éviter les amas de cellules, ne pas agiter les cellules en frappant ou en brassant la flasque en attendant que les cellules se détachent. Les cellules difficiles à détacher peuvent être placées à 37°C pour faciliter leur dispersion. Ajouter 3.0 à 9.0 mL de milieu de croissance complet doucement avec une pipette environ 10 fois. Ajouter les aliquots appropriés de la suspension des cellules dans une nouvelle enceinte de culture. Incuber les cultures à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Ne pas laisser les cellules devenir confluentes. Effectuer la sous-culture 2 fois par semaine à 80% de confluence ou moins.

Ratio de sous-culture : Inoculer 3 à 5 x 10<sup>3</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Renouvellement du milieu : 2 fois par semaine.

## **A.5 Protocole de sous-culture des HEK 293T/17**

### Sous-culture

Les volumes sont donnés pour une flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Augmenter ou diminuer la quantité de milieu dissociant nécessaire proportionnellement pour les contenants de culture à taille différente. Enlever le milieu de culture.

Rinser brièvement la couche de cellules avec du DPBS pour enlever toute trace de sérum qui contient un inhibiteur de trypsine. Ajouter 1 mL de solution de Trypsine-EDTA à la flasque et observer les cellules sous le microscope jusqu'à ce que la couche de cellule se disperse (environ 5 minutes). Note : Pour éviter les amas de cellules, ne pas agiter les cellules en frappant ou en brassant la flasque en attendant que les cellules se détachent. Les cellules difficiles à détacher peuvent être placées à 37°C pour faciliter leur dispersion. Ajouter 3.0 à 9.0 mL de milieu de croissance complet doucement avec une pipette environ 10 fois. Ajouter les aliquots appropriés de la suspension des cellules dans un nouvel enceinte de culture. Incuber les cultures à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Ratio de sous-culture : 1 :4 à 1 :8 est recommandé.

Renouvellement du milieu : à tous les 2 à 3 jours.

## A.6 Pièce personnalisée imprimée en 3D

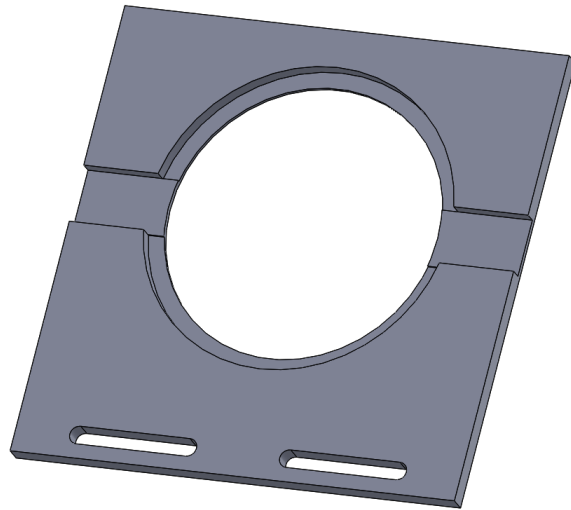


FIGURE A.2 – Base adaptant la chambre PFC-1 ProFlow de Warner Instruments au microscope holographique numérique T1000 de Lyncée Tec. La pièce est réalisée avec SOLIDWORKS et conçue avec une imprimante 3D.

## A.7 Solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité

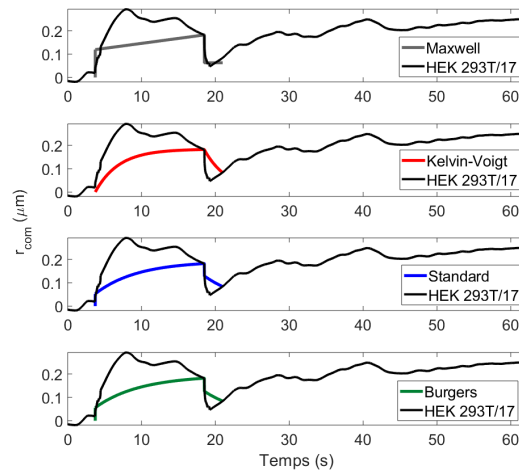


FIGURE A.3 – Exemple d’une solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité causée principalement par des données expérimentales bruitées. Les modèles ne sont pas ajustés sur toute la courbe pour tenter d’atténuer l’erreur liée aux données.

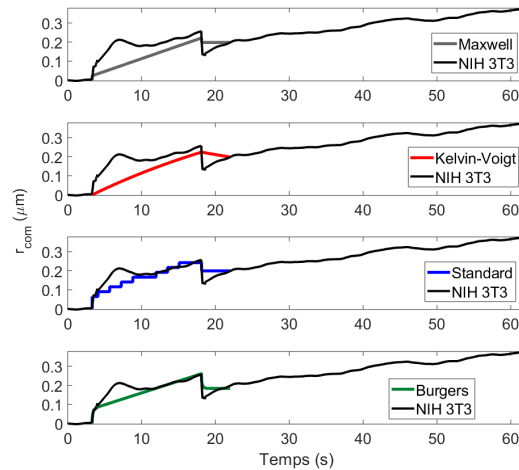


FIGURE A.4 – Exemple d’une solution aux modèles viscoélastiques de mauvaise qualité causée principalement par un déplacement du centre de masse augmentant suite au relâchement de la contrainte. Les modèles ne sont pas ajustés sur toute la courbe pour tenter d’atténuer l’erreur liée aux données.



# Bibliographie

- [1] YongKeun Park, Monica Diez-Silva, Gabriel Popescu, George Lykotrafitis, Wonshik Choi, Michael S Feld, and Subra Suresh. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37) :13730–13735, 2008. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0806100105.
- [2] E Du, Monica Diez-Silva, Gregory J Kato, Ming Dao, and Subra Suresh. Kinetics of sickle cell biorheology and implications for painful vasoocclusive crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5) :1422–7, 2015. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.1424111112. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4321273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [3] Subra Suresh. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 55(12) :3989–4014, 2007. ISSN 13596454. doi : 10.1016/j.actamat.2007.04.022.
- [4] Kristin B. Bernick, Thibault P. Prevost, Subra Suresh, and Simona Socrate. Biomechanics of single cortical neurons. *Acta Biomaterialia*, 7(3) :1210–1219, 2011. ISSN 17427061. doi : 10.1016/j.actbio.2010.10.018. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.10.018>.
- [5] J P Mills, M Diez-Silva, D J Quinn, M Dao, M J Lang, K S W Tan, C T Lim, G Milon, P H David, O Mercereau-Puijalon, S Bonnefoy, and Subra Suresh. Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22) :9213–9217, 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0703433104.
- [6] Daehwan Shin and Kyriacos Athanasiou. Cytoindentation for Obtaining Cell Biomechanical Properties. *Journal of Orthopaedic Research*, 17(6) :880–890, 1999.
- [7] S Suresh, J Spatz, J.P Mills, A Micoulet, M Dao, C.T Lim, M Bail, and T. Seufferlein. Connections between single-cell biomechanics and human disease states : gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomaterialia*, 1 :15–30, 2005. doi : 10.1016/j.actbio.2004.09.001.

- [8] Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Hamid Mahmood, Tess J Moon, and C Casey Cunningham. The Optical Stretcher : A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophysical Journal*, 81(August), 2001. doi : 10.1016/S0006-3495(01)75740-2.
- [9] R. M. Hochmuth, N. Mohandas, and P. L. Blackshear. Measurement of the Elastic Modulus for Red Cell Membrane Using a Fluid Mechanical Technique. *Biophysical Journal*, 13(8) :747–762, 1973. ISSN 00063495. doi : 10.1016/S0006-3495(73)86021-7. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(73\)86021-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(73)86021-7).
- [10] M R Kasschau, G A Barabino, K R Bridges, and D E Golan. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood*, 87(2) :771–80, 1996. ISSN 0006-4971. URL <http://www.bloodjournal.org/content/87/2/771.abstract>.
- [11] Pinar Ulker, Nazmi Yaras, Ozlem Yalcin, Ciler Celik-Ozenci, Paul C. Johnson, Herbert J. Meiselman, and Oguz K. Baskurt. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide*, 24(4) :184–191, 2011. ISSN 10898603. doi : 10.1016/j.niox.2011.03.003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860311000437>.
- [12] Pierre Marquet, Benjamin Rappaz, Pierre J. Magistretti, Etienne Cuche, Yves Emery, Tristan Colomb, and Christian Depeursinge. Digital holographic microscopy : a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters*, 30(5) :468, 2005. ISSN 0146-9592. doi : 10.1364/OL.30.000468. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-30-5-468>.
- [13] Will J. Eldridge, Adi Sheinfeld, Matthew T. Rinehart, and Adam Wax. Imaging deformation of adherent cells due to shear stress using quantitative phase imaging. *Optics Letters*, 41(2) :352, 2016. ISSN 0146-9592. doi : 10.1364/OL.41.000352. URL <http://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=ol-41-2-352&seq=0&html=true>.
- [14] Will J. Eldridge, Zachary A. Steelman, Brianna Loomis, and Adam Wax. Optical Phase Measurements of Disorder Strength Link Microstructure to Cell Stiffness. *Biophysical Journal*, 112(4) :692–702, 2017. ISSN 00063495. doi : 10.1016/j.bpj.2016.12.016. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349516343193http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.12.016>.
- [15] William N. Findley, James S. Lai, and Kasif Onaran. *Creep and relaxation of nonlinear viscoelastic materials*, volume 19. 1978. ISBN 9780720423693. doi : 10.1016/0032-3861(78)90187-8. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0032386178901878>.
- [16] P Kelly. Rheological Models. *Solid Mechanics Part I*, pages 292–301, 2015. ISSN 9780521846707. doi : 10.1007/978-3-642-25311-9.

- [17] Roderic S. Lakes. *Viscoelastic Solids*, volume 1. 1998. ISBN 9780511626722. doi : 10.1201/9781315121369. URL <https://books.google.com/books?hl=en&lr={&}id=soZZ117sm5IC{&}pgis=1http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CB09780511626722A089>.
- [18] Andreas R. Bausch, Florian Ziemann, Alexei A. Boulbitch, Ken Jacobson, and Erich Sackmann. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75(4) :2038–2049, 1998. ISSN 00063495. doi : 10.1016/S0006-3495(98)77646-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77646-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77646-5).
- [19] Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4) :663–676, 2006. ISSN 00928674. doi : 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [20] Maxim A. Vodyanik, Ron Stewart, Jessica Antosiewicz-Bourget, Kim Smuga-Otto, Junying Yu, Jennifer L. Frane, Igor I. Slukvin, Victor Ruotti, Gudrun A. Jonsdottir, Jeff Nie, James A. Thomson, Shulan Tian, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858) :1917–1920, 2007. ISSN 0036-8075. doi : 10.1126/science.1151526.
- [21] A. Reif, S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, M. Lauer, A. Schmitt, and K. P. Lesch. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Molecular Psychiatry*, 11(5) :514–522, 2006. ISSN 13594184. doi : 10.1038/sj.mp.4001791.
- [22] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander D Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Essential Cell Biology*. Garland Science, 2013.
- [23] G Bao, S Suresh, and Review Article. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2 :715–725, 2003.
- [24] Maria Odenthal-Schnittler, Hans Joachim Schnittler, and Björn Kemper. Online quantitative phase imaging of vascular endothelial cells under fluid shear stress utilizing digital holographic microscopy. *SPIE BiOS*, 9718 :97180U, 2016. ISSN 16057422. doi : 10.1117/12.2212551. URL <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=2502999{&}resultClick=1>.
- [25] Open Stax. *Anatomy & Physiology*. Open Stax CNX, 2016. URL <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24>.
- [26] George Plopper. *Principles of Cell Biology*. Jones & Bartlett Publishers, 2014.
- [27] Kevin D. Costa. Single-Cell Elastography : Probing for Disease with the Atomic Force Microscope. *Disease Markers*, 19(2-3) :139–154, 2013. ISSN 0278-0240. doi : 10.1155/2004/482680.

- [28] David J. Quinn, Igor Pivkin, Sophie Y. Wong, Keng Hwee Chiam, Ming Dao, George Em Karniadakis, and Subra Suresh. Combined simulation and experimental study of large deformation of red blood cells in microfluidic systems. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(3) :1041–1050, 2011. ISSN 00906964. doi : 10.1007/s10439-010-0232-y.
- [29] Hansen Bow, Igor V Pivkin, Monica Diez-Silva, Stephen J Goldfless, Ming Dao, Jacquin C Niles, Subra Suresh, and Jongyoon Han. A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. *Lab on a chip*, 11(6) :1065–73, 2011. ISSN 1473-0189. doi : 10.1039/c0lc00472c. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3366288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [30] DJ Quinn. Dynamic behavior of healthy and malaria infected human red blood cells. page 125, 2010. URL <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/61586>.
- [31] YongKeun Park, Monica Diez-Silva, Gabriel Popescu, George Lykotrafitis, Wonshik Choi, Michael S Feld, and Subra Suresh. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37) :13730–13735, 2008. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0806100105.
- [32] Yu M. Efremov, A. A. Dokrunova, A. V. Efremenko, M. P. Kirpichnikov, K. V. Shaitan, and O. S. Sokolova. Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(11) :3117–3125, 2015. ISSN 18792596. doi : 10.1016/j.bbamcr.2015.05.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.008>.
- [33] Małgorzata Lekka. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *BioNanoScience*, 6(1) :65–80, 2016. ISSN 21911649. doi : 10.1007/s12668-016-0191-3.
- [34] Michael Beil, Alexandre Micoulet, Götz Von Wichert, Stephan Paschke, Paul Walther, M. Bishr Omary, Paul P. Van Veldhoven, Ulrike Gern, Elke Wolff-Hieber, Juliane Eggermann, Johannes Waltenberger, Guido Adler, Joachim Spatz, and Thomas Seufferlein. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nature Cell Biology*, 5(9) :803–811, 2003. ISSN 14657392. doi : 10.1038/ncb1037.
- [35] Yu M. Efremov, M. E. Lomakina, D. V. Bagrov, P. I. Makhnovskiy, A. Y. Alexandrova, M. P. Kirpichnikov, and K. V. Shaitan. Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(5) :1013–1019, 2014. ISSN 01674889. doi : 10.1016/j.bbamcr.2014.01.032. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.032>.
- [36] Olivier Thoumine and Albrecht Ott. Comparison of the mechanical properties of normal and transformed fibroblasts. *Biorheology*, 34(4-5) :309–326, 1997.

- [37] O Thoumine and A Ott. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of cell science*, 110 ( Pt 1 :2109–16, 1997. ISSN 0021-9533. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378761>.
- [38] Ryuhei Tanaka, Blase A. Carabello, Michael R. Zile, Israel Mirsky, Francis Spinale, and John R. Lindroth. Left ventricular volume determined echocardiographically by assuming a constant left ventricular epicardial long-axis/ short-axis dimension ratio throughout the cardiac cycle. *Journal of the American College of Cardiology*, 20(4) :986–993, 2010. ISSN 07351097. doi : 10.1016/0735-1097(92)90202-x. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90202-X](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(92)90202-X).
- [39] Elise Spedden, James D. White, Elena N. Naumova, David L. Kaplan, and Cristian Staii. Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 103(5) :868–877, 2012. ISSN 00063495. doi : 10.1016/j.bpj.2012.08.005.
- [40] Tonia Munder, Anna Pfeffer, Stefanie Schreyer, Jing Guo, Juergen Braun, Ingolf Sack, Barbara Steiner, and Charlotte Klein. MR elastography detection of early viscoelastic response of the murine hippocampus to amyloid  $\beta$  accumulation and neuronal cell loss due to Alzheimer’s disease. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 47(1) :105–114, 2018. ISSN 15222586. doi : 10.1002/jmri.25741.
- [41] David F. Horrobin, A. Iain M. Glen, and Krishna Vaddadi. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res*, 13 :195–207, 1994.
- [42] W. J M Van der Kemp, D. W J Klomp, R. S. Kahn, P. R. Luijten, and H. E. Hulshoff Pol. A meta-analysis of the polyunsaturated fatty acid composition of erythrocyte membranes in schizophrenia. *Schizophr Res*, 141(2-3) :153–161, 2012. ISSN 09209964. doi : 10.1016/j.schres.2012.08.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2012.08.014>.
- [43] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annual Review of Materials Research*, 41(1) :75–97, 2011. ISSN 1531-7331. doi : 10.1146/annurev-matsci-062910-100351.
- [44] Emad Moendarbary and Andrew R. Harris. Cell mechanics : Principles, practices, and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Systems Biology and Medicine*, 6(5) :371–388, 2014. ISSN 1939005X. doi : 10.1002/wsbm.1275.
- [45] Wen Xiao, Qixiang Wang, Feng Pan, and Runyu Cao. Unlabeled flow cellular deformation measurement based on digital holographic microscopy. *Proceedings of SPIE*, (August), 2018. doi : 10.1117/12.2324852.
- [46] G. A. Truskey and J. S. Pirone. The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(10) :1333–1353, 1990. ISSN 00219304. doi : 10.1002/jbm.820241006.

- [47] Peter Butler, Sheldon Weinbaum, Shu Chien, and Lemons Daniel. Endothelium-Dependent, Shear-Induced Vasodilation is Rate-Sensitive. *Microcirculation*, pages 53–65, 2000.
- [48] Björn Kemper and Gert von Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied Optics*, 47(4) :A52, 2008. ISSN 0003-6935. doi : 10.1364/AO.47.000A52. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-47-4-A52>.
- [49] E Cuche, F Bevilacqua, and C Depeursinge. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics letters*, 24(5) :291–3, mar 1999. ISSN 0146-9592. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18071483>.
- [50] Pierre Marquet and Pierre J Magistretti. Review of quantitative phase-digital holographic microscopy : promising novel imaging technique to resolve neuronal network activity and identify cellular biomarkers of psychiatric disorders microscopy : promising novel imaging technique to. 2014. doi : 10.1117/1.NPh.1.2.020901.
- [51] P. Marquet, K. Rothenfusser, B. Rappaz, C. Depeursinge, P. Jourdain, and P. J. Magistretti. Quantitative phase-digital holographic microscopy : a new imaging modality to identify original cellular biomarkers of diseases. 9718 :97180K, 2016. ISSN 16057422. doi : 10.1117/12.2213454. URL <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2213454>.
- [52] Benjamin Rappaz, Pierre Marquet, Etienne Cuche, Yves Emery, Christian Depeursinge, and Pierre J. Magistretti. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*, 13(23) :9361, 2005. ISSN 1094-4087. doi : 10.1364/OPEX.13.009361. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-13-23-9361>.
- [53] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7) :686–698, 1942. ISSN 00318914. doi : 10.1016/S0031-8914(42)80035-X.
- [54] U. Schnars and W. Jüptner. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Applied Optics*, 33(2) :179, 1994. ISSN 0003-6935. doi : 10.1364/ao.33.000179.
- [55] Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Applied Optics*, 38(34), 1999.
- [56] Tristan Colomb, Jonas Kühn, Florian Charrière, Christian Depeursinge, Pierre Marquet, and Nicolas Aspert. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram. *Optics Express*, 14(10) :4300, 2006. ISSN 1094-4087. doi : 10.1364/OE.14.004300. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-14-10-4300>.

- [57] Tristan Colomb, Etienne Cuche, Florian Charrière, Jonas Kühn, Nicolas Aspert, Frédéric Montfort, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation. *Applied Optics*, 45(5) :851, 2006. ISSN 0003-6935. doi : 10.1364/AO.45.000851. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-45-5-851>.
- [58] Tristan Colomb, Frédéric Montfort, Jonas Kühn, Nicolas Aspert, Etienne Cuche, Anca Marian, Florian Charrière, Sébastien Bourquin, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 23(12) :3177, 2006. ISSN 1084-7529. doi : 10.1364/JOSAA.23.003177. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=josaa-23-12-3177>.
- [59] SangYun Lee, HyunJoo Park, Kyoohyun Kim, YongHak Sohn, Seongsoo Jang, and YongKeun Park. Refractive index tomograms and dynamic membrane fluctuations of red blood cells from patients with diabetes mellitus. *bioRxiv*, (November 2016) :1–11, 2016. ISSN 20452322. doi : 10.1038/s41598-017-01036-4. URL <http://biorxiv.org/content/early/2016/11/14/087460.abstract>.
- [60] Gabriel Popescu, YongKeun Park, Wonshik Choi, Ramachandra R. Dasari, Michael S. Feld, and Kamran Badizadegan. Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 41(1) :10–16, 2008. ISSN 10799796. doi : 10.1016/j.bcmd.2008.01.010.
- [61] YongKeun Park, Catherine a Best, Thorsten Auth, Nir S Gov, Samuel a Safran, Gabriel Popescu, Subra Suresh, and Michael S Feld. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4) :1289–1294, 2010. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0910785107.
- [62] Su A. Yang, Jonghee Yoon, Kyoohyun Kim, and YongKeun Park. Measurements of morphological and biophysical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson’s disease. *Cytometry Part A*, 2017. ISSN 15524930. doi : 10.1002/cyto.a.23110.
- [63] Bruce R Munson, Theodore H Okiishi, Alric P Rothmayer, and Wade W Huebsch. *Fundamentals of fluid mechanics*. John Wiley & Sons, 2014.
- [64] Yunus Cengel and John Cimbala. *Fluid mechanics fundamentals and applications*. McGraw-Hill, 2006.
- [65] Michael H. Winer, Ali Ahmadi, and Karen C. Cheung. Application of a three-dimensional (3D) particle tracking method to microfluidic particle focusing. *Lab Chip*, 14(8) :1443–1451, 2014. ISSN 1473-0197. doi : 10.1039/C3LC51352A. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC51352A>.

- [66] Jacek J Skrzypek and Artur W Ganczarski. Mechanics of Anisotropic Materials. pages 57–86, 2015. ISSN 00442267. doi : 10.1007/978-3-319-17160-9. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-17160-9>.
- [67] Nicolas Desprat, Alain Richert, Jacqueline Simeon, and Atef Asnacios. Creep Function of a Single Living Cell. *Biophysical Journal*, 88(3) :2224–2233, 2005. ISSN 0006-3495. doi : 10.1529/biophysj.104.050278. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.050278>.
- [68] Thibault P. Prevost, Asha Balakrishnan, Subra Suresh, and Simona Socrate. Biomechanics of brain tissue. *Acta Biomaterialia*, 7(1) :83–95, 2011. ISSN 17427061. doi : 10.1016/j.actbio.2010.06.035. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.035>.
- [69] Mukund Gupta, Bibhu Ranjan Sarangi, Joran Deschamps, Yasaman Nematbakhsh, Andrew Callan-Jones, Felix Margadant, René-Marc Mège, Chwee Teck Lim, Raphaël Voituriez, and Benoît Ladoux. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature Communications*, 6(May) :7525, 2015. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/ncomms8525. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms8525>.
- [70] Eric J Anderson, Adam Sorkin, and Melissa L Knothe Tate. Performance Evaluation of Four Cell Flow Chambers : How Well Is Stress Controlled at a Cellular Level? *Proceedings of IMECE04*, pages 1–2, 2004.
- [71] Eric J Anderson, Thomas D Falls, Adam M Sorkin, and Melissa L Knothe Tate. The imperative for controlled mechanical stresses in unraveling cellular mechanisms of mechanotransduction. *Biomedical engineering online*, 5 :27, 2006. ISSN 1475-925X. doi : 10.1186/1475-925X-5-27. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1526737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [72] Eric J Anderson and Melissa L Knothe Tate. Open access to novel dual flow chamber technology for in vitro cell mechanotransduction, toxicity and pharmacokinetic studies. *Biomedical engineering online*, 6(1) :46, 2007. ISSN 1475-925X. doi : 10.1186/1475-925X-6-46. URL <http://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-6-46>.
- [73] Jean-Yves Tinevez, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M Hoopes, Gregory D Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y Bednarek, Spencer L Shorte, and Kevin W Eliceiri. TrackMate : An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115 :80–90, 2017.
- [74] Francine Nault and Paul De Koninck. Protocols for Neural Cell Culture. In *Protocols for Neural Cell Culture*, number 1, chapter 8, pages 137–159. 2003. ISBN 9781607612926. doi : 10.1385/1592592074.



- [75] Matthew T. Rinehart, Han Sang Park, and Adam Wax. Influence of defocus on quantitative analysis of microscopic objects and individual cells with digital holography. *Biomedical Optics Express*, 6(6) :2067, 2015. ISSN 2156-7085. doi : 10.1364/BOE.6.002067. URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=boe-6-6-2067>.
- [76] Erik Bélanger, Sébastien A. Lévesque, Émile Rioux-Pellerin, Pauline Lavergne, and Pierre Marquet. Low-cost, open-source and do-it-yourself 3D-printed flow chamber optimized to perform measurements of whole-cell refractive index and absolute cell volume using quantitative-phase digital holographic microscopy. *Optics and Photonics*.