



MODEX 2021

Caractérisation d'un appareil
microfluidique utilisé pour étudier la
déformation mécanique des sphéroïdes
de tumeurs cancéreuses

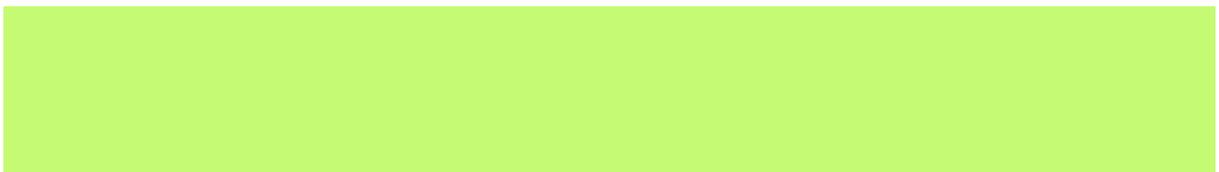


Table des matières

1	Introduction	2
2	L'appareil microfluidique	3
3	Expériences	5
3.1	Banc d'expérimentation	5
3.2	Le démarche de l'étude	6
4	Modèles géométriques	10
4.1	Modèle de Poisson	10
4.2	Modèle ellipsoïdal	11
4.3	Modèle à bords aplatis	12
5	Résultats et Analyse	14
5.1	Déformation de la puce en fonction de la pression pour un sphéroïde	14
5.2	Comparaison avec d'autres matériaux : huile	15
5.3	Comparaison avec d'autres matériaux : hydrogel	16
5.4	Comparaison avec la modélisation numérique du laboratoire	18
6	Conclusion	19

1 Introduction

Ces dernières décennies, les recherches sur les cellules cancéreuses se sont accélérées. Des domaines comme la mécanique sont désormais très importants pour faire avancer la recherche en biologie et comprendre le fonctionnement mécanique et le développement des cellules dans leur environnement à l'échelle microscopique. Des études montrent que soumettre ces cellules cancéreuses à des forces mécaniques externes peut entraîner leur apoptose et pourrait ainsi réduire la taille d'une tumeur[1]. Par exemple, une réduction de taille d'une tumeur a été observée sur un rat lorsque des étirements quotidiens lui étaient appliqués pendant un mois. [2]. Ces études permettent de faire progresser notre compréhension du cancer et d'imaginer de nouvelles formes de traitement.

Un dispositif microfluidique a été développé par le laboratoire de l'Institut Pasteur. Il s'agit d'une puce contrôlée en pression qui permet d'appliquer différentes contraintes et déformations sur le matériau qui se situe à l'intérieur tels que les sphéroïdes de cellules cancéreuses, d'une manière beaucoup plus simple que les montages expérimentaux couramment utilisés. Une description plus précise de l'appareil sera développée dans la première partie de ce rapport. L'objectif de ce Modex est de caractériser les performances de l'appareil et donc d'obtenir une courbe qui relie la pression appliquée par l'utilisateur et la déformation du sphéroïde contenu dans l'appareil.

Dans un premier temps, nous réaliserons des mesures expérimentales. Nous analyserons les images obtenues au microscope pour en extraire des données géométriques sur la déformation des sphéroïdes.

Dans un second temps, nous développerons différents modèles géométriques qui nous permettront d'obtenir des résultats sur la déformation verticale des sphéroïdes à partir des données expérimentales.

Finalement nous analyserons les résultats et chercherons à en évaluer la robustesse en réalisant d'autres expériences avec d'autres types de cellules à notre disposition ainsi qu'en les comparant aux résultats de la modélisation numérique réalisée par l'Institut Pasteur.

2 L'appareil microfluidique

L'étude a été menée sur une puce microfluidique développée et fournie par l'Institut Pasteur. Les détails précis de construction du dispositif ne peuvent pas être divulgués, mais son principe de fonctionnement sera expliqué. La Figure 1 présente les principales régions de l'appareil microfluidique.

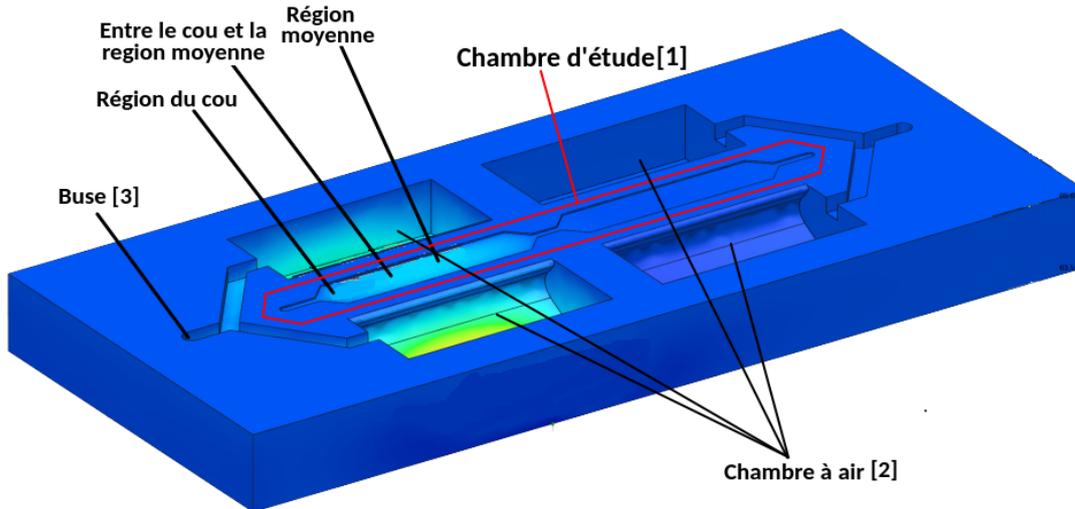


FIGURE 1 – L'appareil microfluidique, objet de notre étude

Dans la région centrale, des sphéroïdes ou tout autre type de matériau peuvent être déposés dans la chambre d'étude. Des deux côtés de cette chambre sont disposés des chambres à air, reliées à une buse où un dispositif de contrôle de pression est connecté. De cette manière il est possible de contrôler la pression dans les chambres à air et par conséquent la déformation de la paroi supérieure de l'appareil. En appliquant une pression négative dans ces chambres à air, la pression atmosphérique comprime le dispositif et par conséquent la région centrale se retrouve également comprimée. C'est ce que nous observons sur la Figure 2.

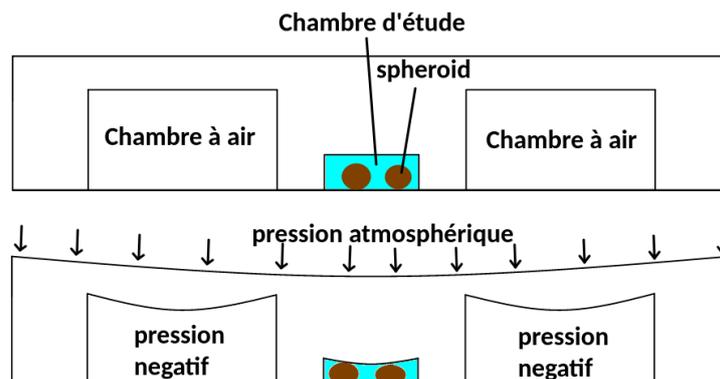


FIGURE 2 – Coupe transversale schématique de l'appareil

Le dispositif fonctionne selon un principe simple mais puissant. Il permet d'imposer une déformation sur un objet dans un environnement 3D, et d'observer sa déformation à travers le microscope directement au-dessus. Le contrôle du type d'effort (cyclique, constant, variable, etc.) se fait entièrement par le dispositif de contrôle de la pression grâce à une pompe. L'appareil coûte peu cher, est petit (environ 5 cm de longueur), et peut se fabriquer par impression 3D.

L'objectif du travail est alors de caractériser la déformation verticale que subit la paroi supérieure de l'appareil, ce qui permet de caractériser la déformation subie par les sphéroïdes dans la chambre d'étude. Une simulation par éléments finis a été réalisée par l'Institut Pasteur, qui a obtenu les déformations suivantes de la paroi supérieure aux emplacements indiqués sur la Figure 1.

Pression (<i>mbar</i>)	Déplacement verticale (μm)		
	Région du cou	Entre le cou et la moyenne	Région moyenne
-100	6.307	11.32	12.47
-200	12.63	22.56	24.77
-300	18.953	33.8	37.15
-400	25.26	45.11	49.54
-500	31.58	56.39	61.92
-600	37.89	67.67	74.31

TABLE 1 – Déplacements verticaux simulés par éléments finis

3 Expériences

3.1 Banc d'expérimentation

Pour réaliser les expériences, un système de pression et un système d'acquisition sont nécessaires, en plus du dispositif microfluidique. La Figure 3 est une photo du banc réalisé dans le laboratoire MechaTrex de l'École Polytechnique. La pompe est connectée au contrôleur, qui est connecté à l'appareil par la buse. Le microscope se connecte à l'ordinateur, permettant de visualiser en temps réel la vue de dessus de la chambre d'étude du dispositif microfluidique.

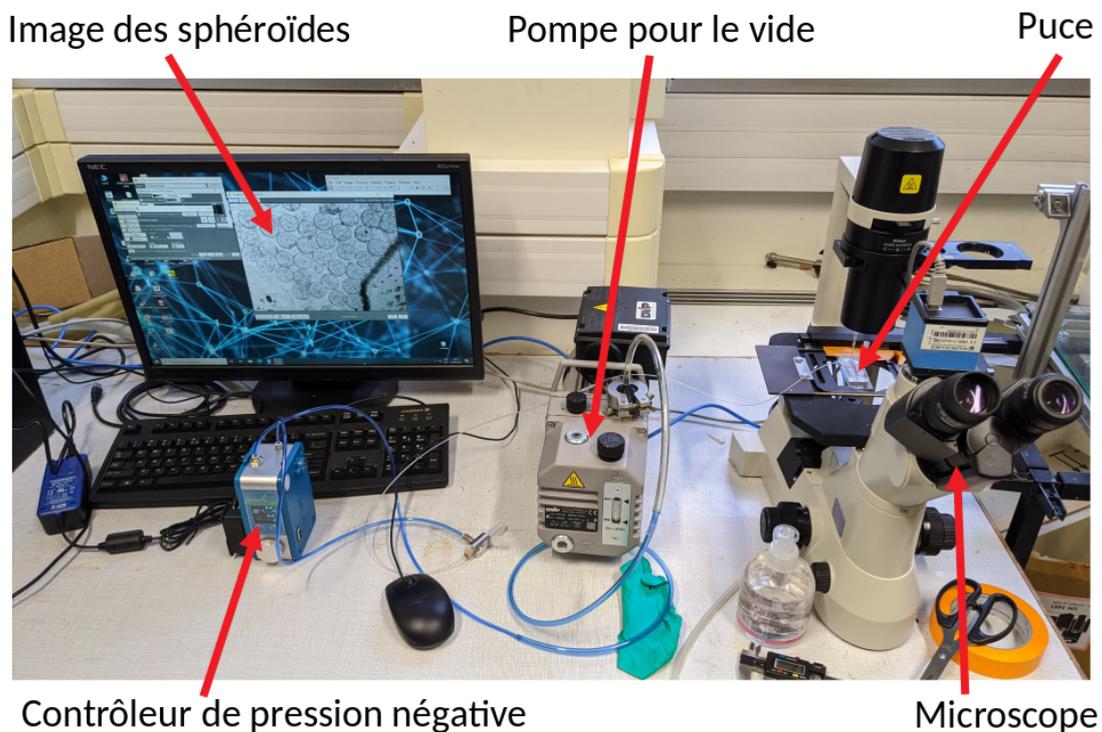


FIGURE 3 – Photo du banc d'expérimentation

Ce montage expérimental est simple à mettre en place et permet d'étudier le comportement sous pression de différents matériaux microscopiques de manière simple. D'autres montages expérimentaux plus complexes ont été réalisés par Foty et al[3], leur permettant d'obtenir en plus une vue latérale de leur expérience comme illustré sur la Figure 4. N'ayant pas accès à cette vue latérale dans notre montage, nous devons élaborer des modèles théoriques pour combler ce manque d'information.

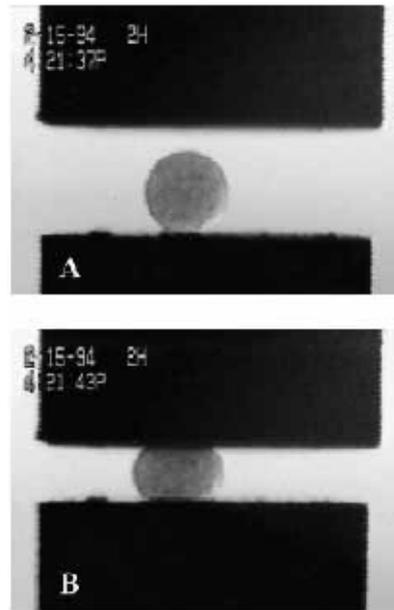


FIGURE 4 – Une photo d'un agrégat cardiaque sphérique sous compression réalisée dans l'étude par Foty et al[3]

3.2 Le démarche de l'étude

Il est important de souligner que l'étude se base uniquement sur les données extraites des images que nous avons obtenues au microscope. Nous n'avons mené aucun autre type de mesure. Des vidéos et des images ont été obtenues, et l'étude consiste à faire varier la pression négative sur le contrôleur et à prendre des photos de l'état déformé de différents matériaux.

Tout le problème de la caractérisation de l'équipement a également été développé et pensé par l'équipe pendant la période MODEX, car il s'agit d'une expérience inhabituelle, c'était la créativité des membres pour réfléchir de manière critique aux approches du problème. Pour cette raison, l'équipe a dû constamment faire des recherches bibliographiques, planifier de nouvelles expériences et traiter les données obtenues au cours des semaines du projet. Étant donné que chaque nouvelle découverte représentait une nouvelle possibilité d'approche et que le temps était court pour tester, valider ou rejeter les méthodologies et les hypothèses.

Certaines propriétés du matériau hydrogel étaient déjà connues (géométrie, module d'élasticité et rigidité), au moyen d'une table que l'équipe disposait. Pour cette raison, nous avons choisi de tester ce matériau en premier (ironiquement, il s'est avéré être le matériau le plus problématique pour les modèles élaborés). Les données ont été prises pour des pressions allant de 0 à 600 mbar à des intervalles de 50 mbar.

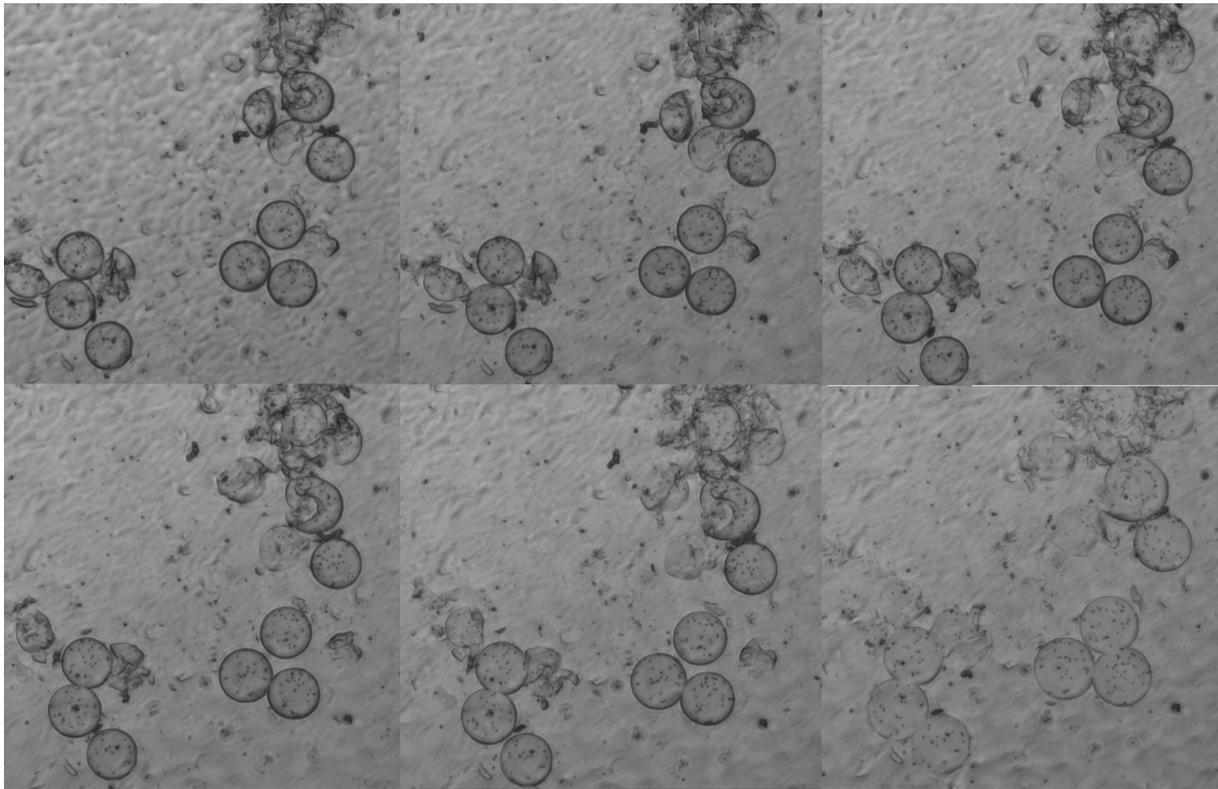


FIGURE 5 – Photo de l’hydrogel déformé pour les pression imposée au contrôleur (de gauche à droite et de haut en bas : -23.4 mbar ; -100mbar ; -200mbar ; -300mbar ; -400mbar ; -600mbar)

L’idée initiale était d’utiliser les propriétés tabulées connues dans un modèle de déformation linéaire, avec un poisson $\nu = 0,5$ pour les transformations à volume constant. De nombreux problèmes ont été soulevés comme si les déformations seraient suffisamment faibles pour l’utilisation de ce modèle ou si l’hydrogel conservait en fait son volume lors de la déformation (les deux hypothèses se sont par la suite révélées fausses).

Jusque-là, le groupe a recherché et réfléchi aux possibilités d’approches, des modèles basés sur l’équation LaPlace-Young de la tension superficielle et la loi des gaz parfaits ont été considérés. Le groupe a ensuite trouvé l’article de Lina et al[6], qui a été le plus influent dans la définition d’une méthodologie basée sur une prise en compte de la conservation des volumes pendant la deformation, cela sera expliqué plus en détail lors de la prochaine session.

Des expériences ont ensuite été menées avec des gouttes d’huile, un matériau qui conservait son volume et qui avait tendance à former des dépôts sphériques dans l’eau. L’utilisation de ce matériau seul apportait plusieurs complications, les bulles bougeaient beaucoup dans la chambre d’étude (ce qui permettait de les perdre facilement de vue et rendait difficile l’obtention d’une mesure locale de déformation dans l’appareil), et

elles avaient tendance à se rejoindre formant une seule grande flaque d'huile informe. Les données ont été prises pour des pressions allant de 0 à 400 mbar à des intervalles de 50 mbar.

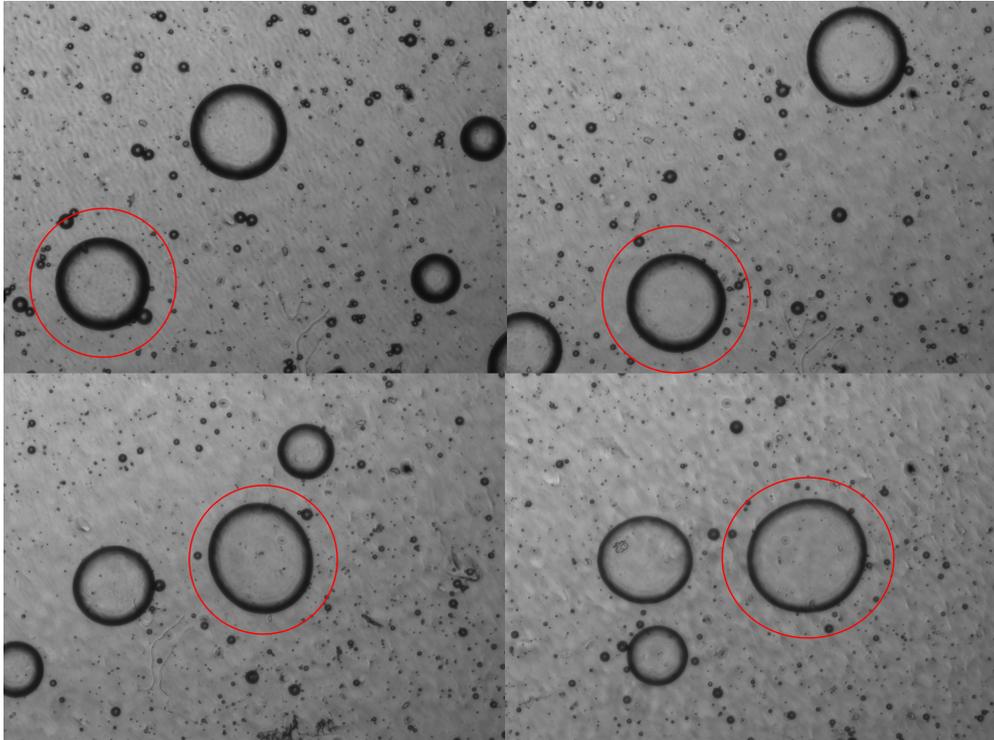


FIGURE 6 – Photo de l'huile déformée pour les pressions imposées au contrôleur (de gauche à droite et de haut en bas : -25 mbar ; -100 mbar ; -200 mbar ; -400 mbar ;)

Enfin, des données ont été collectées pour les sphéroïdes de cellules cancéreuses, objet d'étude pour lequel le dispositif a été conçu, comme le montre la Figure 7.

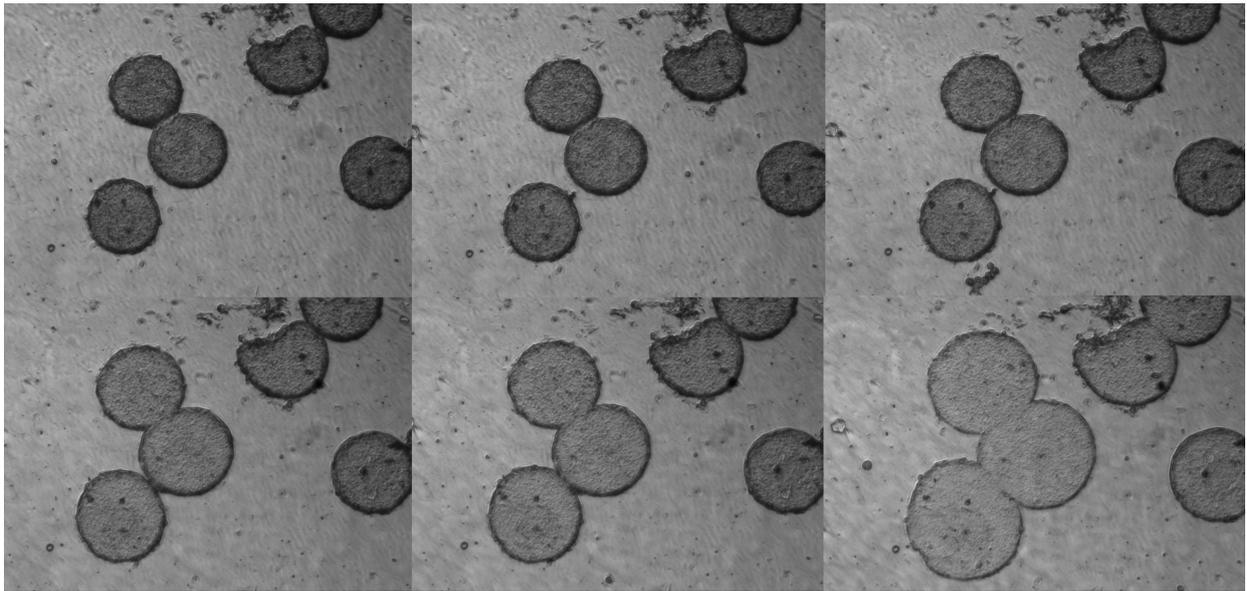


FIGURE 7 – Photo des sphéroïdes déformés pour les pression imposée au contrôleur (de gauche à droite et de haut en bas : -17 mbar ; -100mbar ; -200mbar ; -300mbar ; -400mbar ; -600mbar)

Le programme de traitement d'image ImageJ a été utilisé, il permet d'insérer l'échelle μm : *pixel*, d'extraire des mesures de zones, de lignes, de périmètre, etc. Ces données ont été extraites des images obtenues et traitées sous Excel Les objets ont été considérés comme parfaitement circulaires pour la réalisation des modèles, vus de dessus, une considération valable puisque les valeurs de rayon primaire et secondaire tirées d'ImageJ étaient très proches.

4 Modèles géométriques

Il s'agit dans cette partie d'exploiter les données expérimentales obtenues pour répondre à la problématique posée : relier la déformation verticale des sphéroïdes à la pression imposée par la puce. Il convient de remarquer que les données sont obtenues dans un plan horizontal (il s'agit d'une vue de dessus du sphéroïde) alors que la déformation étudiée est une déformation verticale. Nous allons donc développer dans cette partie trois modèles géométriques (du plus simple au plus complexe) permettant de caractériser la déformation verticale du sphéroïde connaissant uniquement sa prise de vue du dessus.

4.1 Modèle de Poisson

Le modèle de Poisson est le modèle le plus intuitif et le plus simple. Il repose sur l'hypothèse de conservation du volume entre l'état initial du sphéroïde et son état de compression par la paroi supérieure de la puce microfluidique.

Ce modèle repose sur la définition même du coefficient de Poisson qui relie la variation de longueur selon l'axe de la contrainte appliquée (l'axe vertical) Δh à la variation de longueur du matériau selon l'axe orthogonal (l'axe horizontal) Δd .

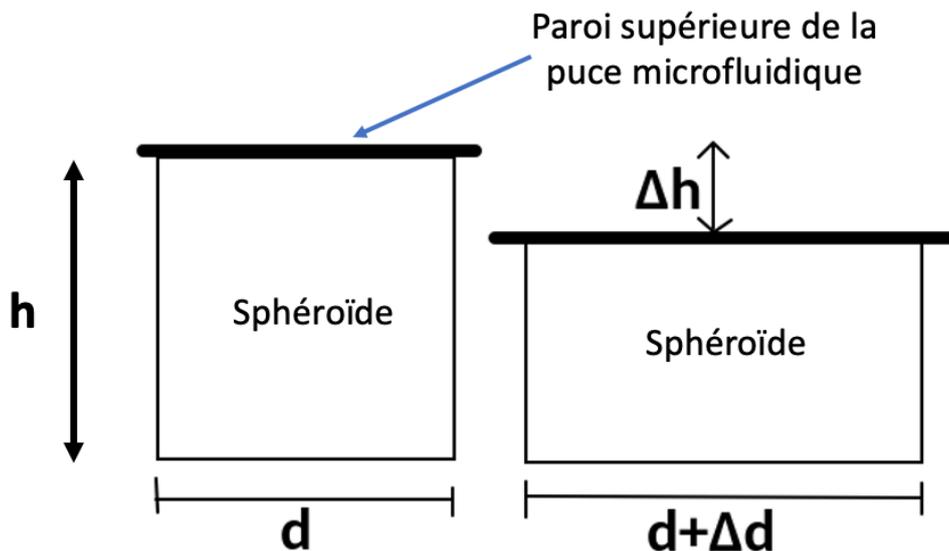


FIGURE 8 – Modèle de Poisson

$$\nu = \frac{\Delta d}{\Delta h} \quad (1)$$

Ainsi connaissant le coefficient de poisson du matériau élastique ainsi que Δd mesu-

rée grâce à l'acquisition image sur la vue de dessus du sphéroïde, nous pouvons donc déterminer la déformation verticale Δh par la relation (1).

Remarquons que ce modèle ne fait aucune hypothèse géométrique sur la forme du sphéroïde et qu'il ne s'applique que dans le cadre des petites déformations.

4.2 Modèle ellipsoïdal

Le modèle ellipsoïdal repose également sur l'hypothèse de conservation du volume du sphéroïde entre son état initial et son état de compression. La seconde hypothèse concerne sa géométrie dans l'espace. On suppose que le sphéroïde a une forme ellipsoïdale à deux rayons égaux. Cette hypothèse géométrique permet de calculer le volume initial et le volume final du sphéroïde.

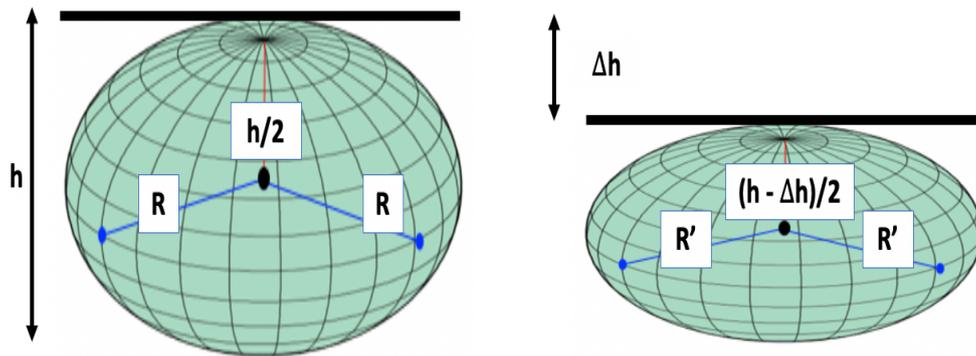


FIGURE 9 – Modèle ellipsoïdal

$$V_i = \frac{4}{3}\pi \frac{h}{2} R^2 \quad (2)$$

$$V_f = \frac{4}{3}\pi \frac{h - \Delta h}{2} R'^2 \quad (3)$$

L'hypothèse de conservation du volume permet d'obtenir l'équation sur Δh par égalisation de ces deux volumes.

$$\Delta h = h \left(1 - \left(\frac{R}{R'}\right)^2\right) \quad (4)$$

Ainsi nous sommes en mesure de calculer Δh puisque nous avons mesuré par acquisition d'image R et R' et que nous connaissons la hauteur de la cavité de la puce microfluidique h ($h=100 \mu m$).

4.3 Modèle à bords aplatis

Le modèle à bords aplatis est proche du modèle ellipsoïdal à la différence près qu'il considère que les parois aplatisent les bords supérieur et inférieur du sphéroïde. Ainsi, ce modèle repose lui aussi sur la conservation du volume du sphéroïde et sa géométrie est une ellipsoïde aplatie. Nous avons imaginé ce modèle car il nous semblait pertinent de considérer un contact plan-plan au niveau des bords du sphéroïde. Notre démarche est confortée par les résultats d'études menées sur des balles en caoutchouc mou qui utilisent ce même modèle géométrique [6]. L'hypothèse géométrique permet de calculer les volumes initial et final.

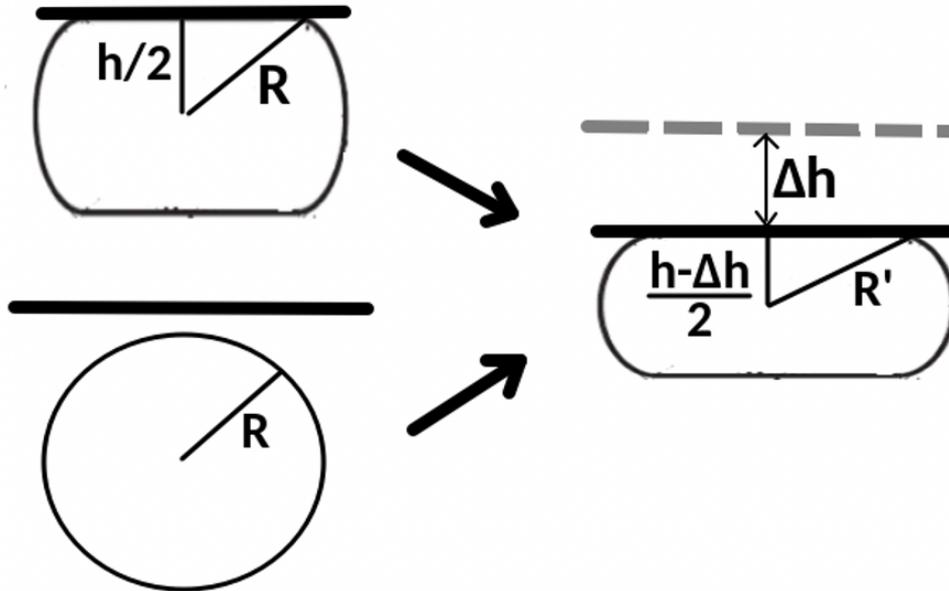


FIGURE 10 – Modèle à bords aplatis

$$V_i = 2\pi\left(R^2\frac{h}{2} - \frac{\left(\frac{h}{2}\right)^3}{3}\right) \quad (5)$$

$$V_f = 2\pi\left(R'^2\left(\frac{h - \Delta h}{2}\right) - \frac{\left(\frac{h}{2}\right)^3}{3}\right) \quad (6)$$

L'hypothèse de conservation du volume permet d'obtenir l'équation sur Δh par égalisation de ces deux volumes.

$$\Delta h^3 - 3h\Delta h^2 + (3h^2 - 12R'^2)\Delta h + 12h(R^2 - R'^2) = 0 \quad (7)$$

Ainsi connaissant tous les paramètres h , R et R' , il nous est possible de déterminer

la variation de hauteur du spherode Δh en résolvant cette équation du troisième degré à l'aide d'une macro Excel.

5 Résultats et Analyse

5.1 Déformation de la puce en fonction de la pression pour un sphéroïde

Les modèles présentés dans la partie précédente nous permettent d'obtenir la variation verticale de hauteur de la paroi de la puce microfluidique Δh . Le graphique de la Figure 11 établit pour un sphéroïde les courbes Δh en fonction de la pression imposée dans l'appareil microfluidique pour les trois modèles.

Nous tenons à préciser que pour établir ces courbes nous avons réalisé des mesures sur trois sphéroïdes distincts situés dans un environnement proche. Les barres d'erreur sur le graphique sont des barres d'écart type et la courbe est tracée au niveau de la médiane de cette série de données.

Nous remarquons que pour des pressions faibles de 0 à 250 mbar, les trois modèles fournissent des résultats de déformation très proches. Ainsi, aux petites déformations les trois modèles sont équivalents. Au dessus de 250 mbar, le modèle de Poisson donne des résultats très éloignés des modèles ellipsoïdal et à bords aplatis. En réalité, ceci est tout à fait logique car ce modèle de Poisson n'est valable qu'aux petites déformations. Il convient donc de s'intéresser aux deux autres pour être au plus proche de la déformation réelle de la cavité de la puce microfluidique. Nous remarquons que ces deux modèles sont très proches avec un écart d'environ $5 \mu m$ seulement (pour une hauteur de cavité h de $100 \mu m$).

Ainsi notre étude et nos modèles nous conduisent à penser que la déformation réelle de la paroi de la puce microfluidique est très proche des deux courbes des modèles ellipsoïdal et à bords aplatis.

Les deux sections suivantes consisteront à évaluer la robustesse de nos résultats.

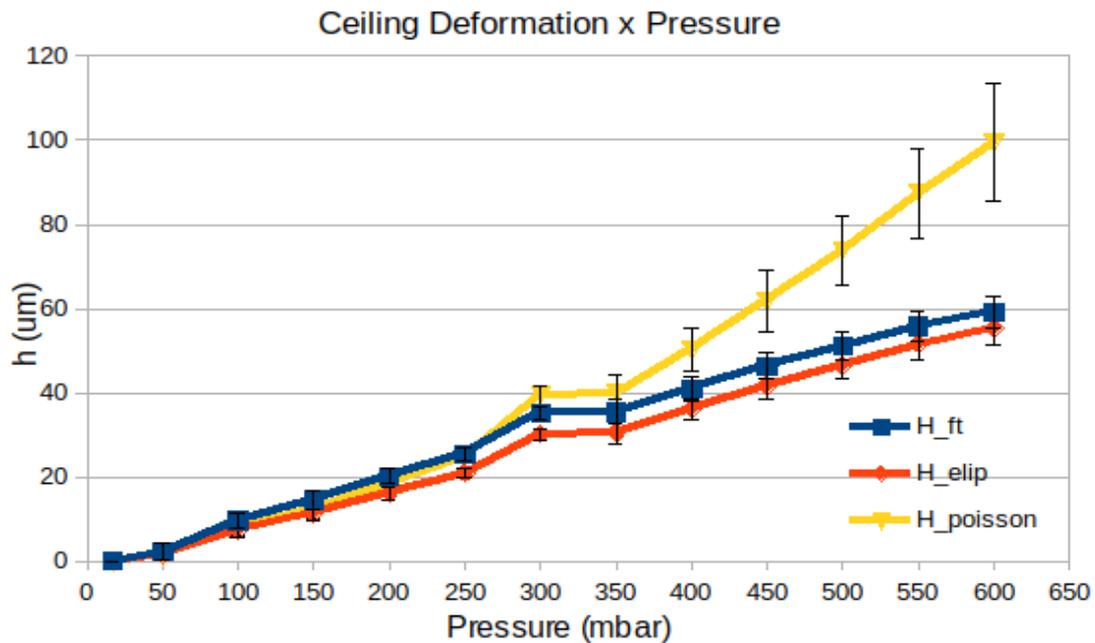


FIGURE 11 – Déformation de la paroi en fonction de la pression pour le sphéroïde

5.2 Comparaison avec d'autres matériaux : huile

Nous avons à disposition d'autres types de matériau microfluidique que nous avons exploités pour tester la force de nos modèles.

Le premier matériau est une goutte d'huile contenue dans un filet d'eau. Comme pour le sphéroïde, nous remarquons une concordance des modèles aux petites déformations, une non validité du modèle de Poisson aux grandes déformations ainsi qu'une proche corrélation des modèles ellipsoïdal et à bords aplatis. Toutefois nous remarquons que ces modèles sont moins linéaires que pour le sphéroïde.

Ainsi ce matériau permet de donner de la force à nos modèles puisque pour un matériau différent, les deux modèles ellipsoïdal et à bords aplatis sont encore une fois très proches et cette fois ci à $3\mu m$ près.

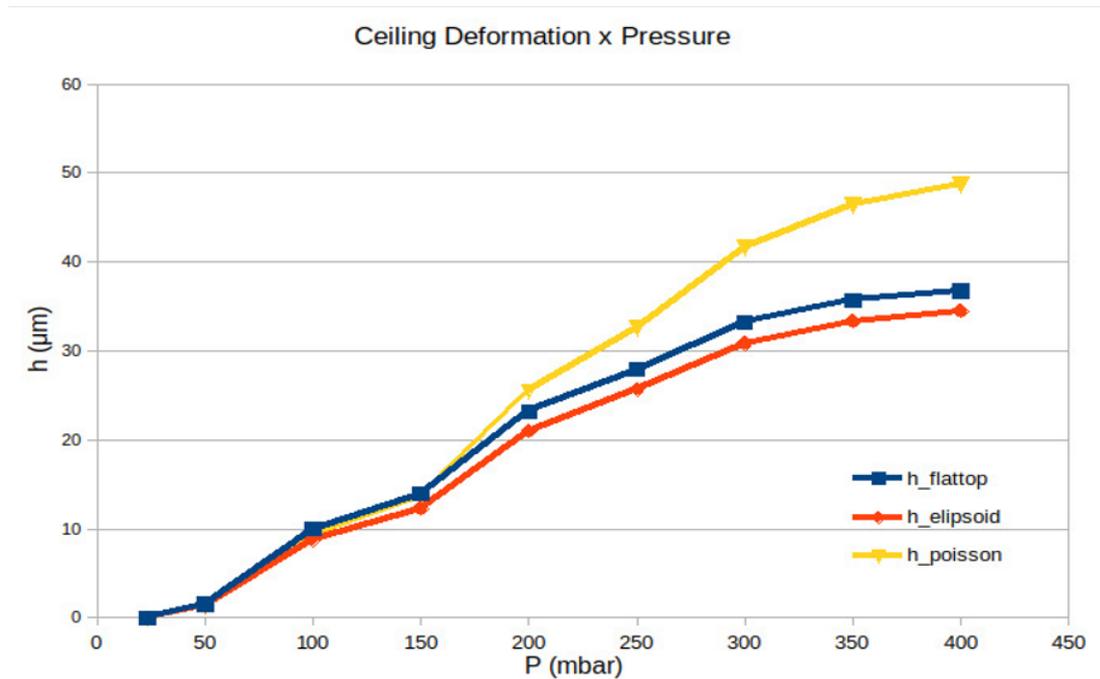


FIGURE 12 – Déformation de la paroi en fonction de la pression pour l’huile

5.3 Comparaison avec d’autres matériaux : hydrogel

Le second matériau est l’hydrogel. Pour ce matériau, les résultats sont très différents. Nous constatons qu’aux petites déformations, seuls les modèles de Poisson et ellipsoidal concordent tandis que le modèle à bords aplatis accuse une différence de plus de $10\mu m$ ce qui représente un écart supérieur à 10% au regard de la hauteur de la paroi de $100\mu m$. Le modèle de Poisson n’étant pas valable aux grandes déformations, nous pouvons penser que la déformation réelle de la paroi pour un sphéroïde serait proche du modèle ellipsoidal.

Ainsi ce second matériau fournit des résultats surprenant et c’est bien normal. En réalité l’hydrogel se comporterait comme une éponge et n’obéirait pas à l’hypothèse de conservation du volume. Les modèles que nous avons proposés ne s’appliqueraient donc pas à ce matériau.

Concernant la divergence observée pour le modèle à bords aplatis, très éloigné des deux autres modèles pour l’hydrogel, une autre explication existe. Nous avons considéré que la géométrie était celle d’une sphère aplatis, mais il peut aussi s’agir d’un ellipsoïde aplati. ceci a également été développé dans l’étude de Lina et al [6]. Un profil ellipsoïdal ajoute un degré de liberté supplémentaire au système (puisque des ellipses infinies formeraient le même cercle vu de dessus) qui ne peut pas être mesuré dans notre cas car une vue latérale de la déformation serait nécessaire.

Ainsi, cette expérience ne semble pas pouvoir confirmer la robustesse de nos modèles. En réalité, c'est tout l'inverse. Cette expérience nous conduit à penser que la déformation réelle du matériau serait un modèle intermédiaire général entre l'ellipsoïde et le sphéroïde aux bords aplatis et que ceux-ci ne seraient que les cas extrêmes de ce modèle général. Ce modèle général serait une amélioration du modèle à bords aplatis. La différence serait de considérer un profil latéral à bords latéraux ellipsoïdaux et non pas sphériques comme c'est le cas pour le modèle à bords aplatis. Un degré de liberté serait donc ajouté et il s'agirait du rayon de contact avec le mur. Ainsi en utilisant un tel modèle général que l'on appellerait "modèle à bords aplatis et profil ellipsoïdal", on observerait au mieux la déformation réelle. Nous nous attendons à ce que la courbe se trouve entre les courbes du modèle ellipsoïdal et du modèle à bords aplatis Figure 13.

Autrement dit, cette expérience renforce nos résultats obtenus sur le sphéroïde : pour le sphéroïde, les courbes du modèle ellipsoïdal et du modèle à bords aplatis sont très proches car la dispersion autour du modèle général serait très faible.

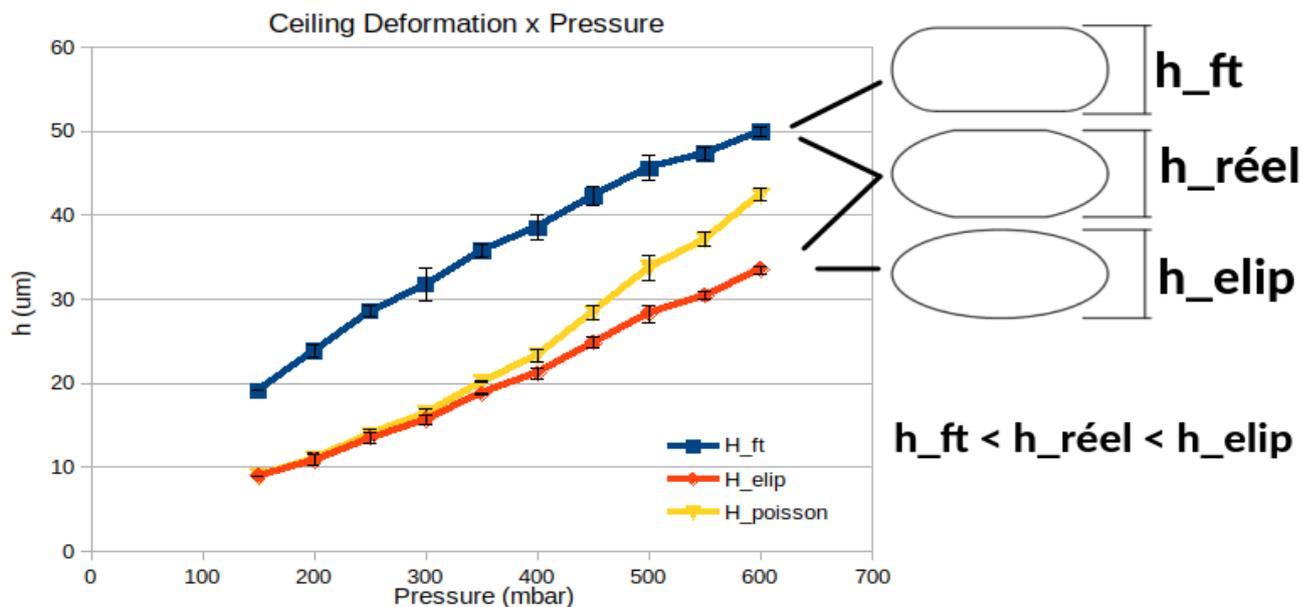


FIGURE 13 – Déformation de la paroi en fonction de la pression pour l'hydrogel

Pour conclure sur ces deux expériences supplémentaires, elles mettent en évidence deux points importants à souligner : le sphéroïde obéit bien à l'hypothèse de conservation du volume et sa déformation réelle est proche des deux modèles ellipsoïdal et à bords aplatis.

5.4 Comparaison avec la modélisation numérique du laboratoire

Nous pouvons comparer nos modèles et résultats à ceux obtenus par simulation aux éléments finis de l'Institut Pasteur. La Figure 14 compare les résultats simulés (en jaune) aux courbes pour le sphéroïde précédemment présentés en Figure 11.

Nous constatons que les résultats simulés et nos résultats sont très proches. Il s'agit de réponses linéaires et les coefficients directeur des droites sont identiques. L'écart maximal est de $10 \mu m$ entre la simulation et le modèle ellipsoïdal. La simulation et nos résultats nous permettent d'estimer la déformation réelle avec précision ce qui vient de nouveau renforcer les modèles que nous avons proposés.

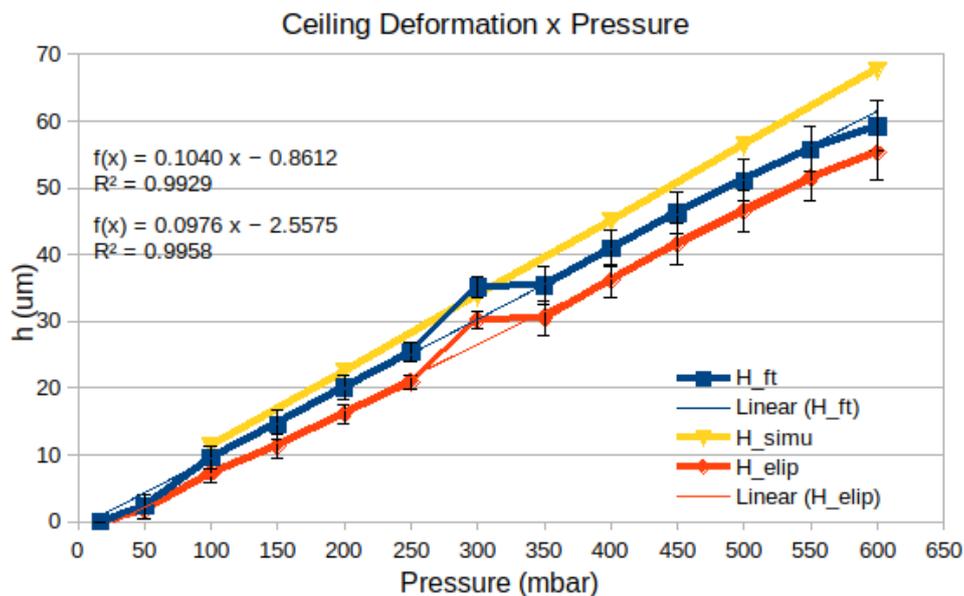


FIGURE 14 – Comparaison entre les résultats expérimentaux et les résultats simulés par éléments finis

6 Conclusion

Pour conclure nous avons pu établir la caractérisation de l'appareil microfluidique développé par l'Institut Pasteur et établir que la déformation de la paroi de l'appareil répond linéairement à la pression négative imposée.

Concernant la démarche de ce projet, nous avons combiné études expérimentales et études théoriques pour obtenir nos résultats. Les trois modèles géométriques concernant la forme du sphéroïde se sont révélés pertinents pour conduire cette étude. Il est intéressant de retenir qu'un modèle encore plus évolué pourrait être mis en place et généraliser les deux modèles ellipsoïdal et à bords aplatis qui se sont toutefois révélés très efficaces.

Nous tenons à remercier Shreyansh Jain pour l'encadrement de qualité qu'il a su nous offrir et son enthousiasme concernant la mécano-biologie.

Références

- [1] Tijore, A. et al. “Mechanical Stretch Kills Transformed Cancer Cells” *bioRxiv* (2018) doi :10.1101/491746.
- [2] Berrueta, L. et al. “Stretching Reduces Tumor Growth in a Mouse Breast Cancer Model” *Scientific Reports* (2018), 8.
- [3] RA. Foty ; CM. Pflöger ; G. Forgacs ; MS. Steinberg. “Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior” *Development* Vol. 122 (1996) p. 1611-1620.
- [4] G. Forgacs et al. “Viscoelastic properties of living embryonic tissues : a quantitative study” *Biophysical journal* Vol. 74 (1998) p. 2227-2234.
- [5] Du, V. ; Luciani, N. ; Richard, S. ; Mary, G. ; Gay, C. ; Mazuel, F. ; Reffay, M. ; Menasche, P. ; Agbulut, O. ; Wilhelm, C. “A 3D magnetic tissue stretcher for remote mechanical control of embryonic stem cell differentiation” *Nature Communications* (2017) 8, 400.
- [6] Yu-Li Lina, Da-Ming Wanga, Wei-Ming Lua, Yu-Shen Linb, Kuo-Lun Tungb, “Compression and deformation of soft spherical particles”, *Chemical Engineering Science* 63 (2008) 195–203