



HAL
open science

Problèmes inverses en biomécanique : De la caractérisation des propriétés élastiques de cellules adhérentes à la quantification des déformations locales de cellules contractiles et de tissus.

Alain Caril Kamgoue Tchouassi

► **To cite this version:**

Alain Caril Kamgoue Tchouassi. Problèmes inverses en biomécanique : De la caractérisation des propriétés élastiques de cellules adhérentes à la quantification des déformations locales de cellules contractiles et de tissus.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00372508

HAL Id: tel-00372508

<https://theses.hal.science/tel-00372508>

Submitted on 1 Apr 2009

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

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



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER (GRENOBLE I)
ÉCOLE DOCTORALE INGENIERIE POUR LA SANTE, LA COGNITION ET
L'ENVIRONNEMENT.

N° d'enregistrement :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier**

Discipline : Modèles Méthodes et Algorithmes en Biologie Santé et
Environnement

Présentée et soutenue publiquement le 23 janvier 2009

Alain Caril KAMGOUE TCHOUASSI

**Problèmes inverses en biomécanique : de la caractérisation des
propriétés élastiques de cellules adhérentes à l'élaboration d'un
outil de mesure des déformations locales au sein des cellules
contractiles et de tissus.**

Devant le jury composé de :

Pr. Pierre BACONNIER	Examineur
Pr. Christian ODDOU	Examineur
Dr. Patrick CLARYSSE	Rapporteur
Dr. Sylvie WENDLING-MANSUY	Rapporteur
M. Jacques DESOBRY	Invité
Dr. Philippe TRACQUI	Directeur de thèse
Pr. Jacques OHAYON	Directeur de thèse

Laboratoire **TIMC-IMAG**, UMR CNRS 5525
Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité-
Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble

REMERCIEMENTS

Au jour du bonheur, sois heureux, et au jour du malheur, réfléchis: Dieu a fait l'un comme l'autre, afin que l'homme ne découvre en rien ce qui sera après lui.

(l'Ecclésiaste)

Longtemps je définirai ce travail de thèse comme la preuve de l'Amour des personnes qui m'ont entouré durant cette aventure. Toute ma gratitude à :

La **FONDATION D'ENTREPRISE BANQUE POPULAIRE** par Mme GROS et M. DESOBRY qui m'ont fait confiance, soutenu et conseillé durant trois ans en finançant mes travaux de doctorat. Au nom de toutes les personnes handicapées que vous accompagnez, grand merci et longue vie à la fondation.

Messieurs Jacques Ohayon et Philippe Tracqui pour ces quatre années pendant lesquelles ils ont essayé de faire de moi un chercheur. Merci pour leur patience.

Monsieur Pierre Baconnier qui a accepté de faire partir de mon jury de thèse. Une joie particulière, car, alors étudiant en licence mathématiques, il m'avait reçu pour me parler des applications des mathématiques en biologie et en médecine.

Monsieur Christian ODDOU qui a accepté de faire partir de mon jury de thèse. Les chaleureux encouragements lors du Congrès Français de Mécanique furent un punch dans ma carrière.

Mme Sylvie WENDLING-MANSUY pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. C'est un honneur, car ses travaux en mécanique cellulaire ont été une source d'inspiration.

M. Patrick CLARYSSE pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. C'est un honneur car ses travaux en suivi du mouvement ont été une source d'inspiration.

Mes collègues et amis d'équipe DYNACELL, Simon LEFLOC'H, Angélique STEPHANOU, Tzvetelina TZVETKOVA-CHEVOLLEAU, Nicolas MESNIER, Thomas BOUDOU, Julie HERNANDEZ, Mohamed TRIFFA, Olivier COLLIN, Patrick NAMY, Ghislaine MESKAOUI et Hasna FATEHI. Je n'oublie pas les benjamins Marga et Céline. Merci à tous d'avoir su m'intégrer à vos cotés. D'avoir été là aux moments de doutes. Et surtout, cette belle ambiance.

Mes collègues et amis de l'EPHE, Xavier RONOT, Bastien TOUQUET, Bastien GERBI, Arnaud LAMARCA, et tous les autres, pour ces beaux moments partagés

A Angélique Brouta « ange gardienne », merci d'avoir tenu quatre années, merci surtout d'avoir été là.

A tous les membres du laboratoire TIMC, pour leur gentillesse, ce fut quatre belles années avec vous. Un merci particulier à la direction du TIMC et celle de l'EDISCE.

Les lignes précédentes représentent la partie visible de cette aventure de doctorat. Je tiens à adresser mes remerciements à une autre partie (invisible).

Aux personnels hospitaliers de : l'hôpital général de Douala, l'hôpital laquintinie de Douala, le centre national de réhabilitation des handicapés du Cameroun, l'hôpital Raymond Poincaré de Garches et le Centre médico-universitaire Daniel Douady. Merci pour le souffle de vie que vous avez successivement insufflé en moi.

A ceux qui ont pris avec brio la suite : le Service d'Accueil des Handicapés de Grenoble Université, le foyer pour étudiants handicapés (foyer Prélude), le service infirmier SSIAD. Recevez toute ma gratitude.

Que dire de vous ? Vous, ami(e)s d'enfance, de jeux, de galère. Vous qui avez toujours été là pour simplement me dire un « courage ». Merci beaucoup.

Que les anges se lèvent pour cet hommage. Voilà des femmes sensationnelles qui m'ont adopté. Je résumerai leur devise à « tout faire pour que je sois bien ». Merci à vos familles d'avoir accepté ce sacrifice. Françoise, Nagette, Martine, Geneviève, France, Isabelle, Nadia, Agnès. Je n'oublie pas Emmanuel, Lionel, Didier, Eddy et bien d'autres. Cette thèse vous l'avez écrite avec moi. Merci surtout pour la patience.

Au ministère de l'enseignement supérieur du Cameroun pour la confiance. Toute ma reconnaissance et mon amour à M. Jean Marie ATANGANA MEBARA, Mme ENO, M. Mme LINJOUOM et leurs équipes. Vous avez cru quand je ne croyais plus. Que le Seigneur vous bénisse.

Enfin, ceux à qui je dois tout. Des gènes à la culture. Ma famille, mon « far ». Je ne trouverai pas de mots pour vous témoigner mon amour, ma fierté. Je reprendrai cette autre parole de l'Ecclésiaste que vous m'avez souvent répétée « *Mon fils, sois sage, et réjouis mon coeur, Et je pourrai répondre à celui qui m'outrage* ».

Quand j'étais encore jeune, avant de vagabonder, j'ai cherché la sagesse ouvertement dans ma prière. Devant le Temple, j'ai prié à son sujet et jusqu'au bout je la rechercherai. En sa fleur, comme la grappe qui mûrit, elle a été la joie de mon cœur. Mon pied a marché dans le droit chemin, depuis ma jeunesse, j'ai suivi sa trace. Pour peu que j'aie incliné l'oreille, je l'ai reçue et j'ai trouvé pour moi une abondante instruction. C'est grâce à elle que j'ai progressé; à qui me donne la sagesse, je donnerai la gloire, car j'ai résolu de la mettre en pratique, j'ai été zélé pour le bien et jamais ne le regretterai. Mon âme a lutté vaillamment avec elle et dans la pratique de la Loi j'ai été minutieux. J'ai étendu les mains vers le

ciel et déploré mes manquements à son égard. J'ai dirigé mon âme vers elle et dans la pureté je l'ai trouvée. Avec elle j'ai reçu l'intelligence dès le commencement; c'est pourquoi jamais je ne connaîtrai l'abandon. Mes entrailles se sont émues à sa recherche; aussi ai-je fait une bonne acquisition. Le Seigneur m'a donné la langue pour ma récompense et avec elle je veux le glorifier. Venez à moi, gens sans instruction, installez-vous à mon école. Pourquoi plus longtemps en rester dépourvus, tandis que vos âmes sont ardemment assoiffées? J'ouvre la bouche et je proclame: faites-en pour vous l'acquisition sans argent, soumettez votre nuque à son joug et que votre âme reçoive l'instruction!

C'est tout près qu'on la peut trouver. Voyez de vos yeux combien peu j'ai peiné avant de trouver un profond repos. Participez à l'instruction au prix de beaucoup d'argent, aussi bien, grâce à elle vous acquerrez beaucoup d'or. Que votre âme se réjouisse dans la miséricorde du Seigneur et n'ayez pas honte de le louer. Accomplissez votre œuvre avant le temps fixé et il vous donnera votre récompense en son temps.

L'ECCLÉSIASTIQUE 51, 13-30

TABLE DES MATIERES

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GENERALE

I.1. La cellule : une entité physique à l'architecture complexe.	2
I.2. Micromanipulations cellulaires et problèmes inverses associés.	5
I.2.1 Cadre général des problèmes inverses	6
I.2.1.a <i>Historique</i>	6
I.2.1.b : <i>Problèmes directes et problèmes inverses</i>	7
I.3. Micromanipulations et réponses cellulaires passives.	8
I.3.1 Cellule adhérente sollicitée par microscopie à force atomique	8
I.3.2. Cellule aspirée par micropipette	10
I.3.3 Cellule adhérente sollicitée par Magnétocytométrie par rotation (MTC)	11
I.3.4. Cellule étirée/comprimée par microplaques	12
I.3.5. Réponse cellulaire à une indentation par aiguille	14
I.3.6. Cellule adhérente placée dans une chambre à flux.	15
I.4. Micromanipulations et échantillons biologiques « actifs ».	16
I.4.1 Suivi de Particules.	16
I.4.2 Utilisation de substrats en relief déformables	17
I.5. Objectifs de nos travaux de recherche	18
I.5.1 Modèles numériques pour la caractérisation des propriétés élastiques de cellules adhérentes passives	19
I.5.2 Modèles numériques pour la quantification des déformations locales de cellules et tissus contractiles	21
I.6. Plan de la thèse	22

DEUXIEME CHAPITRE : CARACTERISATION GLOBALE

Résumé du chapitre II	24
II.1 Introduction	25
II.2 Le Principe des pinces optiques.	26
II.3 Contexte de l'étude	28
II.3.1. Techniques de micromanipulation optiques et magnétiques.	28
II.3.1.1. Pinces magnétiques	28
II.3.1.2 Pinces optiques et pinces opto-magnétiques	29
II. 3.1 3. Etirement par pinces optiques (optical stretcher)	29
II.3.2 Bille noyée dans un milieu élastique infini: module apparent	30
II.4 Modèle géométrique bille/cellule de type I	35
II.4.1 Analyse par éléments finis de la réponse cellulaire	35
II.4.1.1 Géométrie Cellule/bille	35
II.4.1.2 Propriétés des matériaux cellules et bille	36
II.4.1.3 Conditions aux limites	37
II.4.2 Influence des paramètres géométriques sur la réponse cellulaire	37
II.4.2.1 Influence de l'épaisseur de la cellule sur la distribution des déformations intracellulaires.	38
II.4.2.2 Influence de l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule sur la distribution des déformations intracellulaires.	39

II.4.2.3	Expressions des fonctions de correction non linéaires $\alpha(\xi, \gamma)$ et $\beta(\xi, \gamma)$	40
II.4.2.4	Géométries bille/cellule nécessitant une correction de la mesure rigidité apparente	45
II.5	Modèle géométrique bille/cellule de type II	45
II.5.1	Analyse éléments finis	46
II.5.1.1	Géométrie cellule/bille	46
II.5.1.2	Propriétés des matériaux cellule bille	48
II.5.1.3	Conditions aux limites du problème	48
II.5.2	Fonctions de correction et dépendances	48
II.5.2.2	Influence de la hauteur sous bille ($\xi=hu/2R$) sur la distribution des déformations intracellulaires.	49
II.5.2.3	Influence de l'angle d'imprégnation γ sur la distribution des déformations intracellulaires	50
II.5.2.4	Influence du rayon cellulaire ($\chi=R_{cell}/2R$) sur la distribution des déformations intracellulaires	52
II.5.2.5	Expression des fonctions de correction $\alpha(\gamma, \xi, \chi)$ et $\beta(\gamma, \xi, \chi)$	53
II.5.2.6	Application	56
II.6	Comparaison avec les résultats précédents.	58
II.7	DISCUSSION et CONCLUSIONS	61

TROISIEME CHAPITRE : CINEMATIQUE LOCALE 63

Résumé	64
III.1 INTRODUCTION	65
III.2 Estimation du mouvement : les fondements.	65
III.2.1. Mouvement réel, mouvement apparent et mouvement estimé	65
III.2.2. Appariement de primitives	66
III.2.3 Méthodes différentielles	67
III.2.4. Estimation du mouvement par corrélation d'images	68
III.3 La corrélation d'images : les principes.	70
III.3.1 Approximation de la transformation locale	70
III.3.2. Coefficients de corrélation	72
III.3.3. Techniques d'estimation de la transformation locale	74
III.4. Méthode développée	75
III.4.2. Optimisation de la couverture ou Zone d'Intérêt (ZI).	77
III.4.3. Détermination des champs de déplacements et de déformations.	77
III.5. Résultats et validations sur cas théoriques simulés	80
III.5.1. Expérience de traction	80
III.5.2. Expérience de cisaillement	85
III.5.3. Expérience de compression uni-axiale	89
III.5.4. Expérience d'inclusion	93
III.6. Conclusion	96

QUATRIEME CHAPITRE : CORRELATION D'IMAGES SUR CARDIOMYOCYTE

Résumé	99
IV.1 Introduction	100
IV.2 Dynamique du calcium	101
IV.3. Analyse de la contractilité du cardiomyocyte par corrélation d'images	103
IV.3.1. Culture des cardiomyocytes	103
IV.3.2. Acquisition vidéo-microscopique	103
IV.3.3. RESULTATS DE L'ANALYSE PAR CORRELATION D'IMAGES	104
IV.3.3.1. Quantification et évaluation du champ des déplacements.	104
IV.3.3.2. Quantification du raccourcissement du cardiomyocyte adulte isolé.	107
IV.3.3.3. Caractérisation des profils de contraction	109
IV.4. Mise en évidence et analyse des déformations résiduelles.	114
IV.5. Problème inverse : caractérisation de la dynamique calcique contrôlant les contractions cellulaires	115
IV.6. Analyse par corrélation d'images des déformations d'un cardiomyocyte néonatal.	121
IV.6.1. Culture des cardiomyocytes néo-nataux	121
IV.6.2. Caractérisation des profils de contraction.	122
IV.7. Conclusions	124
PERSPECTIVES	126
BIBLIOGRAPHIE	130
PUBLICATIONS	146

PREMIER CHAPITRE

INTRODUCTION GENERALE

I.1. La cellule : une entité physique à l'architecture complexe.

Le début du XVIIe siècle marque les débuts du rationalisme, et l'étude du vivant connaît des avancées fulgurantes. Dans son ouvrage intitulé « Micrographia », Robert Hooke (1635-1703) nomme « cellule » des cavités délimitées par des parois qu'il observe dans du liège avec un microscope rudimentaire. C'est avec l'avènement du premier microscope qu'Antoine van Leuwenhoek (1632-1723) confirme l'intuition qu'Aristote avait eu dès l'Antiquité : « les animaux et les plantes, si complexes soient-ils, sont formés de peu d'éléments qui se répètent ». Cette découverte va être un bouleversement pour les sciences du vivant. La véritable théorie cellulaire verra le jour en 1839. Schleiden et Schwann établissent que tous les organismes sont formés de cellules, qu'ils soient simples comme les bactéries ou complexes comme les plantes et les animaux supérieurs. Certains organismes sont formés d'une unique cellule autonome, les organismes unicellulaires. D'autres sont formés de plusieurs cellules différenciées tant au niveau des formes que des fonctions, les organismes pluricellulaires.

Pour parvenir au développement efficace de l'entité dont-il dépend, la cellule doit interagir mécaniquement avec son environnement. On sait aujourd'hui que c'est grâce à un réseau dense et dynamique de polymères protéiques présents dans la totalité du cytoplasme que toute cette activité est possible. Ce réseau dense porte le nom de cytosquelette [YATES2005, YAN2008]. En continuité avec l'architecture du noyau (nucléosquelette) de la cellule eucaryote, il interagit avec quasiment tous les organelles [LEADSHAM2008, BOLDOGH2006].

Le cytosquelette est composé de trois types de réseaux protéiques formant le cytosquelette (Fig.1.1.), les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

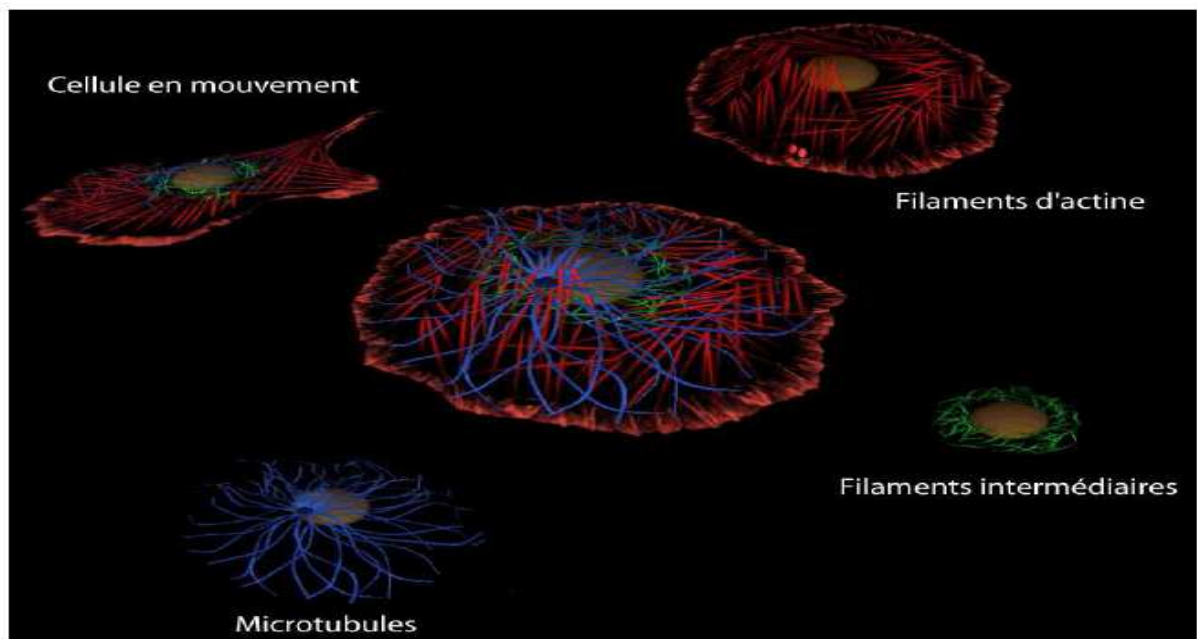


Figure 1.1 : *Positionnement des trois réseaux formant le cytosquelette dans la cellule eucaryote. Les filaments d'actine sont indiqués en rouge, les microtubules en bleu et les filaments intermédiaires en vert*

Les fonctions du cytosquelette sont nombreuses et leurs implications sont majeures pour la vie de la cellule. En effet, il représente comme son nom l'indique, l'échafaudage (squelette) qui définit largement la morphologie et la dynamique cellulaire. Il joue un rôle prépondérant dans la division et la différenciation cellulaire puisque les microtubules constituent le faisceau mitotique responsable de la ségrégation des chromosomes, tandis que les microfilaments d'actine génèrent l'anneau contractile responsable de la cytokinèse [WOLLMAN2008, SCHOLEY2003]. Il joue également un rôle majeur dans la motilité cellulaire avec la création de protrusions cellulaires comme le flagelle (microtubule) et les lamellipodes (actine) [LAI2008, SMALL2002]. Enfin, il est également impliqué dans la méiose, la communication des cellules, la régulation de la transcription et le transport intracellulaire de différents constituants, autant de grandes fonctions cellulaires qui font du cytosquelette un élément clé dans l'étude de la dynamique cellulaire [HOWARD2003, AKHMANOVA2008]. De plus, le cytosquelette est souvent altéré dans différentes pathologies [JANMEY1995, SEKINO2007]. Il constitue donc une cible potentielle pour l'établissement de nouveaux traitements thérapeutiques [GIGANTI2003, HIRAKAWA2007].

Chaque constituant du cytosquelette peut être caractérisée isolément (fig.1.1). Les microfilaments d'actine sont des polymères protéiques hautement dynamique formés de monomères d'actine. D'un diamètre compris entre 3 et 7 nm, ces filaments fournissent à la cellule une rigidité structurale et une tension interne. Son module d'Young est estimé à 1kPa [KOJIMA1994]. Les microtubules, structures également fortement dynamiques, sont quant à eux constitués de 13 protofilaments et peuvent avoir une longueur de 5 à 50 μm pour un diamètre de 15 à 25 nm et un module d'Young de 1.2 GPa. A la différence des microfilaments et des microtubules, les filaments intermédiaires sont composés de protéines différentes en fonction du type cellulaire. Ils ont longtemps été perçus comme les composants du réseau statique nécessaire pour résister aux contraintes mécaniques extracellulaires [COULOMBE2000]. Bien que ces fonctions soient bien réelles, tout porte à croire que les filaments intermédiaires sont également capables d'une certaine dynamique [HELFAND2004]. Par exemple, la vimentine, constituant des filaments intermédiaires dans les fibroblastes, est constamment désassemblée et reassemblée [GOLDMAN1999]. De plus, à travers leurs interactions avec les autres réseaux du cytosquelette, les filaments intermédiaires sont impliqués dans des fonctions cellulaires communes.

Les filaments intermédiaires ne possèdent pas de centres organisateurs connus. Ils sont cependant localisés autour du noyau de la cellule eucaryote et, en fonction du type cellulaire, en lien étroit avec les jonctions cellulaires comme les desmosomes. Ils contribuent au maintien de la structure de la cellule [GOLDMAN1996 ; ESUE2006].

Les premiers modèles proposés pour analyser la réponse de la cellule à des contraintes externes furent des modèles dits microstructuraux plus précisément les modèles de câbles prétendus ou « prestressed cable ». La réponse mécanique dans ces modèles est déterminée à partir de la tension initiale des filaments d'actine. Les filaments d'actines sont modélisés par des câbles prétendus. Des éléments micro structuraux plus rigides comme les microtubules, ainsi que le noyau permettent d'équilibrer la tension des câbles [STAMENOVIC1999 ; WENDLING2002 ; CANADAS2003].

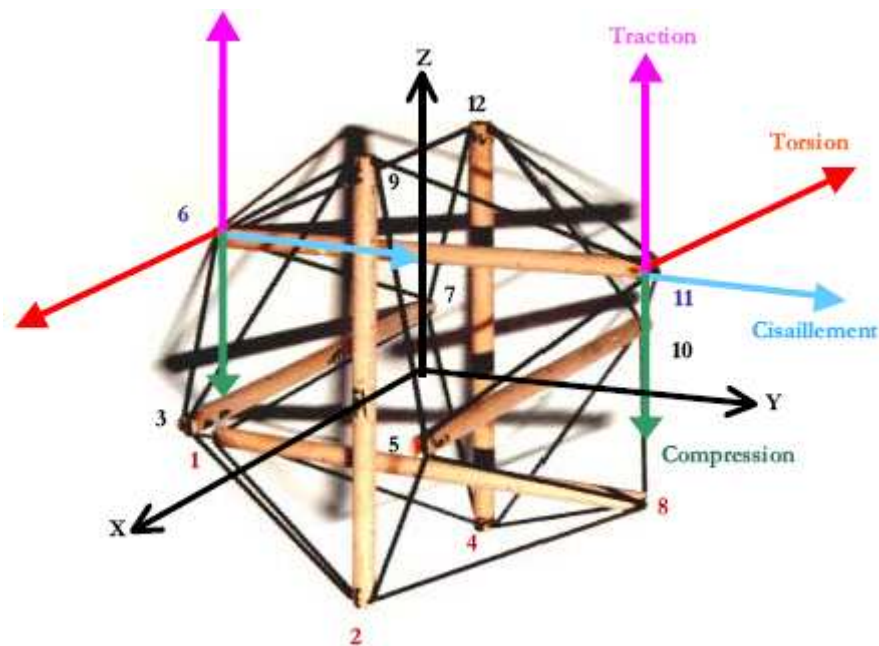


Figure.1.2 : Structure de tensegrité composé de 6 barres (couleur marron) et de 24 câbles (en noir). Les nœuds indiqués en bordeaux (#1, #2, #4 et #8) sont fixés dans l'espace défini par la base orthonormée directe $\{X,Y,Z\}$ et les nœuds marqués en indigo (#6 et #11) sont soumis à des efforts de traction, compression, cisaillement et torsion [extrait de la thèse de P. Cañadas].

I.2. Micromanipulations cellulaires et problèmes inverses associés.

Si le XXI^{ème} siècle reste dans l'histoire comme le temps de la conquête de l'infiniment grand, avec le développement de techniques d'ingénierie qui permettront à l'homme de mettre le pied sur la lune, il est aussi celui d'une autre conquête, celle de l'infiniment petit. En effet, les scientifiques ont développé des techniques d'ingénierie de plus en plus sophistiquées leur permettant d'appréhender la cellule dans toute sa complexité. Nous nous intéressons plus spécifiquement dans le cadre de cette thèse aux techniques dites de micromanipulation, qui ont permis des avancées significatives dans notre compréhension des propriétés mécaniques de la cellule (Fig.1.3).

Schématiquement, un ensemble de méthodes (noté « e » sur la Fig.1.3) différentes sera utilisé pour stimuler mécaniquement la cellule (notée « M » sur la Fig.1.3), induisant des réponses cellulaires multiformes et spécifiques (notée « s » sur la Fig.1.3). Il existe une variété de mécanismes à l'intérieur de la cellule assurant la transduction de ces stimuli extracellulaires en une réponse observable. En particulier, il est important d'examiner comment des forces externes sont transmises à l'intérieur de l'ensemble de la cellule, ainsi que de quantifier l'ampleur et la répartition intracellulaires des contraintes et déformations

induites par ces différentes méthodes de stimulation. Sur un plan formel, cette problématique s'inscrit dans le cadre général de la résolution de problèmes inverses.

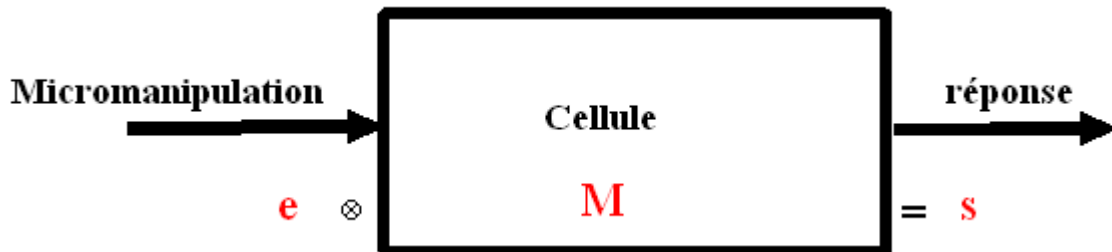


Figure 1.3 : Synopsis du problème inverse lié à une expérience de micromanipulation : par le biais d'une technique de micromanipulation, un signal e est envoyé à la cellule. On mesure le signal s après transduction du signal e . Le but du problème inverse est de déterminer e connaissant M , ou de déterminer les paramètres du modèle M qui permet la transduction du message e en s .

I.2.1 Cadre général des problèmes inverses

I.2.1.a Historique

Commençons par un peu d'histoire. Le mathématicien Français Hadamard fut le premier à introduire la notion de « problème bien-posé » pour définir certains problèmes mathématiques. Notons cependant que, certaines écoles de mathématiques, l'école française avec Cauchy, Darboux et Goursat, l'école russe avec Kowalewsky, l'école suédoise avec Holmgren, avaient déjà pris conscience de ce cadre conceptuel entre 1840 et 1900.

Hadamard définit un problème entrée/sortie « bien-posé » comme, un problème satisfaisant les trois conditions suivantes :

- Il existe une solution globale pour toutes données raisonnablement observables.
- Cette solution est unique.
- La continuité de la solution dépend de la stabilité des données.

A contrario, pour Hadamard, un problème qui n'est pas « bien-posé » est un problème « mal-posé » (« ill-posed »).

Afin d'éclaircir cette notion, Hadamard prend pour exemple le problème de transfert de la chaleur défini dans le cas monodimensionnel par une barre de longueur l refroidie à ses extrémités et initialement soumise à une distribution spatiale de température $u(x)$. L'évolution du profil de température dans la barre est décrite par les équations suivantes :

$$w_t = w_{xx}, \quad 0 < x < 1, \quad t > 0$$

$$w(t, 0) = 0 \quad w(t, 1) = 0 \quad \text{et} \quad w(0, x) = u(x)$$

(P1)

Le problème posé est le suivant : pour un profil initial donné $u(x)$ de température, quelle est la distribution de la température dans la barre au temps $t = 1$? Ce problème est bien posé lorsque $u(x) \in C^0([0, 1])$, $u(x) \in C^1(]0, 1[)$ et $u(0) = u(1) = 0$.

Le problème inverse associé est le suivant : étant donné $w(1, x)$ le profil de température dans la barre à $t = 1$, quelle est la distribution de la température $w(0, x)$ à $t = 0$? Hadamard remarqua que résoudre ce problème reviendrait à violer le second principe de la thermodynamique qui stipule que : une transformation dont le seul résultat est le transfert de la chaleur d'un corps à une température donnée à un autre de température plus élevée est impossible.

I.2.1.b : Problèmes directes et problèmes inverses

Schématiquement, l'étude d'un système physique peut être abordée selon trois étapes génériques [TARANTOLA2005].

Sans restreindre la généralité, considérons un système physique caractérisé par le modèle suivant :

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}}(t) = f(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \boldsymbol{\varphi}, t), & \mathbf{x}(t=0) = \mathbf{x}_0 \\ \mathbf{y}(t) = g(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \boldsymbol{\varphi}, t) \end{cases} \quad (1.1)$$

\mathbf{u} : vecteur d'entrée, $\boldsymbol{\varphi}$: vecteur paramètres du modèle, \mathbf{x} : variable d'état et \mathbf{y} : variables observées.

La solution d'un tel système est donnée par

$$\mathbf{y}(t) = F(\mathbf{x}, \boldsymbol{\varphi}, \mathbf{u}, t) \quad (1.2)$$

Lorsque \mathbf{u} et $\boldsymbol{\varphi}$ sont connus, la détermination de \mathbf{y} est connu sous le nom de *problème direct*.

Les autres situations définissent différentes classes de problèmes inverses caractérisés de la façon suivante :

1. Les entrées/sorties \mathbf{y} et \mathbf{u} sont connues,
la détermination de $\boldsymbol{\varphi}$ correspond à l'*identification paramétrique*.
2. \mathbf{y} et $\boldsymbol{\varphi}$ sont connus,
la détermination de \mathbf{u} correspond au *problème inverse standard*.

Dans la classe des problèmes inverses, on distingue deux types de problèmes inverses ; les problèmes inverses linéaires [SHOU2008 ; HALLEZ2007] et les problèmes inverses non-linéaires [VOIT2004, VILELA2008].

Les techniques de base pour la résolution des problèmes inverses linéaires sont bien connues [DAUBECHIES2008 ; SABATIER2000] même si certaines questions ne sont pas résolues (signification physique des quasi-solutions [KLANN2006]).

Les problèmes inverses non linéaires définissent des problématiques plus complexes qui font toujours l'objet d'actives recherches [SOKHANVAR2008, ZHAO2008].

I.3. Micromanipulations et réponses cellulaires passives.

L'utilisation des techniques de micromanipulation permet, par résolution de problèmes inverses, de type identification paramétrique de mieux caractériser l'objet cellule. La résolution de ce problème inverse nécessite le choix d'un modèle dont les paramètres seront identifiés à partir de l'observation de la réponse cellulaire.

Nous proposons ici un rapide panorama des modèles cellulaires développés pour analyser les réponses passives de cellules sollicitées par les différentes techniques de micromanipulations utilisées classiquement dans ce domaine

1.3.1 Cellule adhérente sollicitée par microscopie à force atomique

Les données issues de la microscopie par force atomique (AFM) sont typiquement des données sur la déformation progressive du levier (cantilever) lors de l'indentation de

la cellule par la pointe AFM. Le modèle cellulaire utilisé dépend de la géométrie de la pointe [HOH1994].

Dans le modèle de Hertz, la cellule adhérente est modélisée comme un milieu élastique semi infini, la pointe est modélisée par une sphère de rayon R . Dans ce cas, le problème d'identification consiste à déterminer le module d'élasticité de la cellule connaissant la force appliquée par la pointe et la profondeur de l'indentation δ . Grâce à la théorie du contact de Hertz [HERTZ1882], on établit une relation entre la force F , le déplacement δ et le module d'Young E de la cellule (Fig.1.4)

$$F = \frac{4}{3} R^{0.5} \delta^{1.5} \frac{E_{cell}}{1-\nu_{cell}^2} \quad (1.3)$$

où ν_{cell} est le coefficient de Poisson de la cellule.

Soulignons que δ , doit être petite devant le rayon R . [MAHAFFY2004; PARK2005]

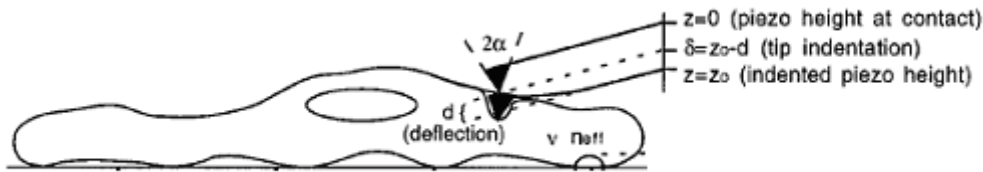


Figure 1.4 : Déplacement d'une pointe d'AFM. la pointe d'angle 2α déforme le milieu élastique en appliquant une force. Figure modifiée issue de MATHUR2000.

Plusieurs autres modèles ont été définis pour des pointes non spécifiques. Par exemple, pour un cône de demi-angle θ , Sneddon et al. proposent le modèle [SNEDDON1965, MATHUR2000]

$$F = \frac{2E_{cell} \tan \theta}{\pi(1-\nu_{cell}^2)} \delta^2 \quad (1.4)$$

Pour une pointe cylindrique de rayon a , Sneddon et al. [SNEDDON1965] proposent la relation

$$F = \frac{2E_{cell}}{(1-\nu_{cell}^2)} a \delta \quad (1.5)$$

Pour une pointe pyramidale de demi-angle θ , Bilodeau et al. [BILODEAU1992, ALCARAZ2003] ont établi la relation

$$F = \frac{0.7453 E_{cell} \tan \theta}{(1 - \nu_{cell}^2)} \delta^2 \quad (1.6)$$

Dans les modèles précédents, la cellule est supposée adhérente sur toute sa surface basale. Tu et coll. ont proposé un modèle prenant en compte la non-adhérence partielle de la cellule [TU1964, MAHAFFY2004]. Dans ce cas, Mahaffy et coll. ont montré l'importance de l'épaisseur de la cellule sous la pointe pour le problème d'identification. Nous verrons que cette propriété a également été mise en évidence dans l'interprétation des expériences de magnétocytométrie [OHAYON2004].

I.3.2. Cellule aspirée par micropipette

Les modèles utilisés pour caractériser l'aspiration des cellules à l'intérieur d'une micropipette dépendent du type de cellule. Les chondrocytes et les cellules endothéliales ont un comportement de type solide, alors que les globules rouges et les neutrophiles ont un comportement de type liquide durant l'aspiration par micropipette.

Pour identifier les paramètres rhéologiques dans le cas solide, les premiers modèles développés considéraient la cellule comme un milieu semi infini [THERET1988, AOKI1997, ALEXOPOULOS2003], en supposant que l'épaisseur et le rayon de la pipette étaient petits par rapport à l'épaisseur de la cellule. L'analyse de ce modèle donne une relation liant la pression appliquée ΔP , la hauteur de cellule aspirée dans la pipette L_p , le module d'Young de la cellule E , le rayon interne R_i de la pipette et une fonction de forme Φ qui dépend principalement de l'épaisseur de la pipette (Fig. 1.5).

$$\Delta P = \frac{2\pi}{3} E \delta \Phi \quad (1.7)$$

Thomas Boudou, dans ses travaux de thèse [BOUDOU2007 ; BOUDOU2006], a mis en évidence et quantifié la non linéarité de la réponse cellulaire, et a proposé la relation suivante pour déterminer le module d'Young E :

$$E = \alpha(\nu, \xi) \frac{3\Delta P}{2\pi\delta} \Phi \left(\frac{R_e - R_i}{R_i} \right). \quad (1.8)$$

Où α est une fonction dépendant du coefficient de poisson ν et de l'épaisseur normalisée de l'échantillon analysé ξ , δ est la hauteur de matière aspirée normalisée (L_p/R).

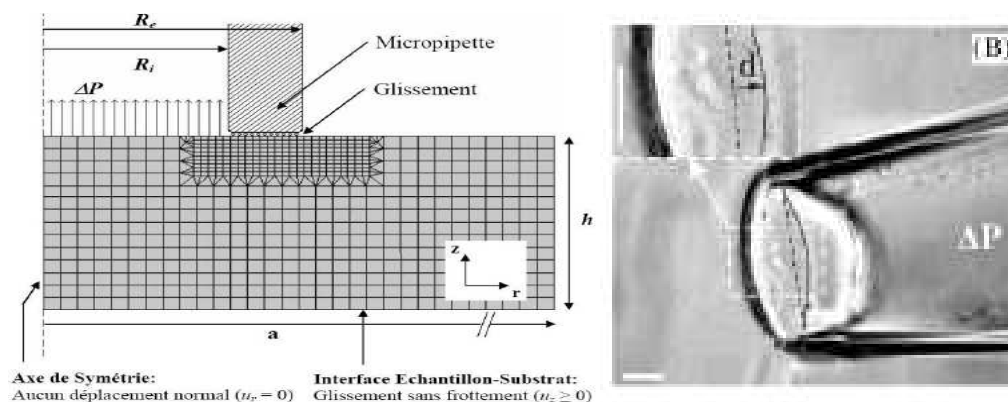


Figure.1.5 : *Modèle aux éléments finis décrivant l’aspiration par micropipette étudié par Thomas Boudou au sein de notre laboratoire TIMC-DynaCell (période 2005-2008). L’aspiration de l’échantillon à travers la pipette est représentée par une pression ΔP appliquée à l’intérieur d’une région circulaire délimitée par le rayon interne R_i de la micropipette ($0 \leq r \leq R_i$) tandis que dans une zone annulaire représentant la paroi de la micropipette ($R_i \leq r \leq R_e$), les déplacements normaux $u_z(r,0)$ sont nuls.*

1.3.3 Cellule adhérente sollicitée par Magnétocytométrie par rotation (MTC)

Introduite en 1993 par l’équipe de Ning Wang [WANG1993 ; MAKSYM2000], la magnétocytométrie par rotation repose sur un principe simple. Une bille magnétisable est fixée par le biais des ligands spécifiques, sur la membrane de cellules adhérentes. Un champ magnétique, permet de solliciter la cellule en appliquant un couple de rotation à ladite bille (Fig. 1.6).

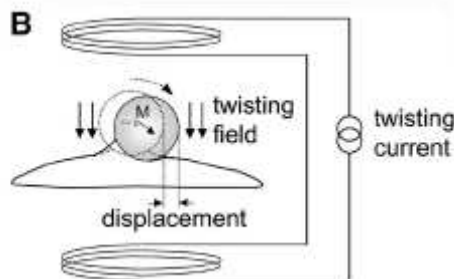


Figure.1.6 : *Schéma descriptif simplifié de l’expérience de magnétocytométrie.*

En régime dynamique, Fabry et coll. [FABRY1999] mettent en évidence une relation non linéaire entre le module d’élasticité apparent et le moment appliqué à la bille.

Mijailovich et al. [MIJAILOVICH2002], en utilisant une modélisation par éléments finis, proposeront une identification du module d'élasticité de la cellule adhérente à partir des relations qui prennent en compte les facteurs géométriques du modèle. Ainsi :

$$\frac{T}{\phi} = \kappa \alpha G^{rot} \quad (1.9)$$

où G^{rot} est le module d'élasticité déduit de la rotation de la bille.

$$\frac{T}{d} = \kappa \frac{\beta}{R} G^{trans} \quad (1.10)$$

où G^{trans} est le module d'élasticité déduit de la translation de la bille.

Dans ces formules, κ représente le facteur de forme (pour une bille sphérique $\kappa=6$), ϕ est l'angle de rotation de la bille, d mesure sa translation, T le couple imposé par le champ magnétique, R le rayon de la bille. α et β sont des paramètres dépendant de l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule, et de l'épaisseur de la cellule.

Pour affiner la résolution de ce problème inverse, Ohayon et Tracqui [OHAYON2005] utiliseront également la méthode aux éléments finis pour caractériser précisément cette non linéarité en proposant des expressions analytiques des fonctions α et β en fonction de l'angle d'imprégnation γ_i de la bille dans la cellule et la hauteur normalisée ξ de la cellule sous la bille.

1.3.4. Cellule étirée/comprimée par microplaques

Cette technique de micromanipulation consiste à fixer une cellule entre deux microplaques de verre. La microplaque supérieure est plus fine et flexible, tandis que la microplaque inférieure est rigide [THOUMINE1997 ;DESPRAT2005] (Fig. 1.7).

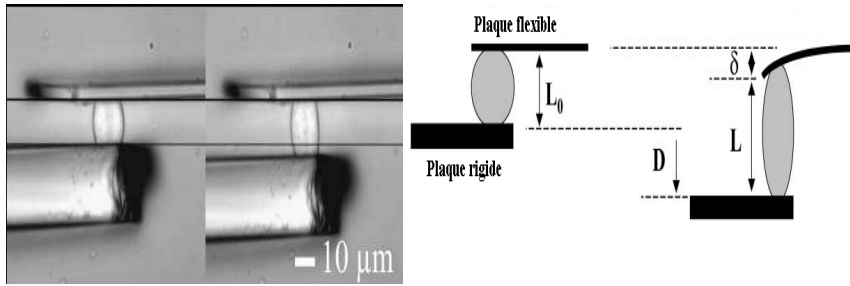


Figure. 1.7: Etirement d'une cellule par des microplaques de verre. La plaque rigide déforme la cellule et la plaque flexible en se déplaçant. Extrait de [DESPRATi2005]

Au cours de l'expérience, la microplaque fine est fixée et sa déflexion δ est mesurée. L'étirement de la cellule est contrôlé par le déplacement de la plaque rigide. La déformation de la cellule est donnée par $\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0}$, où L_0 est la longueur initiale de la cellule, et L la longueur après étirement (Fig.1.7). Sachant que $D + L_0 = L + \delta$, on peut exprimer ce déplacement en fonction des déplacements des deux microplaques

$$\varepsilon = \frac{D - \delta}{L_0}.$$

Connaissant la constante de rigidité k de la plaque flexible, on peut déterminer la force imposée $F = k\delta$. En approximant la zone de contact entre la cellule et les microplaques par un cercle, on peut déterminer les contraintes sur la cellule au niveau des deux plaques :

$$\sigma_{flexible} = \frac{4F}{\pi D_{flexible}^2} \quad \sigma_{rigide} = \frac{4F}{\pi D_{rigide}^2} \quad (1.11)$$

où $D_{flexible}$ est le diamètre de la zone de contact cellule/plaque flexible et D_{rigide} est le diamètre de la zone de contact cellule/plaque rigide.

La contrainte totale est prise comme étant la moyenne des deux contraintes précédentes.

$$\sigma = \frac{1}{2}(\sigma_{flexible} + \sigma_{rigide}) \quad (1.12)$$

On peut en déduire le module d'Young de la cellule par :

$$E_{cell} = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (1.13)$$

En régime dynamique, Desprat et coll. [DESPRAT2005] ont pu mettre en évidence sur des myoblastes des comportements de type loi puissance pour la fonction de fluage et les modules complexes.

1.3.5. Réponse cellulaire à une indentation par aiguille

Le principe de cette expérience consiste à monter une aiguille de verre verticale avec une extrémité d'environ 2µm de diamètre sur un fil d'acier horizontal d'environ 3cm de longueur et fixé à un moteur [PETERSEN1982] (fig. 1.8).

Quand une tension variable est appliquée au moteur, le fil subit un déplacement vertical correspondant. Les signaux de sortie des deux sondes sont identiques quand l'extrémité de l'aiguille n'est pas en contact avec la surface de la cellule. Quand il y a contact, la force exercée sur l'aiguille par la surface de la cellule réduit son déplacement et plie le fil légèrement. La constante de raideur du fil d'acier k peut être déterminée. Ainsi, il est alors possible de calculer la force résistive F , et la différence de déplacement, X , entre le bout de l'aiguille et le moteur. La force résistive est donnée par

$$F = kX \quad (1.14)$$

La cellule est modélisée comme une couche élastique d'épaisseur h adhérant sur un demi-espace rigide. La couche est déformée par un corps solide rigide plat-fini axisymétrique de rayon a , comme indiqué précédemment. La relation entre la force appliquée F et la profondeur de l'indentation u est donnée par [PETERSEN1982] :

$$F = \frac{2E_{cell}au}{(1-\nu^2)} \quad (1.15)$$

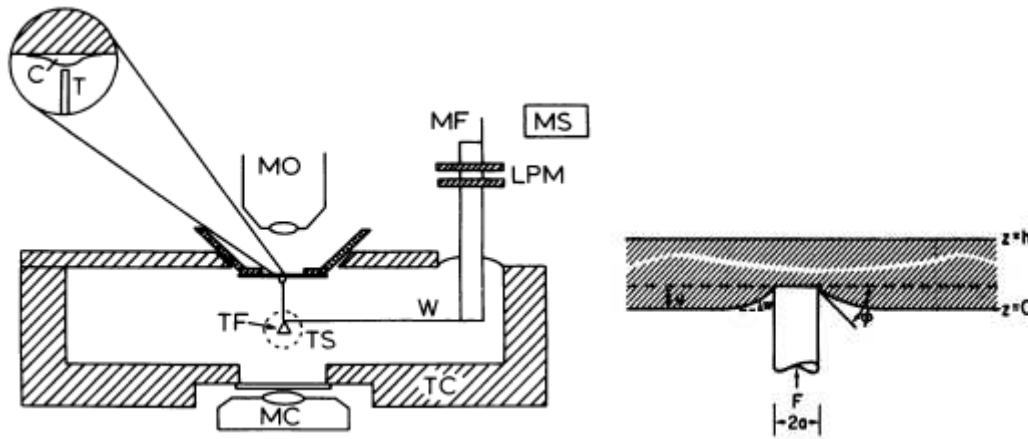


Figure. 1.8: Dispositif d'indentation : Le fil d'acier T est monté sur un moteur piézoélectrique linéaire (LPM). Les sondes optiques (MS et TS) surveillent les positions verticales du moteur (MF) et de l'extrémité de l'aiguille de verre (TF).

Certains auteurs [GLADWELL1980 ; JOHNSON1985] ont montré que l'épaisseur de la couche h affectait le module d'Young ainsi déterminé. Pour résoudre ce problème, ils ont introduit une fonction de correction $\alpha(a, h)$ selon la relation suivante :

$$F = \frac{2\alpha(a, h)E_{cell}\alpha u}{(1-\nu^2)} \quad (1.16)$$

avec

$$\alpha(a, h) = 1 + 1.12696 \frac{a}{h} + 1.27003 \left(\frac{a}{h}\right)^2 + 1.18369 \left(\frac{a}{h}\right)^3 + 1.05496 \left(\frac{a}{h}\right)^4 + o\left(\left(\frac{a}{h}\right)^5\right) \quad (1.17)$$

1.3.6. Cellule adhérente placée dans une chambre à flux.

Ce système de mesure utilise la force hydrodynamique de cisaillement produite dans une chambre de mesure de dimensions parfaitement connues où s'écoule un flux laminaire. Les propriétés élastiques et viscoélastiques des échantillons testés sont obtenues à partir de la connaissance de ce flux et des déformations mesurées. Cette technique fût employée afin de mesurer les propriétés viscoélastiques de polymères [HAN2006, SITTIKIYOTHIN2004], de biofilms [RUPP2005] ou encore pour étudier la réponse de

cellules soumises à des contraintes de cisaillement générées par le flux [CHOTARD-GHODSNIA2007, WANG2007, ZHANG2007].

I.4. Micromanipulations et échantillons biologiques « actifs ».

Les micromanipulations présentées précédemment visent à caractériser le comportement passif de la cellule ou du tissu. Or dans de nombreuses situations, ces objets biologiques ont un comportement actif de contractilité. C'est le cas notamment de la cellule musculaire cardiaque, où des processus biochimiques déclenchent des contractions spontanées de cette dernière [HUANG2008, PUSTOC'H2005]. La cellule étant le siège des processus aussi variés que complexes à l'échelle moléculaire, différentes approches ont été développées afin de pouvoir obtenir des informations à un niveau local pour mieux comprendre et analyser des phénomènes comme la contractilité cellulaire. Nous verrons que ces méthodes imposent une observation séquentielle du comportement cellulaire et une analyse à posteriori des images acquises afin de pouvoir remonter par résolution de problèmes inverses aux propriétés mécaniques actives de la cellule.

I.4.1 Suivi de Particules.

Le suivi de particules est probablement l'approche expérimentale la plus ancienne. Crick et Hughes, dès 1949[CRICK1949 ; GEERTS1987] avaient proposé de façon remarquable une caractérisation des propriétés physiques du cytoplasme à l'aide des particules magnétiques phagocytées par les cellules.

L'idée principale consiste à suivre le champ des déplacements des billes phagocytées et d'en déduire le comportement mécanique des cellules. Une difficulté de cette approche est la quantification des champs de déplacements obtenus (Fig. 1.9).

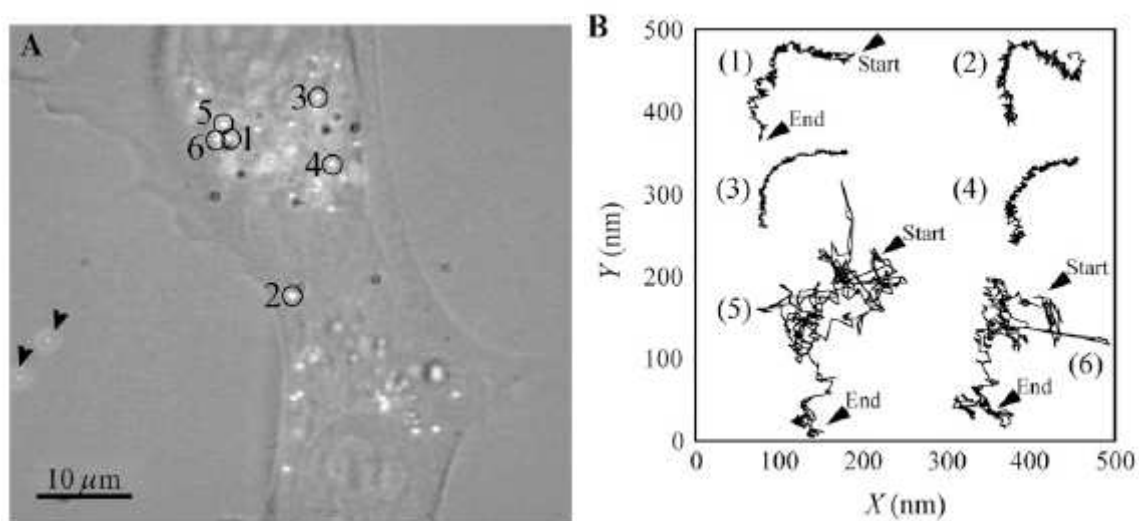


Figure 1.9 : *Suivi de particules à l'intérieur d'un fibroblaste [WEIHS2006]. (A) images en contraste de phase présentant des particules de 100-nm de diamètre. (B) Trajectoires des particules labellisées en (A) ; mouvement brownien pour les particules (5) et (6).*

En suivant le déplacement des microbilles immergées dans un substrat Dembo et al. [DEMBO1999] ont pu ainsi caractériser les forces de traction qu'un fibroblaste développait en se déplaçant sur ce substrat.

1.4.2 Utilisation de substrats en relief déformables

Pour déterminer les efforts que développe la cellule lors de sa migration, différents groupes de recherche, ont développé des substrats originaux pour analyser et quantifier plusieurs aspects de cette dynamique migratoire.

Ainsi, des tapis de micropiliers ont été utilisés pour caractériser le champ de forces (Fig.1.10) au sein de la cellule épithéliale durant sa migration [TAN2003, BUGUIN2005, DU ROURE2005].

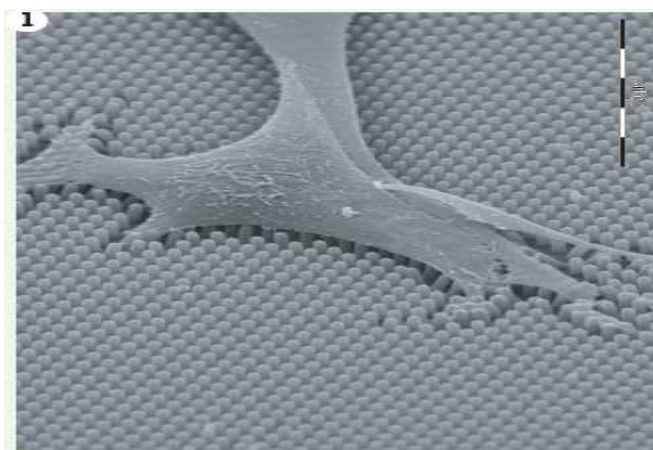


Figure 1.10 : *Microscopie électronique à balayage des cellules épithéliales sur un substrat de microplots [BUGUIN2005]*

Tzvetkova-Chevolleau et al. (2008) dans un travail récent, ont fait varier la rigidité, la géométrie et la disposition des micropiliers (Fig.1.11). Ces chercheurs ont ainsi pu mettre en évidence l'influence respective de ces paramètres sur la motilité et l'orientation des trajectoires de cellules normales et de cellules cancéreuses [TZVETKOVA-CHEVOLLEAU2008].

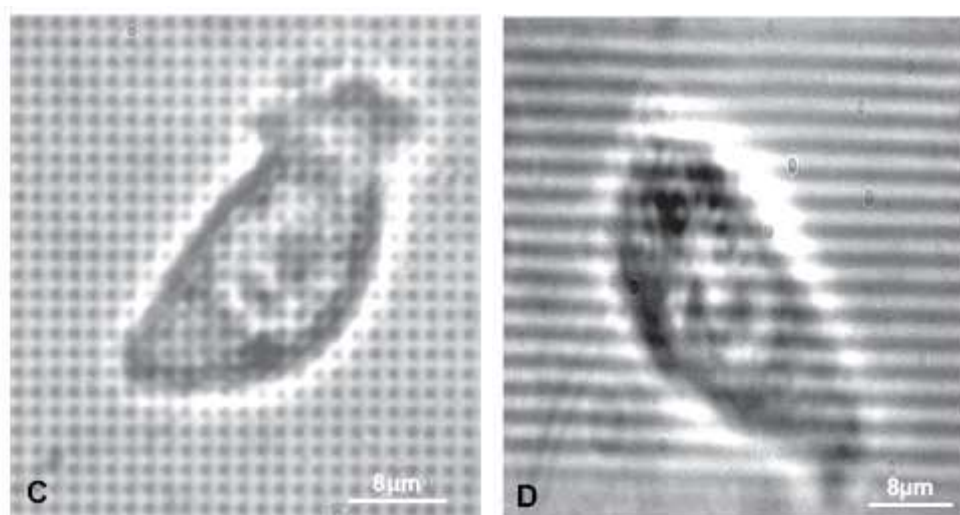


Figure 1.11 : Microscopie en contraste de phase des cellules 3T3 cultivées sur des substrats micropaternés (C) en plot et (D) en ligne [Tzvetkova-Chevolleau2008].

I.5. Objectifs de nos travaux de recherche

L'état de l'art que nous avons brièvement dressé dans les paragraphes précédents montre que les recherches en biologie cellulaire ont été fortement marquées au cours des

deux dernières décennies par la prise en compte accrue des propriétés mécaniques des cellules vivantes. Cependant, l'examen des différentes approches expérimentales qui ont été présentées souligne les biais et les limitations, parfois importantes, qui subsistent lorsqu'il s'agit de remonter aux propriétés mécaniques intrinsèques de l'objet biologique étudié à partir des données expérimentales brutes. Cette thèse est une contribution à la résolution des problèmes inverses qui sont posés par la caractérisation des propriétés mécaniques actives et passives de cellules adhérentes à partir de leur réponse à des sollicitations imposées.

1.5.1 Modèles numériques pour la caractérisation des propriétés élastiques de cellules adhérentes passives

Plus précisément, notre travail de thèse comporte deux volets principaux. Dans le premier, nous avons analysé l'influence des nonlinéarités matérielles et géométriques sur la précision avec laquelle le module d'élasticité intrinsèque d'une cellule peut être déterminée au cours des expériences de micromanipulations par pinces optiques ou magnétiques.

Une quantification précise de ce module mécanique est en effet essentielle si l'on veut estimer par exemple l'amplitude des contraintes et des déformations qui sont transmises par le cytosquelette aux différents points de contacts que la cellule met en place avec son microenvironnement (adhésion cellule-cellule, adhésions focales,...). Maksym et al. [MAKSYM2000], soulignait déjà une dispersion dans les modules d'élasticité calculés par les différentes techniques de micromanipulation. D'où la question : cette dispersion peut-elle être réduite si l'on intègre dans l'analyse de la réponse cellulaire l'influence de la géométrie, des conditions aux limites et l'hétérogénéité de la cellule?

Dans le cadre de la caractérisation du module d'Young d'une cellule adhérente par pinces optiques ou pinces magnétiques, la bille est supposée immergée totalement dans la cellule considérée comme un milieu infini. Or, durant ces expériences, ces hypothèses sont rarement vérifiées et les géométries bille/cellule réelles sont bien plus complexes.

C'est pourquoi nous avons développé à l'aide de la méthode aux éléments finis (MEF), un premier modèle à géométrie bille/cellule plus réaliste simulant l'expérience des pinces magnétiques ou optiques lors de la caractérisation du module d'Young de la cellule

adhérente. En faisant varier les paramètres clés du modèle qui sont : l'angle d'imprégnation γ et la hauteur de la cellule sous la bille h_u , nous allons dans un premier temps mettre en évidence l'influence de ces paramètres sur la réponse mécanique cellulaire. Après cette analyse, nous proposerons - grâce aux résultats des simulations effectuées pour différentes valeurs des paramètres clés - des fonctions de correction $f(\gamma, h_u)$ permettant une caractérisation plus précise du module d'Young de la cellule.

Au cours de certaines expériences de pinces optiques et pinces magnétiques, la bille est fixée sur le bord de la cellule. Au bord des cellules, la courbure de la cellule devient un facteur clé qui influence la réponse de la cellule durant une expérience de pinces optiques ou magnétiques. C'est pour caractériser ces effets de courbure cellulaire que nous avons aussi développé un second modèle géométrique de l'interface bille/cellule. Comme nous l'avons fait pour le premier modèle, nous mettrons en évidence l'influence de cette courbure R_{cell} et nous proposerons une fonction de correction prenant en sus des paramètres du premier modèle, la courbure de la cellule $f(\gamma, h_u, R_{cell})$.

Néanmoins, ces propriétés mécaniques passives ne représentent qu'une facette du comportement cellulaire. Le comportement actif, mitotique, contractile, migratoire de la cellule eucaryote reste un maillon crucial dans le maintien et la réparation des organismes vivants.

Ceci nous a amené, dans une seconde partie de notre thèse, à analyser les propriétés mécaniques actives de cellules adhérentes. Notre modèle expérimental a été le myocyte cardiaque. Ce choix peut paraître paradoxal dans la mesure où il est facile de caractériser les capacités contractiles de cette cellule en mesurant l'amplitude globale de son raccourcissement lors d'une contraction.

Le problème devient beaucoup plus complexe lorsqu'il s'agit de quantifier l'évolution, dans le temps et en tout point de la cellule, des déformations et des contraintes intracellulaires locales, c'est-à-dire au niveau du sarcomère. Très peu de résultats existent à ce jour, et les travaux que nous présentons dans la seconde partie de cette thèse constituent une contribution originale à ce domaine de recherche.

1.5.2 Modèles numériques pour la quantification des déformations locales de cellules et tissus contractiles

En effet, depuis environ une vingtaine d'années, une nouvelle approche du traitement d'images a vu le jour en mécanique. Les mesures optiques [GASVIK2002 ; HORN1981 ; BARRON1990], qui ont connu un essor considérable dans les domaines du contrôle industriel et de la caractérisation mécanique expérimentale, ont permis le développement de techniques dites « de champs », utilisant une ou plusieurs caméras. On peut ainsi avoir accès aux cartographies de grandeurs physiques comme les déplacements, les déformations, les pentes, les courbures ou les coordonnées d'une surface. Ces techniques n'imposent pas de contact physique et de préparation de surface, ce qui les rend tout à fait attrayantes pour étudier le comportement actif d'échantillons biologiques. Dans cette approche, aucune hypothèse n'est faite sur la structure de l'échantillon. L'objectif est d'analyser une séquence d'images à partir de laquelle le champ des déplacements de l'échantillon biologique est extrait. Une analyse a posteriori du champ de déplacement ainsi obtenu peut permettre une quantification des déformations.

L'essor pris par les techniques de suivi de mouvement est considérable. On distingue aujourd'hui parmi ces techniques, les techniques différentielles encore appelées flot optique [YANG1992, CAI2003], les techniques basées sur des approches Markoviennes [GEE1995, ORKISZ1996] et des techniques purement statistiques utilisant des notions de corrélation [GARCIA2001 ; MODERSITZKI2004 ; BERGONNIER2007].

L'utilisation de ces techniques pour la caractérisation des propriétés mécaniques des échantillons biologiques reste cependant encore limitée au niveau cellulaire [GERMAIN1999 ; COLLIN2006 ; BALABAN2001]. Nous développons ici une approche basée sur la corrélation d'images afin de caractériser les propriétés actives de la cellule musculaire cardiaque.

I.6. Plan de la thèse

Après cette partie introductive, nous développons dans le **chapitre 2**, des modélisations aux éléments finis pour, dans un premier temps montrer l'influence de la géométrie bille/cellule sur la réponse mécanique, et dans un second temps quantifier cette influence lors de la caractérisation du module d'Young d'une cellule adhérente. Nous utiliserons deux géométries correspondant aux positions de la bille piégée par les pinces optiques ou magnétiques au cours de ces expériences. Dans la première géométrie, la bille sera supposée immergée dans la cellule loin du bord de cette dernière. Les dimensions latérales de la cellule seront supposées grandes devant celle de la bille. Nous analyserons l'influence de l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule et l'influence de la hauteur de la cellule sous la bille. La seconde géométrie prendra en compte la courbure de la cellule et concernera le cas spécifique où la bille est fixée sur le bord de la cellule. Nous montrerons ainsi l'influence de ces paramètres géométriques sur la réponse cellulaire.

Dans le **chapitre 3**, nous analysons et nous développons un outil basé sur la corrélation d'images pour l'analyse de la cinématique locale des échantillons biologiques.

Tirant profit de la méthode développée au chapitre 3, nous l'appliquerons au **chapitre 4** pour analyser la contractilité de la cellule cardiaque. Nous quantifierons la dynamique locale de contraction des sarcomères pour mieux comprendre les phénomènes de propagation des déformations et contraintes au sein de la cellule cardiaque. Nous essayerons également d'en déduire l'évolution associée des concentrations de calcium intracellulaires.

Dans un dernier chapitre (**perspectives**) nous présentons les prémices d'une nouvelle élastographie des artères coronariennes, obtenue grâce à l'application de l'outil de corrélation d'images développé au chapitre 3.

DEUXIEME CHAPITRE

Problème inverse pour échantillon biologique passif :

**Analyse de la réponse mécanique de la cellule
dans son état passif sollicitée par pinces
magnétiques ou optiques.**

Résumé du chapitre II

Dans ce chapitre, nous cherchons à déterminer les propriétés mécaniques de la cellule dans son état supposé *passif*, connaissant sa réponse mécanique lors d'expériences de pince magnétique ou optique. Ce problème inverse correspond ici à l'identification des constantes matérielles (ou modules mécaniques) d'une cellule comme un milieu continu élastique, homogène isotrope incompressible et passif. Les méthodes inverses qui permettent de caractériser le module d'Young lors de ces expériences font l'hypothèse d'une bille plongée dans un milieu semi-infini. Or, un tel modèle géométrique ne s'avère pas réaliste. C'est pourquoi, nous avons cherché à analyser de façon plus précise cette réponse cellulaire en tenant compte de géométries bille/cellule réelle et plus complexes observées expérimentalement. Cette étude, basée sur des simulations utilisant la méthode aux éléments finis (M.E.F.) nous a permis d'identifier non seulement les rigidités cellulaires, mais aussi l'erreur que l'on commet en considérant le *module apparent* - obtenu en faisant l'hypothèse d'un milieu semi-infini- comme étant le module d'Young intrinsèque de la cellule. Nous montrerons notamment que l'épaisseur finie de la cellule adhérente peut affecter la réponse cellulaire en créant une rigidification apparente de l'échantillon qui n'est pas celle de la cellule mais qui résulte de la géométrie de l'objet uniquement.

De façon à caractériser avec plus de précision les propriétés mécaniques de la cellule, nous avons considéré deux géométries de cellules adhérentes. Ces géométries 3D sont simplifiées mais néanmoins assez représentatives des cas rencontrés lors des expériences de pinces optiques et pinces magnétiques que nous trouvons dans la littérature :

- Dans la première géométrie, la bille n'est pas complètement noyée dans la cellule et est positionnée loin des bords de la cellule [BAUSCH1998]. La géométrie cellulaire 3D considérée est celle d'un parallélépipède d'épaisseur finie. Pour cette géométrie, les paramètres importants sont la hauteur de la cellule sous la bille et l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule.

- Dans la seconde géométrie, nous considérons au contraire une bille positionnée sur le bord de la cellule. Nous prendrons en compte le rayon de courbure local de la membrane cellulaire, en sus des paramètres considérés dans notre étude précédente [LAURENT2002, BALLAND2006].

Pour ces deux études, un grand nombre de simulations numériques ont été effectuées et ont permis d'extraire : a) des abaques qui devraient permettre aux expérimentateurs physiciens et biologistes, de quantifier plus rigoureusement la rigidité de la cellule analysée, et b) d'analyser l'influence des différents paramètres géométriques sur la réponse mécanique passive de cellules adhérentes.

II.1 Introduction

Les stimulations mécaniques exercées par les techniques de pinces optiques et de pinces magnétiques suivent globalement un même principe. Brièvement, une bille sphérique, attachée à la cellule, est soumise à une force externe qui permet d'exercer une contrainte mécanique sur la cellule et son cytosquelette. Les billes subissent un prétraitement afin d'assurer leur fixation sur le cytosquelette cellulaire. Celui-ci consiste à recouvrir d'un peptide de type RGD (arginine-glycine-aspartate) qui permet d'assurer leur fixation aux récepteurs transmembranaires de type intégrines, et donc au cytosquelette des cellules. Typiquement, des microbilles de silice (diamètre de $2.1\mu\text{m}\sim 5.5\mu\text{m}$) sont employées pour les pièges optiques [HENON1999, BALLAND2005], tandis que les expériences de pinces magnétiques utilisent des billes ferromagnétiques (diamètre de $3\text{-}9\mu\text{m}$) [ABNET2000 ; BAUSCH1998]. Dans les deux techniques, les forces appliquées à la bille produisent à la fois un mouvement de rotation et un mouvement de translation de la bille jusqu'à un point d'équilibre où la résistance élastique des cellules équilibre la force externe (état statique).

Dans ce chapitre nous cherchons à résoudre le problème inverse, posé par l'identification des modules mécaniques caractérisant les propriétés mécaniques de la cellule dans son état supposé *passif*, connaissant les différents déplacements mesurés lors d'expériences de pince magnétique ou optique. Pour cela, nous allons développer une approche numérique basée sur la méthode d'éléments finis. Des géométries bille/cellule tridimensionnelle réaliste sont utilisées pour simuler les expériences de pinces optiques et de pinces magnétiques. Nous supposons que la cellule se comporte comme un milieu homogène, hyperélastique, isotrope, passif et incompressible. Comme dans des études précédentes [CAILLE2002 ; OHAYON2005], le comportement mécanique du milieu cellulaire est modélisé par une fonction d'énergie néo-hookienne. Grâce à cette

modélisation 3D, il nous a été possible d'analyser l'influence des différents paramètres géométriques sur la réponse cellulaire lors des expériences.

Après avoir caractérisé le module apparent de la cellule, nous mettrons en évidence la non linéarité du problème inverse associé à l'identification du module d'Young intrinsèque de la cellule. Nous déterminerons également les conditions dans lesquelles ce module de rigidité intrinsèque de la cellule est sur ou sous évalué, comparé à la rigidité apparente de la cellule obtenue à partir des données expérimentales.

II.2 Le Principe des pinces optiques.

Les forces radiatives (exercées par la lumière) n'ont que peu d'effet à l'échelle macroscopique. Un des rares exemples macroscopiques de ces forces est donné par l'orientation de la queue des comètes découverte par l'astronome Johannes Kepler au début du XVII^e siècle. Celle-ci est toujours orientée dans la direction opposée au soleil parce que les particules la composant sont poussées par les forces radiatives. En 1873, James Clerk Maxwell démontre théoriquement que la lumière peut exercer des forces. De par leurs très faibles valeurs, il faut attendre le début des années 1960 et le développement des lasers pour que ces forces soient étudiées.

Un pionnier dans ces études a été Arthur Ashkin. En focalisant un faisceau laser, il a pu déplacer et même faire léviter des particules de quelques microns de diamètre. Ces recherches sont à la base du piégeage et du refroidissement d'atomes, ainsi que du développement des pinces optiques [ASHKIN1970 ; ASHKIN1987]. Selon la puissance du faisceau laser, les pinces optiques exercent des forces allant de quelques piconewtons (pN) à quelques centaines de pN sur des objets de la taille du micron. Cette gamme de force est intéressante pour l'étude des propriétés mécaniques des cellules et des macromolécules.

Une pince optique est obtenue en focalisant un puissant faisceau laser à profil d'intensité gaussien, par un objectif de microscope de grande ouverture numérique. Le gradient d'intensité lumineuse ainsi créé a la propriété de piéger de manière stable des petits objets diélectriques d'indice optique supérieur à celui du milieu environnant. Le piégeage s'effectue au point de plus forte intensité, à savoir le point de focalisation.

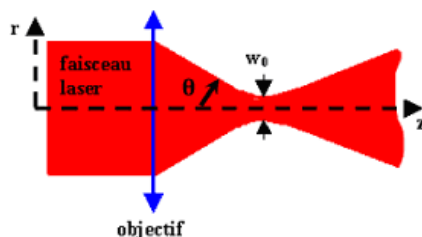


Figure. 2.1: Une pince optique est créée en focalisant un puissant faisceau laser par un objectif de microscope.

- *Forces radiatives*

Deux types de forces radiatives sont en compétition. La première est la force liée au gradient d'intensité qui tend à amener la particule dans la région de plus haute intensité lumineuse. Elle agit suivant la direction du gradient d'intensité. La seconde est due à la pression de radiation qui agit suivant le sens de propagation du faisceau et tend à pousser la particule hors du piège.

Pourquoi y a-t-il piégeage? Pour répondre à cette question, nous considérerons deux cas suivant la taille de la particule piégée. Dans le premier cas, la particule est petite devant la longueur d'onde λ du laser. Dans cette situation, le champ électrique est considéré comme uniforme sur la particule et les relations de l'électromagnétisme s'appliquent simplement. Le deuxième cas concerne les particules grandes devant la longueur d'onde. Un raisonnement d'optique géométrique explique alors le piégeage.

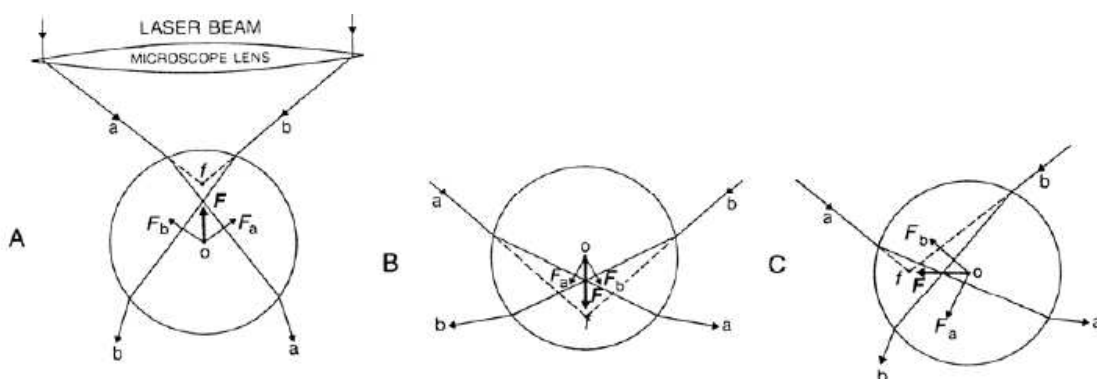


Figure. 2.2: Dans le cas où la bille est grande devant la longueur d'onde, le faisceau est décrit comme une somme de i rayons lumineux. A) et B) représentent le piégeage selon l'axe du faisceau ; C) celui dans le plan transverse [Ashkin1992]

II.3 Contexte de l'étude

II.3.1. Techniques de micromanipulation optiques et magnétiques.

Parmi les techniques de micromanipulation, on distingue celles qui utilisent des champs magnétiques ou optiques comme la magnétocytométrie ou l'optomagnétocytométrie. La force appliquée est parallèle à la surface basale de la cellule adhérente. Notons que dans les expériences de pinces optiques et pinces magnétiques, la translation et la rotation de la bille peuvent être observées et mesurées et que par ailleurs, l'amplitude de la force exercée sur la bille est contrôlée.

II.3.1.1. Pinces magnétiques

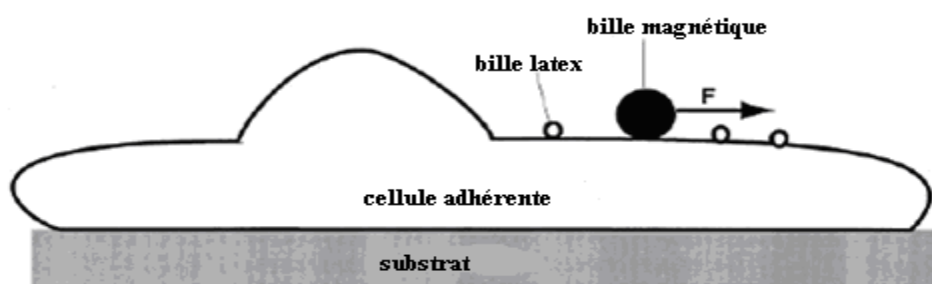


Figure.2.3 : Modèle cellulaire développé par Bausch et al. [Bausch1998].

Dans la technique de pince magnétique développée par Bausch et coll. [BAUSCH1998] le déplacement autour de la bille magnétique était suivi par des billes non magnétiques situées dans le voisinage. En modélisant la réponse de la cellule comme un modèle de Zener et un piston placé en série, on obtient la relation entre le déplacement x , la force F et les paramètres viscoélastiques (k_0 , k_1 , γ_0 et $\tau = \gamma_1(k_0 + k_1)/(k_0 k_1)$).

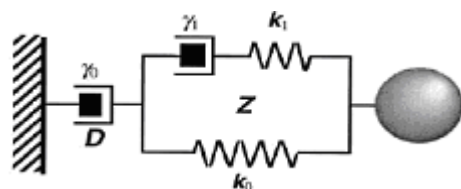


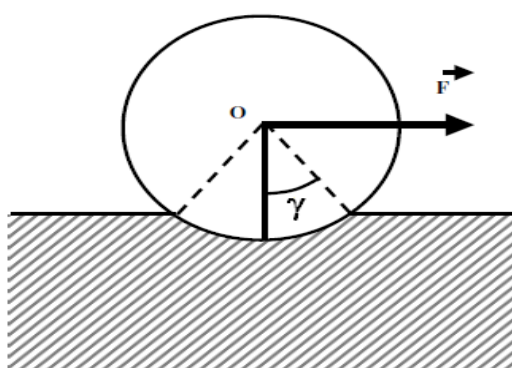
Figure 2.4 : Modèle proposé par Bausch et al.: superposition d'un piston (D) et d'un modèle de Zener (Z) pour analyser la réponse de la cellule durant une sollicitation par pinces magnétiques.

$$\frac{x(t)}{F} = \frac{1}{k_0} \left(1 - \frac{k_1}{k_0 + k_1} \exp(-t/\tau) \right) + \frac{t}{\gamma_0} \quad (2.1)$$

Bausch constate une différence significative entre les mesures effectuées sur des billes fixées sur un groupe de cellules confluentes et celles fixées sur une cellule isolée. Il note ainsi l'influence de la géométrie de la cellule sur les paramètres viscoélastiques.

II.3.1.2 Pinces optiques et pinces opto-magnétiques

Dans les expériences de pinces optiques réalisées par Laurent et coll. [LAURENT2002] le déplacement d'une bille de silice est mesuré et permet de quantifier les propriétés élastiques de la cellule en modélisant cette dernière comme un milieu ayant un comportement isotrope, linéaire et incompressible. Dans cette expérience, sous l'action d'une force F appliquée sur la bille de silice (force tangentielle à la membrane de la cellule), la bille subit une translation u_x dans le sens de la force. Dans le cas d'une petite imprégnation de la bille dans la cellule, Laurent propose la relation suivante pour caractériser la rigidité cellulaire :



$$u_x = \frac{3}{4\pi E} \frac{F}{R} \left(\frac{3}{2 \sin \gamma} + \frac{\cos \gamma}{\sin^3 \gamma} \right) \quad (2.2)$$

Figure 2.5 : *Modèle proposé par Laurent et al. : il permet de prendre en compte l'influence de l'angle d'imprégnation γ .*

où E est le module d'Young intrinsèque de la cellule, R le rayon de la cellule et γ l'angle d'imprégnation (ou d'immersion) de la bille dans la cellule.

II. 3.1 3. Étirement par pinces optiques (optical stretcher)

L'étirement par pinces optiques se fait en fixant deux billes sur la cellule non adhérente. Henon et Lenormand [HENON1999 ; LENORMAND2001] utilisent cette technique pour analyser le comportement du globule rouge après un étirement. En

modélisant le globule rouge discoïde par deux disques plans parallèles dont la membrane est considérée comme un milieu élastique, isotrope, homogène et linéaire, ils caractérisent le module de cisaillement du globule rouge.



Figure. 2.6 : *Un globule avec deux billes en position diamétralement opposée est déformé en augmentant la distance entre les pièges. La variation ΔD est mesurée en fonction de la force F [LENORMAND2001].*

II.3.2 Bille noyée dans un milieu élastique infini: module apparent

Dans la cas d'une bille sphérique, plongée dans un milieu infini homogène linéaire, élastique et incompressible, on peut obtenir une relation analytique entre la force F imposée à la bille et la translation résultante δ , comme une fonction du module d'Young E_{cell} et du rayon de la bille R_{bille} . En fait, le module apparent est issu de cette relation. C'est pourquoi il est important de montrer comment cette solution a été obtenue par Lin et al. [LIN2005].

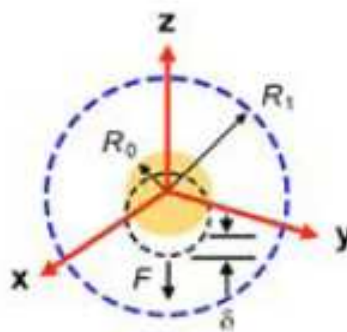


Figure 2.7 : *bille rigide de rayon R_0 , plongée dans un milieu sphérique de rayon R_1 . La force F appliquée au centre de la bille rigide dans la direction (z) provoque un déplacement δ qui dépend de l'élasticité du milieu sphérique et de son rayon.*

L'équilibre du système cellule/bille - si ν représente le coefficient de poisson de l'échantillon biologique et \mathbf{u} le vecteur déplacement - obéit à la condition d'équilibre :

$$\nabla \operatorname{div} \mathbf{u} + (1 - 2\nu) \nabla^2 \mathbf{u} = 0 \quad (2.3)$$

En suivant l'approche proposée par Barber [BARBER2002] pour la résolution des problèmes d'élasticité, on choisit une fonction potentielle représentant le champ des déplacements \mathbf{u} . Il est commode pour cela de prendre un champ de vecteur de Galerkin \mathbf{g} satisfaisant l'équation biharmonique

$$\nabla^4 \mathbf{g} = 0 \quad (2.4)$$

Le champ de déplacement s'exprime en fonction du vecteur de Galerkin comme

$$2G\mathbf{u} = \left[2(1 - \nu) \nabla^2 - \nabla \operatorname{div} \right] \mathbf{g} \quad (2.5)$$

où G est le module de cisaillement.

Introduisons la fonction potentielle ψ définie par

$$\psi = -\frac{1}{2} \nabla^2 \mathbf{g} \quad (2.6)$$

ψ est naturellement harmonique car par définition \mathbf{g} est biharmonique.

Sachant que $\mathbf{r} = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$, utilisant l'identité $\nabla^2(\mathbf{r}.\psi) = 2\operatorname{div} \psi$ avec, on obtient la relation

$$\nabla^2(\mathbf{r}.\psi) = -\nabla^2 \operatorname{div} \mathbf{g} \quad (2.7)$$

En intégrant la relation précédente, on obtient

$$\operatorname{div} \mathbf{g} = \mathbf{r}.\psi + \phi \quad (2.8)$$

où ϕ est une fonction harmonique arbitraire.

Ainsi, l'équation (2.5) peut donc être exprimée en fonction de potentiels : $\mathbf{r}.\psi$ et ϕ

$$2G\mathbf{u} = -4(1 - \nu)\psi + \nabla(\mathbf{r}.\psi + \phi) \quad (2.9)$$

Sans perte de généralité, supposons une rotation autour de l'axe z . On peut donc prendre les composantes x et y de ψ nulles. Soit ω la composante de ψ selon l'axe z . On a les relations suivantes :

$$u_r = \frac{1}{2G} \left(\frac{\partial \phi}{\partial r} + z \frac{\partial \omega}{\partial r} \right) \quad (2.10)$$

$$u_{\theta} = \frac{1}{2G} \left(\frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial \theta} + \frac{z}{r} \frac{\partial \omega}{\partial \theta} \right) \quad (2.11)$$

$$u_z = \frac{1}{2G} \left(\frac{\partial \phi}{\partial z} + z \frac{\partial \omega}{\partial z} - (3-4\nu)\omega \right) \quad (2.12)$$

Avec ce champ de déplacement on déduit le tenseur des contraintes

$$\sigma_{rr} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} + z \frac{\partial^2 \omega}{\partial r^2} - 2\nu \frac{\partial \omega}{\partial z} \quad (2.13)$$

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \phi}{\partial \theta^2} + \frac{z}{r} \frac{\partial \omega}{\partial r} + \frac{z}{r^2} \frac{\partial^2 \omega}{\partial \theta^2} - 2\nu \frac{\partial \omega}{\partial z} \quad (2.14)$$

$$\sigma_{zz} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + z \frac{\partial^2 \omega}{\partial z^2} - 2(1-\nu) \frac{\partial \omega}{\partial z} \quad (2.15)$$

$$\tau_{r\theta} = \frac{1}{r} \frac{\partial^2 \phi}{\partial r \partial \theta} - \frac{1}{r^2} \frac{\partial \phi}{\partial \theta} + \frac{z}{r} \frac{\partial^2 \omega}{\partial r \partial \theta} - \frac{z}{r} \frac{\partial \omega}{\partial \theta} \quad (2.16)$$

$$\tau_{rz} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial r \partial z} + z \frac{\partial^2 \omega}{\partial r \partial z} - (1-2\nu) \frac{\partial \omega}{\partial r} \quad (2.17)$$

$$\tau_{\theta z} = \frac{1}{r} \frac{\partial^2 \phi}{\partial \theta \partial z} + \frac{z}{r} \frac{\partial^2 \omega}{\partial \theta \partial z} - \frac{1-2\nu}{r} \frac{\partial \omega}{\partial \theta} \quad (2.18)$$

En exprimant ϕ et ω comme une somme d'harmoniques sphériques à l'aide des fonctions de Legendre

$$\phi = \sum_0^{\infty} \left[A_n P_n(x) R^{-n-1} + B_n P_n(x) R^n \right] \quad (2.19)$$

$$\omega = \sum_0^{\infty} \left[C_n P_n(x) R^{-n-1} + D_n P_n(x) R^n \right] \quad (2.20)$$

où les polynômes de Legendre sont définis comme

$$P_n(x) = \frac{1}{2^n n!} \frac{d^n}{dx^n} (x^2 - 1)^n \quad (2.21)$$

avec $x = \frac{z}{R}$ et $R = \sqrt{r^2 + z^2}$

Les constantes A_n, B_n, C_n et D_n sont déterminées en appliquant les conditions au bord.

Dans le cas où il n'y a pas de glissement de la bille, les conditions à la surface de la

bille $R = R_{bille}$ sont données par

$$\begin{cases} u_r = 0 \\ u_z = \delta \end{cases} \quad (2.22)$$

où δ est le déplacement de la bille jusqu'à la condition d'équilibre.

Autour du milieu sphérique dans lequel est plongée la bille $R = R_{ext}$ on a

$$\begin{cases} u_r = 0 \\ u_z = 0 \end{cases} \quad (2.23)$$

Soit $d\vec{a}$ un élément de surface de la sphère

$$d\vec{a} = (r\mathbf{e}_r + z\mathbf{e}_z) d\theta dz \quad (2.24)$$

La force sur cet élément est donnée par

$$d\mathbf{F} = (r\sigma_{rr} + z\tau_{rz}) d\theta dz \mathbf{e}_r + (z\sigma_{zz} + r\tau_{rz}) d\theta dz \mathbf{e}_z \quad (2.25)$$

Le théorème d'unicité des équations différentielles permet de choisir un nombre fini de termes qui remplissent les conditions limites.

$$\phi = A_2 z R^{-3} + B_1 z + \frac{1}{2} B_3 (5z^3 - 3zR^2) \quad (2.26)$$

$$\omega = C_0 R^{-1} + \frac{1}{2} D_2 (3z^2 - R^2) \quad (2.27)$$

En intégrant l'équation (2.25) dans la direction z , on obtient

$$F = \int_{-R_{bille}}^{R_{bille}} \int_0^{2\pi} (z\sigma_{zz} + r\tau_{rz}) d\theta dz \quad (2.28)$$

En substituant les valeurs des constantes on obtient la relation entre la force F , le module d'Young E_{cell} , le rayon de la bille R_{bille} et le rayon extérieur du milieu sphérique R_{ext} .

$$E = \frac{F}{8\pi\delta R_{bille}} \frac{1+\nu}{1-\nu} \left[(3-4\nu) \left(1 - \frac{1}{q} \right) + \frac{(q^3-1)^2}{3q(q^5-1)} - \frac{(3-2\nu)(q^2-1)^2}{2(2-2\nu)(q^5-1)} \right] \quad (2.29)$$

$$\text{avec } q = \frac{R_{ext}}{R_{bille}}$$

Pour un milieu infini incompressible $\nu \rightarrow 0.5$ et $R_{ext} \rightarrow \infty$ donc $q \rightarrow \infty$

On obtient la relation

$$E = \frac{F}{2\pi\delta R_{bille}} = \frac{2F}{S_{bille} \frac{\delta}{R_{bille}}} \quad (2.30)$$

où S_{bille} est la surface de la bille.

Dans les expériences de piégeage magnétique ou optique, le module élastique apparent E_{ap} peut être calculé à partir du déplacement latéral normalisé de la bille

$\rho = \frac{\delta}{R_{bille}}$ ou de sa rotation associée θ . Ainsi, nous posons [MIJAILOVICH2002 ;

OHAYON2005]:

$$E_{ap}^{\delta} = \frac{2F}{S\rho} \quad (2.31)$$

$$E_{ap}^{\theta} = \frac{2F}{S\theta} \quad (2.32)$$

Cependant, ce module apparent n'est pas le module intrinsèque de la cellule. En effet son estimation est biaisée par les effets des paramètres géométriques tels que l'épaisseur de l'échantillon biologique h , le rayon de la bille R et l'angle d'imprégnation γ dans la réponse mécanique. Ainsi, nous devons considérer l'existence des fonctions de correction α et β , dépendant au moins des paramètres géométriques h , R et γ , qui permettent de passer du module apparent au module intrinsèque par les relations de la forme:

$$E_{ap}^{\delta} = \alpha(h, R, \gamma) E_{cell} \quad (2.33)$$

$$E_{ap}^{\theta} = \beta(h, R, \gamma) E_{cell} \quad (2.34)$$

Afin d'évaluer l'importance de ces fonctions correctrices, il est crucial d'étudier l'influence des paramètres géométriques avant de pouvoir les quantifier.

Notons qu'un tel modèle géométrique proposé par Lin et al. [LIN2005] ne s'avère pas assez réaliste pour simuler les réponses cellulaires issues des expériences de pinces optiques et pinces magnétiques. C'est pourquoi, grâce à la méthode aux éléments finis (MEF), nous avons décidé de simuler cette réponse cellulaire en tenant compte de géométries bille/cellule plus complexes observées expérimentalement.

II.4 Modèle géométrique bille/cellule de type I

Ce modèle correspond à des expériences où la bille est positionnée sur la cellule, loin de ses bords (fig. 2.8).

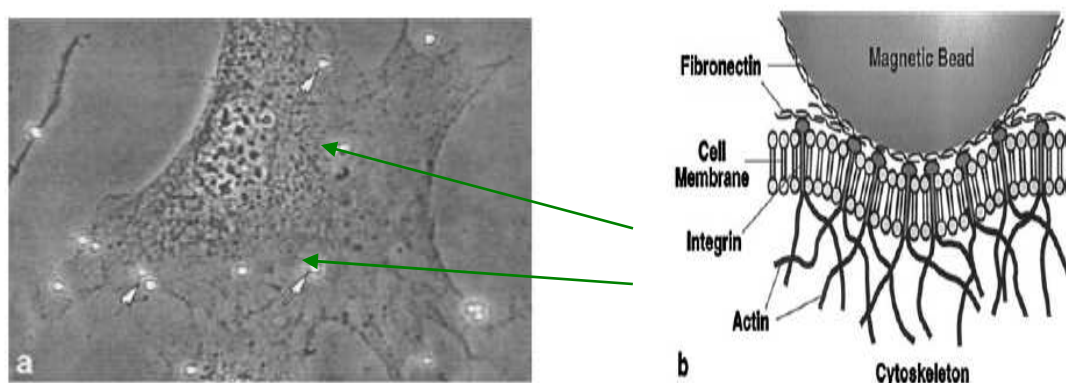


Figure 2.8: Fixation des billes sur un fibroblaste à l'aide de la fibronectine. Les billes correspondants au modèle 1 sont celles qui sont loin du bord. [BAUSCH1998]

Les simulations de la translation et de la rotation induites par la force appliquée au centre de la bille ont été développées à l'aide du logiciel éléments finis ANSYS (Ansys 10 software, Ansys, Inc., Cannonsburg, Pennsylvania, USA). Afin de tenir compte de la variabilité des conditions expérimentales [LAURENT2002, FODIL2003], nous avons simulé la réponse de la cellule pour approximativement 300 géométries différentes de l'interface cellule/bille, chacune correspondant à des valeurs données des différents paramètres : a) rayon de la bille R ($1\ \mu\text{m} \leq R \leq 5\ \mu\text{m}$), b) angle d'imprégnation de la bille dans la cellule γ ($15^\circ \leq \gamma \leq 90^\circ$) et c) épaisseur de la cellule h ($1\ \mu\text{m} \leq h \leq 20\ \mu\text{m}$).

II.4.1 Analyse par éléments finis de la réponse cellulaire

II.4.1.1 Géométrie Cellule/bille

L'interface géométrique cellule/bille est modélisée par un volume parallélépipédique de taille ($l \times l \times h$) avec une bille imprégnée sur sa face supérieure. De façon astucieuse, en utilisant le plan de symétrie passant par le centre de la bille, nous pouvons restreindre notre analyse à la moitié du volume parallélépipédique (Fig. 2.9).

Les paramètres géométriques principaux du modèle affectant la réponse mécanique sont (Fig. 2.9): la taille de la cellule l , l'épaisseur de la cellule h , le rayon de la bille R et la moitié de l'angle d'immersion γ .

La discrétisation de la géométrie est faite avec des éléments solid92 de ANSYS qui sont des éléments tétraédriques possédant 10 nœuds et trois degrés de liberté chacun. Les fonctions tests sont de type quadratique.

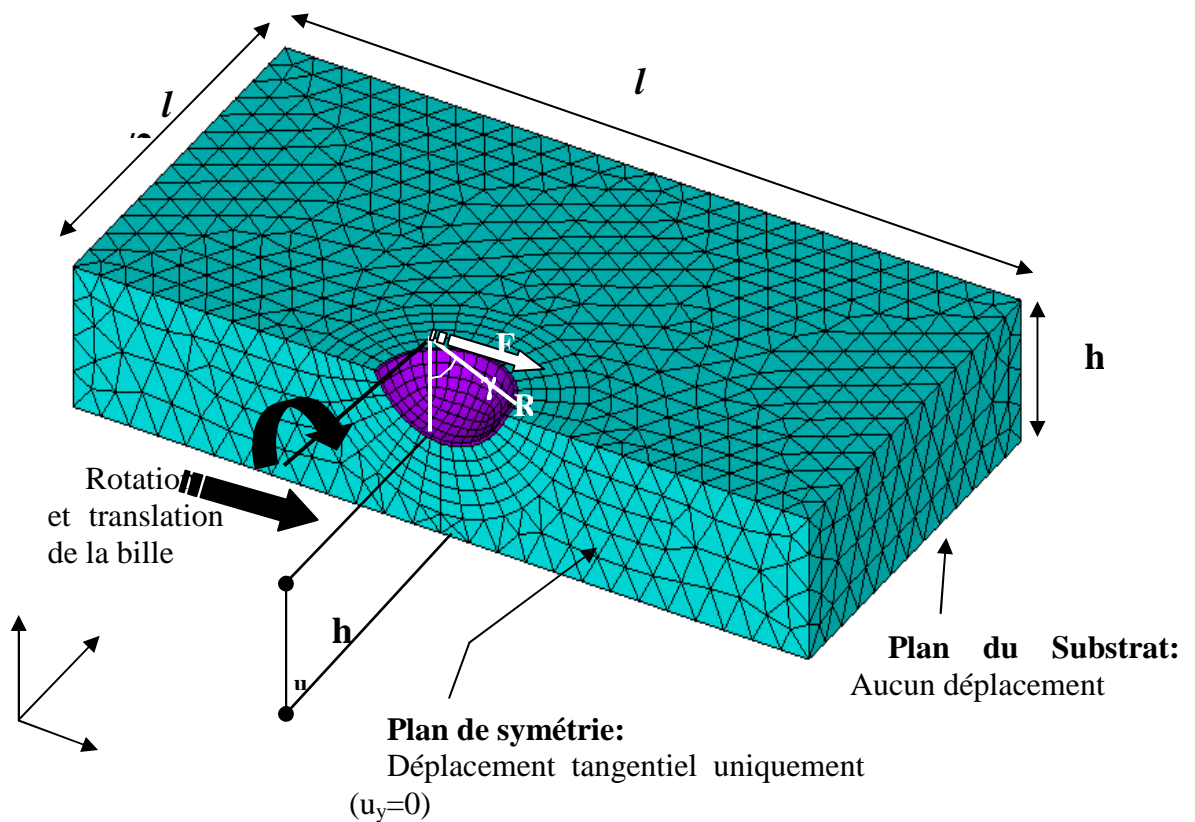


Figure 2.9: *Modèle et maillage éléments finis de l'interface cellule/bille ; la cellule est représentée par un volume parallélépipédique de dimension $l \times l \times h$.*

II.4.1.2 Propriétés des matériaux cellules et bille

La bille est modélisée comme un matériau rigide. De nombreuses études, [CAILLE2002 ; OHAYON2005] ont proposé de considérer le milieu cellulaire comme un milieu homogène et quasi incompressible possédant une fonction d'énergie de

déformation W de type neo-Hookien [HOLZAPFEL2001] pour modéliser le comportement hyperélastique de la cellule, avec :

$$W = a (I_1 - 3) \quad (2.35)$$

où a est une constante matérielle (en Pa), I_1 est le premier invariant du tenseur des déformations droit de Cauchy-Green \mathbf{C} ($I_1 = \text{Trace}(\mathbf{C})$, [HOLZAPFEL2001]). Pour les milieux quasi-incompressibles, on peut obtenir une relation explicite entre le module d'élasticité E_{cell} et la constante matérielle a . Dans le cas de sollicitations uni-axiales, elle est donnée par :

$$E_{\text{cell}} = 2 a (2 + \lambda^{-3}) \quad (2.36)$$

où λ est le rapport d'extension dans la direction de la contrainte uni-axiale. Notons que pour des petites extensions ($\lambda \sim 1$), ceci nous donne $E_{\text{cell}} \sim 6 a$.

II.4.1.3 Conditions aux limites

Les conditions aux limites sur la moitié de notre géométrie cellule/bille (Fig. 2.9), sont les suivantes:

- (i) Pour modéliser l'attachement complet de la membrane cellulaire au substrat rigide, un déplacement nul est imposé à tous les nœuds de la face inférieure du parallélépipédique ou surface basale.
- (ii) Du fait de la symétrie du modèle, les nœuds appartenant à la section du plan de symétrie ont un déplacement normal nul.
- (iii) Pour le reste de la cellule, les conditions libres sont imposées sur les nœuds à la surface.
- (iv) Comme chargement externe, une force horizontale parallèle au plan de symétrie est appliquée au centre de la bille.

II.4.2 Influence des paramètres géométriques sur la réponse cellulaire

Par le biais du modèle aux éléments finis élaboré précédemment, le mouvement de la bille et les déformations et contraintes engendrées sur la cellule ont été simulées pour un

ensemble de 300 géométries bille/cellule distinctes définies à partir de nos gammes de paramètres géométriques considérées. Lors des expériences de pinces optiques et pinces magnétiques, la translation et la rotation de la bille peuvent être observées et mesurées. Dans cette étude, nous montrons comment le module d'élasticité cellulaire peut être déduit connaissant la géométrie bille/cellule, la force imposée F et l'un des déplacements observés, c'est-à-dire soit la translation de la bille, soit sa rotation.

Typiquement, lors des expériences de pinces optiques et pinces magnétiques, le diamètre de la bille ($2R$) est approximativement au moins dix fois plus petit que la taille de la surface basale de la cellule. Par conséquent, la dimension l a été prise égale à $20R$ (voir Fig.2.9). Nos simulations ont montré que le rapport $h_u/2R$, i.e. l'épaisseur de la cellule sous la bille (h_u) sur le diamètre de la bille ($2R$), apparaît comme un paramètre géométrique clé pour la quantification de la réponse de la cellule. Ainsi, ce résultat nous montre que les principaux paramètres géométriques influençant la réponse mécanique sont : a) l'épaisseur normalisée de la cellule $\xi = \frac{h_u}{2R}$, et b) l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule γ . Ces deux paramètres varient dans les domaines réalistes suivants: $0.1 \leq \xi \leq 10$ et $15^\circ \leq \gamma \leq 90^\circ$. Ainsi, approximativement 300 géométries bille/cellule ont été considérées pour cette étude.

II.4.2.1 Influence de l'épaisseur de la cellule sur la distribution des déformations intracellulaires.

L'importance de l'épaisseur de la cellule sur la distribution des déformations effectives à l'intérieur de la cellule est soulignée sur la Fig.2.10. Pour des valeurs typiques du rayon de la bille et de l'angle d'imprégnation dans les expériences de micromanipulation [LAURENT2002 ; FODIL2003] nous présentons sur la Fig. 2.10 les résultats de la réponse de la cellule de notre modèle pour $R=2 \mu\text{m}$ et $\gamma=50^\circ$, respectivement. L'intensité de la force horizontale imposée au centre de la bille est de 50 pN, en accord avec la gamme de force obtenue lors des expériences de pinces optiques [HENON1999]. Pour ces simulations, le module de Young a été fixée à $E_{cell} = 6a = 500 \text{ Pa}$.

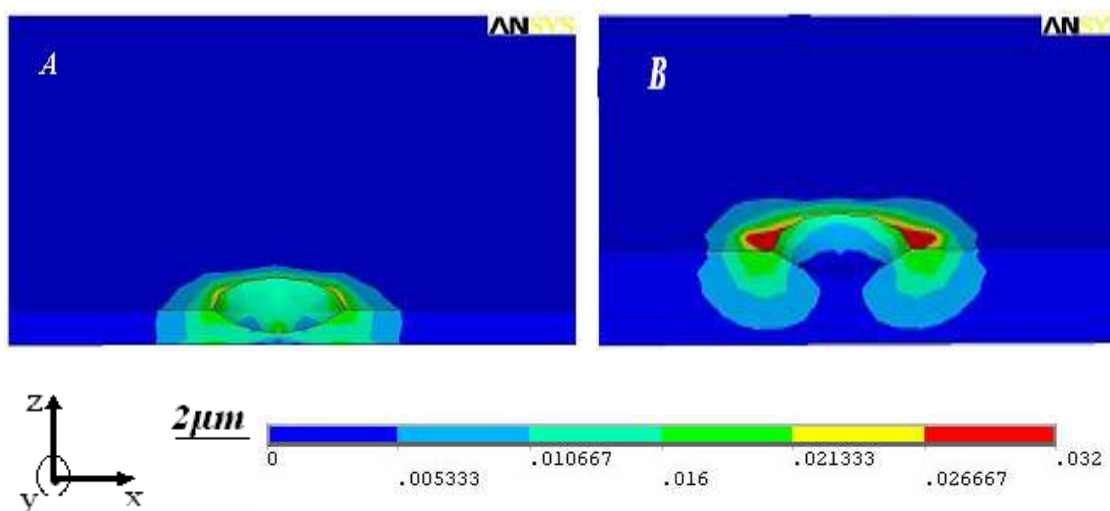


Figure. 2.10: Influence de la hauteur sous bille sur la distribution des déformations effectives. Cartographies des déformations effectives $e_{eff}=(2e_{ij}e_{ij}/3)^{1/2}$, ou les e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. A) l'angle d'imprégnation $\gamma= 50^\circ$, la hauteur sous bille $h_u=0.4\mu m$. B) $\gamma= 50^\circ$, $h_u=2\mu m$. Pour ces deux simulations on impose une même force $F = 50$ pN à la bille, les paramètres suivants ont été maintenus constants :le module d'Young de la cellule $E = 6a = 500$ Pa, le rayon de la bille $R = 2 \mu m$, la longueur du pavé (cellule) $l = 20 \times R$.

II.4.2.2 Influence de l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule sur la distribution des déformations intracellulaires.

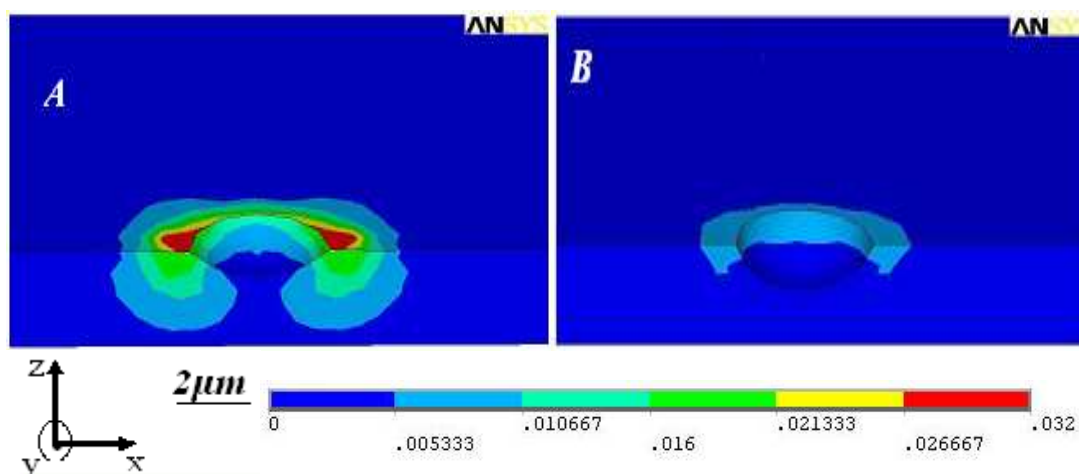


Figure. 2.11: Influence de l'angle d'imprégnation sur la distribution des déformations effectives. Cartographies des déformations effectives $e_{eff}=(2e_{ij}e_{ij}/3)^{1/2}$, ou les e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. A) l'angle d'imprégnation $\gamma= 50^\circ$, la hauteur sous bille $h_u=2\mu m$. B) $\gamma= 80^\circ$, $h_u=2\mu m$. Pour ces deux simulations on impose une même force $F = 50$ pN à la bille.

la bille, les paramètres suivants ont été maintenus constants : le module d'Young de la cellule $E = 6a = 500 \text{ Pa}$, le rayon de la bille $R = 2 \mu\text{m}$, la longueur du pavé (cellule) $l = 20 \times R$.

L'importance de l'épaisseur de la cellule sur la distribution des déformations effectives à l'intérieur de la cellule est soulignée sur la Fig.2.11. Afin de souligner cette influence, nous avons considéré dans les deux cas une bille de $2\mu\text{m}$ de diamètre, une hauteur de cellule sous bille $h_u = 2\mu\text{m}$. Au cours de la première simulation (fig. 2.11.A), nous avons fixé l'angle d'imprégnation $\gamma = 50^\circ$. $\gamma = 80^\circ$ pour la seconde simulation. L'intensité de la force horizontale imposée au centre de la bille est de 50 pN .

II.4.2.3 Expressions des fonctions de correction non linéaires $\alpha(\xi, \gamma)$ et $\beta(\xi, \gamma)$

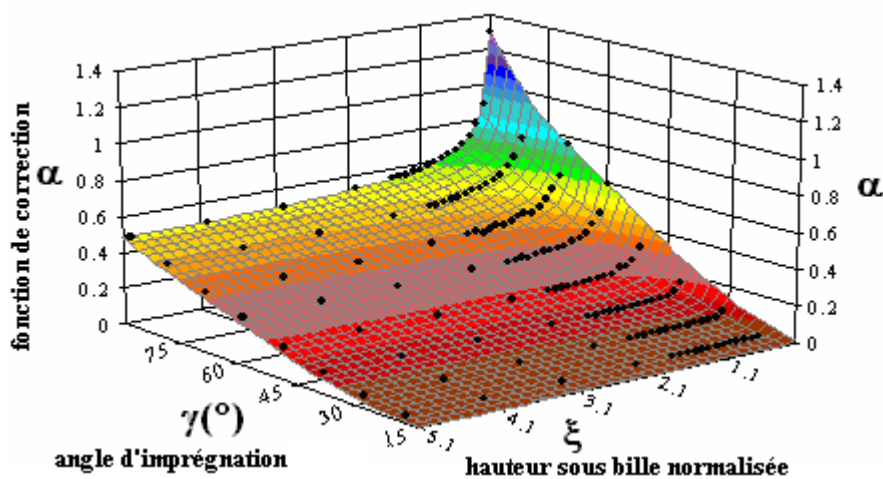


Figure 2.12A

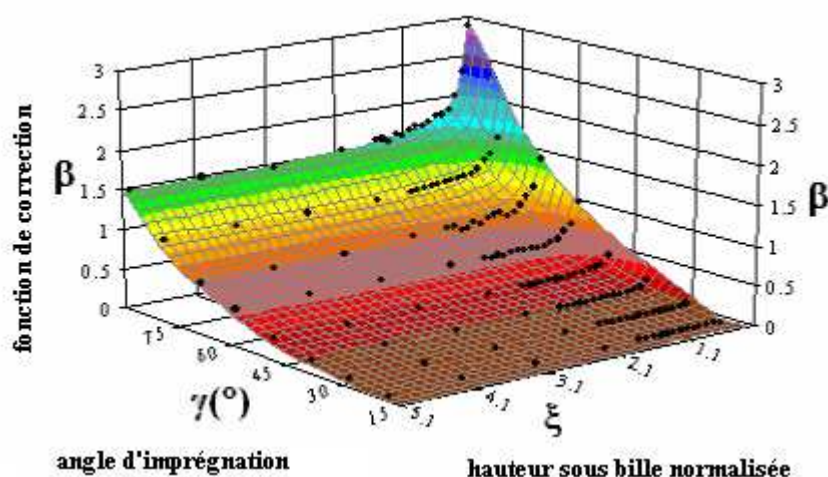


Figure 2.12B

Figure 2.12. Valeurs des coefficients de correction α (Fig. 2.12A) et β (Fig.2.12B) en fonction de la hauteur sous bille normalisée ξ et de l'angle d'imprégnation γ

Les valeurs des fonctions de correction $\alpha(\xi, \gamma)$ $\beta(\xi, \gamma)$ ont été calculées pour

l'ensemble de nos 300 simulations à partir des Eqs. 2.31, 2.33 et Eqs. 2.32, 2.34 qui donnent leurs expressions en fonction des paramètres et résultats du modèle numérique :

$$\alpha = \frac{2F}{S\rho E} \text{ avec } \rho = \frac{\delta}{R} \quad (2.37)$$

$$\beta = \frac{2F}{S\theta E} \quad (2.38)$$

Rappelons que F est la force exercée sur la bille, S la surface de la bille sphérique, E le module d'Young du milieu cellulaire, δ est la translation de la bille, et θ est sa rotation (en radian). Les deux dernières quantités sont mesurées. La Fig. 2.12 montre l'influence des paramètres géométriques sur l'amplitude des fonctions de correction. Dans le cas particulier d'une bille imprégnée à moitié ($\gamma=90^\circ$) dans un milieu semi-infini (simulation faite avec une longueur infini l_{infini} et une épaisseur cellulaire infini h_{infini} prises toutes les deux égales à $20R$, qui donne un ratio $\xi=9.5$), nous avons trouvé une correction α égale à 0.486 (Fig. 2.12A),. De façon intéressante, cette valeur correspond à la moitié de l'amplitude de la fonction de correction obtenue en utilisant la solution exacte dans le cas d'une bille immergée dans un milieu infini (solution présentée précédemment en I.4.2).

Notons que les amplitudes maximales des fonction de correction sont obtenues pour des petites valeurs de ξ (i.e épaisseur cellulaire petite) et les grandes valeurs de γ (i.e. grand angle d'imprégnation de la bille dans la cellule) (Fig. 2.12). En effet, pour ces géométries, la réponse mécanique de la cellule est très sensible aux conditions de bord imposées sur la surface basale (i.e. un attachement complet de la cellule au substrat), ce qui a pour effet une augmentation de la rigidité apparente de la cellule.

Par le biais de notre modèle aux éléments finis, nous pouvons déterminer un ensemble de valeurs des fonctions $\alpha(\xi, \gamma)$ et $\beta(\xi, \gamma)$, valeurs qui nous permettraient de mieux estimer le module d'Young intrinsèque de la cellule sondée par pinces optiques ou pinces magnétiques. Par conséquent, une série de *lissages* a été effectuée sur les résultats de nos simulations afin de déterminer les meilleures fonctions d'interpolation pour nos fonctions de correction α et β . Dans un premier temps, nous avons *lissé* les points pour chaque angle d'imprégnation, les valeurs de α et β en fonction du rapport ξ pour γ fixés. Des *lissages* satisfaisants ont été obtenus (Fig.2.13, pour $\gamma_i= 80^\circ$) en considérant pour chaque angle d'imprégnation γ_i une relation hyperbolique de la forme:

$$\alpha(\gamma_i, \xi) = A_\alpha(\gamma_i) + \frac{B_\alpha(\gamma_i)}{\xi} \tag{2.39}$$

$$\beta(\gamma_i, \xi) = A_\beta(\gamma_i) + \frac{B_\beta(\gamma_i)}{\xi} \tag{2.40}$$

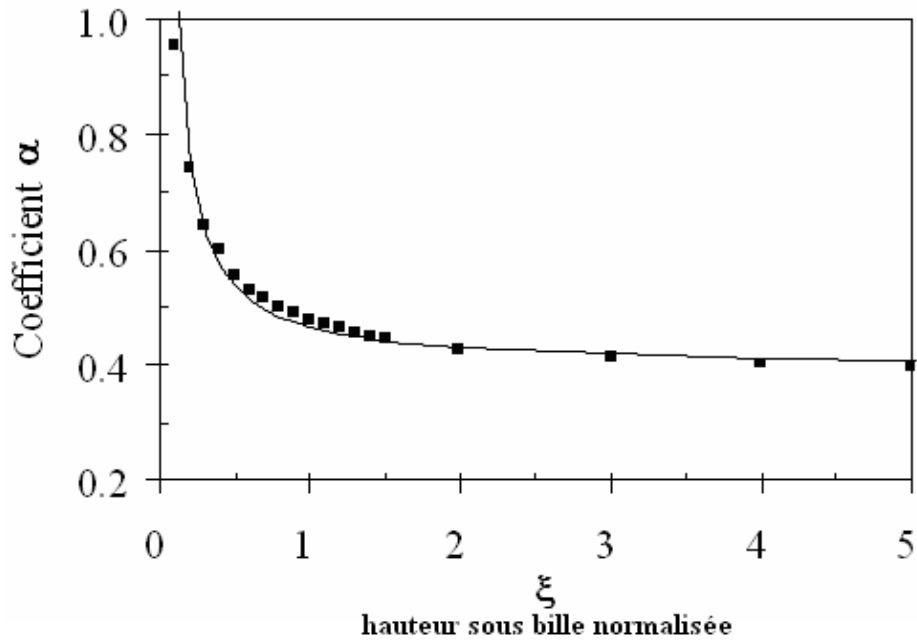


Figure. 2.13A

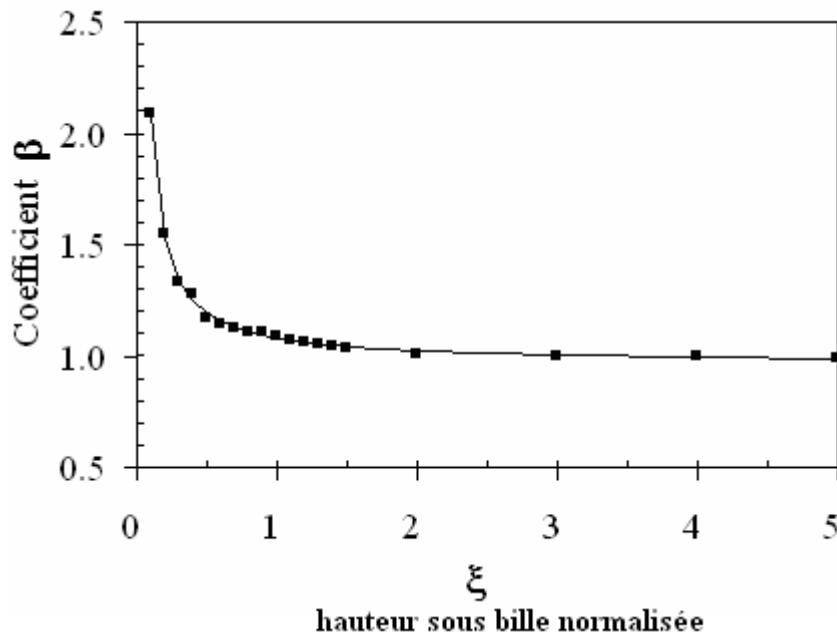


Figure. 2.13B

Figure. 2.13: Meilleurs lissages obtenus pour les deux fonctions de correction hyperbolique $\alpha(\xi)$ ((A), $r^2 = 0.990$) et $\beta(\xi)$ ((B), $r^2 = 0.995$) pour l'angle d'imprégnation = 80° .

Afin de trouver des expressions analytiques pour les fonctions correctrices $\alpha(\xi, \gamma)$ et $\beta(\xi, \gamma)$, nous avons dans un deuxième temps, effectué un *lissage* des coefficients trouvés précédemment $A_\alpha(\gamma_i)$, $B_\alpha(\gamma_i)$, $A_\beta(\gamma_i)$ et $B_\beta(\gamma_i)$ en fonction des γ_i (Fig.2.13). Ce lissage a été effectué en considérant des fonctions d'interpolation polynomiales :

$$A_\alpha(\gamma) = A_{\alpha 0} + A_{\alpha 1} \gamma + A_{\alpha 2} \gamma^2 + A_{\alpha 3} \gamma^3 \quad (2.41)$$

$$B_\alpha(\gamma) = B_{\alpha 0} + B_{\alpha 1} \gamma + B_{\alpha 2} \gamma^2 + B_{\alpha 3} \gamma^3 \quad (2.42)$$

$$A_\beta(\gamma) = A_{\beta 0} + A_{\beta 1} \gamma + A_{\beta 2} \gamma^2 + A_{\beta 3} \gamma^3 \quad (2.43)$$

$$B_\beta(\gamma) = B_{\beta 0} + B_{\beta 1} \gamma + B_{\beta 2} \gamma^2 + B_{\beta 3} \gamma^3 \quad (2.44)$$

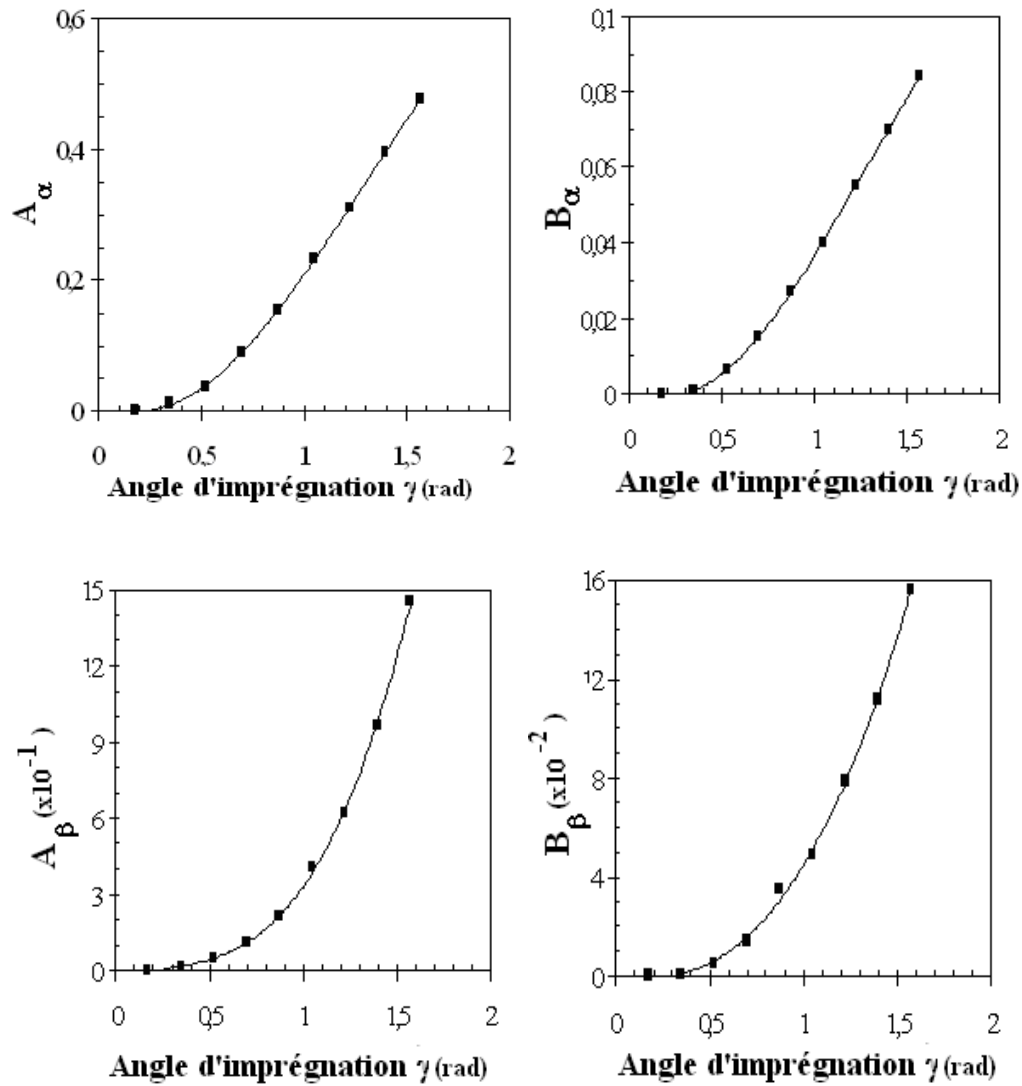


Figure.2.14: Meilleurs lissages polynomiaux des quatre fonctions $A()$ ((A), $r^2 = 0.999$), $B()$ ((B), $r^2 = 0.999$), $A_\beta(\gamma)$ ((C), $r^2 = 0.999$) et $B_\beta(\gamma)$ ((D), $r^2 = 0.999$) données aux équations (2.41-2.44) utilisées pour l'estimation des deux fonctions de correction α et β . γ est exprimé en radian.

Un lissage satisfaisant a été obtenu pour les valeurs de paramètres données dans le tableau Table 2.1.

α	$15^\circ \leq \gamma \leq 90^\circ$	β	$15^\circ \leq \gamma \leq 90^\circ$
$A_{\alpha 0}$	$2.321 \cdot 10^{-2}$	$A_{\beta 0}$	$-5.522 \cdot 10^{-2}$
$A_{\alpha 1}$	$-2.054 \cdot 10^{-1}$	$A_{\beta 1}$	$3.008 \cdot 10^{-1}$
$A_{\alpha 2}$	$5.250 \cdot 10^{-1}$	$A_{\beta 2}$	$-4.953 \cdot 10^{-1}$
$A_{\alpha 3}$	$-1.338 \cdot 10^{-1}$	$A_{\beta 3}$	$5.807 \cdot 10^{-1}$
$B_{\alpha 0}$	$4.788 \cdot 10^{-3}$	$B_{\beta 0}$	0
$B_{\alpha 1}$	$-4.314 \cdot 10^{-2}$	$B_{\beta 1}$	$-9.293 \cdot 10^{-3}$
$B_{\alpha 2}$	$1.020 \cdot 10^{-1}$	$B_{\beta 2}$	$2.900 \cdot 10^{-2}$
$B_{\alpha 3}$	$-2.698 \cdot 10^{-2}$	$B_{\beta 3}$	$2.559 \cdot 10^{-2}$

Table 2.1: Valeurs des coefficients polynomiaux obtenus pour des lissages optimaux des fonctions $A_\alpha(\cdot)$, $B_\alpha(\cdot)$, $A_\beta(\cdot)$ et $B_\beta(\cdot)$.

II.4.2.4 Géométries bille/cellule nécessitant une correction de la mesure rigidité apparente

L'un des premiers bénéfices de ce travail est de nous permettre une détermination précise des valeurs des paramètres pour lesquelles la correction de la rigidité est nécessaire. Acceptant une erreur relative au plus de 25% sur l'estimation du module de Young, nous avons établi sur la Fig. 2.15 les domaines pour lesquels la valeur du module Young E devrait être rectifiée. Ce domaine a été obtenu en considérant les valeurs critiques de ξ et de l'angle d'imprégnation γ pour lesquels les valeurs du coefficient α (Eq. 2.37) sont comprises entre 0.75 et 1.25.

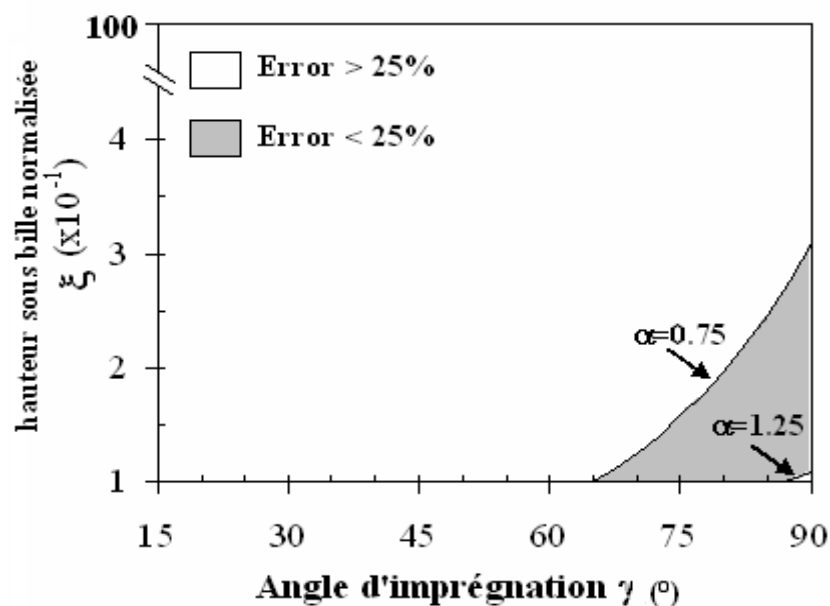


Figure.2.15: *Domaine critique (zone blanche) spécifiant les valeurs de ξ et γ pour lesquelles le module apparent devrait être corrigé si l'on tolère une erreur de 25%. La zone grise représente la zone le module apparent peut être assimilé au module intrinsèque.*

II.5 Modèle géométrique bille/cellule de type II

Dans la section précédente, nous avons considéré la bille positionnée loin des *bords* de la cellule, cas souvent rencontrés dans les expériences de pinces magnétiques. A l'inverse, pour les expériences de pinces optiques, les billes que l'on va piéger sont souvent situées sur le bord de la cellule. Dans une telle configuration bille/cellule, la bille n'est que partiellement contrainte par le milieu cellulaire. De plus la courbure du bord de la cellule peu jouer un rôle important sur la réponse mécanique cellulaire, [BLOOD2006 ; GOV2006]. L'un des intérêts du modèle que nous considérons dans cette section est la prise en compte d'une des courbures de la membrane cellulaire.

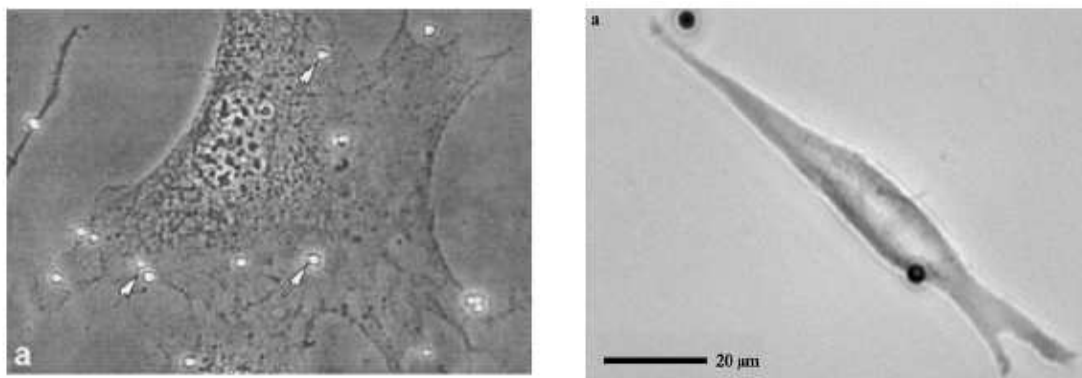


Figure.2.16: *Durant l'expérience de pinces magnétiques (à gauche) [Bausch1998], pinces optiques (à droite) [Balland2006] on peut remarquer que les billes situées sur la frontière sont dans des zones à courbure variée.*

II.5.1 Analyse éléments finis

II.5.1.1 Géométrie cellule/bille

La cellule est modélisée par un volume cylindrique de rayon R de hauteur h . Les principaux paramètres géométriques dont nous désirons analyser l'influence sont : (Fig. 2.17A, 2.17B):

- Le rayon de la cellule R_{cell} , notons que ce rayon nous permet de prendre en compte la courbure de la cellule à l'endroit où la bille est fixée.
- Le demi angle d'imprégnation γ_{reel} aussi appelé angle d'imprégnation réel. En effet, dans certains cas, il est impossible de mesurer cet angle réel, ceci par la position de l'objectif du microscope (vue de dessus). Dans ces cas, l'angle mesuré est un angle apparent que nous notons γ_{ap} . Fig. 2.17B. On peut définir une relation entre les deux angles (i.e. $\gamma_{reel} = \gamma_{ap} - \pi/4$) (voir en annexe 1 le développement de la relation entre γ_{ap} et γ_{reel}):
- La hauteur de la bille sous la cellule h_u , notons que la relation entre la hauteur du volume cylindrique h et h_u est donnée par $h_u = h - R(1 - \cos\gamma_{reel})$.

La discrétisation de la géométrie est faite avec des éléments solid92 qui sont des éléments tétraédriques possédant 10 nœuds et trois degrés de liberté chacun. Les fonctions tests sont de type quadratique.

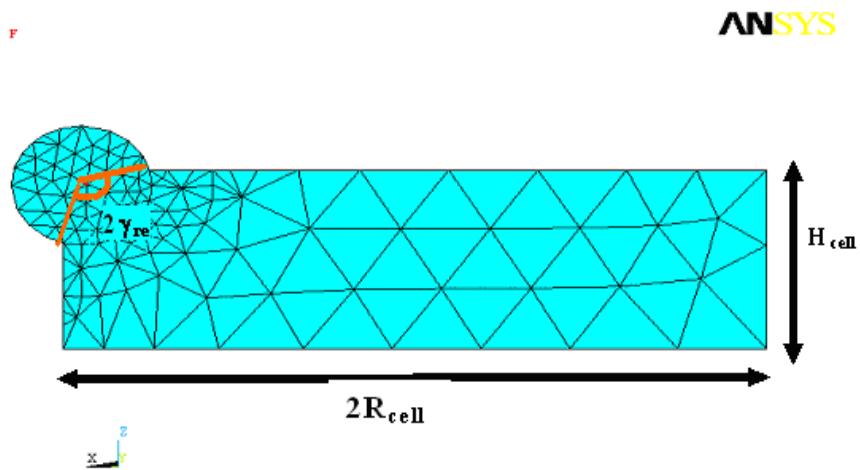


Fig. 2.17A

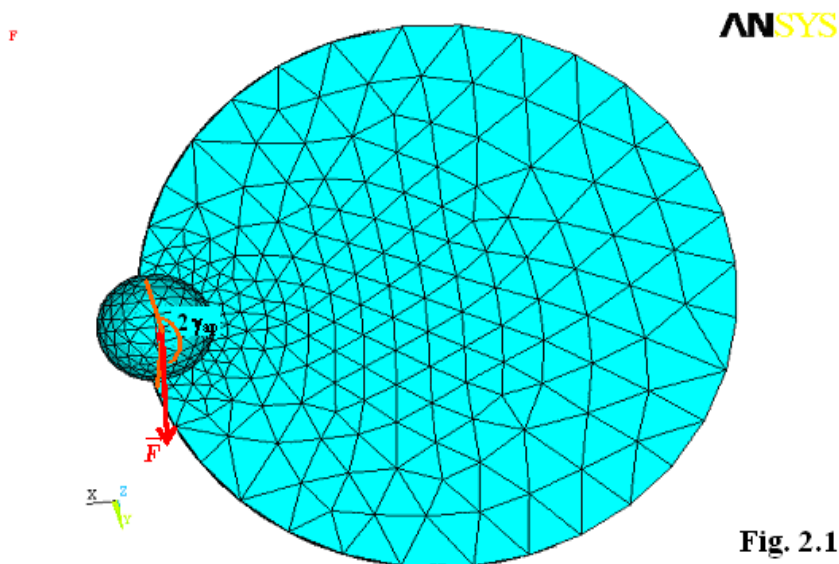


Fig. 2.17B

Figure.2.17: Maillage du modèle cylindrique : pour la prise en compte de la courbure locale, la cellule est modélisée par un cylindre de rayon R_{cell} (rayon de courbure locale) et d'épaisseur h . A) vue de côté. B) vue de dessus.

II.5.1.2 Propriétés des matériaux cellule bille

Les propriétés mécanique utilisé pour décrire le milieu cellulaire sont les mêmes que celles du considérées dans l'étude du modèle 1 (paragraphe II.4).

II.5.1.3 Conditions aux limites du problème

- (i) Pour modéliser l'attachement complet de la membrane cellulaire au substrat rigide, un déplacement nul est imposé à tous les nœuds de la face inférieure du cylindre.
- (ii) Pour le reste de la cellule, les conditions libres sont imposées sur les nœuds à la surface.
- (iii) Comme chargement externe, une force horizontale parallèle au plan de symétrie est appliquée au centre de la bille.

II.5.2 Fonctions de correction et dépendances

Les fonctions de correction α et β permettent de prendre en compte les facteurs géométriques qui sont ici plus complexes que celles précédemment trouvées pour le modèle 1. En effet, en plus de leurs dépendances vis-à-vis de la hauteur sous bille de la cellule h_u , du rayon de la bille R et de l'angle d'imprégnation $\gamma_{réel}$, les fonctions de correction font intervenir maintenant un paramètre géométrique supplémentaire qui est le rayon de la cellule. Des calculs préliminaires ont montré qu'en fait seulement 3 paramètres normalisés sont nécessaires pour expliciter cette dépendance. Il s'agit de $(\xi=h_u/2R)$, $\gamma_{réel}$ et $\chi=R_{cell}/2R$

Ainsi,

$$E_{app}^{\delta} = \alpha(\xi, \gamma_{réel}, \chi)E \quad (2.45)$$

$$E_{app}^{\theta} = \beta(\xi, \gamma_{réel}, \chi)E \quad (2.46)$$

II.5.2.2 Influence de la hauteur sous bille ($\xi=h_u/2R$) sur la distribution des déformations intracellulaire.

Dans le but de montrer l'influence de la hauteur sous bille, nous considérons deux géométries différentes. Pour ces deux géométries, nous gardons le rayon cellulaire $R_{cell}=10\mu\text{m}$, le rayon de bille $R=1\mu\text{m}$, et l'angle d'imprégnation réel $\gamma=50^\circ$. Pour la première géométrie, nous prenons $h=2\mu\text{m}$ (ce qui correspond au rapport $\xi=0.456$ fig.

2.18A) et $h=8\mu\text{m}$ (qui donne un rapport $\xi=3.455$ fig. 2.18B) pour la seconde géométrie. La force tangentielle imposée sur la bille est prise égale à 100pN. Pour les simulations, nous avons fixé le module d'Young de la cellule $E_{\text{cell}}=6a=500$ Pa.

Dans les deux cas, les déformations effectives sont identiques. Mais les effets de l'adhérence de la cellule sur le substrat sont importants pour les petites hauteurs sous bille. Les figures (Fig.2.19A; 2.19B) montrent l'évolution des coefficients de correction en fonction de ξ pour $\chi=5$ fixé.

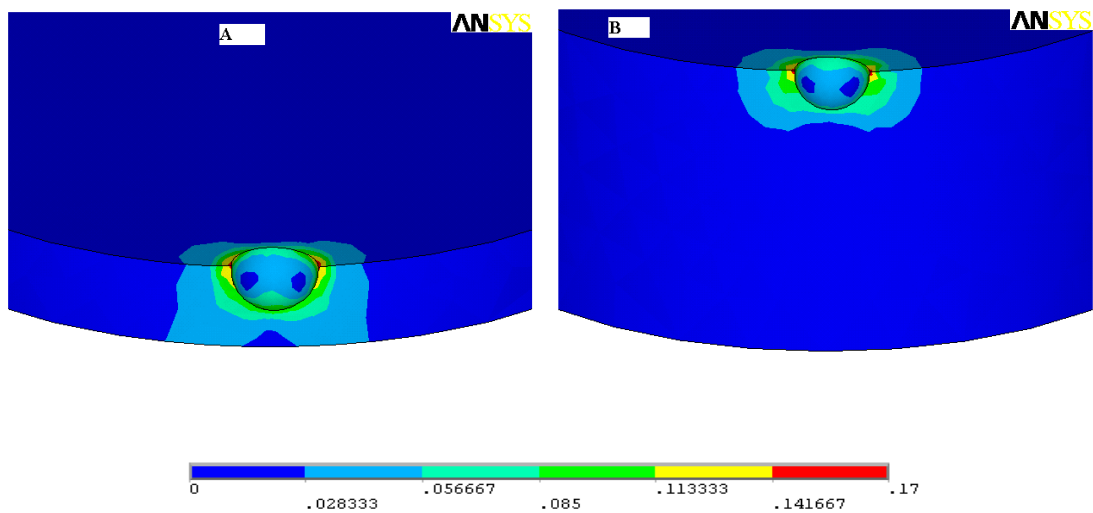


Figure.2.18: Influence de l'épaisseur sous bille sur la distribution des déformations effectives. Cartographies des déformations effectives $e_{\text{eff}}=(2e_{ij}e_{ij}/3)^{1/2}$, ou les e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. A) l'angle d'imprégnation $\gamma=50^\circ$, la hauteur sous bille normalisée $\xi=0.456\mu\text{m}$. B) $\gamma=50^\circ$, $\xi=3.455\mu\text{m}$. Pour ces deux simulations on impose une même force $F=100$ pN à la bille, les paramètres suivants ont été maintenus constants : le module d'Young $E=6a=500$ Pa, le rayon de la bille $R=10\mu\text{m}$, $R=1\mu\text{m}$.

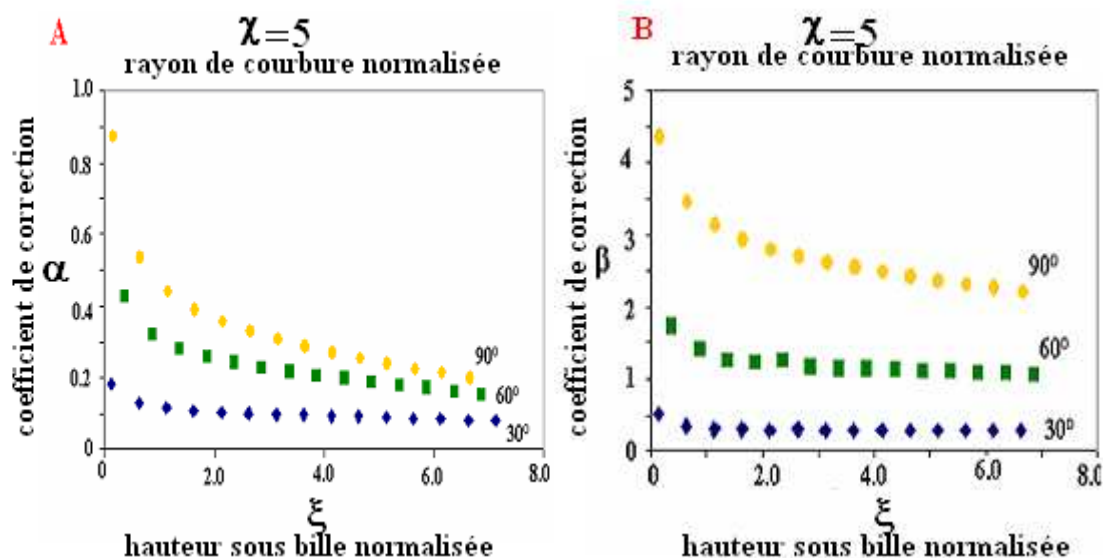


Figure.2.19: Evolution des coefficients de correction en fonction de la hauteur sous bille normalisé ξ pour $\chi=5$.

II.5.2.3 Influence de l'angle d'imprégnation γ sur la distribution des déformations intracellulaires

Pour étudier le rôle de l'angle d'imprégnation, nous considérons deux géométries différentes. Pour les deux géométries, nous gardons le rayon cellulaire à $R_{cell}=10\mu\text{m}$, le rayon de la bille $R=1\mu\text{m}$ et la hauteur de la cellule $h=5\mu\text{m}$. Pour la première géométrie, l'angle d'imprégnation réel est $\gamma_{re}=30^\circ$, et $\gamma_{re}=60^\circ$ dans la seconde géométrie. On note des déformations effectives plus importantes pour une imprégnation à 30° . Dans les deux cas, la force tangentielle appliquée sur la bille est prise égale à 100pN . Pour ces simulations, le module d'Young est gardé à $E=6a=500\text{ Pa}$. (Fig.2.20C; 2.20D). Sur les figures (Fig.2.21C; 2.21D) nous montrons l'évolution du coefficient de correction en fonction de $\gamma=\gamma_{re}$ pour une hauteur sous bille fixée $\xi=1$.

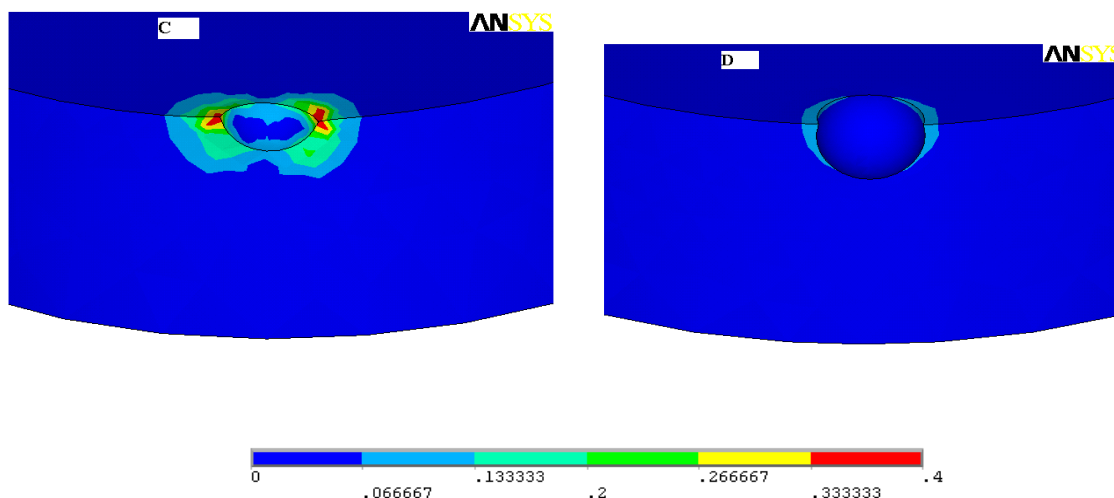


Figure.2.20: Influence de l'angle d'imprégnation sur la distribution des déformations effectives. Cartographies des déformations effectives $e_{eff}=(2e_{ij}e_{ij}/3)^{1/2}$, où les e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. A) l'angle d'imprégnation $\gamma= 30^\circ$, B) $\gamma= 60^\circ$. Pour ces deux simulations on impose une même force $F = 100$ pN à la bille, les paramètres suivants ont été maintenus constants : le module d'Young $E = 6a = 500$ Pa, le rayon de courbure cellulaire $R_{cell} = 10\mu m$, $R=1\mu m$, $\xi=1$.

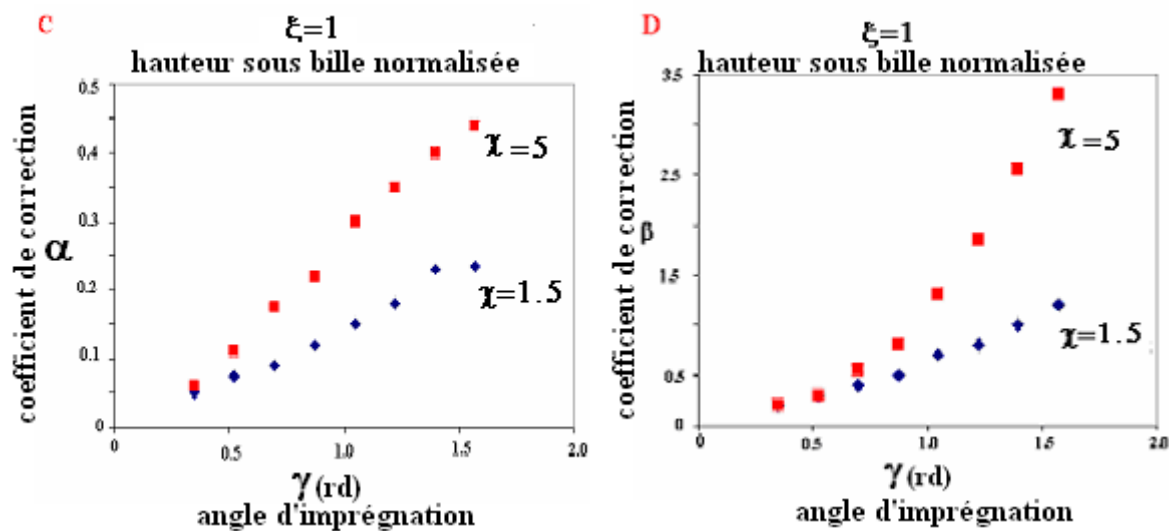


Figure.2.21: Evolution de l'amplitude des fonctions de correction en fonction de l'angle d'imprégnation γ pour $\xi=1$.

II.5.2.4 Influence du rayon cellulaire ($\chi=R_{cell}/2R$) sur la distribution des déformations intracellulaires

L'importance de la courbure de la cellule durant une expérience de pinces optiques et magnétiques est mise en évidence sur les figures (Fig.2.22E, 2.22F). Pour les deux géométries considérées, nous prenons le rayon de la bille $R=1\mu\text{m}$, la hauteur de la cellule, $h=5\mu\text{m}$ et l'angle d'imprégnation réel $\gamma=60^\circ$. Dans le premier cas, nous prenons $R_{cell}=3\mu\text{m}$ et $R_{cell}=10\mu\text{m}$ dans le second cas. Pour ces simulations, le module d'Young $E=6a=500\text{ Pa}$, et la force tangentielle est gardée à 100 pN . Ainsi, nous notons que pour des petits rayons le substrat est sollicité bien que les déformations effectives restent identiques.

Les figures (Fig.2.23E; 2.23F) montrent une évolution du coefficient de correction en fonction de χ pour l'angle d'imprégnation réel $\gamma_{réel}=60^\circ$ et $\xi=5$.

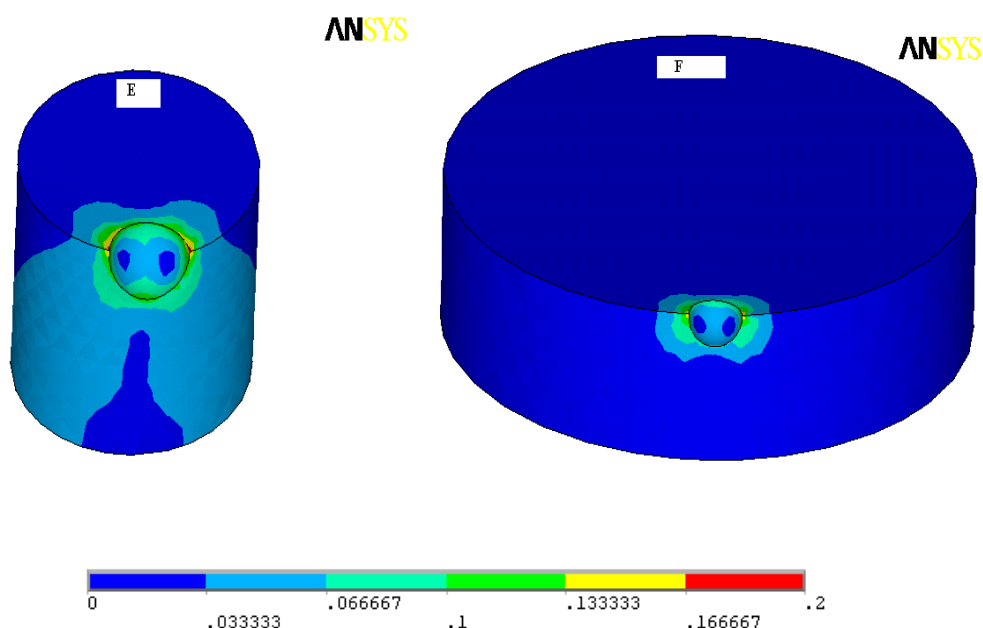


Figure.2.22: Influence du rayon de courbure sur la distribution des déformations effectives. Cartographies des déformations effectives $e_{eff}=(2e_{ij}e_{ij}/3)^{1/2}$, où les e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. A) $\chi=1.5$, B) $\chi=5$. Pour ces deux simulations on impose une même force $F=100\text{ pN}$ à la bille, les paramètres suivants ont été maintenus constants : $E=6a=500\text{ Pa}$, $H_{cell}=5\mu\text{m}$, $R=1\mu\text{m}$ et $\gamma=60^\circ$.

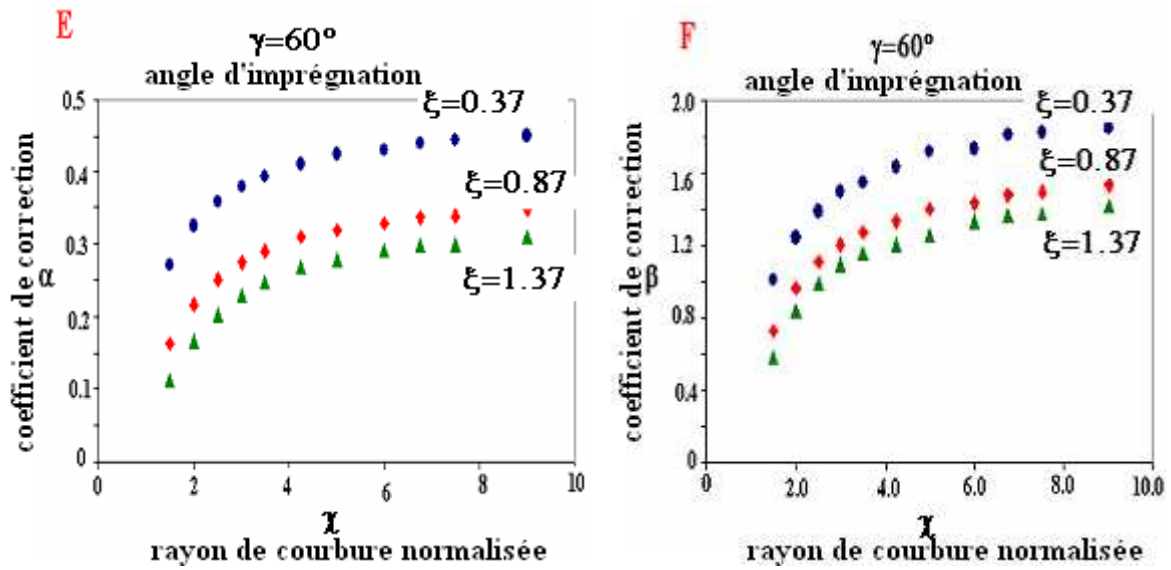


Figure.2.23: Evolution des coefficients de correction en fonction de la courbure pour $\gamma=60^\circ$.

II.5.2.5 Expression des fonctions de correction $\alpha(\gamma, \xi, \chi)$ et $\beta(\gamma, \xi, \chi)$

Les équations Eq. 2.31 ; 2.45 et Eq. 2.32 ; 2.46, nous permettent de calculer pour R_{cell} ($3\mu m \leq R_{cell} \leq 30\mu m$), γ ($15^\circ \leq \gamma \leq 90^\circ$), h_u ($0.05\mu m \leq h_u \leq 10\mu m$) les fonctions de correction $\alpha(\gamma, \xi, \chi)$ et $\beta(\gamma, \xi, \chi)$ déterminant le module d'Young intrinsèque d'une cellule adhérente sollicitée par pinces optiques ou magnétiques. Nous avons par la suite appliqué une série de lissages des corrections α et β en fonction de γ_{re} et ξ pour différentes valeurs de χ .

Des lissages satisfaisants (Fig. 2.24, Fig. 2.25, pour $\chi=5$) sont obtenus pour chaque rapport χ en considérant des relations puissances à deux variables:

$$\alpha_\chi(\gamma, \xi) = A_\alpha \gamma^{B_\alpha} \xi^{C_\alpha} \quad (2.47)$$

avec $A_\alpha = A_\alpha(\chi)$, $B_\alpha = B_\alpha(\chi)$, $C_\alpha = C_\alpha(\chi)$

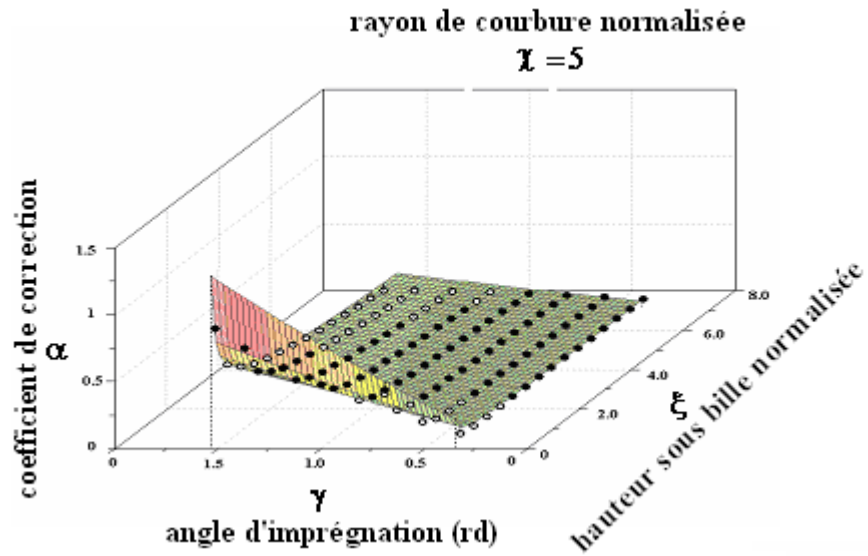


Figure 2.24: Lissage des points de simulation par une fonction puissance à deux variables pour la correction en translation.

$$\beta_\chi(\gamma, \xi) = A_\beta \gamma^{B_\beta} \xi^{C_\beta} \quad (2.48)$$

avec $A_\beta = A_\beta(\chi)$, $B_\beta = B_\beta(\chi)$, $C_\beta = C_\beta(\chi)$

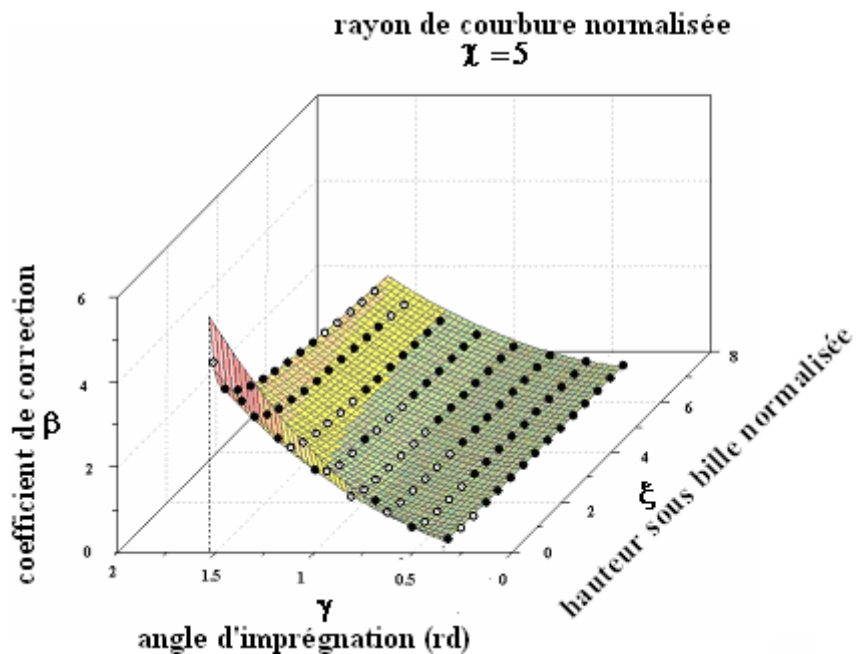


Figure 2.25: Lissage des points de simulation par une fonction puissance à deux variables pour la correction en rotation.

Afin d'obtenir une description complète des fonctions de corrections

$$\alpha(\gamma, \xi, \chi) \text{ et } \beta(\gamma, \xi, \chi)$$

nous appliquons un second lissage afin d'obtenir les valeurs de $(A_i, B_i, C_i)_{i=1,2}$ en fonction du rapport χ ($1.5 \leq \chi \leq 9$). (Fig. 2.26)

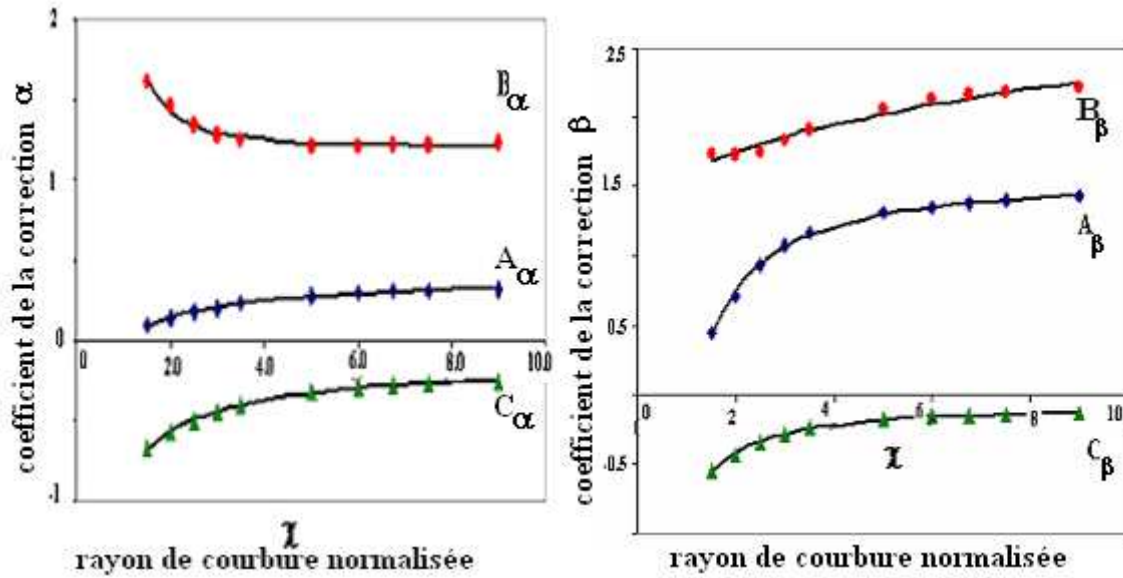


Figure.2.26: Lissage des coefficients des fonctions puissances en fonction χ .

Les fonctions ci dessous sont celles qui nous donnent des meilleurs lissages.

$$A_\alpha = A_{11} + A_{12}\chi^{A_{13}} \quad (2.49) \quad A_\beta = A_{21} + A_{22}\chi^{A_{23}} \quad (2.52)$$

$$B_\alpha = B_{11} + B_{12}\chi^{B_{13}} \quad (2.50) \quad B_\beta = B_{21} + B_{22}\chi^{B_{23}} \quad (2.53)$$

$$C_\alpha = C_{11} + C_{12}\chi^{C_{13}} \quad (2.51) \quad C_\beta = C_{21} + C_{22}\chi^{C_{23}} \quad (2.54)$$

A_{11}	4.693E-01	A_{21}	1.596E+00
A_{12}	-4.753E-01	A_{22}	-1.838E+00
A_{13}	-5.464E-01	A_{23}	-1.124E+00
B_{11}	1.189E+00	B_{21}	1.072E+00
B_{12}	1.000E+00	B_{22}	5.266E-01
B_{13}	-2.085E+00	B_{23}	3.694E-01
C_{11}	-8.720E-02	C_{21}	-6.822E-02
C_{12}	-8.037E-01	C_{22}	-7.995E-01
C_{13}	-7.453E-01	C_{23}	-1.177E+00

Table 2.2: Valeurs des coefficients optimisant les fonctions de lissage

II.5.2.6 Application

Les données expérimentales que nous analysons pour ce modèle nous ont été aimablement communiquées par l'équipe du Pr. Sylvie Henon. Ces données sont issues des expériences de pinces optiques en régime dynamique sur des macrophages alvéolaires de rat (fig.2.27) suivant le protocole développé par Balland et al. [BALLAND2006]. Pour cette expérience, ces auteurs ont montré un comportement du module de cisaillement complexe sous la forme de loi puissance:

$$|G_e(f)| = G_0 (f)^\kappa$$

où G_0 appelé préfacteur, représente la mesure du module de cisaillement complexe à la fréquence de 1Hz. Ce facteur est un facteur géométriquement-dépendant. A contrario, l'exposant κ est un facteur type cellulaire-dépendant

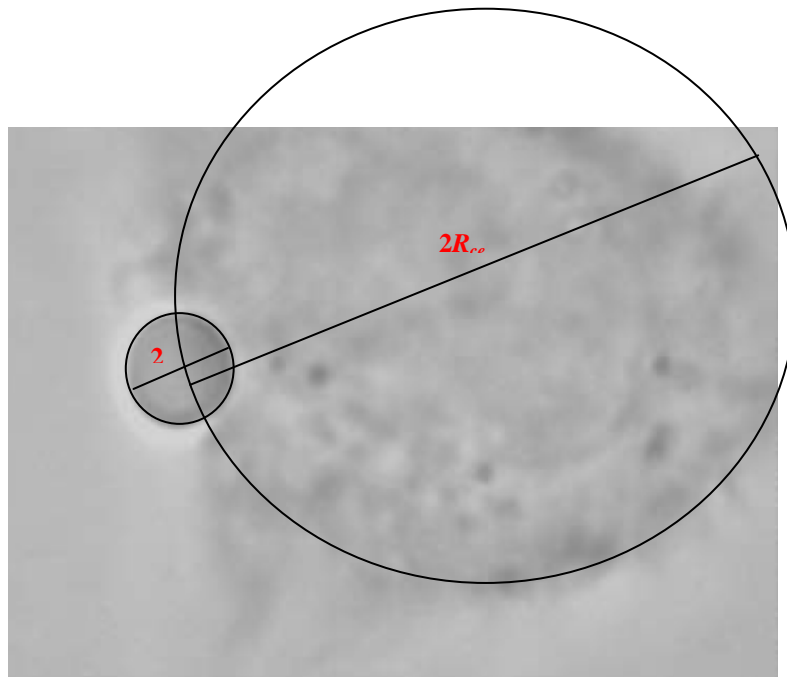


Figure 2.27 : estimation du rayon de courbure R_{cell} d'un macrophage alvéolaire de rat durant une expérience de pinces optiques.

Pour chacune des expériences, les données qui nous ont été communiquées sont : l'angle d'imprégnation apparent γ_{app} , le rayon de courbure de la cellule R_{cell} et le module à 1Hz G_0 , la hauteur sous bille de la cellule h_u et le rayon des billes $R=3,47\mu m$.

Nous avons déduit de ces données le rayon de courbure normalisé χ (Tab. 3 colonne 2), la hauteur sous bille normalisée ξ (Tab. 3 colonne 3) et l'angle d'imprégnation réel γ (Tab.3 colonne 4). Le préfacteur G_0 (Tab.3 colonne 5) correspondant au module apparent a été corrigé (Tab. 3 colonne 7) en calculant les valeurs α de la fonction de correction 2.50 (Tab. 3 colonne 6).

	χ	ξ	γ	G_0	α	G_0^{re}
<i>Bead-1</i>	9,29	0,26	44,00	153,30	0,33	463,83
<i>Bead-2</i>	5,47	0,20	27,00	283,69	0,19	1522,91
<i>Bead-3</i>	6,08	0,20	12,00	46,71	0,07	661,61
<i>Bead-7</i>	8,34	0,11	5,00	110,19	0,03	3697,54
<i>Bead-8</i>	8,34	0,09	16,00	136,08	0,13	1072,52
<i>Bead-9</i>	8,34	0,07	29,00	166,78	0,28	603,60
<i>Bead-4</i>	8,34	0,13	56,00	264,38	0,52	507,35
<i>Bead-5</i>	5,47	0,13	20,00	89,38	0,15	604,20
<i>Bead-6</i>	2,96	0,13	35,00	8,99	0,27	33,22
<i>Bead-10</i>	8,34	0,01	51,00	165,95	0,89	186,34
<i>Bead-11</i>	8,34	0,01	25,00	1060,52	0,38	2805,28
<i>Bead-12</i>	3,20	0,01	12,00	50,64	0,21	242,48

Tableau 2.3 : récapitulatif des paramètres obtenus durant l'expérience de pinces optiques sur des macrophages alvéolaires. Les colonnes 2 et 3 représentent le rayon de courbure et la hauteur sous bille normalisée. La colonne 4 représente l'angle d'imprégnation réel déduit de l'angle d'imprégnation apparent. G_0^{re} représente le module de cisaillement corrigé par la fonction de correction $\alpha(\chi, \gamma, \xi)$

Nous trouvons après correction une valeur moyenne du module de cisaillement complexe $G_0^{re}=1033\text{Pa}$ avec un écart moyen $\eta=537\text{Pa}$. Notons que cette plage de valeurs est proche du module élastique $G'=1200\pm 200$ trouvée par Smith et al. [SMITH2005] obtenue pour une expérience de microscopie à force atomique sur des macrophages alvéolaires de rat. Maksym et al.[MAKSYM2000] utilisant l'expérience de magnétocytométrie en régime dynamique entre 0.05Hz et 0.4Hz sur le même type cellulaire, trouve un module de cisaillement à 1Hz $G_0=827\text{Pa}$. Dans une gamme de fréquence plus élevée 0.05Hz à 50Hz, Balland et al.[BALLAND2006] durant une expérience de pinces optiques trouvent un $G_0=420\text{Pa}$ après une correction ne prenant en

compte que l'angle d'imprégnation. Cette valeur représente la moitié de celle obtenue en appliquant la correction développée dans ce travail.

Ainsi, grâce à la fonction de correction développée dans ce travail, nous uniformisons les résultats entre microscopie à force atomique, magnétocytométrie et pinces optiques.

II.6 Comparaison avec les résultats précédents.

Nous avons comparé les valeurs de la fonction de correction α issue de notre premier modèle, à celles de la solution analytique proposée par Laurent, [LAURENT2002]:

$$\alpha_{La}(\gamma) = \frac{4\sin^3(\gamma)}{3(3\sin^2(\gamma) + 2\cos(\gamma))} \quad (2.55)$$

Le tracé de la différence $\alpha_{La} - \alpha$ (Fig. 2.28) montre que la fonction de correction α_{La} donne une bonne correction de la rigidité apparente dans deux cas seulement: (i) pour les grandes valeurs de $h_u/2R$ (i.e. dans une configuration géométrique équivalente à un milieu semi-infini, et (ii) pour des petites valeurs de l'angle d'imprégnation γ avec un seuil supérieur autour de 30° .

Cependant cette différence augmente rapidement avec des petites valeurs de ξ c.-à-d. quand l'influence de l'épaisseur de la cellule ne peut plus être négligée. La figure 2.28 prouve que la fonction α_{La} tend à surestimer la valeur du module d'Young de la cellule.

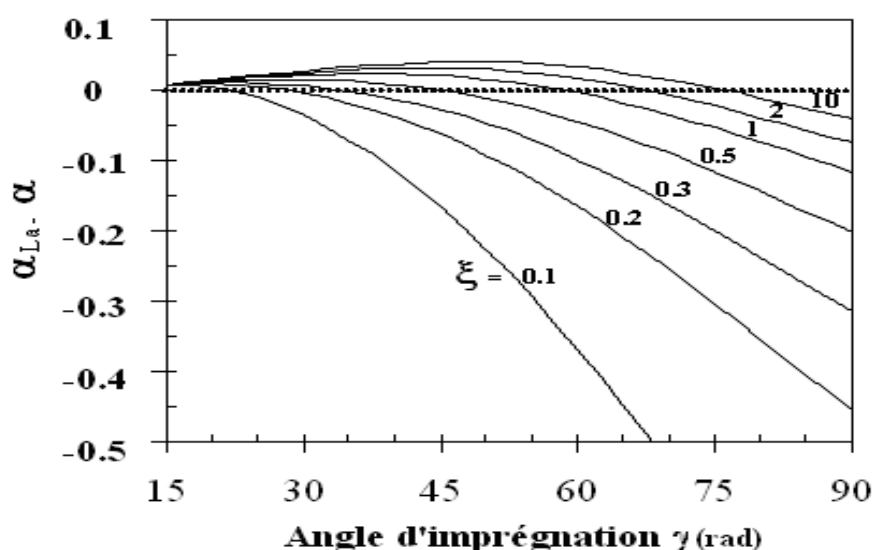


Figure 2.28: Comparaison entre la fonction de correction $\alpha(\gamma, \xi)$, proposée dans ce travail et $\alpha_{La}(\gamma)$ proposée par Laurent et al. [2002]. Les courbes représentent la différence des deux corrections pour différentes valeurs de ξ .

Cohérence entre les modules d'Young déterminés par une expérience de magnétocytométrie (MTC) et une expérience de pinces optiques (OT).

Dans Laurent et al. [LAURENT2002] les auteurs soulignent sans l'expliquer une différence importante entre les rigidités obtenues sur des cellules de même type sollicitées soit par magnétocytométrie (MTC) pour des couples de faible intensité ($E_{cell,La}^{MTC} = 34 Pa$) soit par pinces optiques ($E_{cell,La}^{OT} = 125 Pa$). Tirant bénéfice des fonctions de corrections établies précédemment par Ohayon et al. pour les expériences de magnétocytométrie [OHAYON2005] et considérant les résultats développés dans ce travail pour les pinces optiques, nous pouvons reconsidérer ces deux valeurs moyennes déterminées par Laurent et al. [LAURENT2002], de la façon suivante.

Les valeurs rapportées (Table 2.4, colonne 2) sont obtenues pour les valeurs géométriques de du système cellule/bille donnée dans la Table 2.4 (colonne 1). En utilisant la fonction de correction de Laurent et coll., [LAURENT2002] (Table 2.4, colonne 3) nous sommes remontés aux valeurs des rigidités apparentes des cellules (Table 2.7, colonne 4). En supposant une épaisseur de cellules $h = 3.66 \mu m$ (Table 2.4, colonne 5) et utilisant les fonctions de correction établies pour les expériences de MTC [OHAYON2005] et PO (Pincés Optiques), nous avons calculé (Table 2.4, colonne 6) les valeurs de correction α correspondant aux paramètres géométriques donnés au Table 2.4 (colonne 1). Cette

correction nous permet de remonter à des rigidités de la cellule de 48 Pa pour la MTC et 103 Pa pour PO (Table 2.4, colonne 7), i.e une diminution de moitié de la différence initialement reportée par Laurent et al. [LAURENT2002].

La différence restante encore pourrait être due à la variation de l'épaisseur de la cellule. En effet, remarquons que dans des expériences de pinces optiques, la bille est parfois située près de la frontière de la cellule, c.-à-d. dans un endroit où la cellule est relativement aplatie donc une épaisseur de cellule plus petite que dans des expériences de MTC où les billes sont plus probablement situées dans la partie centrale du corps de la cellule [Fig. 1 dans OHAYON2004]. Avec cette considération à l'esprit, nous avons considéré l'épaisseur de la cellule comme une inconnue du problème, recherchant les valeurs d'épaisseur qui donneraient un coefficient correcteur égal au rapport $\alpha=35/48$ dans le but d'obtenir un module d'élasticité de 48 Pa comme pour les données de MTC. De façon intéressante, nous avons constaté que cette contrainte est satisfaite pour une valeur d'épaisseur de cellule de $h=1.78\mu\text{m}$, ce qui peut être tout à fait conforme aux considérations expérimentales: i) cette valeur est plus petite que $3.66\mu\text{m}$ épaisseur de la cellule dans les expériences de MTC, là où des billes sont la plupart du temps situées dans une partie plus centrale (et ainsi plus épaisse) de la cellule.

géométrie cell/bille	Module d'Young corrigé $E_{cell,La}$	Fonction de correction utilisée. $\alpha_{La} = E_{ap} / E_{cell,La}$	Module apparent E_{ap}	épaisseur cellule h	Correction $\alpha = E_{ap} / E_{cell}$	Module D'Young Corrigé E_{cell}
$\gamma = 67^\circ$ $R = 2.25\mu\text{m}$	$E_{cell,La}^{MTC} = 34 Pa$	$\alpha_{La} = \frac{\sin^3 \gamma}{2}$	13 Pa	3.66 μm	$\alpha=0.263$	48 Pa
$\gamma = 65^\circ$ $R = 2.5\mu\text{m}$	$E_{cell,La}^{OT} = 125 Pa$	$\alpha_{La} = \frac{4 \sin^3 \gamma}{3(3 \sin^2 \gamma + 2 \cos \gamma)}$	35 Pa	3.66 μm	$\alpha=0.339$	103 Pa
				1.78 μm	$\alpha=0.729$	48 Pa

Table 2.4: Mise en cohérence des modules d'Young calculés par Laurent et al. [2002] lors d'une expérience de MTC et PO. MTC: magnetic twisting cytometry. PO: Pinces Optiques. $E_{cell,La}$, α_{La} : Module d'Young de la cellule et fonction de correction proposée par Laurent et al. . E_{ap} : Module d'élasticité apparent. h : épaisseur de la cellule. α , E_{cell} : fonction de correction et module d'Young intrinsèque.

II.7 DISCUSSION et CONCLUSIONS

Dans les travaux précédents utilisant les pinces optiques ou magnétiques [LAURENT2002, BALLAND2006, BALLAND2005] les modules apparents ont été corrigés en prenant en compte l'angle d'imprégnation. Ensuite, Hélène Karcher [KARCHER2003] a soulevé l'importance de l'épaisseur de la cellule, mais sans quantifier cette influence sur le module d'Young de la cellule sollicitée. Dans ce chapitre, nous avons développé deux modèles éléments finis permettant de prendre en compte les effets de la géométrie cellulaire. Ces géométries correspondent à des positions de billes sur la cellule représentatives des expériences de pinces magnétiques et optiques [BAUSCH1998, LAURENT2002, BALLAND2006, BALLAND2005]. Grâce à ces modélisations, nous avons ainsi pu développer une correction qui prend en compte plus finement les effets locaux de la géométrie de la cellule lors des expériences de pinces optiques et pinces magnétiques.

Plus précisément, nous avons prolongé et généralisé le calcul du module d'Young en établissant, dans une gamme des valeurs expérimentales des paramètres prise pour l'angle d'imprégnation de la bille dans la cellule γ , la hauteur de la cellule h et le rayon de la bille R , des expressions analytiques des fonctions permettant la correction du module d'Young apparent (appelées aussi « fonctions de correction » ou « coefficients correcteurs »). Dans cette analyse *étendue* des différentes géométries cellule/bille, nous avons déterminé en fonction des dimensions de la cellule, les valeurs critiques au-dessous desquelles de telles fonctions sont exigées pour corriger la valeur apparente du module d'élasticité. De façon intéressante, cette étude numérique a permis de mieux comprendre les écarts obtenus, jusque là mal expliqués, entre les rigidités obtenus sur un même type de cellule lorsque l'on utilise soit la technique expérimentale de magnétocytométrie, soit celle de pinces optiques [LAURENT2002, BALLAND2005].

Ainsi, nous avons fourni une analyse quantitative de la réponse mécanique de la cellule lors des expériences de pinces optiques et de pinces magnétiques. Dans un premier temps celle-ci permet d'affirmer si une correction de la rigidité apparente obtenue des résultats expérimentaux est nécessaire ; si elle l'est, en second lieu, nous proposons des fonctions de correction qui assurent une dérivation plus précise du module d'Young à partir des données expérimentales. Notons que cette évaluation peut être faite à partir des mesures de translation de la bille ou de rotation de cette dernière.

Considérant la cellule comme un matériau linéaire quasi-incompressible hyperélastique, notre analyse éléments finis montre que l'angle d'imprégnation de la bille γ et l'épaisseur sous bille normalisée ξ et χ paramètre de courbure sont les paramètres les plus importants pour établir les fonctions de correction.

Limitations des modèles présentés

Le travail développé dans les paragraphes précédents pointe bien l'influence des facteurs géométriques lors de la résolution du problème inverse de caractérisation du module d'Young par pinces optiques ou pinces magnétiques. Ce travail présente néanmoins quelques limitations. Ces limitations sont plus structurelle : a) non prise en compte l'anisotropie des cellules comme certains travaux l'ont montré Hu et al. [HU2004], le sens dans lequel était sollicitée la cellule influençait la réponse de la cellule. b) l'hétérogénéité de la cellule, nos modèles ne prennent pas en compte la présence des entités comme le noyau dont la présence influencerait la réponse de la cellule lors des expériences de pinces magnétiques et optiques. c) Enfin, Ohayon et Tracqui [OHAYON2004] ont montré l'influence du site d'adhésion au cours d'une expérience de magnétocytométrie.

Malgré ces limitations, cette étude reste originale puis qu'elle permet de renforcer l'applicabilité des techniques de pinces optiques et magnétiques en assurant une évaluation plus précise du module d'élasticité intrinsèque de la cellule dans des contextes différents. En particulier, les fonctions correctrices que nous avons établies peuvent être particulièrement appropriées quand une caractérisation précise des propriétés élastiques de la cellule est employée comme borne limite des pathologies cellulaires aussi bien qu'une caractérisation de l'efficacité de leur traitement [HUBMAYR1996].

TROISIEME CHAPITRE

Caractérisation des propriétés mécaniques à partir de l'analyse de la cinématique locale : Développement d'un outil de quantification du mouvement à partir d'une séquence d'images.

Résumé

Dans ce chapitre nous nous intéressons au problème, passionnant et complexe de l'estimation du mouvement. L'objectif est ici de proposer un outil simple et efficace permettant d'obtenir une cinématique locale des échantillons biologiques de façon non invasive. Notons que l'estimation du mouvement à partir des séquences vidéo est un problème mal posé (problème dit « d'ouverture »). Plusieurs approches ont été développées autour de ce thème de recherche. Dans la première partie de ce travail nous présentons les grands fondements de l'estimation du mouvement et les approches proposées. Dans la seconde partie, en nous inspirant des travaux de [LI1995 ; GAO2000 ; HILD2006] nous développons et proposons un algorithme original basé sur la corrélation d'images (ou mise en correspondance par blocs).

Nous validons ensuite, dans la troisième partie, cet algorithme sur des images de synthèse.

III.1 INTRODUCTION

Les techniques de micromanipulation présentées dans la section précédente ont la particularité d'apporter une information dépendante de la dimension de la sonde. De plus la réponse de la cellule adhérente est une réponse en général globale. Notons qu'au cours de ces expériences, l'échantillon est sollicité par une contrainte extérieure, il nous est ainsi difficile de caractériser ce qui pourrait être considéré comme un comportement non biaisé de la cellule. La question qui se pose est de savoir, si, durant les expériences de micromanipulation nous mesurons les propriétés intrinsèques de la cellule (élasticité) ou également des composantes actives générées en réponse à la sollicitation par l'activité des molécules telles que la polymérisation d'actine, de myosine ou de titine (contractilité).

Ces considérations ont incité les chercheurs à développer des approches leur permettant de caractériser les cinématiques locales observées de façon plus précise, et sans biais.

III.2 Estimation du mouvement : les fondements.

Les méthodes d'estimation du mouvement à partir d'une séquence d'images ont connu ces vingt dernières années des développements importants. Nous allons nous focaliser ici sur trois méthodes d'estimation du mouvement. La première méthode, dite méthode d'appariement de primitives, utilise des marqueurs présents dans l'image. La seconde utilise le développement limité de la fonction d'intensité lumineuse; elle est encore connue sous le terme de flot optique. La dernière technique, purement statistique se base sur les techniques de similarité ou corrélation. Pour ce champ de recherche récent, il n'existe aucune solution satisfaisante et générale pour les nombreux problèmes ouverts qu'il suscite [STILLER1999].

III.2.1. Mouvement réel, mouvement apparent et mouvement estimé

Les images 2D représentent la projection de scènes réelles 3D. Le mouvement observé est donc un mouvement apparent. Une image peut aussi représenter la coupe d'un objet 3D. Dans ce cas, le champ de mouvement observé à l'intérieur de cette coupe pourra représenter à la fois un déplacement dans le plan image et également la projection sur ce

plan d'un mouvement 3D. Le but de l'estimation de mouvement étant d'estimer le champ de mouvement 2D ou 3D à partir d'une séquence temporelle d'images 2D ou 3D, on doit différencier :

- Le mouvement réel ;
- le mouvement observé (apparent) ;
- le mouvement estimé.

Le mouvement réel anime la scène réelle, dans l'espace réel 3D. Ce mouvement réel est observé soit par l'œil humain, soit par un système de prise de vue. Souvent, le champ de mouvement réel n'est pas directement mesurable dans une séquence d'images 2D ou 3D si l'on s'appuie seulement sur l'intensité des pixels. Dans ce cas, on observe des changements de la distribution spatiale d'intensité lumineuse. Le mouvement ainsi perçu est appelé champ de mouvement apparent ou « flux optique ». Il est en général différent du champ réel de mouvement.

Le vecteur déplacement estimé correspond au déplacement dans le plan image ; il est donc déterminé à partir du champ de mouvement apparent. En optique, des différences entre le champ de vitesse estimé et le mouvement apparent peuvent exister si :

- Le gradient spatial d'intensité est trop faible.
- L'illumination de la scène varie.

III.2.2. Appariement de primitives

Dans une séquence d'image, on appelle primitive, des attributs géométriques facilement identifiables et discriminants tels que des points caractéristiques, des segments de droites, des coniques, des régions, etc. Les méthodes d'appariement reposent sur la recherche de primitives dans une séquence d'images, puis sur leur appariement [MAURER1993; ROHR2001].

Dans le cas général, le nombre et la répartition de ces primitives sont inconnus. Leur mise en correspondance repose sur le choix d'un critère de similarité locale qui est fonction des attributs attachés à chaque primitive (par exemple l'intensité pour un point caractéristique), et d'un critère global permettant de contraindre la recherche parmi les primitives présentes dans les images. Il est alors relativement facile de les apparier en opérant de proche en proche récursivement. En utilisant des marqueurs spécifiques, cette technique a permis le développement de l'extensométrie optique bidimensionnelle

[HIVER2001, ROTINAT2001, GARCIA2001]. Ainsi, ces primitives permettent, par la seule analyse des variations de leurs attributs caractéristiques, de déterminer les directions principales et les valeurs du champ de déformation, sans utiliser de schéma numérique pour la dérivation du champ de déplacement.



Figure. 3.1 : Différents motifs de grilles utilisés par les méthodes de suivi de marqueurs. [DOUMALIN2000]

Cependant, la détermination de champs de déplacements par cette technique présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, le marquage de la surface du matériau par un réseau de motifs géométriques peut altérer le comportement de l'objet durant l'essai. De plus, la réalisation d'un marquage est une opération longue qui nécessite une préparation minutieuse de la surface de l'objet. Le deuxième inconvénient est lié à la densité des motifs géométriques suivis fixés lors de la réalisation du marquage. Si celui-ci s'avère inadapté aux conditions d'essais, il est nécessaire de réaliser une nouvelle éprouvette et de recommencer l'expérience.

III.2.3 Méthodes différentielles

Aussi appelées flot optique, les méthodes différentielles introduites par Horn et Schunck [HORN1981 ;BRUHN2005] ont été initialement développées pour déterminer la vitesse de déplacement apparente d'une scène en mouvement par rapport à la caméra. Elles sont basées sur l'hypothèse de conservation de l'intensité lumineuse de tout point de la scène pendant leurs mouvements.

Si l'on pose $I(\mathbf{m}, t)$ l'intensité lumineuse du point image \mathbf{m} à l'instant t , l'estimation du mouvement entre les instants $t + \Delta_t$ et t revient à déterminer le vecteur déplacement \mathbf{d} tel que :

$$I(\mathbf{m} + \mathbf{d}, t + \Delta_t) = I(\mathbf{m}, t) + \mathbf{d} \nabla I(\mathbf{m}, t) + \Delta_t \frac{\partial I(\mathbf{m}, t)}{\partial t} \text{ avec } \nabla = \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial u} \\ \frac{\partial}{\partial v} \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

en introduisant le vecteur vitesse de déplacement $\boldsymbol{\eta} = \mathbf{d} / \Delta_t$, la conservation de l'intensité lumineuse conduit à l'équation contrainte du mouvement qui s'écrit :

$$\boldsymbol{\eta} \nabla I(\mathbf{m}, t) + \frac{\partial I(\mathbf{m}, t)}{\partial t} = 0 \quad (3.2)$$

Cette équation introduit une seule contrainte sur le vecteur vitesse, qui possède deux composantes. Cette indétermination est appelée *problème d'ouverture*. Une deuxième contrainte est donc nécessaire pour estimer complètement chaque vecteur mouvement.

De nombreuses solutions au problème d'ouverture ont été proposées et peuvent se classer en deux catégories : imposition de la régularité du flot optique et utilisation d'un modèle de déplacement. Dans le premier cas, la solution du flot optique dépend fortement de cette contrainte supplémentaire et tend à rendre difficile un choix objectif de celle-ci [YANG1992]. De plus, les méthodes numériques mise en œuvre pour cette méthode ne fonctionnent que pour des faibles déplacements. GALVIN et coll. [GALVIN1998] ont testé huit algorithmes de flot optique et concluent que la meilleure des méthodes conduit à une précision d'environ 0,1 pixel seulement.

III.2.4. Estimation du mouvement par corrélation d'images

Considérons deux images correspondant à deux états de déformation d'un objet déformable. Pour déterminer l'homologue d'un pixel de la première image dans la seconde, les méthodes par corrélation évaluent la ressemblance entre deux pixels en calculant un score de corrélation (ou critère de similarité) déterminé sur leur voisinage. Le pixel correspondant dans la deuxième image correspond à celui qui maximise cette mesure de ressemblance (figure 3.2). Le point et son voisinage, support de la mesure, définissent le **domaine de corrélation**.

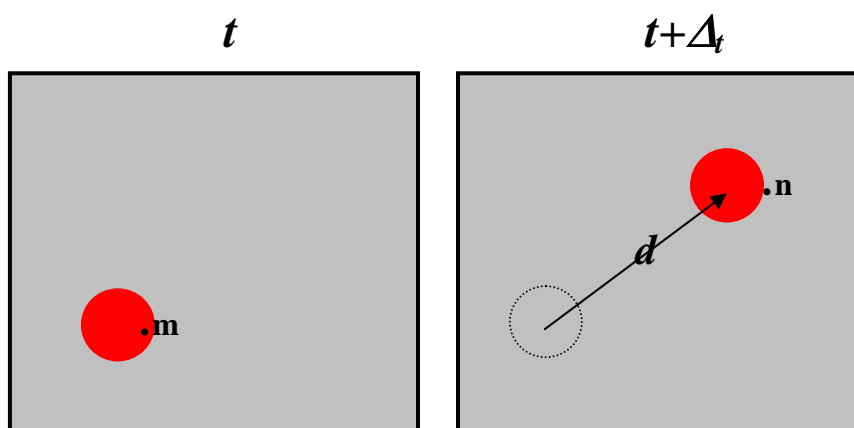


Figure. 3.2 : Le suivi de pixels par corrélation consiste à déterminer le vecteur déplacement d entre les positions m et n de deux domaines de pixels pris dans deux images acquises à deux instants différents. La position n du domaine de pixels au deuxième instant est déterminée par maximisation de la similarité du contenu des deux domaines via une mesure de corrélation.

L'intérêt majeur de cette classe de méthode réside dans la possibilité d'apparier tous les points d'une image ayant un correspondant dans l'autre image, pour peu que l'objet observé soit suffisamment texturé. La mise en correspondance par corrélation est donc d'utilisation plus simple, plus souple et moins coûteuse que les méthodes d'appariements de primitives. De plus, certains travaux sur la mise en correspondance précise par corrélation [SCHREIER2000 ; SUTTON2000 ; HILD2006] ont montré qu'il est possible d'atteindre une précision inférieure au pixel, ce qui surclasse les méthodes de type flot optique. Pour ces raisons, l'appariement par corrélation paraît être le meilleur choix car cette approche combine à la fois souplesse, simplicité d'utilisation et précision [YANG1992].

Les méthodes d'appariement de pixels par corrélation nécessitent le respect de trois contraintes pour pouvoir fonctionner :

Limite de la déformation locale apparente : la surface observée doit localement être similaire entre deux images à apparier pour présenter « suffisamment de similarité » vis-à-vis des mesures de corrélation ;

Contrainte de continuité : la surface doit être et rester au moins localement continue pour que les voisinages de deux points en correspondance soient similaires. En particulier,

la déformation de l'objet ne doit pas entraîner de rupture visible en surface, ou une hétérogénéité des déplacements ;

Contrainte lambertienne : la surface doit être et rester globalement lambertienne, c'est-à-dire que la luminance en tout point de cette surface doit être indépendante de la position d'observation et de sa déformation (dans le cas contraire, les reflets spéculaires des sources d'éclairage mettent en échec la plupart des méthodes surfaciques).

III.3 La corrélation d'images : les principes.

Nous avons vu ci-dessus que les méthodes d'appariement par corrélation reposent sur une mesure de similarité entre deux domaines de pixels à deux états différents de sollicitation de l'objet observé. Cela signifie que localement les domaines de pixels entre l'état initial et l'état déformé dans les images de l'objet sont eux-mêmes déformés. L'approche classique de la mise en correspondance par corrélation consiste alors à faire l'hypothèse que ces déformations des domaines de pixels sont négligeables, et donc à utiliser des fenêtres de corrélation de même géométrie (souvent carrés) entre tous les instants d'acquisition des images. Cette hypothèse conduit toutefois à une perte de précision dans l'appariement et l'on est alors amené à prendre en compte la transformation géométrique de chaque domaine entre les différents instants. Cet aspect est abordé dans la section suivante.

III.3.1 Approximation de la transformation locale

Entre les deux instants d'acquisition des images de l'objet, ce dernier peut avoir subi une déformation et un déplacement. La déformation de l'objet entraîne localement une distorsion de sa texture. Cela a pour conséquence de faire correspondre deux domaines de géométries différentes entre l'image de référence et l'image déformée. Nous noterons Φ la transformation matérielle qui relie des pixels m_i et n_i entre ces deux images :

$$n_i = \Phi(m_i) \quad (3.3)$$

Sans restreindre les applications envisagées, il est possible de connaître l'expression de la transformation matérielle Φ . Nous pouvons toutefois l'approcher localement car les domaines de corrélation sont de faibles dimensions.

Soit $\mathbf{m}_c = (u_c \ v_c)^T$ un point de l'image de référence, habituellement le centre du domaine de corrélation, et $\mathbf{m} = (u \ v)^T$ un point de ce domaine. En ce point \mathbf{m} , la transformation Φ s'écrit :

$$\Phi(\mathbf{m}) = \mathbf{m} + \psi(\mathbf{m}) \quad (3.4)$$

où $\psi(\mathbf{m})$ est le déplacement au point \mathbf{m} . En écrivant le développement limité de $\psi(\mathbf{m})$ au voisinage de \mathbf{m}_c , on obtient une expression Φ_c de Φ en fonction des variations locales de ψ aux différents ordres :

$$\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c) = \mathbf{m} + \psi(\mathbf{m}_c) + \left. \frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{m}} \right|_{\mathbf{m}_c} (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c) + \frac{1}{2} (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c)^T \cdot \left. \frac{\partial^2 \psi}{\partial \mathbf{m}^2} \right|_{\mathbf{m}_c} \cdot (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c) + o\left((\mathbf{m} - \mathbf{m}_c)^T \cdot (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c)\right) \quad (3.5)$$

Cette expression tronquée à différents ordres conduit à différentes approximations $\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c, \mathbf{p})$ de $\Phi(\mathbf{m})$ autour du point \mathbf{m}_c , définissant diverses variantes de la méthode de corrélation. Le vecteur \mathbf{p} est le vecteur des paramètres de l'approximation de la transformation locale.

➤ Ordre 0

A l'ordre 0, les variations de déplacement sur le domaine de corrélation sont supposées nulles. C'est la modélisation la plus simple qui conduit à considérer que Φ est localement une translation autour du point \mathbf{m}_c :

$$\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c, \mathbf{p}) = \mathbf{m} + \mathbf{t} \quad \text{avec } \mathbf{t} = \begin{pmatrix} t_u \\ t_v \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

Le vecteur \mathbf{p} des paramètres de l'approximation de la transformation locale à l'ordre 0 est égale au vecteur \mathbf{t} . [MURAT1997]

➤ Ordre 1

A l'ordre 1, la transformation est représentée par une translation et une déformation locale homogène sur le domaine de corrélation en supposant des variations linéaires du champ de déplacements. Cela conduit à une transformation affine d'expression :

$$\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c, \mathbf{p}) = \mathbf{m} + \mathbf{t} + \begin{pmatrix} a_u & a_v \\ b_u & b_v \end{pmatrix} \cdot (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c) \quad (3.7)$$

où les termes a_u, a_v, b_u, b_v paramètres des différents transformations (élongation, rotation, ...). Le vecteur \mathbf{p} est composé des six paramètres de l'approximation de la transformation locale à l'ordre 1 : $\mathbf{p} = (t_u, t_v, a_u, a_v, b_u, b_v)^T$ [FLEET1992 ;GERMAIN1999]

➤ Ordre 2

A l'ordre 2, la transformation est une expression quadratique à 12 paramètres [WAXMAN1985]:

$$\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c, \mathbf{p}) = \mathbf{m} + \mathbf{t} + \begin{pmatrix} a_u & a_v \\ b_u & b_v \end{pmatrix} \cdot (\mathbf{m} - \mathbf{m}_c) + \begin{pmatrix} a_{uv}(u-u_c)(v-v_c) + a_{uu}(u-u_c)^2 + a_{vv}(v-v_c)^2 \\ b_{uv}(u-u_c)(v-v_c) + b_{uu}(u-u_c)^2 + b_{vv}(v-v_c)^2 \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

III.3.2. Coefficients de corrélation

Les méthodes d'appariement par corrélation sont basées sur une mesure de similarité entre deux domaines de pixels. Afin de rendre cet appariement le plus discriminant possible, il est préférable d'exploiter de grands domaines de corrélation. Cependant, non seulement les temps de calcul deviennent élevés, mais l'hypothèse d'homogénéité de la déformation sur le domaine est mise en défaut. Il y a donc un compromis à faire pour la taille du domaine de corrélation. Généralement, ce choix est guidé par l'expérience.

Appelons \mathbf{m}_c un pixel de l'image I de référence, $V(\mathbf{m}_c)$ l'ensemble des N pixels voisins du point \mathbf{m}_c , et I' l'image déformée. Nous notons \mathbf{p} le vecteur des paramètres de l'approximation de la transformation locale autour du point \mathbf{m}_c , c'est-à-dire selon l'équation (3.6), (3.7) ou (3.8). Le point \mathbf{m} de l'image I a pour homologue le point $\Phi_c(\mathbf{m}, \mathbf{m}_c, \mathbf{p})$ dans l'image déformée I' . Tous les critères de corrélation C que nous allons présenter peuvent alors se formuler selon l'équation suivante :

$$C(\mathbf{m}_c, \mathbf{p}) = \sum_{\mathbf{m}_i \in V(\mathbf{m}_c)} \mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}) \quad (3.9)$$

Les différents critères de corrélation se différencient dans l'expression de la fonctionnelle $\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})$. Nous allons passer en revue les quatre expressions des critères

classiques, dénotés SSD, ZSSD, NCC et ZNCC [ASCHWANDEN1992, FAUGERAS1993].

➤ **Critère SSD (Somme des différences au carré)**

La mesure Sum of Squared Differences (SSD) est définie par l'équation (3.9) dont la fonctionnelle $\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})$ a pour expression :

$$\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}) = [I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})) - I_1(\mathbf{m}_i)]^2 \quad (3.10)$$

Ce critère correspond au carré de la norme I_2 évaluée sur les N points du voisinage de \mathbf{m}_c , entre les fonctions I_1 et I_2 correspondant respectivement à l'image de référence et à l'image déformée. Notons que deux domaines de corrélation identiques annulent ce critère.

➤ **Critère ZSSD (moyenne nulle de la somme des différences au carré)**

La version centrée de SSD est le critère Zero mean Sum of Squared Differences (ZSSD). Elle est définie par l'équation (3.9) dont la fonctionnelle $\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})$ a pour expression :

$$\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}) = \left[\left(I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})) - \bar{I}_2 \right) - \left(I_1(\mathbf{m}_i) - \bar{I}_1 \right) \right]^2 \quad (3.11)$$

où \bar{I}_1 et \bar{I}_2 sont les niveaux de gris moyens respectivement sur les domaines de corrélation de l'image de référence et de l'image déformée, et ont pour expression :

$$\bar{I}_1 = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{m}_i \in V(\mathbf{m}_c)} I_1(\mathbf{m}_i) \quad \text{et} \quad \bar{I}_2 = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{m}_i \in V(\mathbf{m}_c)} I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})) \quad (3.12)$$

où N est le nombre de pixels de $V(\mathbf{m}_i)$. Notons que deux domaines de corrélation identiques à une valeur additive k près annulent ce critère.

➤ **Critère NCC (Corrélation croisée normalisée)**

La mesure Normalized Cross Correlation (NCC) est définie par l'équation (3.9) dont la fonctionnelle $\mathcal{E}(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})$ a pour expression :

$$\varepsilon(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}) = \frac{I_1(\mathbf{m}_i) \cdot I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}))}{\sum_{\mathbf{m}_j \in V(\mathbf{m}_c)} (I_1(\mathbf{m}_j))^2 \sum_{\mathbf{m}_j \in V(\mathbf{m}_c)} (I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_j, \mathbf{p})))^2} \quad (3.13)$$

A la différence des deux critères précédents, celui-ci prend la valeur unité lorsque les deux domaines de corrélation sont identiques à un facteur multiplicatif non nul près.

➤ **Critère ZNCC (moyenne nulle de la corrélation croisée normalisée)**

Le critère Zero mean Normalized Cross Correlation (ZNCC) est défini par l'équation (3.9) avec une fonctionnelle $\varepsilon(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})$ qui a pour expression :

$$\varepsilon(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p}) = \frac{(I_1(\mathbf{m}_i) - \bar{I}_1) \cdot (I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_i, \mathbf{p})) - \bar{I}_2)}{\sum_{\mathbf{m}_j \in V(\mathbf{m}_c)} (I_1(\mathbf{m}_j) - \bar{I}_1)^2 \sum_{\mathbf{m}_j \in V(\mathbf{m}_c)} (I_2(\Phi_c(\mathbf{m}_c, \mathbf{m}_j, \mathbf{p})) - \bar{I}_2)^2} \quad (3.14)$$

où \bar{I}_1 et \bar{I}_2 sont les niveaux de gris moyens respectivement sur les domaines de corrélation de l'image de référence et de l'image déformée. La soustraction de chaque niveau de gris par leur moyenne sur leur domaine respectif permet de rendre ce critère invariant à une valeur additive près des niveaux de gris d'un des deux domaines. De plus, ce critère est, comme le critère NCC, invariant à un facteur multiplicatif non nul près des niveaux de gris d'un des deux domaines. Cette propriété rend ce critère particulièrement robuste aux changements d'illumination de l'objet observé entre l'image de référence et l'image déformée.

III.3.3. Techniques d'estimation de la transformation locale

Le problème de l'estimation des paramètres de la transformation locale passe par la résolution de problèmes de minimisation de la forme :

$$\mathbf{p} = \arg \min_{\mathbf{p}} C(\mathbf{m}_c, \mathbf{p}) \quad (3.15)$$

où le vecteur de paramètres \mathbf{p} est celui du modèle choisi de transformation locale, et C un critère de corrélation. Les deux critères C_{SSD} et C_{ZSSD} s'expriment sous la forme d'une somme d'erreurs quadratiques. On peut donc utiliser une méthode de minimisation telle que celle de LEVENBERG-MARQUARDT [LEVENBERG1944]. En revanche, les critères CNCC et CZNCC ne s'expriment pas sous cette forme, et nécessitent donc

l'utilisation d'une technique d'optimisation de fonction objective telle que la méthode de descente du gradient ou la méthode du gradient conjugué.

Ces méthodes numériques nécessitent la connaissance d'une estimée initiale de chacun des paramètres à calculer, notamment la position approximative de l'appariement (c'est-à-dire une connaissance des paramètres de translation t_u et t_v du modèle de la transformation locale utilisé). Cette dernière peut-être obtenue en utilisant une méthode classique d'appariement par corrélation, comme la recherche bidimensionnelle en coordonnées entières dans une région de l'image suffisamment grande pour être certain qu'elle contient l'appariement. L'estimation de ce dernier est alors le point qui maximise la mesure de ressemblance.

III.4. Méthode développée

La méthode que nous proposons est basée sur la corrélation d'images utilisant le critère de corrélation C_{ZNCC} . La stratégie de recherche est proche de l'algorithme d'élimination successive proposée par Li [LI1995] et Gao [GAO2000].

Soit une paire d'images successives prises aux temps t et $t+\Delta t$, notées en *Image 1* et *Image 2* respectivement. Nous considérons une petite fenêtre de recherche *Wind1* dans *Image 1* (Fig.3.2). Le but de l'algorithme est de trouver la fenêtre *Wind2** dans *Image 2* maximisant la ressemblance avec *Wind1*, i.e., la position à laquelle *Wind1* s'est déplacé durant le temps Δt . Pour cela, *Wind1* est comparé aux autres fenêtres du même voisinage (couverture fine) *Neigh2* dans *image 2* (Fig. 3.2). *Neigh2* est aussi appelée région d'intérêt. Pour chaque fenêtre *Wind2*, nous calculons sa corrélation avec *Wind1*. La fenêtre *Wind2** ayant le meilleur score de corrélation est gardée comme fenêtre résultat.

Si nous désignons \mathbf{I}_{w1} la matrice d'intensité (de niveau de gris) de *Wind1*, et \mathbf{I}_{w2} celle de *Wind2* dans la région d'intérêt, on a:

$$\mathbf{I}_{w1} = (I_t^{ij}) = I_t(i, j) \quad \mathbf{I}_{w2} = (I_{t+\Delta t}^{ij}) = I_{t+\Delta t}(i+u, j+v) \quad (3.19)$$

où l'entier $I_t(i,j)$ définit la valeur de niveau de gris au temps t du pixel situé à (i,j) dans *Image 1*, tandis que $I_{t+\Delta t}(i+u, j+v)$ définit le niveau de gris situé à $(i+u, j+v)$ dans *Image 2*, à $t+\Delta t$.

Pour chaque fenêtre $Wind1$, $Wind2^*$ maximise la mesure de corrélation ainsi:

$$C(I_{W1}, I_{W2^*}) = \max_{(u^*, v^*)/ROI} \{C(I_{W1}, I_{W2})\} \quad (3.20)$$

où

$$I_{W2^*} = (I_{t+\Delta t}^{ij}) = I_{t+\Delta t}(i+u^*, j+v^*) \quad (3.21)$$

et (u^*, v^*) représente les deux composantes inconnues du vecteur déplacement $w^*(u^*, v^*)$.

Considérons deux matrices I_{W1} et I_{W2} de dimension (N, M) . La fonction de corrélation $C_V(.,.)$ que nous choisissons pour chaque paire d'images est la *CZNC*.

$$C_V(I_{W1}, I_{W2}) = \frac{\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [I_t^{ij} - \bar{I}_t] [I_{t+\Delta t}^{ij} - \bar{I}_{t+\Delta t}]}{\sqrt{\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [I_t^{ij} - \bar{I}_t]^2 [I_{t+\Delta t}^{ij} - \bar{I}_{t+\Delta t}]^2}} \quad (3.22)$$

où \bar{I}_t et $\bar{I}_{t+\Delta t}$ représentent les valeurs moyennes respectives de I_t et $I_{t+\Delta t}$ définies comme:

$$\bar{I}_{W1} = \frac{\sum_{ij} I_t^{ij}}{M \times N} \quad \bar{I}_{W2} = \frac{\sum_{ij} I_{t+\Delta t}^{ij}}{M \times N} \quad (3.23)$$

Comme avec la plupart des algorithmes de corrélation, nous devons déterminer une stratégie de recherche. Le point crucial est de déterminer efficacement la taille de la région d'intérêt dans la deuxième image (*Image 2*) afin de minimiser les temps de calcul de l'algorithme. L'idée de base est que pour des petits déplacements, il faut considérer des zones d'intérêt plus petites tandis que pour des déplacements plus grands, il faudrait des zones d'intérêt plus larges. L'inconvénient des zones d'intérêt larges est la probabilité plus importante d'obtenir des solutions non significatives. Ce dilemme peut être résolu en jouant sur la taille de la fenêtre (bloc) de recherche $Wind1$.

III.4.2. Optimisation de la couverture ou Zone d'Intérêt (ZI).

Pour une fenêtre rectangulaire $Wind1$ de taille $(si1 \times si2)$ centrée en (X_t^{kl}, Y_t^{kl}) dans *Image 1*, nous définissons une zone d'intérêt (ZI) centrée en $(X_{t+\Delta t}^{kl}, Y_{t+\Delta t}^{kl})$ dans *Image 2*, de taille $((si1 + (ka \times si1)) \times (si2 + (ka \times si2)))$, où ka est un facteur d'échelle ($ka \geq 1$). Nous commençons la recherche de la fenêtre cible en considérant une ZI deux fois plus large que la fenêtre $Wind1$ ($ka=1$). Si l'entropie au rang $ka+1$ est supérieure à l'entropie au rang ka on continue la boucle en passant à une couverture plus grande ($ka \rightarrow ka+1$).

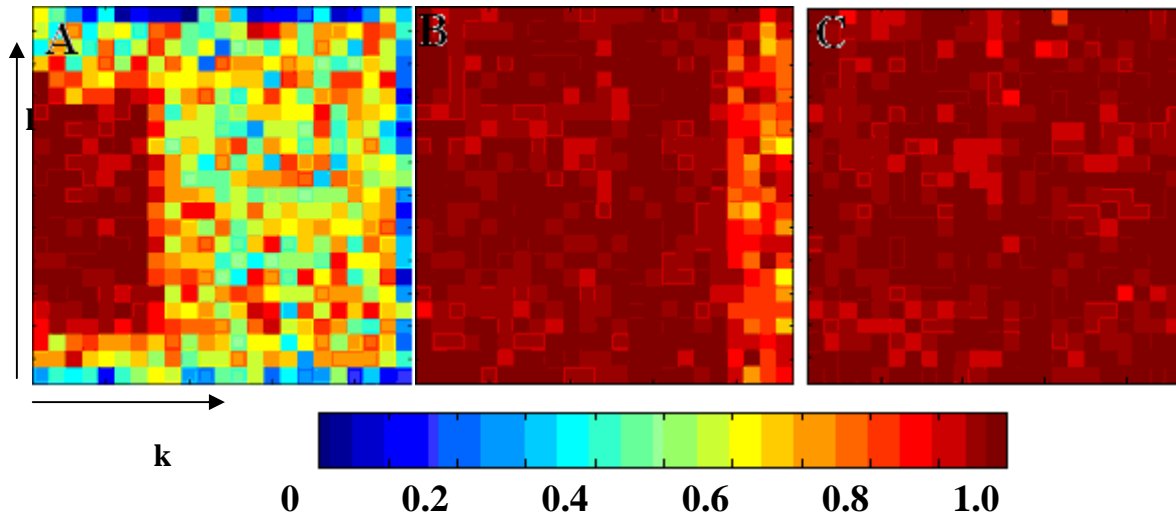


Figure. 3.5 : Evolution de la mesure de corrélation en fonction du facteur d'échelle de la zone d'intérêt lors de l'expérience de traction. Pour un facteur $ka=1$ (A), la recherche n'est optimale que pour une petite fraction du carré. En (B) le suivi du mouvement n'est pas optimisé dans la fraction du bord droit. Corrélations optimales en (C).

III.4.3. Détermination des champs de déplacements et de déformations.

Pour chaque fenêtre trouvée $Wind2^*$, centrée en $(X_{t+\Delta t}^{kl}, Y_{t+\Delta t}^{kl})$ et sa fenêtre de référence associée $Wind1$ centrée en (X_t^{kl}, Y_t^{kl}) au temps t , le champ de déplacement $w_{t,t+\Delta t}^{kl}$ entre t et $t+\Delta t$ est donné par:

$$w_{t,t+\Delta t}^{kl} = \begin{pmatrix} u_{t,t+\Delta t}^{kl} \\ v_{t,t+\Delta t}^{kl} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} X_{t+\Delta t}^{kl} - X_t^{kl} \\ Y_{t+\Delta t}^{kl} - Y_t^{kl} \end{pmatrix} \quad (3.24)$$

Sous l'hypothèse des petites déformations, on peut évaluer les composantes du tenseur des petites déformations entre deux images successives comme:

$$\varepsilon_{xx,t+\Delta t} = \frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial x} \quad \varepsilon_{yy,t+\Delta t} = \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial y} \quad \varepsilon_{xy,t+\Delta t} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial y} + \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial x} \right) \quad (3.25)$$

Numériquement, on peut calculer ces dérivées en utilisant des différences finies centrées.

$$\varepsilon_{xx,t+\Delta t}^{kl} = \frac{u_{t,t+\Delta t}^{(k+1)l} - u_{t,t+\Delta t}^{(k-1)l}}{X^{(k+1)l} - X^{(k-1)l}} \quad \varepsilon_{yy,t+\Delta t}^{kl} = \frac{v_{t,t+\Delta t}^{k(l+1)} - v_{t,t+\Delta t}^{k(l-1)}}{Y^{k(l+1)} - Y^{k(l-1)}} \\ \varepsilon_{xy,t+\Delta t}^{kl} = \frac{1}{2} \left(\frac{u_{t,t+\Delta t}^{k(l+1)} - u_{t,t+\Delta t}^{k(l-1)}}{Y^{k(l+1)} - Y^{k(l-1)}} + \frac{v_{t,t+\Delta t}^{(k+1)l} - v_{t,t+\Delta t}^{(k-1)l}}{X^{(k+1)l} - X^{(k-1)l}} \right) \quad (3.26)$$

Plus généralement, comme l'objet de la cinématique est la description du mouvement des corps dans l'espace-temps et ce de façon indépendante des causes et des lois qui les régissent, celle-ci peut se limiter à l'étude de l'application $\Phi_{t_0,t}$ qui, à chaque instant t , associe la position de chaque point matériel M du continu. En supposant connue une configuration de référence C_0 prise à un instant t_0 , dans laquelle la position de M est notée \mathbf{X} et en notant C_t la configuration courante (à l'instant t) dans laquelle la position de M est notée \mathbf{x} , l'application $\Phi_{t_0,t}$ s'écrit :

$$\begin{aligned} \Phi_{t_0,t} : C_0 &\rightarrow C_t \\ \mathbf{X} &\mapsto \mathbf{x} \end{aligned} \quad (\text{R. 3.1})$$

Les variables $\mathbf{X} = X_i \mathbf{e}_i$ et t , respectivement associées à l'espace et au temps, sont appelées les variables de Lagrange. Ici \mathbf{e}_i ($i=1,2,3$) représente la base cartésienne. L'application $\Phi_{t_0,t}$ représente la description Lagrangienne (\mathbf{L}) du mouvement et caractérise la transformation d'un milieu continu, à un instant t fixé, entre une configuration initiale C_0 et une configuration courante C_t . Comme en physique il est courant de confondre une application avec sa valeur prise en un point, nous écrivons $\mathbf{x} = \mathbf{x}(\mathbf{X}, t) = x_i(\mathbf{X}, t) \mathbf{e}_i$. Si pour suivre la trajectoire d'un point, on observe la différence de position entre deux configurations, alors l'introduction du déplacement $\mathbf{w}(\mathbf{X}, t)$ d'une particule entre les configurations C_0 et C_t permet d'écrire la transformation sous la forme

$$\mathbf{x}(\mathbf{X}, t) = \mathbf{X} + \mathbf{w}(\mathbf{X}, t) \quad (3.27)$$

Considérons la transformation d'un bipoint de mesure infiniment petite défini par $d\mathbf{X}$ dans C_0 et $d\mathbf{x}$ dans C_t . En mécanique des milieux continus, on se limite à l'application linéaire tangente définie par la matrice jacobienne $\mathbf{F}_{t_0,t}$ pour définir localement la transformation de la configuration initiale C_{t_0} à la configuration courante C_t :

$$d\mathbf{x} = \mathbf{F}_{t_0,t}(\mathbf{X},t) \cdot d\mathbf{X} \quad (3.28)$$

où le tenseur gradient de la transformation $\mathbf{F}_{t_0,t}(\mathbf{X},t)$ a pour composantes $F_{ij} = dx_i/dX_j$ dans la base $e_i \otimes e_j$:

$$F_{t_0,t} = \begin{pmatrix} \frac{\partial x_1}{\partial X_1} & \frac{\partial x_1}{\partial X_2} & \frac{\partial x_1}{\partial X_3} \\ \frac{\partial x_2}{\partial X_1} & \frac{\partial x_2}{\partial X_2} & \frac{\partial x_2}{\partial X_3} \\ \frac{\partial x_3}{\partial X_1} & \frac{\partial x_3}{\partial X_2} & \frac{\partial x_3}{\partial X_3} \end{pmatrix}_{e_i \otimes e_j} \quad (3.29)$$

Il est possible à partir du traitement de toute la séquence d'images, effectuer par étapes et toujours entre deux configurations successives, de référer le mouvement final par rapport à une configuration initiale. En effet, notons que la matrice jacobienne d'une composée de fonctions est le produit des matrices jacobienes de ces fonctions. Cette propriété permet de décomposer le gradient de la transformation sous forme de produits simplement contractés (Fig. suivante)

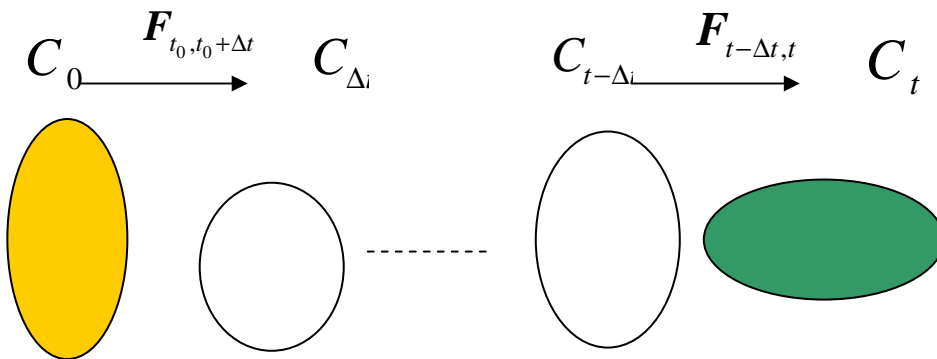


Figure 3.6 : décomposition du gradient de la transformation $\mathbf{F}_{t_0,t}$ entre t_0 et t .

$$C_{t_0,t_0+\Delta t} \rightarrow C_{t_0+\Delta t,t_0+2\Delta t} \rightarrow \dots \rightarrow C_{t-2\Delta t,t-\Delta t} \rightarrow C_{t-\Delta t,t} \quad (3.30)$$

$$\Phi_{t_0,t} = \Phi_{t_0,t_0+\Delta t} \circ \Phi_{t_0+\Delta t,t_0+2\Delta t} \circ \dots \circ \Phi_{t-2\Delta t,t-\Delta t} \circ \Phi_{t-\Delta t,t}$$

D'où par simple application des propriétés de la matrice jacobienne,

$$\mathbf{F}_{t_0,t} = \mathbf{F}_{t-\Delta t,t} \bullet \mathbf{F}_{t-2\Delta t,t-\Delta t} \bullet \dots \bullet \mathbf{F}_{t_0+\Delta t,t_0+2\Delta t} \bullet \mathbf{F}_{t_0,t_0+\Delta t} \quad (3.31)$$

Il existe plusieurs tenseurs du second ordre décrivant les déformations locales d'un corps. Dans ce travail nous nous limiterons au tenseur des déformations de Green-Lagrange défini par :

$$\mathbf{E}_{t_0,t} = \frac{1}{2} (\mathbf{C}_{t_0,t} - \mathbf{I}) \quad (3.32)$$

où \mathbf{C} est le tenseur droit de dilatation de Cauchy-Green droit défini par :

$$\mathbf{C}_{t_0,t} = (\mathbf{F}_{t_0,t})^T \bullet \mathbf{F}_{t_0,t} \quad (3.33)$$

où $(\mathbf{F}_{t_0,t})^T$ est la transposée du tenseur $\mathbf{F}_{t_0,t}$.

III.5. Résultats et validations sur *cas théoriques simulés*

Afin de valider et de tester notre algorithme de corrélation d'images, nous avons construit une succession de paires d'images texturées de déformation d'un solide élastique, ces images représentent des expériences classiques en mécanique des milieux continus. Pour chacune de ces expériences, nous avons l'image avant déformation *Image 1* et l'image déformée *Image 2*. Les images déformées sont calculées à l'aide du logiciel COMSOL MULTIPHYSICS implémentant la méthode des éléments finis (MEF).

III.5.1. Expérience de traction

La première expérience de validation est une expérience de traction. Pour la simuler par la MEF, considérons les points (x,y) d'un carré texturé où $(0 \leq x \leq 1; 0 \leq y \leq 1)$. Nous imposons sur chaque nœud de notre géométrie le champ de déplacement (Fig.3.7.A et 3.7.B)

$$u(x,y) = 0.1 x \quad (3.34)$$

Ainsi défini, le bord gauche est fixe (i.e. $u(0,y) = 0$). Aucune condition n'est imposée sur les autres bords. Le carré texturé se comporte comme un milieu élastique avec un coefficient de poisson $\nu=0.49$ et un module d'Young $E=1500\text{Pa}$.

Pour cette expérience, notre code reconstitue bien le champ de déplacement u . Les champs de déplacements sont quasi similaires comme le montre les figures (Fig.3.7.C et 3.7.D) où les vecteurs déplacements sont reconstitués. La seconde composante du déplacement déduit de cette expérience est très bien estimée. Notons que l'application des filtres moyennés consiste à rajouter des lignes sur les bords. Ces lignes et colonnes ne sont pas à considérer. Pour les valeurs bien corrélées et principalement les points centraux de nos fenêtres, l'erreur maximale est au plus égale à la taille d'un pixel.

Les champs des déformations obtenus sont aussi bien reconstruits avec une erreur sur les fenêtres extrêmes qui se prolonge sur les lignes et les colonnes ; ceci est dû aux méthodes de dérivation discrètes utilisées.

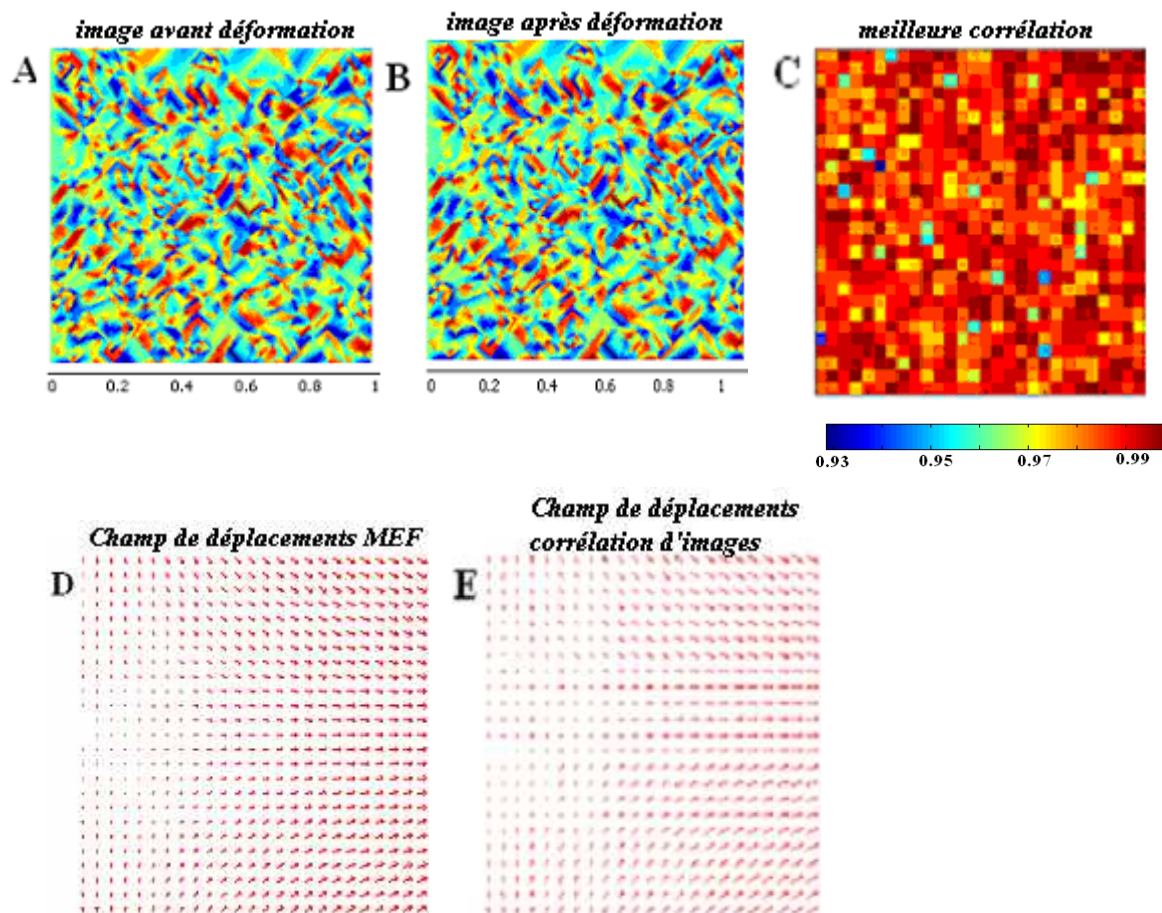
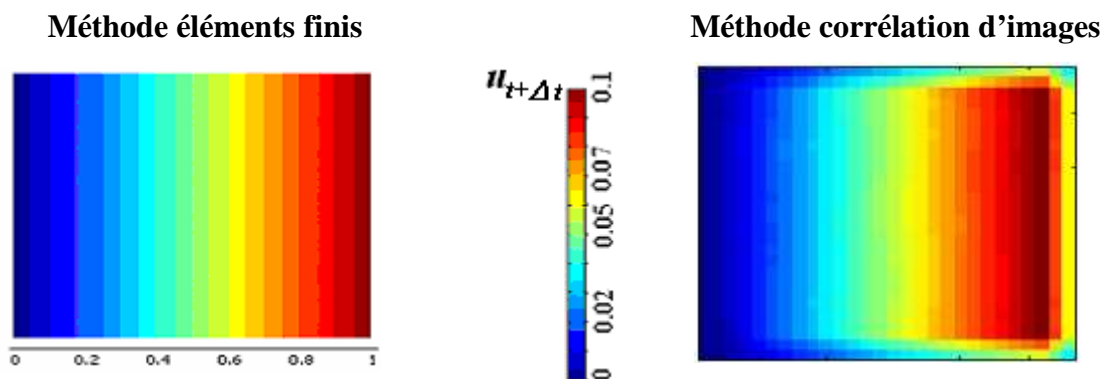


Figure 3.7 : Comparaison entre les champs de déplacement théoriques (cible) obtenus à l’aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de flot optique dans le cas de la simulation de l’expérience de traction. Notre code est appliqué à l’image avant déformation (A) et l’image après déformation (B). La fenêtre de recherche optimale a pour taille $s_i=s_{i1}=s_{i2}=10$ pixels. La région d’intérêt est optimisée pour un facteur $k_a=3$. La figure C présente les scores de corrélation pour les différentes fenêtres. La figure D représente le champ de déplacements déduit de la résolution du problème direct (éléments finis). On note une parfaite similitude avec le champ déduit du problème inverse :figure E.



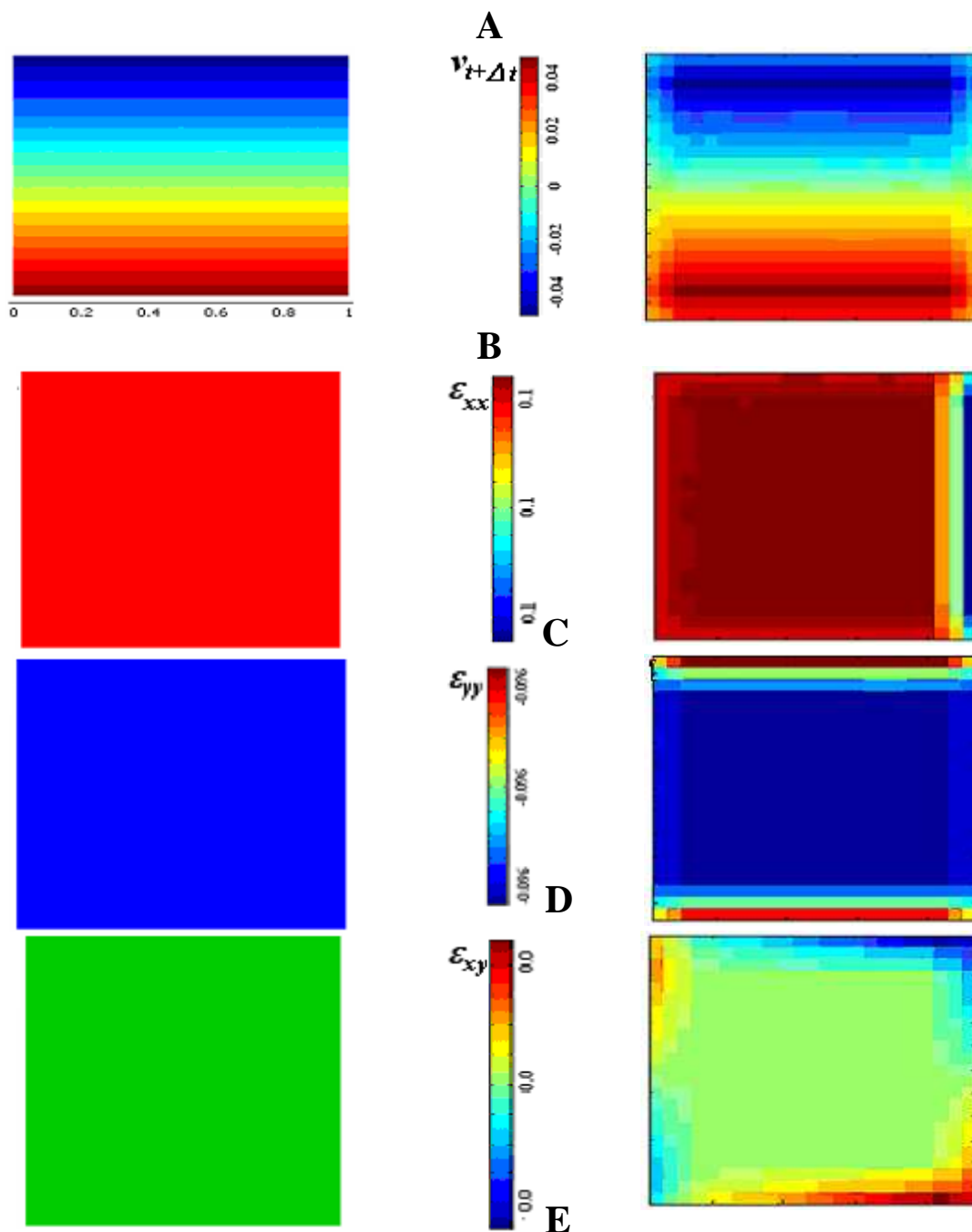


Figure 3.8 : Comparaison entre les résultats théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de corrélation d'images dans le cas de la simulation de l'expérience de traction. Les lignes (A), (B), (C), (D) et (E) représentent respectivement la composante horizontale u du champ des déplacements, la composante verticale v du champ des déplacements, la déformation ϵ_{xx} , la déformation ϵ_{yy} et le cisaillement ϵ_{xy} , déduite de la résolution du problème par éléments finis (à gauche), déduite de la corrélation d'images (à droite). Notons que les deux premières (dernières) lignes et les colonnes sur les bords sont des redondances consécutives à l'application du filtre moyenneur.

III.5.2. Expérience de cisaillement

La seconde expérience de validation que nous allons considérer est une expérience de cisaillement. Considérons des points (x,y) d'un carré texturé où $(0 \leq x \leq 1; 0 \leq y \leq 1)$. Sur ce carré, nous imposons sur chaque nœud de notre géométrie le champ de déplacement (Fig.3.9.A et 3.9.B)

$$u(x,y)=0.1 y \text{ et } v(x,y)= 0.1 x \quad (3.35)$$

Ainsi défini, le point inférieur gauche est fixe (i.e. $u(0,0)= 0$). Aucune condition n'est imposée sur les autres bords. Le carré texturé se comporte comme un milieu élastique avec un coefficient de poisson $\nu=0.49$ et un module d'Young $E=1500\text{Pa}$.

Pour cette expérience, notre code reconstitue bien les deux champs de déplacement u et v . Les champs de déplacements sont quasi similaires comme le montre les figures (Fig.3.9.C et 3.9.D) où les vecteurs déplacements sont reconstruits. Les deux composantes du déplacement de cette expérience sont très bien reconstituées au pixel près. Notons que pour les champs des déplacements notre code n'optimise pas sa recherche pour les fenêtres situées au bord du domaine. Pour les valeurs bien corrélées l'erreur maximale est égale à la taille d'un pixel.

Les champs des déformations sont aussi bien reconstruits avec une erreur sur les fenêtres extrêmes qui se prolonge sur lignes et colonnes, toujours du fait des méthodes de dérivation discrète utilisée.

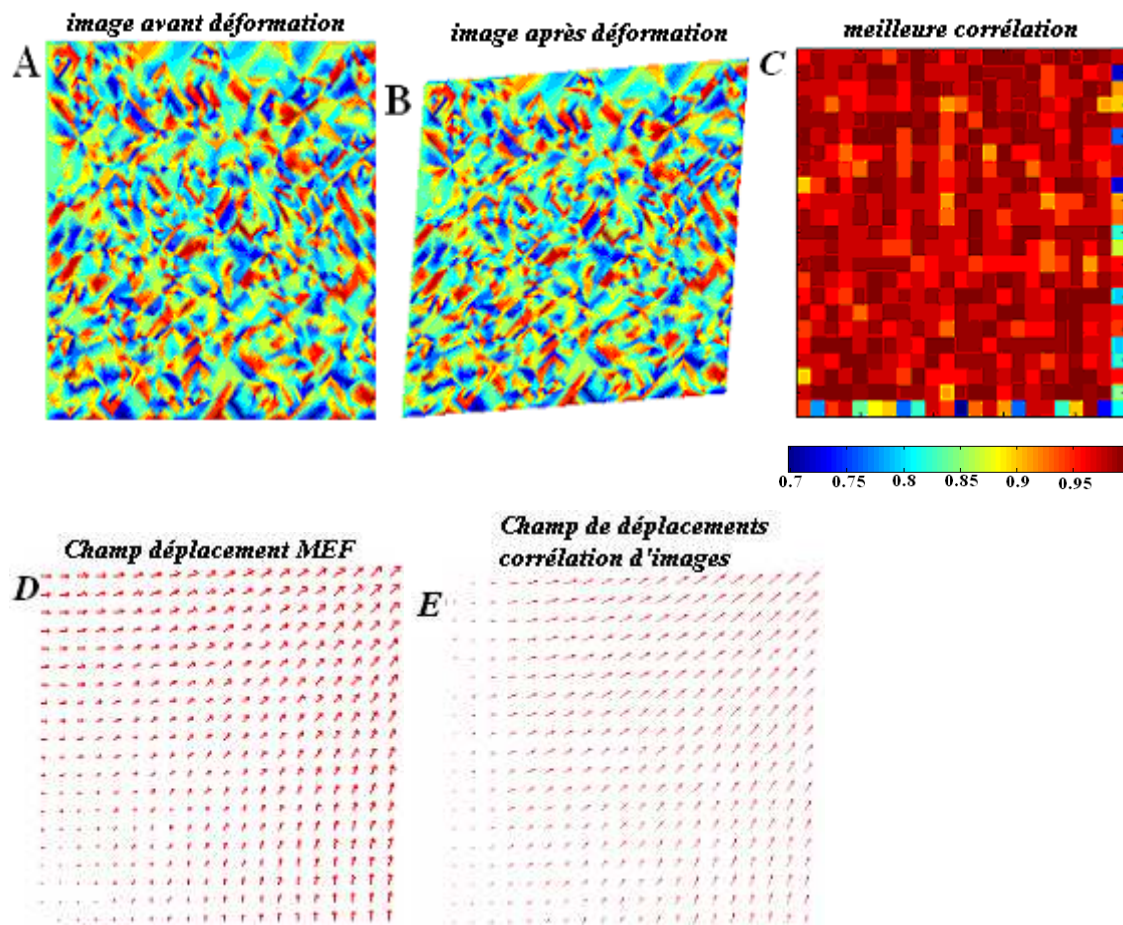
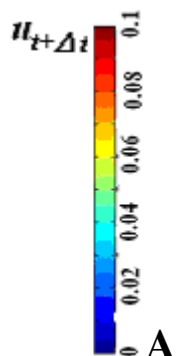
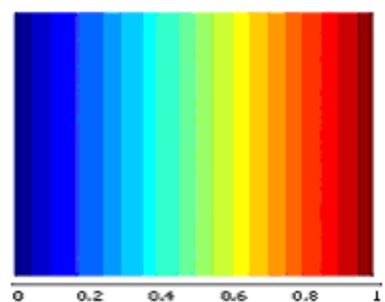
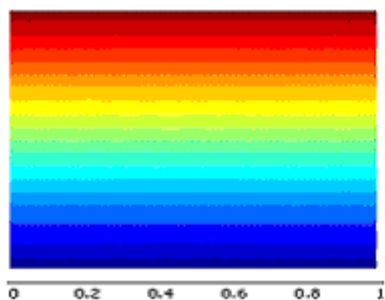
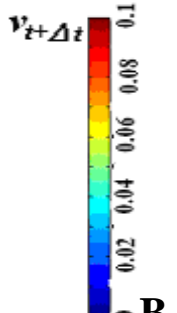


Figure 3.9 : Comparaison entre les champs de déplacement théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de corrélation d'images dans le cas de la simulation de l'expérience de cisaillement. Notre code est appliqué à l'image avant déformation (A) et l'image après déformation (B). La fenêtre de recherche optimale a pour taille $s_i = s_{i1} = s_{i2} = 10$ pixels. La région d'intérêt est optimisée pour un facteur $ka = 3$. Le seuil de tolérance $\delta = 0.9$. La figure D présente le champ de déplacements déduit de la résolution du problème direct (éléments finis). On note une parfaite similitude avec le champ déduit du problème inverse : figure E. La figure C présente les scores de corrélation pour les différentes fenêtres.

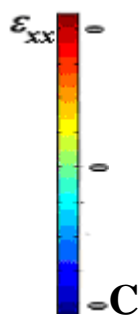
Méthode éléments finis



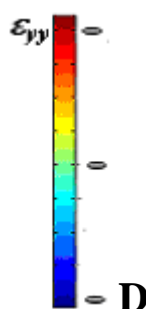
A



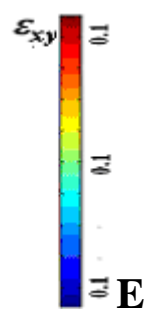
B



C



D



E

Méthode corrélation d'images

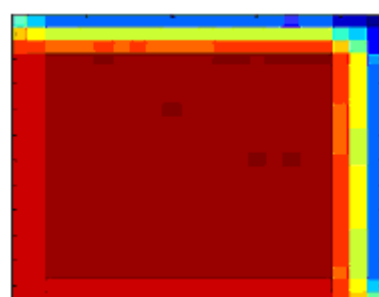
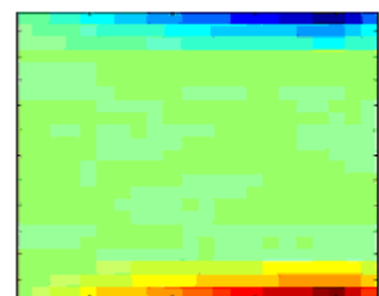
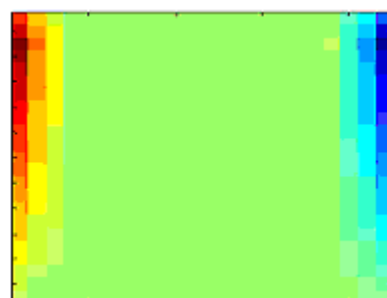
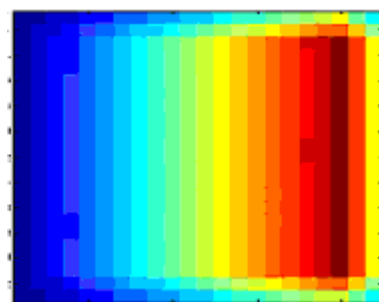
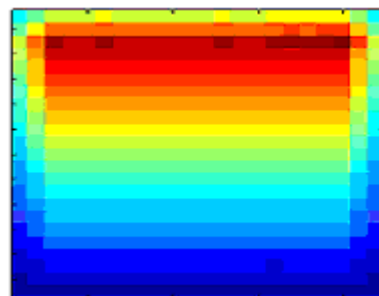


Figure 3.10 : *Comparaison entre les résultats théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de flot optique dans le cas de la simulation de l'expérience de cisaillement. . Les lignes (A), (B), (C), (D) et (E) représentent respectivement la composante horizontale u du champ des déplacements, la composante verticale v du champ des déplacements, la déformation ϵ_{xx} , la déformation ϵ_{yy} et le cisaillement ϵ_{xy} , déduite de la résolution du problème par éléments finis (à gauche), déduite de la corrélation d'images (à droite). Notons que les deux premières (dernières) lignes et les colonnes sur les bords sont des redondances consécutives à l'application du filtre moyennneur.*

III.5.3. Expérience de compression uni-axiale

Considérons des points (x,y) d'un carré texturé $\left(-\frac{1}{2} \leq x \leq \frac{1}{2}; 0 \leq y \leq 1\right)$ pour simuler cette expérience. Sur ce carré, nous imposons sur chaque nœud de notre géométrie le champ de déplacement (Fig.3.11.A et 3.11.B)

$$u(x,y) = -0.1 x \quad (3.36)$$

Attention à la singularité que présente ce problème. En effet d'après le domaine de définition de $u(x)$, $u(x)$ présente une singularité en $x=0$. Aucune condition n'est imposée sur les autres bords. Le carré texturé se comporte comme un milieu élastique avec un coefficient de poisson $\nu=0.49$ et un module d'Young $E=1500\text{Pa}$.

Pour cette expérience, les résultats sont satisfaisants. En effet, les deux champs de déplacement u et v sont bien reconstitués.

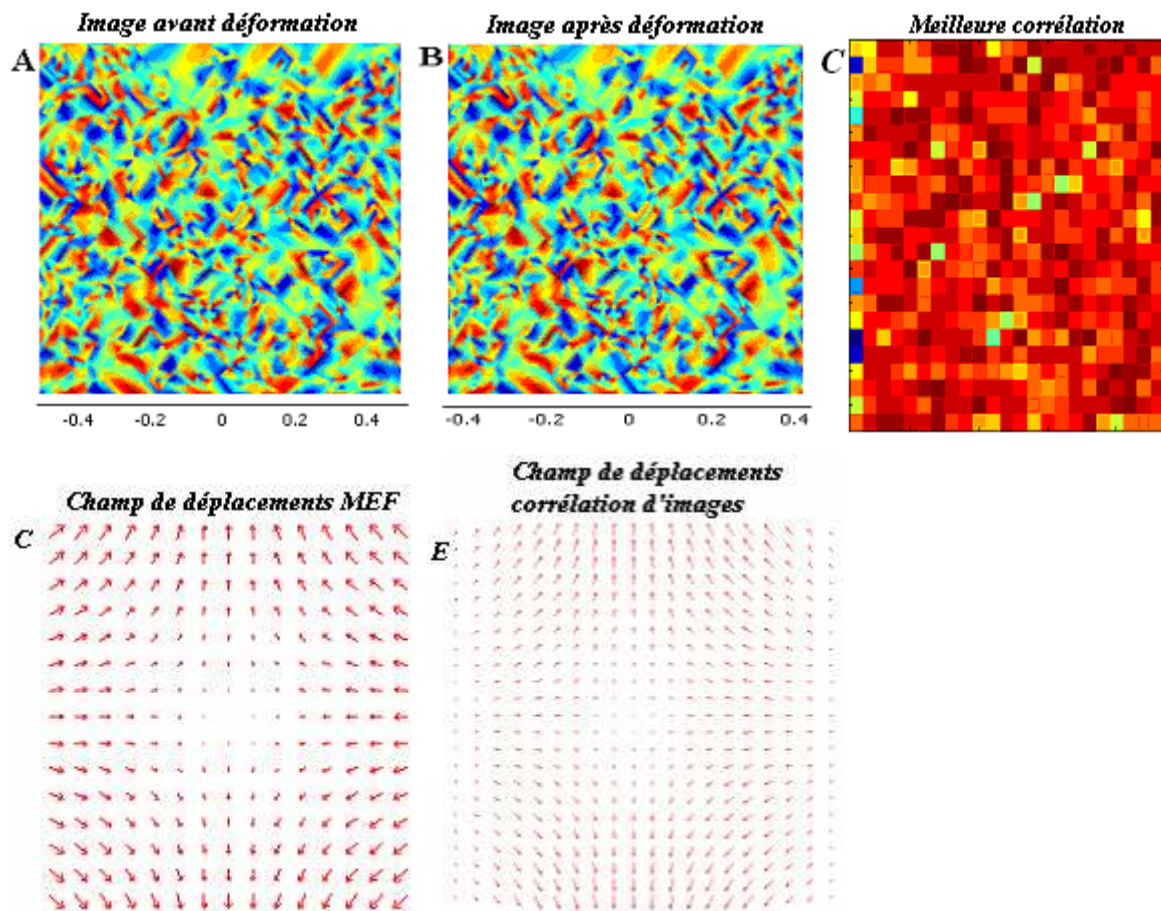


Figure 3.11 : Comparaison entre les champs de déplacement théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de corrélation d'images dans le cas de la simulation de l'expérience de compression. Notre code est appliqué à l'image avant déformation (A) et l'image après déformation (B). La fenêtre de recherche optimale a pour taille $s_1=s_1=s_2=10$ pixels. La région d'intérêt est optimisée pour un facteur $k_a=2$. Le seuil de tolérance $\delta=0.9$. La figure D présente le champ de déplacements déduit de la résolution du problème direct (éléments finis). On note une parfaite similitude avec le champ déduit du problème inverse : figure E. La figure C présente les scores de corrélation pour les différentes fenêtres.

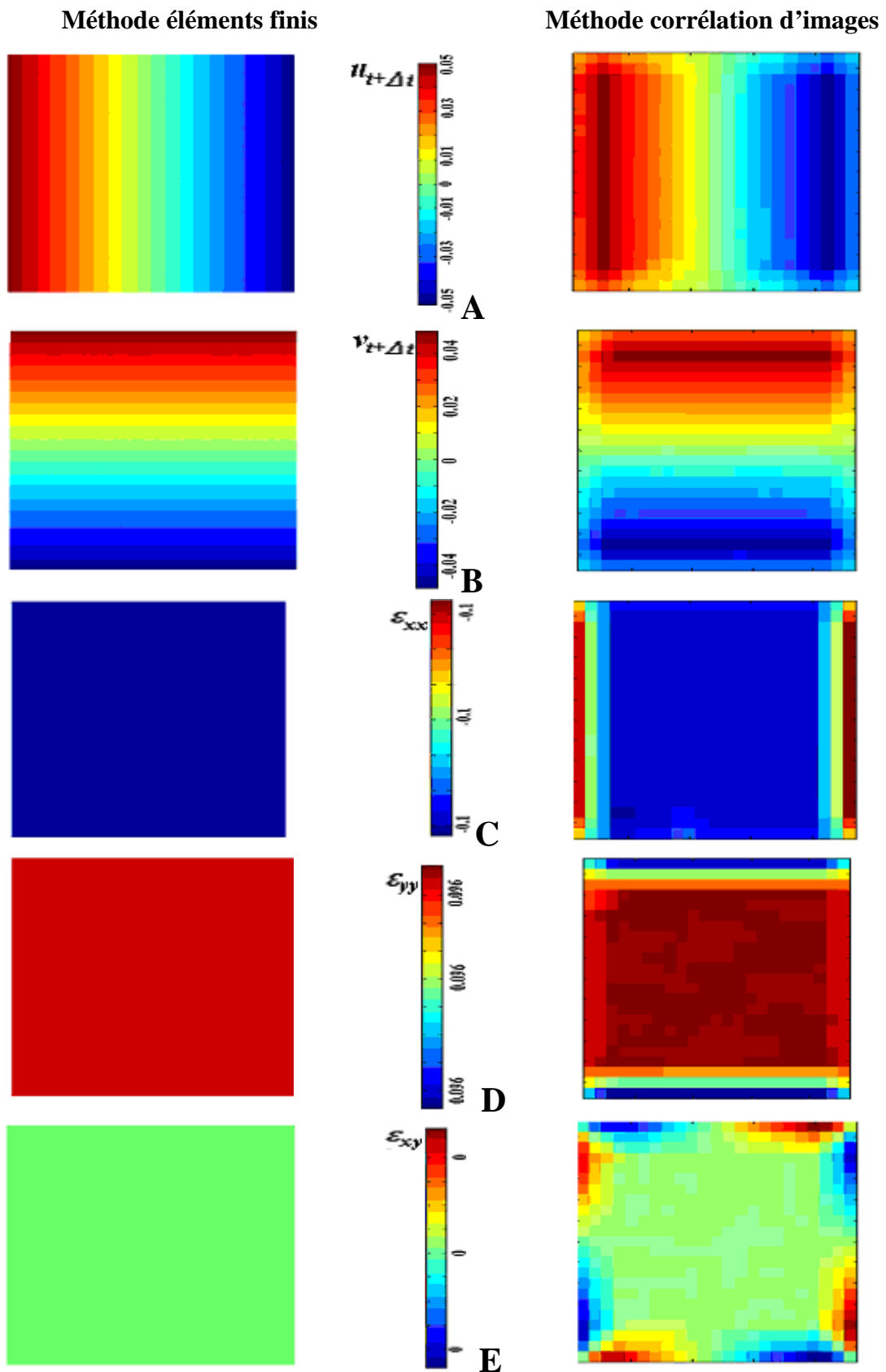


Figure 3.12 : Comparaison entre les résultats théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de flot optique dans le cas de la simulation de

l'expérience de compression. . Les lignes (A), (B), (C), (D) et (E) représentent respectivement la composante horizontale u du champ des déplacements, la composante verticale v du champ des déplacements, la déformation ϵ_{xx} , la déformation ϵ_{yy} et le cisaillement ϵ_{xy} , déduite de la résolution du problème par éléments finis (à gauche), déduite de la corrélation d'images (à droite). Notons que les deux premières (dernières) lignes et les colonnes sur les bords sont des redondances consécutives à l'application du filtre moyennneur.

III.5.4. Expérience d'inclusion

Pour notre dernière expérience nous allons considérer une expérience d'inclusion circulaire. En effet, à l'intérieur de notre carré texturé ($0 \leq x \leq 1$; $0 \leq y \leq 1$), nous mettons une inclusion circulaire de rayon $r=0.15$ au centre du carré. La rigidité de l'inclusion est 10 fois inférieure à celle du carré. Nous imposons sur chaque nœud de notre géométrie (carré et inclusion) le champ de déplacement (Fig.3.13.A et 3.13.B)

$$u(x,y)=0.1 x \quad (3.37)$$

Aucune condition n'est imposée sur les autres bords. Le carré texturé se comporte comme un milieu élastique avec un coefficient de poisson $\nu=0.49$ et un module d'Young $E=1500\text{Pa}$.

Pour cette expérience, notre code recalcule bien les deux champs de déplacement u et v . Les champs de déplacements sont quasi similaires comme le montre les figures (Fig.3.13.C et 3.13.D) où les vecteurs déplacements sont reconstitués. Les deux composantes du déplacement de cette expérience sont également bien reconstituées au pixel près.

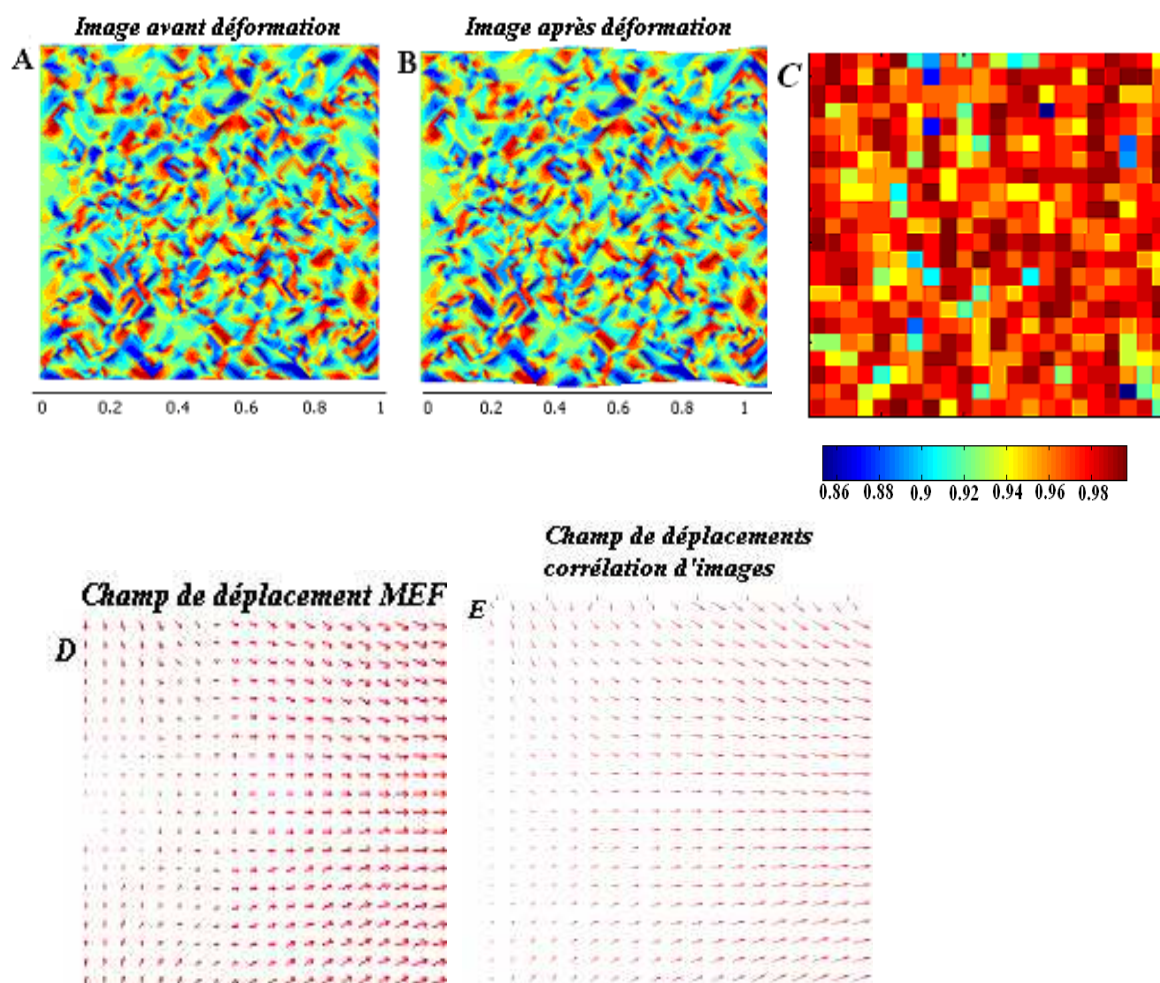
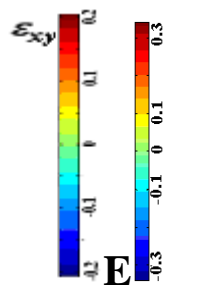
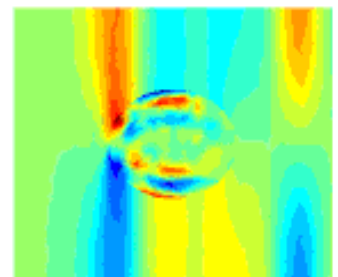
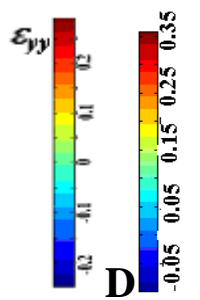
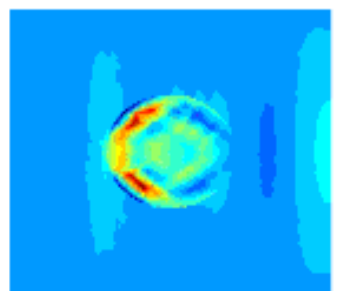
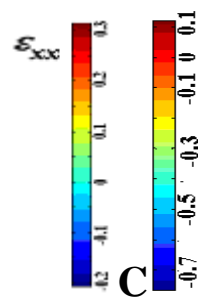
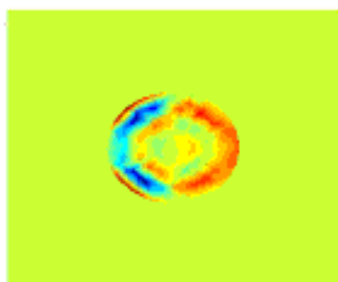
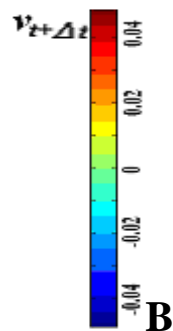
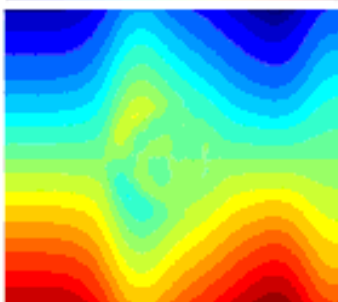
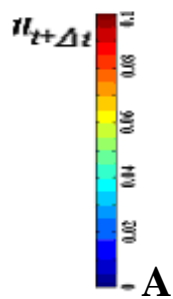
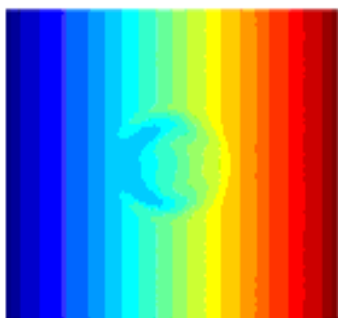


Figure 3.15 : Comparaison entre les champs de déplacement théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de corrélation d'images dans le cas de la simulation de l'expérience avec inclusion. Notre code est appliqué à l'image avant déformation (A) et l'image après déformation (B). La fenêtre de recherche optimale a pour taille $s_1=s_1=s_2=10$ pixels. La région d'intérêt est optimisée pour un facteur $k_a=3$. Le seuil de tolérance $\delta=0.9$. La figure D présente le champ de déplacements déduit de la résolution du problème direct (éléments finis). On note une parfaite similitude avec le champ déduit du problème inverse : figure E. La figure C présente les scores de corrélation pour les différentes fenêtres.

Méthode éléments finis



Méthode corrélation d'images

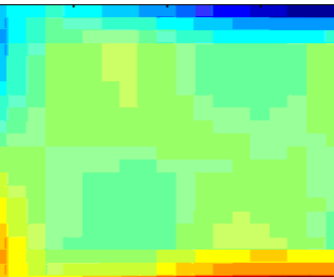
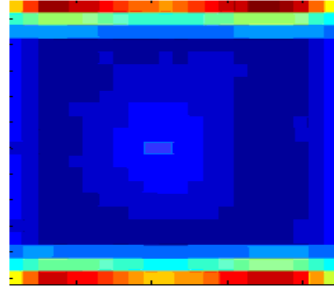
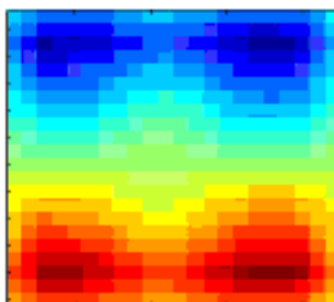
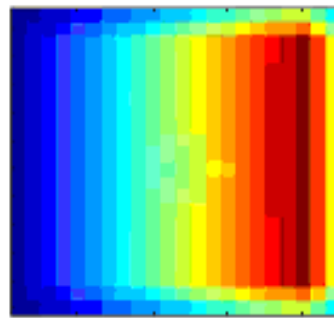


Figure 3.16 : Comparaison entre les résultats théoriques (cible) obtenus à l'aide de la MEF et ceux déduits à partir de notre algorithme de flot optique dans le cas de la simulation de l'expérience de compression. . Les lignes (A), (B), (C), (D) et (E) représentent respectivement la composante horizontale u du champ des déplacements, la composante verticale v du champ des déplacements, la déformation ϵ_{xx} , la déformation ϵ_{yy} et le cisaillement ϵ_{xy} , déduite de la résolution du problème par éléments finis (à gauche), déduite de la corrélation d'images (à droite). Notons que les deux premières (dernières) lignes et les colonnes sur les bords sont des redondances consécutives à l'application du filtre moyennneur.

III.6. Conclusion

Notre objectif dans ce chapitre était le développement d'un outil simple et efficace permettant d'analyser les échantillons biologiques déformables. Parmi les trois grandes méthodes de suivi de mouvement, nous avons choisi celui de la corrélation d'images. Ce choix a été guidé par la texture des échantillons biologiques.

Une définition générale peut caractériser une texture comme un ensemble de primitives arrangées selon des règles particulières de placement [GROSS1983 ; WU1992]. Une texture sera fonction de la variation spatiale de l'intensité des pixels [TAMARA1978]. Il existe deux grands types de textures :

- a) une texture périodique est formée de primitives arrangées d'une façon particulières. Le motif de base se répète alors de manière régulière.
- b) une texture aléatoire semble totalement désordonnée. Il est alors impossible d'isoler un motif de base.

Les méthodes de suivi de mouvement comme l'appariement de primitives et le flot optique sont mieux indiquées pour analyser les échantillons biologiques à texture périodique. Par contre pour analyser des structures fines, sans régularité apparente la corrélation d'images est une bonne solution.

Le point crucial au cours de l'approche par corrélation d'images est l'optimisation des paramètres clés: a) la taille de la fenêtre de recherche, b) la taille de la région d'intérêt et c) le seuil de corrélation.

- a) la fenêtre de recherche : ce paramètre agit comme une loupe sur le mouvement. Pour des fenêtres très grandes, on perdra une information locale importante. Pour une fenêtre très petite, on augmente la probabilité d'obtenir des solutions non

significatives. Donc, un compromis devra être trouvé. Les images étant de taille et de nature différentes, seule l'expérience peut aider à fixer au mieux ce paramètre. Notons enfin que plusieurs études comme celles présentées aux paragraphes II.3.1. (méthodes paramétriques) proposent de prendre des tailles de fenêtre assez importantes afin d'avoir assez d'informations pour utiliser une technique de minimisation. Ces techniques de minimisation sont sensibles au choix des valeurs initiales. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé une méthode de minimisation par comparaison (élimination) successive. Le mouvement est autant précis que les fenêtres sont petites ; cette approche semblable à celle utilisée par Lebesgue pour calculer l'intégrale d'une fonction continue sur un segment.

- b) La taille de la région d'intérêt : ce paramètre agit plus sur le temps de calcul de l'algorithme. En effet, le but est de déterminer la zone de recherche de la meilleure corrélation. La probabilité de trouver la meilleure corrélation dans une zone de recherche petite est inférieure à la probabilité de trouver cette corrélation dans une zone plus grande. Mais, la probabilité d'obtenir une meilleure corrélation non significative est plus importante dans une zone de recherche plus grande.
- c) Le seuil de corrélation ou corrélation moyenne : ce paramètre nous permet de prendre une décision en présence du bruit. Traitant des images biologiques, le bruit peut provenir de plusieurs sources (caméra, milieu de culture,...). Ce bruit, lorsqu'il est local, se caractérise par une faible corrélation (inférieur au seuil de corrélation). Le déplacement local dans ce cas est approximé par celui des fenêtres voisines.

Ainsi, cette méthode a le mérite de prendre en compte une dimension spatiale (fenêtre de recherche), une dimension temporelle (optimisation de la zone de recherche) et une dimension liée à la nature de l'échantillon biologique.

QUATRIEME CHAPITRE

**Quantification des champs de déformations
intracellulaires générées lors de la contraction
spontanée d'une cellule cardiaque**

Résumé

La contraction du cardiomyocyte est classiquement quantifiée à partir de l'amplitude des déplacements de ses extrémités. Cependant, cette quantification macroscopique du raccourcissement de la cellule est une mesure intégrale qui ne permet pas de caractériser la contractilité intracellulaire locale, à l'échelle des sarcomères. Grâce à la méthode de corrélation d'images développée au chapitre précédent, nous présentons ici une analyse originale de la dynamique contractile de cardiomyocytes isolés à partir de la reconstruction des champs de déformations intracellulaires. Notre approche tire partie de l'architecture spécifique et de l'aspect texturé des images video-microscopiques de ces cellules.

Pour deux séquences de contractions caractéristiques, nous reconstruirons successivement l'évolution temporelle des champs de déplacements et des champs de déformations en tout point de la cellule. Nous utiliserons ensuite ces données pour résoudre le problème inverse correspondant à l'identification de la vague calcique intracellulaire qui contrôle la contraction de proche en proche de la cellule.

IV.1 Introduction

La contraction du cardiomyocyte est contrôlée par le déclenchement de vagues de calcium intracellulaires qui se propagent rapidement dans la cellule [BELEVYCH2007 ; CAGALINEC2007, DUPONT2007]. La caractérisation qualitative et quantitative des ondes calciques en amplitude, fréquence et vitesse de propagation, est donc une question centrale pour la compréhension du comportement contractile normal ou pathologique [MIURA1993; PRIEBE1998; WAKAYAMA2005]. Dans le myocarde, les cardiomyocytes sont disposés selon une architecture spécifique. Cependant, malgré des limites évidentes, différentes informations peuvent être obtenues par l'étude de cellules cardiaques isolées. Ainsi, le suivi des vagues de Ca^{2+} est possible grâce à des techniques de microscopie couplées à l'utilisation de sondes fluorescentes du calcium tels que le Fluo-3 [LOUGHREY2003; ROCKWELL1999]. Les sondes fluorescentes se sont avérées également très utiles pour analyser la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire et des récepteurs à la ryanodine impliqués dans la libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique [ZHAO2007; YIN2005].

Néanmoins, l'efficacité mécanique de la contraction cellulaire dépend directement des variations de longueur des sarcomères : celle-ci reste donc un paramètre caractéristique essentiel de l'activité mécanique cellulaire. Les mesures de longueur des sarcomères sont généralement basées sur les techniques de diffraction laser [SLAWNYCH1998], mais cette approche n'est pas bien adaptée à l'analyse de la variation spatio-temporelle des longueurs des sarcomères lorsque la dynamique de propagation des contractions locales du cardiomyocyte doit être caractérisée.

La méthode développée au chapitre précédent nous permet une approche originale de ce problème. En effet, bien que les méthodes de flot optique soient assez largement appliquées dans l'ingénierie ou dans les domaines de la bio-ingénierie, seules quelques applications de ces techniques ont été développées pour l'analyse des changements de morphologies cellulaires [GERMAIN1999; CAI2003 ; COLLIN2006], principalement en raison du fait que les cellules animales sont des objets fortement déformables. Dans le large spectre des méthodes de suivi du mouvement [MARTEL2007 ; BARRON1994], la

méthode de corrélation d'images, [BERGONNIER2005; BESNARD2006; BOERBOOM2008] nous paraît la plus pertinente pour caractériser le comportement mécanique du cardiomyocyte au cours de sa contraction.

IV.2 Dynamique du calcium

Les techniques d'imagerie de la cellule vivante ont permis de visualiser les oscillations rapides et spontanées du calcium intracellulaire, ainsi que sa diffusion anisotrope [SUBRAMANIAN2001]. En se basant sur le modèle biochimique non-linéaire à un compartiment calcique de Goldbeter et al. [GOLDBETER1990], centré sur le mécanisme autocatalytique de libération auto-induite du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique (calcium-induced-calcium-released ou CICR, [FABIATO1983]), Pustoc'h et al. [PUSTOC'H2005], Tracqui et al. [TRACQUI2008] ont développé des modèles biomécaniques de la contraction du cardiomyocyte isolé. Nous présentons rapidement ces modèles, dont certains éléments nous seront nécessaires pour introduire la résolution du problème inverse qui sera posé dans la dernière partie de ce chapitre.

Brièvement, ces modèles minimaux considèrent seulement deux variables qui sont respectivement les concentrations en calcium sarcoplasmique $Y(t)$ et en calcium cytosolique $Z(t)$, ce dernier diffusant de façon anisotrope au sein de la cellule. L'évolution spatio-temporelle de ces variables est régie par le système d'équations aux dérivées partielles non linéaires suivant :

$$\begin{cases} \frac{\partial Y}{\partial t} = v_2(Z) - v_3(Y, Z) - k_f Y \\ \frac{\partial Z}{\partial t} = v_0 + v_1 \beta - v_2(Z) + v_3(Y, Z) + k_f Y - kZ + \nabla \cdot (\mathbf{D} \nabla Z) \\ Z(r, t_0) = Z_0; Y(r, t_0) = Y_0 \end{cases} \quad (4.1)$$

où \mathbf{D} est le tenseur diagonal de diffusion de composantes D_{ij} ($D_{ij} = 0$ pour $i \neq j$). En accord avec les données expérimentales [SUBRAMANIAN2001], on peut considérer un rapport $\frac{D_{22}}{D_{11}} = 0.5$ entre les diffusions transverse et longitudinale. L'interprétation des termes réactionnels du système d'équations est la suivante : le réticulum sarcoplasmique

(RS) contrôle un flux constant de calcium vers le cytosol noté $v_1\beta$. La concentration en calcium cytosolique $Z(t)$ varie dans le temps et oscille entre deux phases : l'une pendant laquelle la concentration est très faible en raison du pompage actif du calcium par le RS (v_2) et l'autre pendant laquelle la concentration $Z(t)$ est très élevée, caractérisant le relargage massif de Ca^{2+} (v_3) du RS dans le cytosol. Les paramètres v_0 et kZ désignent respectivement les flux d'entrée et de sortie du calcium au sein de la cellule. Le terme $k_f Y$ représente une fuite de calcium depuis le RS dans le cytoplasme. Les flux de calcium v_2 et v_3 sont exprimés à l'aide des fonctions de Michaelis-Menten (Leonor Michaelis 1875-1949, Maud Menten 1879-1960) suivantes :

$$v_2 = V_{M_2} \frac{Z^n}{K_2^n + Z^n} \quad v_3 = V_{M_3} \frac{Y^m}{K_R^m + Y^m} \frac{Z^p}{K_A^p + Z^p} \tag{4.2}$$

Les termes V_{M_2} et V_{M_3} sont respectivement les vitesses maximales de pompage et de relargage de calcium par le RS. Les paramètres m , n , et p sont les coefficients de Hill : ils caractérisent le niveau d'activation du processus. Les constantes K_2 , K_R et K_A désignent les valeurs seuils de concentrations pour le pompage, la libération et l'activation.

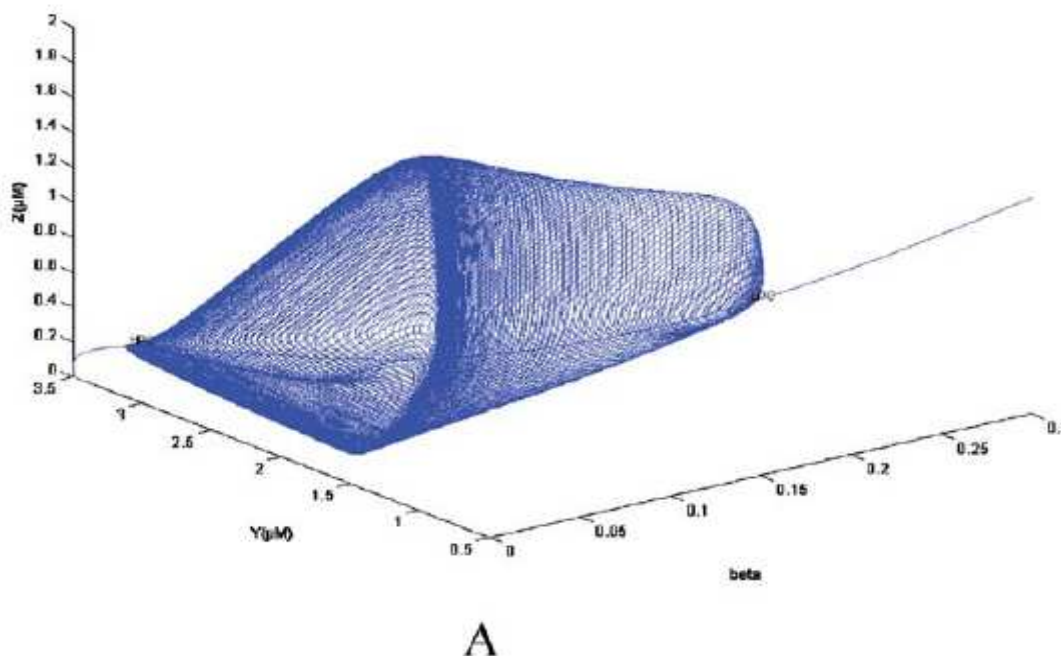


Figure.4.1 : Diagramme de bifurcation associé au modèle calcique à un pool. Evolution des cycles limites dans le plan de phase $(X(t), Y(t))$ lorsque le paramètre β est pris comme paramètre de bifurcation.

Pour déterminer des valeurs de paramètres qui soient cohérentes avec la périodicité des contractions observées expérimentalement, nous avons construit le diagramme de bifurcations du système non-linéaire sans les termes de diffusion (Fig. 4.1). Ce système possède deux points fixes. Le comportement de ces points fixes a été analysé grâce au logiciel de suivi de bifurcations MATCONT [DHOOGHE2008]. La déstabilisation d'un point fixe est associée à l'apparition d'un cycle limite par bifurcation de Hopf. Cette déstabilisation, ainsi que la périodicité du cycle limite associé, est contrôlable en faisant varier le paramètre de bifurcation β .

IV.3. Analyse de la contractilité du cardiomyocyte par corrélation d'images

IV.3.1. Culture des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes de rat adulte que nous avons analysés au cours de nos travaux ont été gracieusement fournis par le LBFA (Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée) de l'Université Joseph Fourier. Les cardiomyocytes sont extraits des ventricules des rats adultes suivant le protocole de dissociation enzymatique donné dans [OLIVARES1992].

IV.3.2. Acquisition vidéo-microscopique

Les contractions périodiques et spontanées du cardiomyocyte adulte isolé de rat ont été enregistrées par vidéomicroscopie en contraste de phase et contraste différentiel (DIC). La station d'acquisition se compose d'un microscope inversé (Zeiss Achrostigmat Axiovert 135) équipé d'un objectif x5, de volets automatiques (Uniblitz) et d'une caméra CCD (CoolSNAP HQ, Roper Scientific). L'acquisition des images est contrôlée à partir du logiciel Metaview (Roper Scientific). La calibration du microscope a été effectuée à l'aide d'une lame micrométrique (PRESS-PRO21). La taille des images analysées est de 442×161 pixels. Les images sont prises toutes les 110ms.

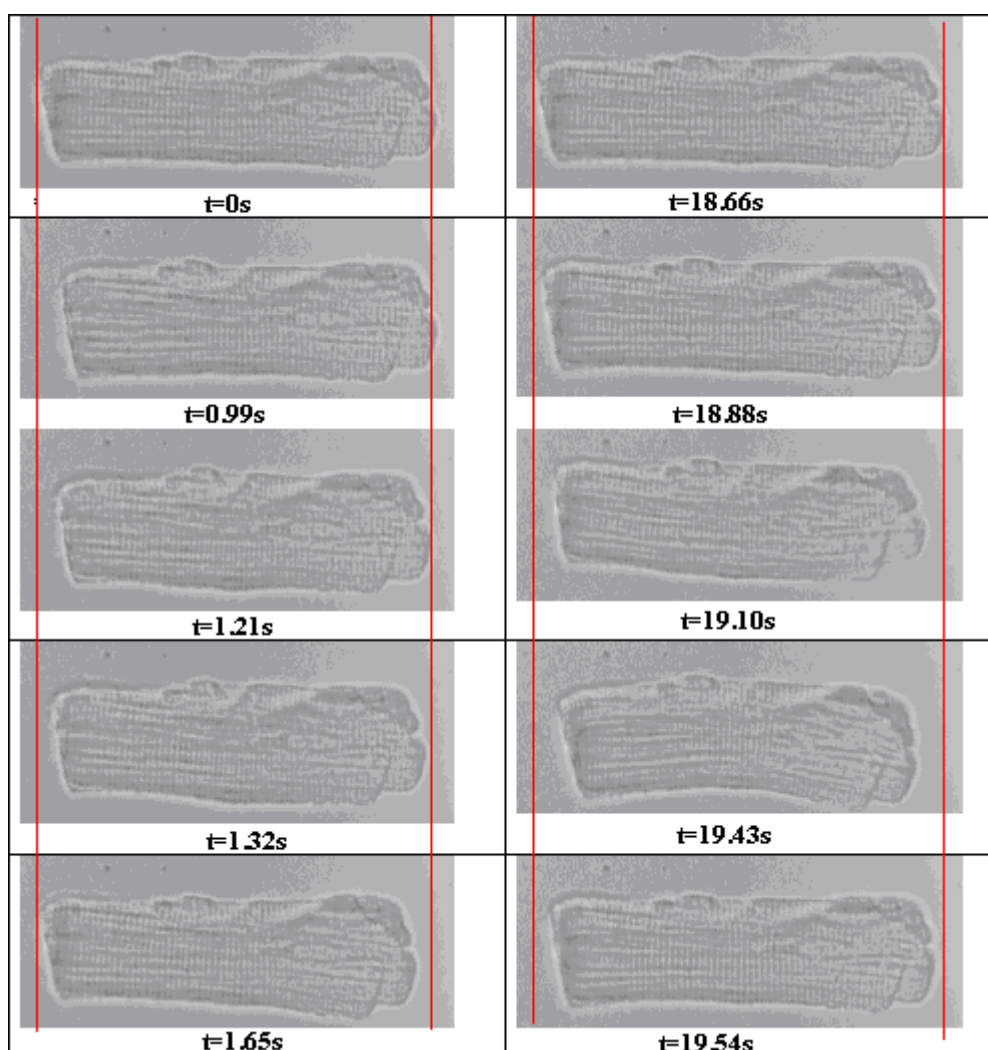


Figure.4.2 : Images successives de la première (seq1, colonne de gauche) et de la seconde (seq2, colonne de droite) séquence de contraction observée sur un cardiomyocyte adulte. Le temps indiqué est le temps réel. Les lignes verticales sont des repères pour visualiser la contraction de la cellule.

IV.3.3. RESULTATS DE L'ANALYSE PAR CORRELATION D'IMAGES

IV.3.3.1. Quantification et évaluation du champ des déplacements.

Dans cette section nous présentons l'analyse, par la méthode décrite au chapitre 3, du champ de déplacements au niveau des sarcomères des deux profils de contractions présentés sur la figure 4.2.

Afin d'obtenir une caractérisation locale précise, nous allons considérer des fenêtres carrées paramétrées de la façon suivante : largeur $si1=si2=10$ pixels, facteur

d'échelle $ka=1$ et seuil de corrélation $\delta=0.75$.

Dans la première séquence (seq1), on peut diviser la dynamique de contraction en quatre phases. Durant la première phase, l'extrémité gauche de la cellule se déplace (Fig. 4.4(1A)), suivie, dans la deuxième phase (Fig. 4.4(1B)) du déplacement de l'extrémité droite. Durant cette phase la cellule va atteindre son raccourcissement optimal. Au cours de la troisième phase, les vecteurs déplacements changent de sens, caractérisant la relaxation de l'extrémité gauche (Fig. 4.4(1C)) puis droite de la cellule (Fig. 4.4(1D)).

De façon intéressante, la même cellule présente quelque temps après une toute autre dynamique (séquence seq2, Fig. 4.2). Contrairement à la contraction précédente, celle-ci est initiée à partir du centre de la cellule (Fig. 4.4(2A-2B)). On note un champ de déplacement qui se caractérise par une flexion de la cellule, dans un premier temps vers le bas (Fig. 4.4(2C)) et ensuite vers le haut (Fig. 4.4(2D)). Une relaxation des extrémités suivra (Fig. 4.4(2E)). Les deux séquences sont séparées d'un temps $\Delta t=18.34$ s.

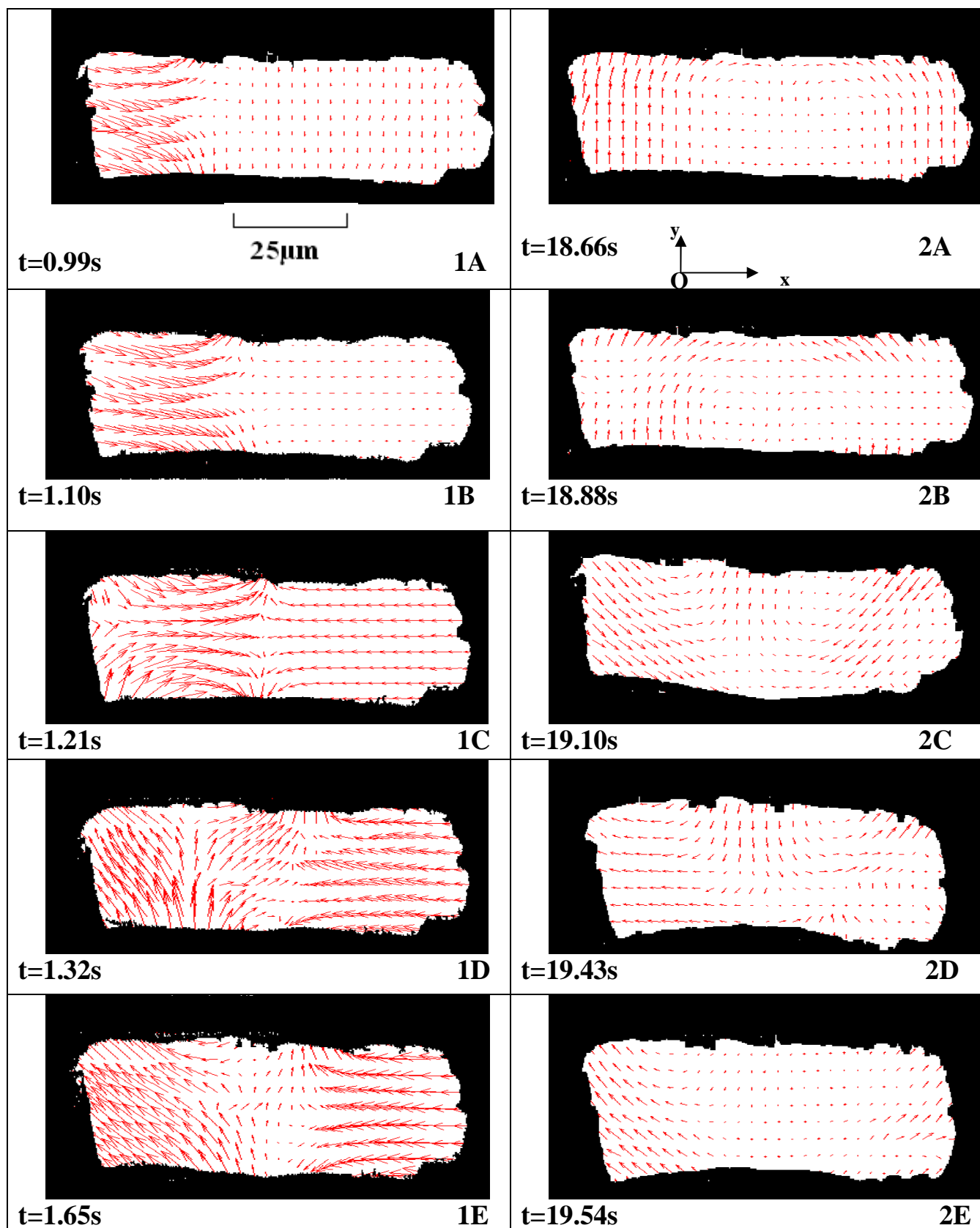


Figure 4.4 : Champs des déplacements des sarcomères durant la première contraction (seq1, 1A-1E) et la seconde contraction (seq2, 2A-2E) du cardiomyocyte observé.

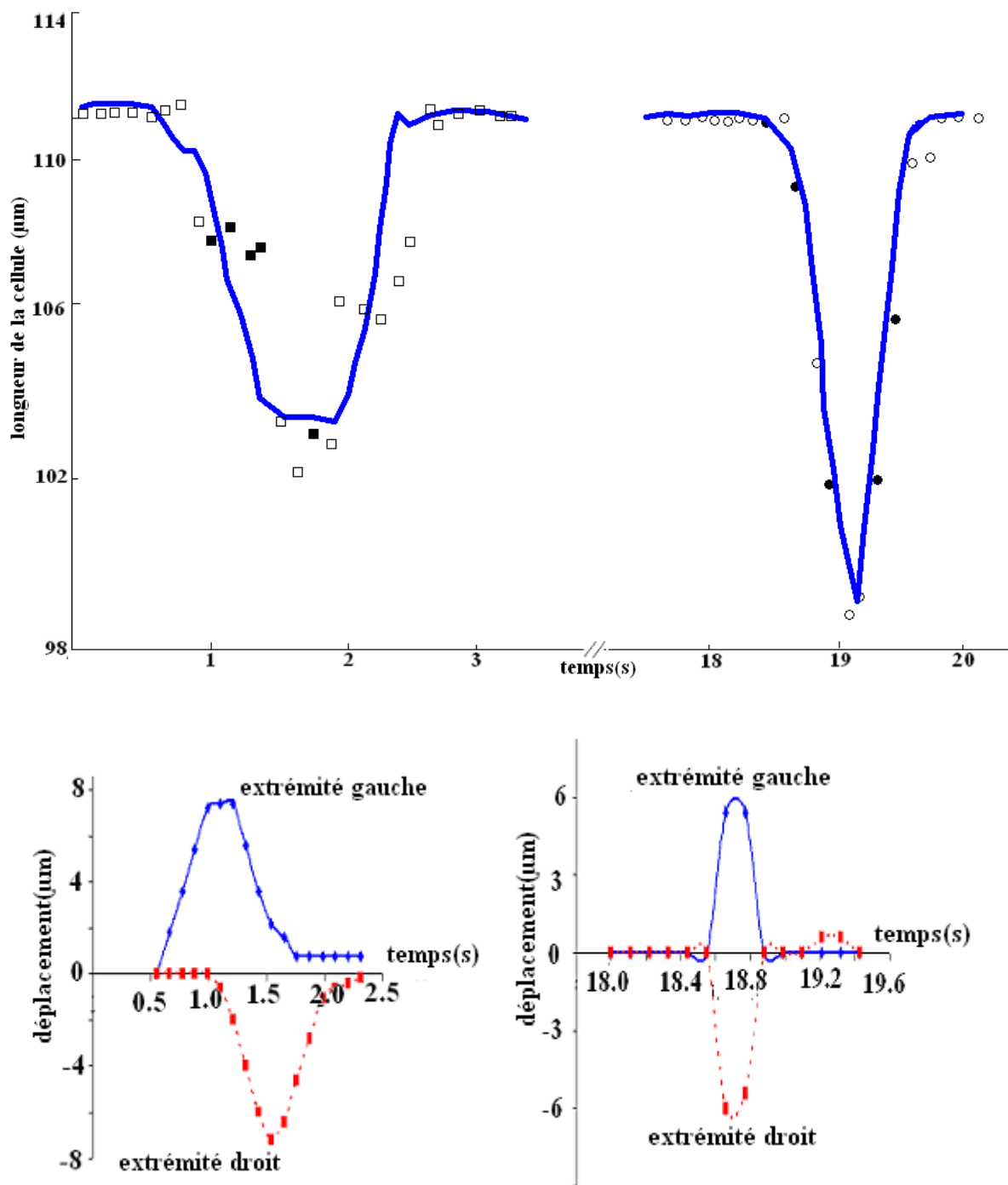
IV.3.3.2. Quantification du raccourcissement du cardiomyocyte adulte isolé.

La Figure 4.5 montre la dynamique de raccourcissement du cardiomyocyte correspondant aux séquences seq1 et seq2, respectivement. Le raccourcissement de la cellule est mesuré de deux façons.

Premièrement, nous avons fait une évaluation globale du raccourcissement en quantifiant la longueur de la cellule par la variation de longueur du plus petit rectangle contenant le cardiomyocyte (Fig. 4.5.A, ligne bleue). Deuxièmement, la dynamique de raccourcissement a été déterminée à partir d'une intégration des déformations longitudinales locales calculées à partir de l'analyse par corrélation d'images. (Fig.4.5A marqueurs carrés à gauche). Ainsi, on peut remarquer que si l'on obtient un bon accord entre les deux méthodes pour la première séquence (seq1) ce n'est pas le cas pour la seconde (seq2). En effet, dans cette séquence, la flexion de la cellule biaise l'estimation faite à partir des déformations longitudinales. Néanmoins dans ce cas, nous avons obtenu le raccourcissement en tenant compte du déplacement des fenêtres situées aux extrémités de la cellule (Fig. 4.5A marqueurs circulaires à droite). Cet accord entre mesures globales et mesures locales atteste de la précision et de la robustesse de la méthode que nous avons développée.

Durant la première séquence (seq1), le temps de contraction/relaxation de la cellule est de 2.05 s. La contraction représente environ 6% (7.13 μm) de la longueur de la cellule (112.05 μm). Par contre cette phase de contraction/relaxation est plus courte (1.21 s) avec une amplitude plus grande (13.69 μm) durant la séquence seq2, dû au déplacement en phase des deux extrémités. Notons également que le temps mis par la cellule pour atteindre son raccourcissement maximal est de 0.57 s et 0.33 s pour chacune des séquences seq1 et seq2, respectivement.

Dans la première séquence, la contraction/relaxation commence au niveau du bord gauche. Pendant la relaxation du bord gauche, une contraction/relaxation apparaît à l'extrémité droite. Nous avons aussi analysé le comportement des deux extrémités durant les deux séquences. On peut noter des profils de déplacements très antagonistes (Fig.4.5.B ; 4.5.C). Ces profils sont semblables à ceux mesurés en utilisant des fibres de carbones [NISHIMURA2004 ; SUGIURA2006].



C

Figure 4.5 : Analyse du raccourcissement de la cellule. (A) Le tracé en bleu montre le raccourcissement global à partir de la longueur de la plus petite fenêtre contenant la cellule cardiaque. Les marqueurs carrés et circulaires indiquent le raccourcissement obtenu par intégration des déplacements locaux calculés par corrélation d'images. Les figures (B) et (C) montrent le comportement des deux extrémités pour chacune des séquences seq1 et seq2.

IV.3.3.3. Caractérisation des profils de contraction

Les vagues de déformation qui se propagent à l'intérieur du cardiomyocyte ont été analysées pour les deux séquences seq1 et seq2. Grâce aux résultats obtenus sur les champs de déplacements par notre approche de corrélation d'images, nous pouvons avoir accès au comportement intracellulaire du cardiomyocyte à un niveau de détails au moins égal à celui des sarcomères. Pour cette analyse, nous avons considéré une fenêtre de recherche de 10 pixels sur 10 pixels et des voisinages de recherches de forme carrée et de 30 pixels de coté.

Comme nous l'avons précédemment souligné, au cours de la première séquence le champ de déplacement montre quatre étapes durant la contraction du cardiomyocyte. La première phase est caractérisée par la contraction du coté gauche, aucun mouvement n'est détecté à droite. Cette phase dure 440 ms (Fig. 4.4(1A)). Dans la seconde phase (220 ms), on peut observer une contraction des sarcomères qui apparaît aussi bien à gauche qu'à droite (Fig. 4.4(1C)). Dans la troisième phase, on note une relaxation des sarcomères à gauche tandis que la contraction continue à droite pendant 330 ms (Fig. 4.4(1D)). Finalement, on observe une relaxation presque complète du coté droit également pendant 550 ms (Fig. 4.4(1E)).

L'analyse de la seconde séquence (seq2) montre deux phases principales. Durant la première phase, les déformations s'étagent du centre de la cellule vers les coins supérieurs (durée 550ms) (Fig. 4.4(2A), 4.4(2B)). Mais ce mouvement de torsion est immédiatement suivi par une inversion du couple de torsion, ce qui tend à déplacer les extrémités de la cellule vers le bas, probablement à la suite de l'homogénéisation des concentrations de calcium dans la cellule (Fig. 4.4(2C), 4.4(2D)).

Un des principaux intérêts de la méthode que nous avons développée est la possibilité de pouvoir extraire le champ des déformations spatio-temporelles à partir du champ des déplacements estimés par corrélation d'images. Dans cette section, nous analysons plus précisément ces champs de déformations.

Pour les deux séquences, nous présentons sur la Fig.4.6 l'amplitude des différentes composantes du tenseur des déformations de Green-Lagrange à l'instant t : déformation horizontale $E_{xx,t}$ dans la direction des sarcomères, la déformation transverse

$E_{yy,t}$ et le cisaillement $E_{xy,t}$. Notons qu'un étirement local est caractérisé par une déformation positive, tandis qu'une déformation négative indique un pincement.

Lorsque la contraction se propage de la gauche vers la droite (seq1), le front de la vague est précédé d'une déformation négative (Fig.4.6) et suivi d'une déformation positive. Ces déformations sont comprises entre $E_{xx,t} = 12\% \sim 15\%$ et $E_{yy,t} \sim 8\%$.

Dans la seconde séquence, la contraction qui apparaît au centre du cardiomyocyte est associée à une déformation négative dans les deux directions. Dans ce cas, cette propagation se fait dans les deux directions ; horizontalement et verticalement (Fig. 4.7). Après cette vague de contraction, on peut constater une vague de dilatation caractérisée par des déformations positives. Ces déformations sont comprises entre $E_{xx,t} = 15\% \sim 20\%$ et $E_{yy,t} = 7\% \sim 10\%$.

Notons que dans ces deux cas, les valeurs de cisaillement $E_{xy,t}$ sont non négligeables. On note des valeurs autour de $\sim 10\%$ pour les deux séquences (Fig.4.8). En particulier, bien que la vague de déformation se propage dans la direction des sarcomères, on peut noter des cisaillements non négligeables dans les coins de la cellule, atteignant $E_{xy,t} \sim 5\%$ pour la deuxième séquence seq2.

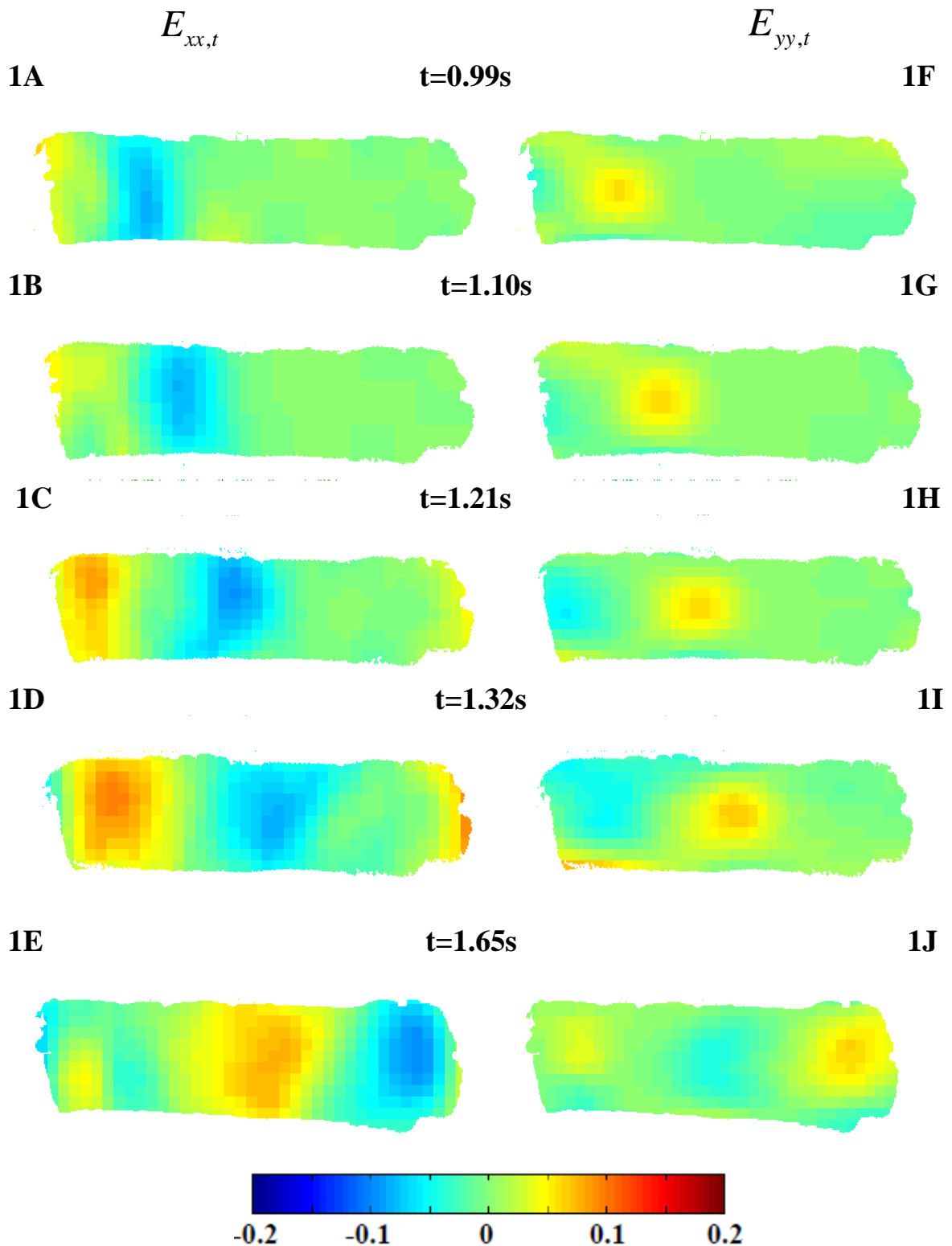


Figure 4.6 : Champs des déformations $E_{xx,t}$ (colonne de gauche) et $E_{yy,t}$ (droite) obtenus pour des fenêtres de recherche de 10 pixels et une ROI de 30pixels et un seuil de corrélation $\delta=0.9$ sur la première séquence.

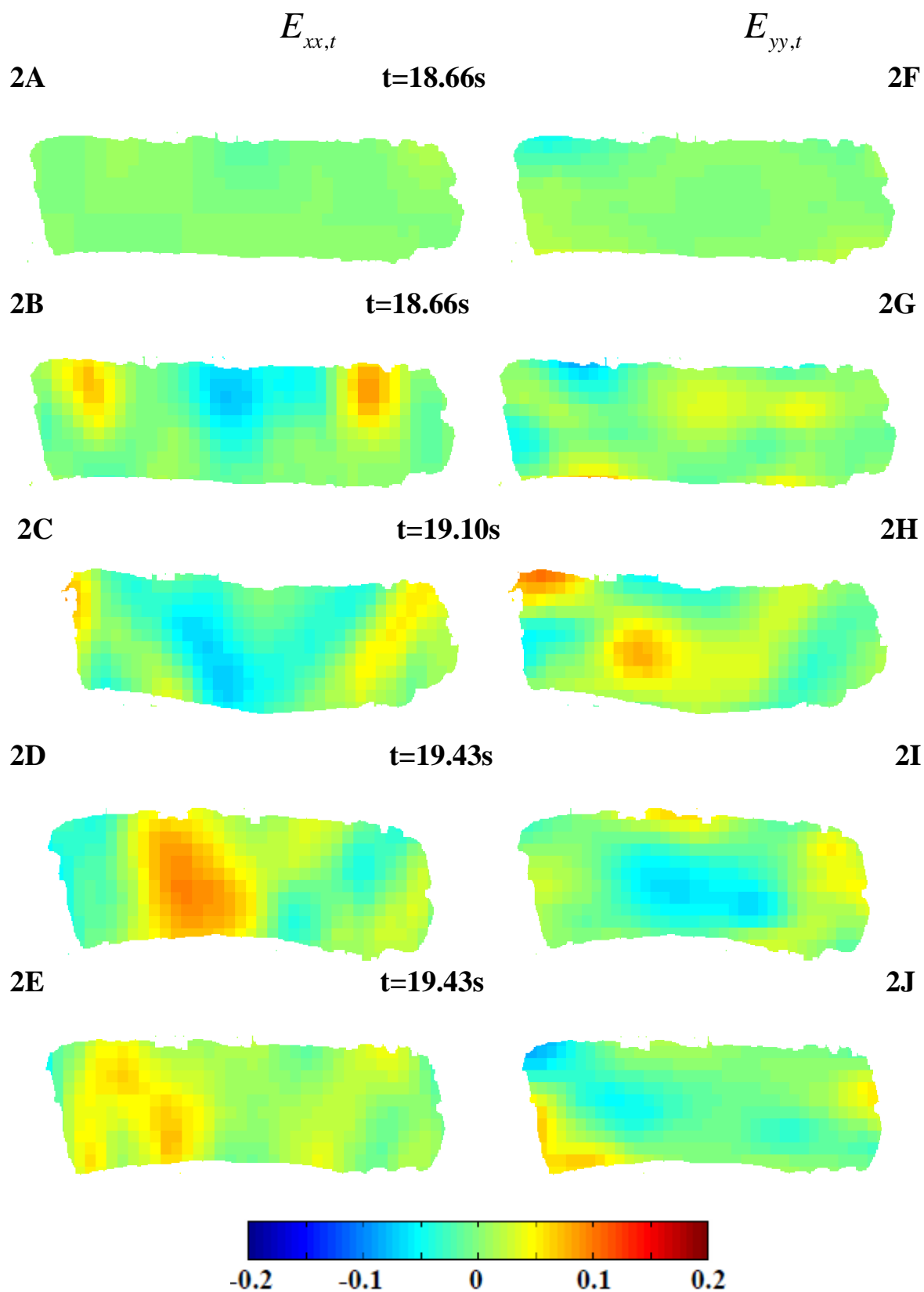


Figure 4.7 : Champs des déformations $E_{xx,t}$ (gauche) et $E_{yy,t}$ (droite) obtenus pour des fenêtres de recherche de 10 pixels et une ROI de 30 pixels et un seuil de corrélation $\delta=0.9$ sur la deuxième séquence.

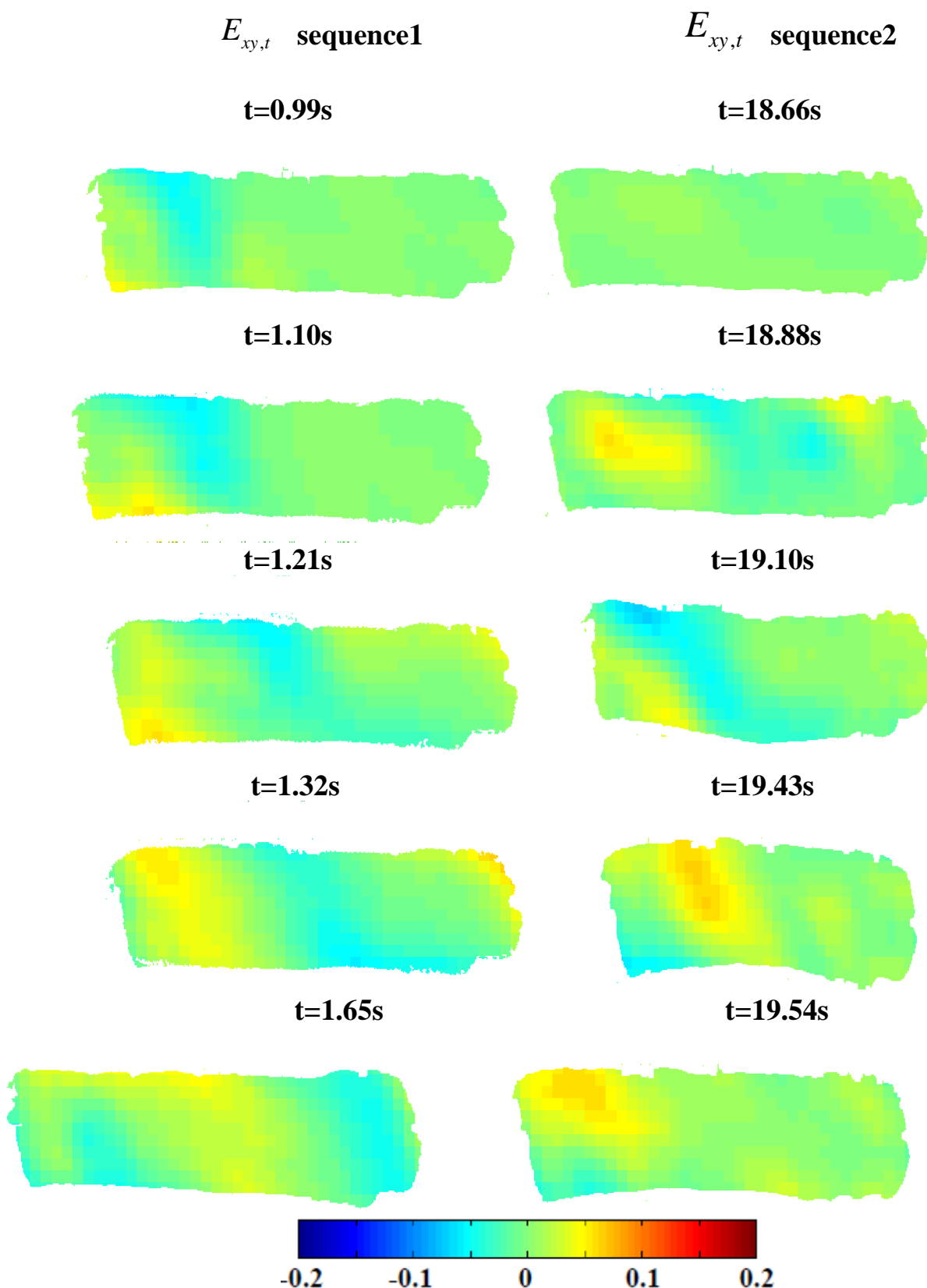


Figure 4.8 : Champs des déformations $E_{xy,t}$ (gauche : 1^{ière} séquence, droite : 2^{ième} séquence) obtenus pour des fenêtres de recherche de 10 pixels et une ROI de 30pixels et un seuil de corrélation $\delta=0.9$.

IV.4. Mise en évidence et analyse des déformations résiduelles.

L'un des postulats de base des techniques de flot optique est celui de la conservation de l'intensité de la lumière d'une image sur l'autre, soit $I(\mathbf{x}, t) = I(\mathbf{x}, t + \Delta t)$. D'un point de vue expérimental, pour assurer cette hypothèse, on joue sur la qualité et la fréquence d'acquisition de la caméra.

Durant l'analyse de la première séquence seq1, nous avons observé l'existence d'une déformation résiduelle. Pour vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une accumulation d'erreurs due à la technique, nous allons comparer les couples d'images suivants:

1. 1^{ère} image 1^{ère} séquence \rightarrow dernières images 1^{ère} séquence
2. 1^{ère} image 1^{ère} séquence \rightarrow 1^{ère} image 2^{ème} séquence
3. 1^{ère} image 2^{ème} séquence \rightarrow dernières images 2^{ème} séquence

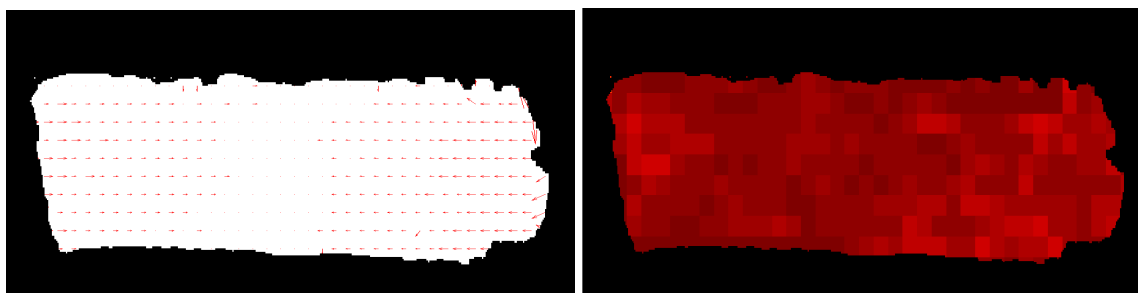


Figure 4.9 : La comparaison entre la première image de la première séquence et la dernière image de la première séquence nous montre un champ de déformation résiduel qui n'est pas visible lorsqu'on compare les images successives. Notre cardiomyocyte reste ainsi sous tension.

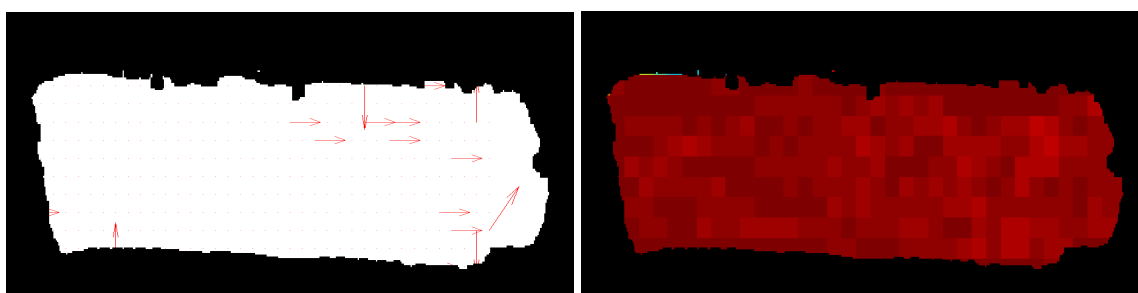


Figure 4.10 : Entre la première image de la première séquence et la première image de la seconde séquence, on peut constater que la cellule est revenue à son état de repos (état du début de la première séquence). Ainsi, dans le laps de temps ne figurant pas dans nos séquences, la tension observée précédemment s'est dissipée.

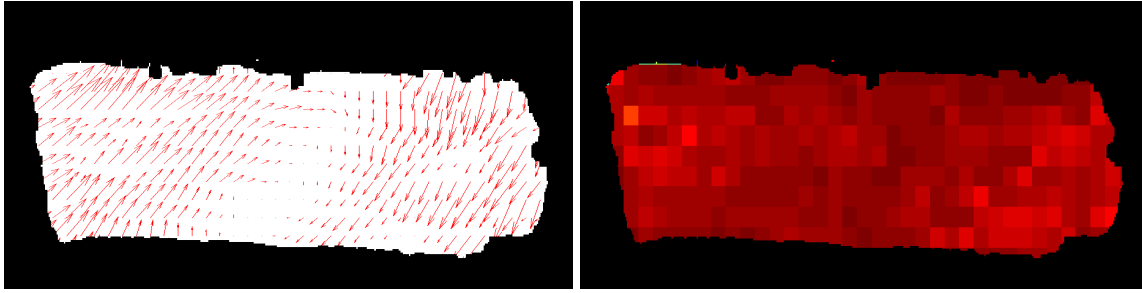


Figure 4.11 : A la fin de la deuxième séquence, on note également des déformations résiduelles.

On peut penser que cette déformation résiduelle serait due des facteurs comme la cinétique de relaxation des interactions protéiques actine/myosine, à la viscosité de la cellule ou encore à la cinétique de recapture totale du calcium dans les organites de stockage intracellulaires (réticulum, mitochondries, ...).

IV.5. Problème inverse : caractérisation de la dynamique calcique contrôlant les contractions cellulaires

A partir de l'évolution des champs de déformations que nous avons calculés, nous posons le problème inverse suivant : est-il possible de reconstruire à chaque instant le profil spatial des concentrations de Ca^{2+} cytosolic à l'origine des contractions locales des sarcomères ?

Les modèles biomécaniques rappelés en introduction, développés par différents groupes, dont notre équipe, de ce chapitre [PUSTOC'H2005 ; NIEDERER2006 ; TRACQUI2008], considèrent que la contrainte intracellulaire active qui induit localement la contraction du cardiomyocyte est reliée à la concentration cytosolique locale de calcium par la loi phénoménologique suivante :

$$T_{act}(Ca, \lambda) = \gamma(Ca) T_{max}(\lambda) \quad (4.3)$$

$$\gamma(Ca) = \frac{Ca^{nH}}{Ca_{50}^{nH} + Ca^{nH}} \quad (4.4)$$

où $\lambda = SL/SL_0$ est l'élongation locale des sarcomères et $T_{max}(\lambda)$ est la tension maximale

qui peut être générée pour une élongation de sarcomère donnée. Dans cette expression communément admise, la dépendance vis-à-vis du calcium est décrite par une fonction de Hill d'exposant nH , tandis que le terme Ca_{50} est la concentration cytosolique correspondant à la moitié de l'activation maximale. Cette dernière est caractérisée par une amplitude maximale de contrainte T_{max} . Il est bien admis que T_{max} est fonction de la longueur des sarcomères, et différentes fonctions ont été utilisées pour décrire cette dépendance. Les données expérimentales montrent une dépendance de type gaussienne qui peut être décrite par la fonction suivante [TRACQUI2008]

$$T_{max}(\lambda) = \frac{A (\lambda - \lambda_{min})^{p1}}{B + (\lambda - \lambda_{min})^{p2}} \quad (4.5)$$

Considérant la longueur de sarcomère au repos SL_0 , ($\sim 1.9 \mu m$), λ_{min} est le rapport SL_{min}/SL_0 , avec une longueur minimale $SL_{min} = 1.6 \mu m$ des sarcomères. Les paramètres A , B , $p1$ et $p2$ sont des réels positifs identifiés à partir des données expérimentales. Pour des concentrations de Ca^{2+} correspondant à une valeur de pCa (or $-\log[Ca^{2+}]M$) de 4.9, qui induit l'activation totale contractile de la cellule, les valeurs suivantes sont obtenues [TRACQUI 2008] :

$$A = 16 \text{ Pa}, p1=1; p2 = 13; B = 8.41 \cdot 10^{-5}, Ca_{50} = 3.0 \mu M; nH = 2.6.$$

Ainsi nous avons :

$$T_{act}(Ca, \lambda) = \frac{A (\lambda - \lambda_{min})^{p1}}{B + (\lambda - \lambda_{min})^{p2}} \left[\frac{Ca^{nH}}{Ca_{50}^{nH} + Ca^{nH}} \right] \quad (4.6)$$

Notons également que les valeurs de $p1$ et $p2$ sont restreintes à des valeurs entières et $p1=1$ correspond à la forme linéaire de la partie ascendante de la courbe des contraintes également envisagée dans d'autres études.

Niederer et al. [NIEDERER2006] ont introduit un lissage linéaire de la forme:

$$T_M(\lambda) = T_{ref} \left[1 + \beta_0 (\lambda - 1) \right] \quad (4.7)$$

En linéarisant l'expression T_{max} autour de λ_{min} on obtient

$$T_{max}(\lambda) \approx \frac{A}{B} (\lambda - \lambda_{min}) \quad (4.8)$$

qui donne après identification, les valeurs correspondantes des facteurs $\beta_0^* = 6,33$ et $T_{ref}^* = 30 \text{ kPa}$, comparables à celles proposées par Niederer et al. [NIEDERER2006] $\beta_0 = 4,9$

et $T_{ref}=56,2\text{kPa}$ pour un recueil de données expérimentales à partir de différentes espèces et prises dans la partie ascendante de la courbe de tension des sarcomères.

Notons également que l'expression qui est proposée ci-dessus pour $T_{act}(Ca, \lambda)$ n'est valable que pour des longueurs de sarcomères supérieures à la longueur minimale SL_{min} . En dessous de cette valeur, la tension active tend exponentiellement vers zéro. La compression locale observée n'est plus que le résultat d'une compression active locale calcium dépendante, mais la résultante des contractions actives des zones périphériques où la longueur SL est encore supérieure à SL_{min} . On considèrera pour la résolution du problème inverse que la concentration en calcium dans ces zones « tétanisées » de la cellule ($SL \leq SL_{min}$) est au maximum égale à $12,6 \mu\text{M}$, ce qui correspond à la concentration maximale en calcium utilisée dans les expériences de Wiewad et al. [WIEWAD2000], soit environ $4 [Ca_{50}]$.

En conséquence, le tenseur des contraintes actives de Cauchy intracellulaire généré par la sarcomeres a été modélisé en tant que:

$$\boldsymbol{\tau}_{act} = T_{act} \mathbf{f} \otimes \mathbf{f} \quad (4.9)$$

où T_{act} est l'amplitude locale de la contraction intracellulaire, tandis que le symbole \otimes désigne le produit tensoriel (ou dyadique). Le vecteur \mathbf{f} est le vecteur unité dans la direction sarcomère dans la configuration.

Notre modélisation des propriétés mécaniques du cardiomyocyte montre que cette cellule se comporte comme un milieu hyperélastique neo-Hookéen, homogène et incompressible, qui se caractérise par la fonction d'énergie suivante:

$$W_{cell} = a_{cell} (I_1 - 3) \quad (4.10)$$

où a_{cell} est la constante matérielle de la cellule.

Pour ce type de milieu incompressible, une relation explicite entre le module de Young E_{cell} et la constante matérielle a_{cell} peut être obtenue pour des tensions uni-axiales ou de compression du milieu. Pour ces conditions de chargement, nous avons $E_{cell} = 2 a_{cell} (2 + \lambda^{-3})$, où λ est le rapport d'extension dans la direction de la contrainte uniaxiale. Pour des petites extensions ($\lambda \sim 1$), ce qui nous donne une expression de $E_{cell} \sim 6 a_{cell}$. Pustoc'h et al. ont évalué ce module d'Young $E_{cell} \sim 30 \text{ kPa}$ [PUSTOC'H2005] à partir des expériences de traction uniaxial de Cazorla et al. [CAZORLA2003]. On obtient ainsi, une valeur de la constante matérielle $a_{cell} = 5 \text{ kPa}$.

Le tenseur des contraintes de Cauchy à l'intérieur de la cellule est donné par:

$$\boldsymbol{\sigma} = -p\mathbf{I} + \mathbf{F} \frac{\partial W_{cell}}{\partial \mathbf{E}} \mathbf{F}^T + \boldsymbol{\tau}_{act} \quad (4.11)$$

Les observations expérimentales mettent en évidence le caractère quasi-uniaxial de la contraction du cardiomyocyte, cette caractéristique étant directement liée à l'orientation des sarcomères selon le grand axe de la cellule.

On fera l'hypothèse que la cellule est une juxtaposition de disques de largeur h (fig.4.12) glissant les uns sur les autres et se contractant de façon autonome (pincement local). Dans chaque disque, les contraintes de cisaillement sont négligeables.

Dans ces conditions, et en tenant compte des contraintes normales nulles sur les bords de la cellule, les rapports d'élongation dans la configuration déformée de chaque disque d_k peuvent s'écrire simplement vis-à-vis de la configuration initiale de la façon suivante :

$$x_i = \lambda_i(t, d_k) X_i \quad (\text{indices muets non utilisés})$$

Ou chaque indice i ($i=1, \dots, 3$) correspond à la direction portée par le vecteur de base \mathbf{e}_i . Les tenseurs définis précédemment s'écrivent alors :

$$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix} \quad \mathbf{C} = \begin{bmatrix} \lambda_1^2 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2^2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3^2 \end{bmatrix} \quad \mathbf{E} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \lambda_1^2 - 1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2^2 - 1 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3^2 - 1 \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

Avec un premier invariant I_1 qui vaut alors :

$$I_1 = \text{Trace}(\mathbf{C}) = 2E_{ii} + 3 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2$$

La dérivation de la fonction d'énergie de déformation $\partial W_{cell}/\partial \mathbf{E} = (\partial W_{cell}/\partial I_1)(\partial I_1/\partial \mathbf{E})$ donne alors l'expression des trois composantes principales du tenseur de Cauchy $\boldsymbol{\sigma}$ comme :

$$\begin{aligned} \sigma_{11} &= -p + 2\lambda_1^2 a_{cell} + T_{act}(\lambda_1, Ca^{2+}) \\ \sigma_{22} &= -p + 2\lambda_2^2 a_{cell} \\ \sigma_{33} &= -p + 2\lambda_3^2 a_{cell} \end{aligned} \quad (4.13)$$

L'écriture de la première équation traduit le caractère uniaxial de la déformation, l'orientation des sarcomères n'étant alors pas modifiée dans la configuration déformée.

En tenant compte de l'axi-symétrie du problème ($\lambda_2=\lambda_3$), de l'hypothèse d'incompressibilité du milieu cellulaire ($\det(\mathbf{F})=\lambda_1\lambda_2\lambda_3=1$), et des contraintes normales nulles sur les bords de la cellule, la solution du problème inverse est alors donnée par l'équation :

$$T_{act}(\lambda_1, Ca^{2+}) = -2a_{cell} \left(\lambda_1^2 - \frac{1}{\lambda_1} \right) \quad (4.14)$$

A partir de l'expression de $\gamma(Ca^{2+})$, on peut en effet déduire les valeurs de concentrations en calcium cytosolique induisant le pincement cellulaire en calculant pour les zones de compression locales ($E_{II} < 0$) les valeurs :

$$Ca(t, d_k) = Ca_{50} \left[\frac{H(\lambda_1(t, d_k))}{1 - H(\lambda_1(t, d_k))} \right]^{\left(\frac{1}{nH}\right)} \quad H(\lambda_1(t, d_k)) = \frac{-2a_{cell}}{T_{max}(\lambda_1(t, d_k))} \left(\lambda_1(t, d_k)^2 - \frac{1}{\lambda_1(t, d_k)} \right) \quad (4.15)$$

Les profils de déformations E_{xx} calculés par corrélation d'images dans la configuration initiale à des temps successifs de la séquence seq1 sont représentés sous forme d'un scan de ligne sur la figure 4.13 pour une ligne passant par le milieu de l'image projetée de la cellule. Le profil des vagues calciques reconstruites par résolution du problème inverse sont indiquées sur la figure 4.14. Le maximum imposé de 12,6 μM pour les concentrations en calcium dans les zones « téтанisées » ($SL \leq SL_{min}$) est obtenue pour une valeur effective $SL/SL_0 \approx 0,8642$, soit une valeur effective minimale $SL \approx 1,64 \mu\text{m}$ tout à fait cohérente avec la valeur $SL_{min} = 1,6 \mu\text{m}$ déterminée précédemment par le lissage des données expérimentales de tension active.

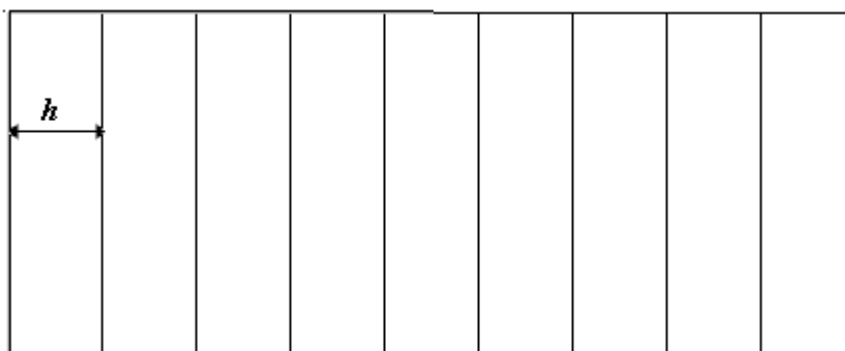


Figure 4.12 : juxtaposition de disques de largeur h représentant le cardiomyocyte.

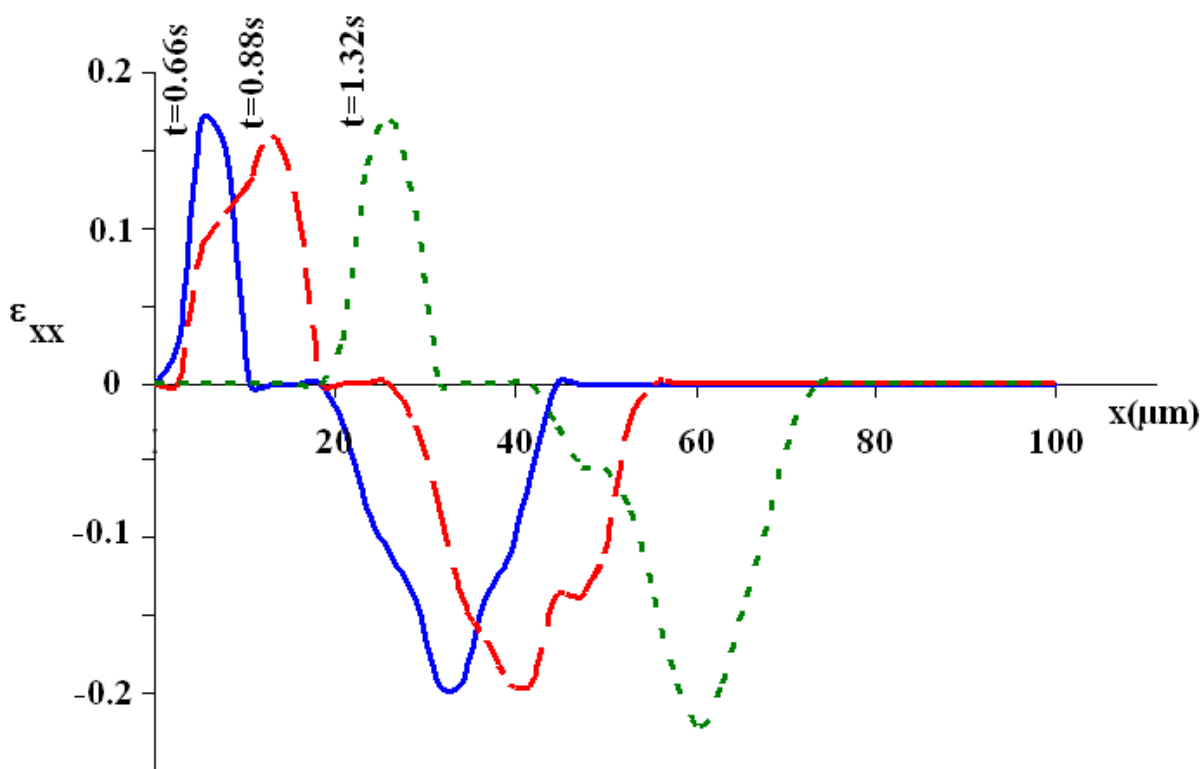


Figure 4.13 : Profil des déformations le long de la ligne médiane traversant le cardiomyocyte à $t=0.66\text{s}$, $t=0.88\text{s}$ et $t=1.32\text{s}$.

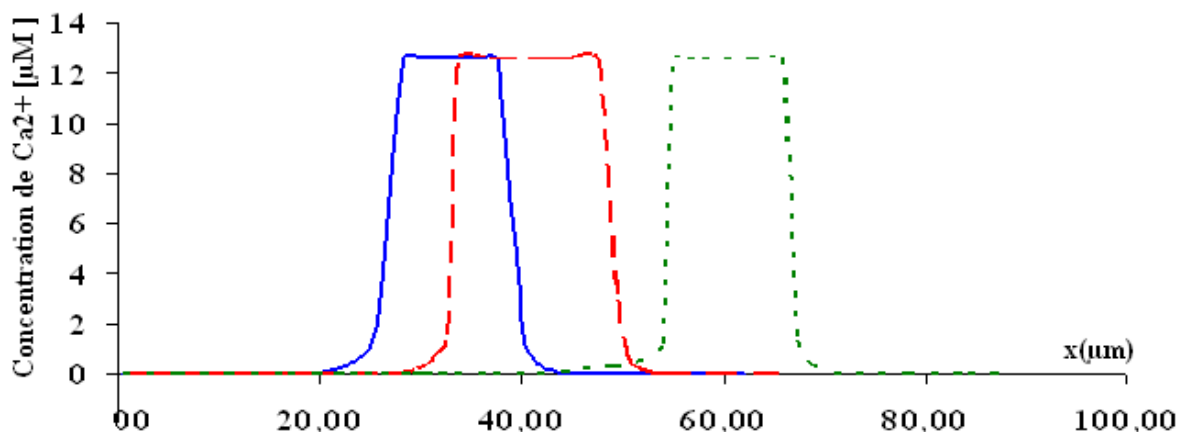


Figure 4.14 : Reconstitution de la concentration de calcium à partir du profil des déformations à $t=0.66s$, $t=0.88s$ et $t=1.32s$

IV.6. Analyse par corrélation d'images des déformations d'un cardiomyocyte néonatal.

De façon à analyser les performances de notre algorithme sur des images moins texturées, mais toujours dans le cadre de contractions cellulaires, nous avons utilisé la corrélation d'images pour analyser les contractions spontanées de cardiomyocytes néonataux. Le cardiomyocyte néonatal est en effet dans un stade de différenciation intermédiaire, dans lequel l'architecture intracellulaire n'est pas encore bien définie : les sarcomères ne sont pas orientés dans une direction privilégiée, et la cellule a une morphologie étalée et non en bâtonnet, comme dans le cas de cardiomyocytes adultes (Fig.4.15). La corrélation d'image se fera sur des structures peu texturées, dans la mesure où l'alternance des bandes claires et foncées n'est pas visible. Rappelons que dans la méthode que nous décrivons au chapitre 3 nous avons deux paramètres dépendants qui nous permettront de contourner ce problème. Le coefficient de corrélation via le seuil δ d'admissibilité de mouvement et la taille de la région d'intérêt via le coefficient ka .

IV.6.1. Culture des cardiomyocytes néo-nataux

La séquence cardiomyocytes néo-natal a été obtenue par M. Triffa [TRIFFA2007].

L'isolation des cellules à partir du ventricule de souris a été réalisée au sein de l'équipe INSERMU877, Radiopharmaceutique biocliniques de la Faculté de Médecine de Grenoble (L. Riou).

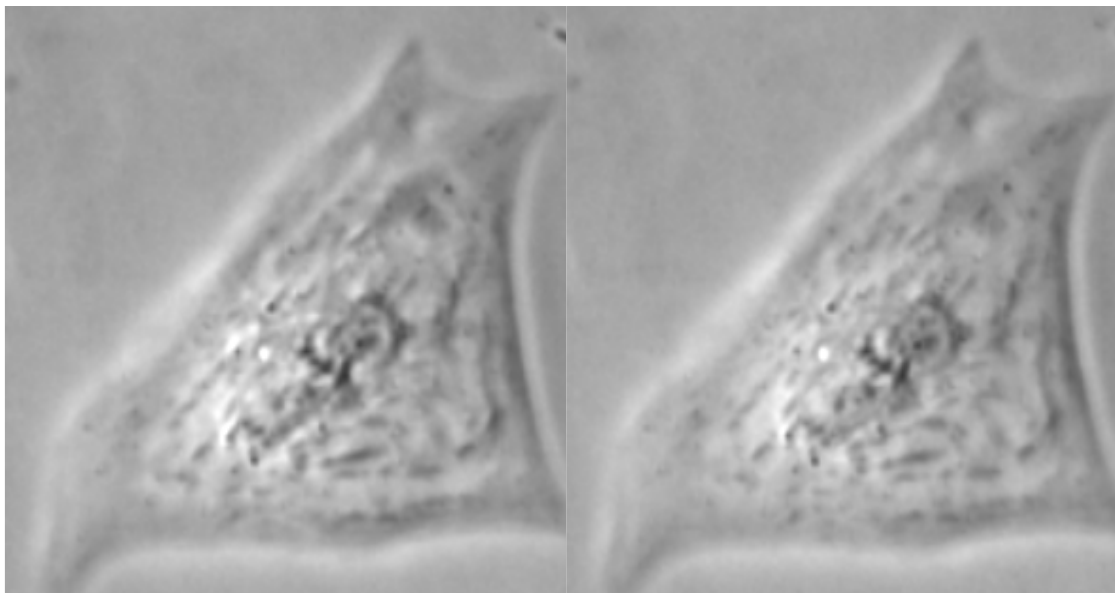


Figure 4.15 : *Images successives de cardiomyocyte néo natal. On peut noter une texture peu spécifique, sans périodicité apparente.*

IV.6.2. Caractérisation des profils de contraction.

Le cardiomyocyte néo-natal présente un comportement totalement différent de celui de la cellule cardiaque adulte. On note sur plusieurs périodes l'apparition d'un champ de déplacements centrifuges ou centripètes, ce qui dénote une dynamique totalement différente de la vague de calcium.

Quantitativement, on obtient des amplitudes de déformations égales au tiers de celles développées par le cardiomyocyte adulte. Ces valeurs sont en accord avec les données expérimentales rapportées par [SIEDNER2003 ; CAI1999] et seraient probablement dues au fait que les sarcomères ne sont pas encore matures, et donc avec une capacité contractile plus faible qu'au stade adulte.

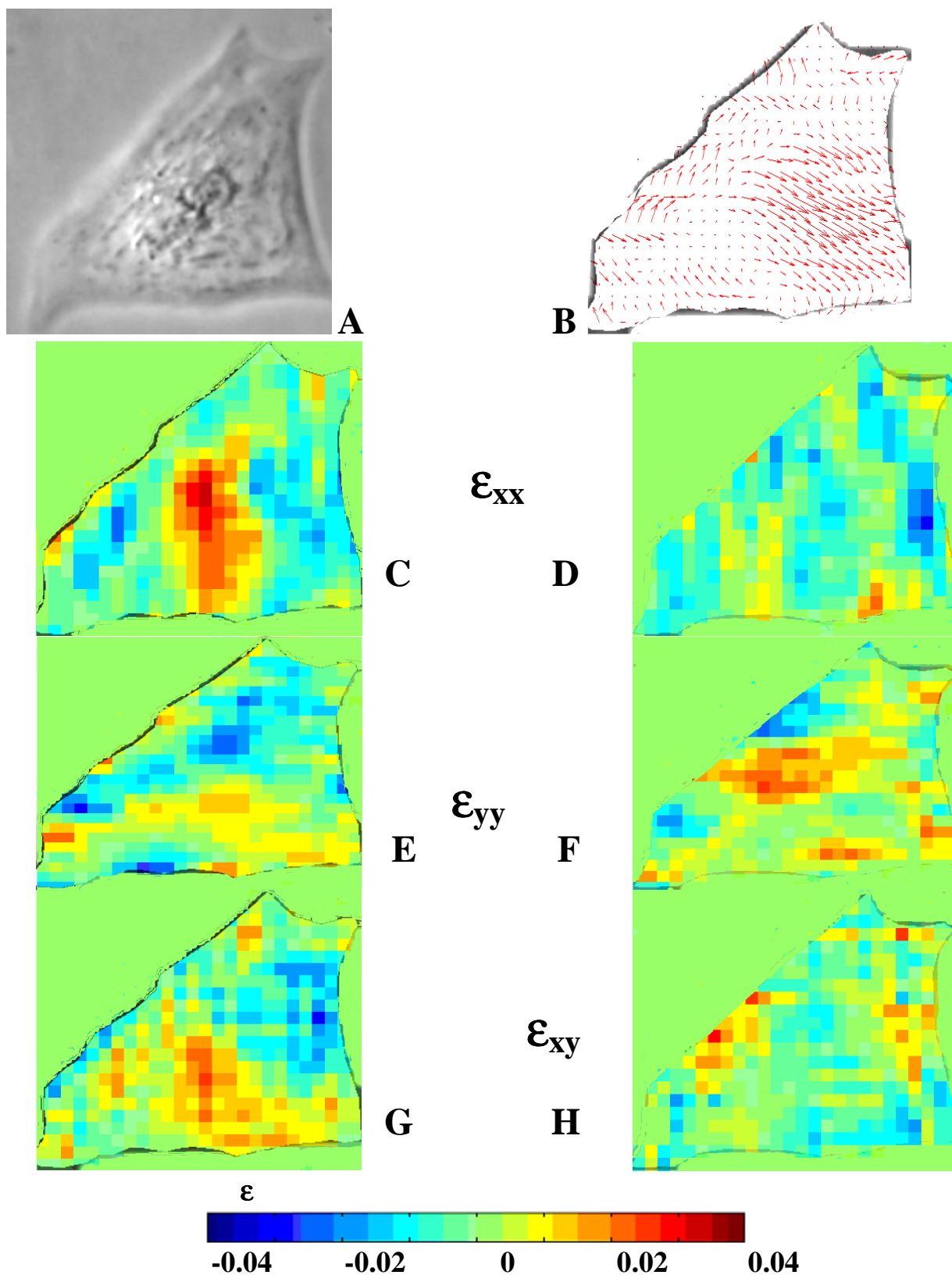


Figure 4.20 : Résultat de la corrélation d'images sur cardiomyocyte nouveau né. Pour ces résultats, nous avons choisi une taille de fenêtre $s_i=s_{i1}=s_{i2}=10$ pixels et une région d'intérêt de 30 pixels, la tolérance $\delta=0.75$. (A) Champ de déplacements, (B) score de corrélation, (C) déformation ϵ_{xx} , (D) déformation ϵ_{yy} , (E) cisaillement ϵ_{xy} .

IV.7. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons appliqué la méthode de corrélation d'images développée au chapitre 3 sur des séquences de contraction du cardiomyocyte. Ceci nous a permis de quantifier les variations spatio-temporelles des déformations à l'échelle des sarcomères. Cette méthode de traitement d'images permet de suivre les déformations de la cellule à partir de l'analyse de corrélation des niveaux de gris de deux images consécutives.

Tout en appartenant à la classe des méthodes de traitement d'image pour l'analyse du mouvement à partir des séquences d'images [BARRON1994], cette approche est encore rarement utilisée dans le cadre de la dynamique cellulaire [GERMAIN1999 ;COLLIN2006]. En effet, l'association des limites dues au faible contraste des images et aux grandes déformations limitent la mise en œuvre des méthodes de flot optique. Ainsi, afin d'obtenir une représentation vectorielle 2D des déplacements dans l'image, les conditions de régularisation sont généralement ajoutées. La méthode développée au chapitre 3, appliquée dans ce chapitre présente d'importantes améliorations par rapport à la méthode utilisée dans d'autres études [CAI2003 ;HU1999], car elle évite d'introduire des contraintes de régularisation. En fait, notre méthode tire parti de la texture naturelle fournie par les sarcomères. En effet, il n'est pas nécessaire d'utiliser des marqueurs spécifiques, tels que les microbilles, sur la surface de la cellule pour suivre la cinématique intracellulaire [DEMBO1999; RIVELINE2001 ;BALABAN2001].

Ainsi, notre approche offre un moyen simple et efficace qui permet de relier les observations faites sur l'ensemble de la cellule à une dynamique locale plus fine à l'échelle des sarcomères. L'approche proposée semble plutôt satisfaisante et puissante d'autant que l'intégration des champs de déplacements calculés à l'échelle sub-cellulaire sont en accord avec les mesures globales du raccourcissement obtenu par le suivi des deux extrémités du cardiomyocyte. En conséquence, nous avons été en mesure d'identifier avec précision l'amplitude et les variations spatio-temporelles des déformations caractérisées par des contraction / relaxation successives des sarcomères. Grâce à une telle analyse, nous avons mis en évidence l'existence des déformations « résiduelles » au sein du cardiomyocyte adulte.

La précision de la méthode nous assure que les déplacements de quelques microns

peuvent être détectés avec fiabilité. Cependant, notre algorithme peut encore être amélioré afin de permettre une précision inférieure au pixel.

Nous avons également souligné l'importance de nos résultats pour la résolution du problème inverse consistant à déterminer les concentrations de calcium à partir des déformations négatives longitudinales.

Enfin, nous avons montré que notre approche fondée sur la corrélation reste fiable pour l'analyse des déformations mécaniques des cellules qui ne présentent pas des structures régulières ou organisées. C'est le cas des cardiomyocytes de rats nouveau-nés qui n'ont pas cette structure bien organisée des sarcomères observable sur les cardiomyocytes adultes. Notre code de corrélation d'images réussi à quantifier la dynamique complexe des cardiomyocytes de rat nouveau-nés composée des phases de contractions centripètes qui génèrent des cisaillements non négligeables.

En conclusion, l'approche proposée offre des améliorations significatives par rapport aux méthodes classiques qui permettent de quantifier les déformations du cardiomyocyte en utilisant des techniques de diffraction ou des sondes fluorescentes. Cette méthode permet une mesure directe et non invasive des déformations à l'échelle des sarcomères, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation des techniques de micromanipulation comme la magnétocytométrie [LAMMERDING2003] ou la microscopie à force atomique [LIEBER2004].

PERSPECTIVES

La relation entre structure, propriété et fonction est bien établie en science des matériaux : la structure confère une propriété qui peut être mise à profit en spécifiant la fonction au matériau.

Dans une première phase de ce travail de thèse, nous avons proposé une démarche rigoureuse qui permet d'affiner la quantification du module d'Young en considérant l'influence des facteurs géométriques. Ainsi, contrairement aux études précédentes où n'était calculé qu'un module d'Young apparent, ce travail permet de mieux estimer le module d'Young intrinsèque de la cellule. Maksym et al. [MAKSYM2000] avaient souligné la dépendance des modules d'élasticité par rapport aux techniques de micromanipulation. La démarche suivie dans ce travail de thèse devrait permettre de réduire sensiblement les disparités entre les propriétés mécaniques cellulaires identifiées à partir de différentes techniques.

De nos jours plusieurs études ont mis en évidence le rôle de la rhéologie de la cellule dans certaines pathologies. On peut citer les maladies infectieuses dues au *plasmodium falciparum* malaria. Les résultats indiquent que pendant une période de 48 h après l'invasion du globule rouge par le merozoite, la rigidité de la cellule augmente d'un facteur de 10 [MILLS2007]. Quelque soit la technique utilisée, la prise en compte des paramètres géométriques est capitale pour mieux estimer ce facteur et à fortiori poser un bon diagnostic.

En médecine comme en biologie, l'exploration des propriétés du vivant nous oblige à développer des outils de caractérisation non invasifs. C'est pourquoi, dans une deuxième partie de ce nous avons développé avec succès un outil de quantification des déformations spatio-temporelles de la cellule. Grâce à cet outil, nous avons pu mettre en exergue la relation entre mécanique et biochimie au sein de la cellule musculaire cardiaque.

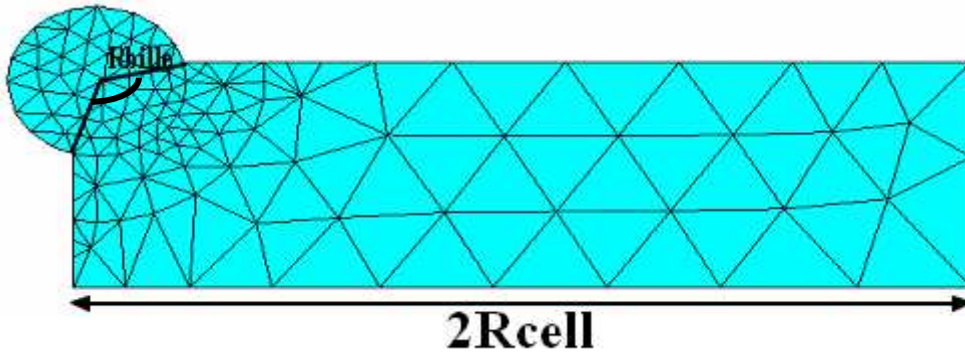
Tirant bénéfice de la méthode de corrélation d'images développée dans ce travail de thèse, nous avons obtenu des premiers résultats encourageants vers une nouvelle élastographie d'images d'IVUS des sections d'artères coronariennes.

Rappelons que les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont parmi les premières causes de mortalité dans le monde. Leur prévalence devrait croître dans les prochaines années en raison de l'adoption par des populations jusque-là épargnées de modes de vie occidentaux comportant des facteurs de risque inhérents.

La vulnérabilité de la plaque d'athérome dépend de sa morphologie et des propriétés mécaniques de ses constituants et l'analyse de son évolution est déterminante pour les praticiens. Grâce à l'évolution de la technologie des ultrasons, l'Ultrasonographie Intravasculaire (IVUS) a pris une place importante dans la détection des plaques d'athéromes. Contrairement à l'angiographie on est capable d'obtenir des images de façon moins invasive d'une artère. En effet, le signal ultrasore réfléchi par les structures composant la paroi artérielle est utilisé pour générer une image en niveaux de gris. Cependant, la présence de calcifications opacifie le signal en provenance des régions sous-jacentes, la différenciation entre zones calcifiées et zones lipidiques est très difficile, et la résolution de cette technique ne permet pas de discerner la capsule fibreuse caractéristique des plaques vulnérables. Des résultats préliminaires ont montré que notre algorithme peut être également utilisé dans ce contexte. Cette nouvelle élastographie basée sur la corrélation d'images permet d'identifier différentes régions (ou zones) de textures et probablement de rigidités différentes. Ceci ouvre des perspectives tout à fait intéressantes à l'approche par corrélation d'images que nous avons développé dans cette thèse.

ANNEXE I

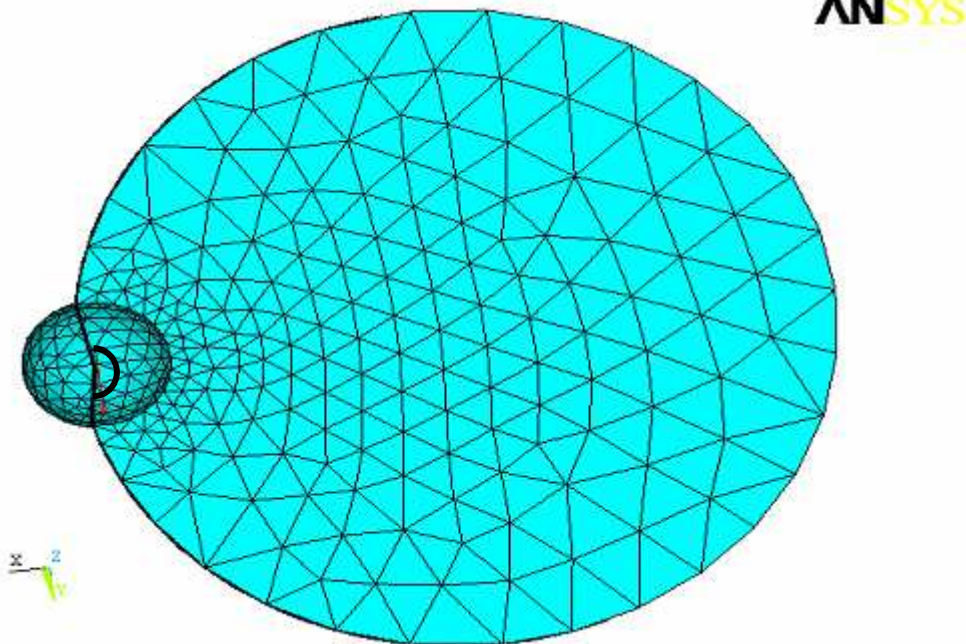
Dans le plan (X,Z), l'angle défini est l'angle d'imprégnation dit réel γ_{re} .



Les coordonnées du centre de la bille dans ce plan sont définies par :

$$\begin{cases} X_c = R_{cell} + R_{bille} \cos\left(\gamma_{re} + \frac{\pi}{4}\right) \\ Z_c = H_{cell} + R_{bille} \cos\left(\gamma_{re} + \frac{\pi}{4}\right) \end{cases} \quad (1.1)$$

Dans le plan (X,Y), l'angle défini est l'angle d'imprégnation dit apparent γ_{ap}



$$\begin{cases} X_c = R_{cell} + R_{bille} \cos(\gamma_{ap}) \\ Y_c = R_{cell} \end{cases} \quad (1.1)$$

Des équations (1.1) et (1.2) on obtient

$$\gamma_{re} = \gamma_{ap} - \frac{\pi}{4}$$

BIBLIOGRAPHIE

ABNET2000 : Abnet, C. C. and D. M. Freeman (2000). "Deformations of the isolated mouse tectorial membrane produced by oscillatory forces." *Hear Res* 144(1-2): 29-46.

AKHMANOVA2008 : Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz (2008). "Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 309-22.

ALCARAZ2003 : Alcaraz, J., L. Buscemi, et al. (2003). "Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy." *Biophys J* 84(3): 2071-9.

ALEXOPOULOS2003 : Alexopoulos, L.G., Haider, M.A., Vail, T.P., and Guilak, F., 2003. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis, *J. Biomech. Eng.* **125**, 323-333.

AOKI1997 : Aoki, T., Ohashi, T., Matsumoto, T., and Sato, M., 1997. The pipette aspiration applied to the local stiffness measurement of soft tissues. *Ann. Biomed. Eng.* **25**, 581-587.

ASCHWANDEN1992 : P. Aschwanden and W. Guggenbühl, "Experimental results from a comparative study on correlationtype registration algorithms," in *Robust Computer Vision*, Forstner and Ruwiedel, Eds., pp. 268–282. Wichmann, 1992.

ASHKIN1970 : Ashkin, A. 1970. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* 24:156-59

ASHKIN1987 : Ashkin, A., J. M. Dziedzic, and T. Yamane. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 330:769-771

BALABAN2001 : Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. and Geiger, B., 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 166-472.

BALLAND2005 : Balland, M., A. Richert, et al. (2005). "The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts." *Eur Biophys J* 34(3): 255-61.

BALLAND2006 : Balland, M., N. Desprat, et al. (2006). "Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 74(2 Pt 1): 021911.

BAND1964 : Band, R.P., Burton, A.C., 1964. Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophysical Journal* 4, 115.

BARBER2002 : J.R.Barber, Elasticity, Kluwer, Dordrecht 2nd edn. (2002), 410pp.

BARRON1994 : Barron J.L, Fleet D, Beauchemin S. Performance of optical flow techniques. International Journal of Computer Vision 1994; 12(1).

BAUSCH1998 : Bausch AR, Moller W, Sackmann E. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys J* 1999;76(1 Pt 1):573-9.

BAUSCH1999 : Bausch, A. R., F. Ziemann, et al. (1998). "Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry." *Biophys J* 75(4): 2038-49.

BECHE2007 : A B  ch  , J L Rouvi  re, J C Barb  , F Andrieu, J Eymery, M Mermou, D Rouchon. Colloque SF  -2007 – Grenoble

BELEVYCH2007: Belevych A, Kubalova Z, Terentyev D, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorke S. Enhanced ryanodine receptor-mediated calcium leak determines reduced sarcoplasmic reticulum calcium content in chronic canine heart failure. *Biophys J* 2007;93(11):4083-92.

BERGONNIER2005 : Bergonnier S, Hild F, Rieunier J, Roux S. Strain heterogeneities and local anisotropy in crimped glass wool. *Journal of Materials Science* 2005;40:5949–54.

BERGONNIER2007 : BERGONNIER, S., HILD, F., ROUX, S. *Local anisotropy analysis for non-smooth images*. *Pattern Recognition*. Vol 40. Num 2. Pages 544-556. 2007

BESNARD2006 : Besnard G, Hild F, Roux S. "Finite-Element" Displacement Fields Analysis from Digital Images: Application to Portevin–Le Ch  telier Bands. *Experimental Mechanics* 2006; 46: 789–803

BILODEAU1992 : G. Bilodeau. Regular pyramid punch problem. *J.Appl.Mech. Trans.ASME*, 59:519–523, 1992.

BLOOD2006 : Blood, P. D. and G. A. Voth (2006). "Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15068-72.

BOLDOGH2006 : Boldogh, I. R. and L. A. Pon (2006). "Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton." *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 450-62.

BOERBOOM2008 : Boerboom RA, Rubbens MP, Driessen NJ, Bouten CV, Baaijens FP. Effect of strain magnitude on the tissue properties of engineered cardiovascular constructs. *Ann Biomed Eng* 2008;36(2):244-53.

BOUDOU2006 : Boudou, T., J. Ohayon, et al. (2006). "An extended relationship for the characterization of Young's modulus and Poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels." *Biorheology* 43(6): 721-8.

BOUDOU2007 : Boudou T, Ohayon J, Picart C, Tracqui P. Influences of adhesion area and biological sample size on the estimation of Young's modulus and Poisson's ratio assessed by micropipette aspiration technique. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007;2007:5391-4.

BRUHN2005 : Andrés Bruhn, Joachim Weickert and Christoph Schnörr. *Lucas/Kanade Meets Horn/Schunck: Combining Local and Global Optic Flow Methods International Journal of Computer Vision. Volume 61, Number 3 / février 2005*

BUGUIN2005 : Axel Buguin, Philippe Chavier, Benoit Ladoux, Olivia du Roure, Alexandre Saez, Pascal Silberzan. Un substrat de micropiliers pour étudier la migration cellulaire. *MEDECINE/SCIENCES* 2005 ; 21 : 765-7

CAGALINEC2007: Cagalinec M, Chorvat D, Jr., Mateasik A, Bacharova L. Sustained spiral calcium wave patterns in rat ventricular myocytes. *J Cell Mol Med* 2007;11(3):598-9.

CAI1999 : H Cai, Y. Usson, **P-S. Jouk**, J. Ohayon. Fiber Orientation in Mid-gestation Human fetal Heart and ventricular mechanics, *Innov.Techn.Biol. Med.*, 1999, 20(2): 67-83

CAI2003 : Cai H, Richter CP, Chadwick RS. Motion analysis in the hemicochlea. *Biophys J* 2003;85(3):1929-37.

CAILLE2002 : Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y. and Meister, J.J. 2002. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J. Biomech.* 35, 177–187

CANADAS2003 : Canadas, P., V. M. Laurent, et al. (2003). "Mechanisms governing the visco-elastic responses of living cells assessed by foam and tensegrity models." *Med Biol Eng Comput* 41(6): 733-9.

CANADAS2003 : Canadas, P. (2003). "Modèle de tenségrité viscoélastique pour l'étude de la réponse dynamique des cellules adhérentes". Thèse de doctorat Université Paris XII.

CHOTARD-GHODSNIA2007: Chotard-Ghodsnia, R., Haddad, O., Leyrat, A., Drochon, A., Verdier, C. and Duperray, A., 2007. Morphological analysis of tumor cell/endothelial

cell interactions under shear flow. *J. Biomech.* **40**(2), 335-44.

COLLIN2006 : Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clément-Lacroix, J. and Planus, E., 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility, *J. Cell. Sci.* **119**, 1914-1925

COULOMBE2000 : Coulombe, P. A., O. Bousquet, et al. (2000). "The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization." *Trends Cell Biol* 10(10): 420-8.

CRICK1950 : Crick, F.H.C., Hughes, A.F.W., 1950. The physical properties of cytoplasm: a study by means of the magnetic particle method. Part I. Experimental. *Experimental Cell Research* 1, 37–80.

DAUBECHIES2008 : Ingrid Daubechies, Ronald DeVore, Massimo Fornasier, C. Sinan Gunturk Iteratively re-weighted least squares minimization for sparse recovery, 2008.

DEMBO1999 : Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 1999;76(4):2307-16.

DESPRAT2005 : Desprat, N., A. Richert, et al. (2005). "Creep function of a single living cell." *Biophys J* 88(3): 2224-33.

DHOOGHE2008 : Dhooge, A. and Govaerts, W. and Kuznetsov, Y.A. and Meijer, H.G.E. and Sautois, B. (2008) *New features of the software MatCont for bifurcation analysis of dynamical*

DOUMALIN2000 : *Microextensométrie locale par corrélation d'images numériques. Application aux études micromécaniques par microscopie électronique à balayage.* Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique (France), juin 2000.

DOYLE2008 : Doyle TE, Warnick KH, Carruth BL. Histology-based simulations for the ultrasonic detection of microscopic cancer in vivo. *J Acoust Soc Am* 2007;122(6):EL210-6.

DU ROURE2005 : Du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R.H., Chavrier, P., Silberzan, P. and Ladoux, B., 2005. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2390-2395.

DUPONT2007: Dupont G, Combettes L, Leybaert L. Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int Rev Cytol* 2007;261:193-245.

ESKANDARI2008: Eskandari, H., S. E. Salcudean, et al. (2008). "Viscoelastic characterization of soft tissue from dynamic finite element models." *Phys Med Biol* 53(22): 6569-90.

ESUE2006: Esue, O., A. A. Carson, et al. (2006). "A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin." *J Biol Chem* 281(41): 30393-9.

FABRY1999: Fabry, B., Maksym, G.N., Hubmayr, R.D., Butler, J.P. and Fredberg, J.J., 1999. Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry. *J. Mag. Magn. Mat.* **194**, 120-125.

FAUGERAS1993: O.Faugeras, B.Hotz, H.Mathieu, T.Vieville, Z.Zhang, P.Fua, E.Theron, M.Laurent, G.Berry, J.Vuillemin, P.Bertin, et C.Proy. Real time correlation based stereo: algorithm implementations and applications. RT 2013, INRIA, 1993.

FLEET1992: D. J. Fleet. *Measurement of Image Velocity*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1992

FODIL2003: Fodil, R., V. Laurent, et al. (2003). "Characterization of cytoskeleton mechanical properties and 3D-actin structure in twisted adherent epithelial cells." *Biorheology* 40(1-3): 241-5.

GALVIN1998: B. Galvin, B. McCane, K. Novins, D. Mason, S. Mills. Recovering Motion Fields: An Evaluation of Eight Optical Flow Algorithms. In *British Machine Vision Conference (BMVC'98)*, septembre 1998.

GAO2000: GAO X. Q ; DUANMU C. J.; ZOU C. R.; A multilevel successive elimination algorithm for block matching motion estimation. *IEEE transactions on image processing*. 2000, vol. 9, n°3, pp. 501-504

GARCIA2001: Dorian GARCIA, Mesure de formes et de champs de déplacements tridimensionnels par stéréo-corrélation d'images. Thèse de doctorat : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2001

GASVIK2002: Kjell Gasvik, *Optical Metrology*, John Wiley & Sons, 2002.

GEE1995 : James C. Gee, David R. Haynor, Lionel Le Briquer and Ruzena K. Bajcsy. Advances in elastic matching theory and its implementation. *Lecture Notes in Computer Science* 63-72

GEERTS1987 : Geerts, H., De Brabander, M., Nuydens, R., Geuens, S., Moeremans, M., De Mey, J., Hollenbeck, P., 1987. Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophysical Journal* 52 (5), 775–782.

GERMAIN1999 : Germain F, Doisy A, Ronot X, Tracqui P. Characterization of cell deformation and migration using a parametric estimation of image motion. *IEEE Trans Biomed Eng* 1999;46(5):584-600.

GIGANTI2003 : Giganti, A. and E. Friederich (2003). "The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions." *Prog Cell Cycle Res* 5: 511-25.

GLADWELL1980 : Gladwell, G. M. L. 1980. *Contact Problems in the Classical Theory of Elasticity*. Nijthoff & Noordhoff, Alphen aan den Rijn, Netherlands. 716 pp.

GOLDBETER1990 : Goldbeter, A., G. Dupont, et al. (1990). "Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4): 1461-5.

GOLDMAN1996 : Goldman, R. D., S. Khuon, et al. (1996). "The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity." *J Cell Biol* 134(4): 971-83.

GOLDMAN1999 : Goldman, R. D., Y. H. Chou, et al. (1999). "Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems." *FASEB J* 13 Suppl 2: S261-5.

GOV2006: Gov, N. S. and A. Gopinathan (2006). "Dynamics of membranes driven by actin polymerization." *Biophys J* 90(2): 454-69.

HALLEZ2007 : Hallez H, Vanrumste B, Grech R, Muscat J, De Clercq W, Vergult A, D'Asseler Y, Camilleri KP, Fabri SG, Van Huffel S and others. Review on solving the forward problem in EEG source analysis. *J Neuroeng Rehabil* 2007;4:46.

HAN2006 : Han, C.C., Yao, Y., Zhang, R. and Hobbie, E.K., 2006. Effect of shear flow on multi-component polymer mixtures. *Polymer* **47**, 3271–3286

HELFAND2004 : Helfand, B. T., L. Chang, et al. (2004). "Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture." *J Cell Sci* 117(Pt 2): 133-41.

HELFEN2002 : HELFEN Lukas; BAUMBACH Tilo; STANZICK Heiko; BANHART John; ELMOUTAOUAKKIL Abdelmojid; CLOETENS Peter. Viewing the early stage of metal foam formation by computed tomography using synchrotron radiation. *Advanced engineering materials*. 2002, vol. 4, n°10.

HENGL2007: Hengl S, Kreutz C, Timmer J, Maiwald T. Data-based identifiability analysis of non-linear dynamical models. *Bioinformatics* 2007;23(19):2612-8.

HENON1999 : Henon, S., G. Lenormand, et al. (1999). "A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers." *Biophys J* 76(2): 1145-51.

HERTZ1882 : Hertz, H. 1882. Über den Berührung fester elastischer Körper. *J. Reine Angew. Mathematik*. 92:156-171.

HILD2006 : HILD, F., ROUX, S. *Digital image correlation : from displacement measurement to identification of elastic properties - a review*. *Strain*. Vol 42. Pages 69-80. 2006

HIRAKAWA2007 : Hirakawa, M., Y. Karashima, et al. (2007). "Protein kinase A inhibits lysophosphatidic acid-induced migration of airway smooth muscle cells." *J Pharmacol Exp Ther* 321(3): 1102-8.

HIVER2001 : J. M. Hiver, J. Etienne, C. G'sell. Mesure de l'endommagement plastique dans une striction par un système d'analyse d'image. Dans *Photomécanique'2001*, Futuroscope, Poitiers (France), avril 2001.

HOH1994 : Hoh JH, Schoenenberger CA. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 5):1105-14.

HOLZAPFEL2001 : Holzapfel, G.A., 2000. *Nonlinear solid mechanics*. Ed. John Wiley & Sons, LTD, New York.

HORN1981 : B.K.P. Horn and B.G. Schunck. Determining optical flow. *Artificial Intelligence*, 17: 185-203, 1981.

HOWARD2003 : Howard, J. and A. A. Hyman (2003). "Dynamics and mechanics of the microtubule plus end." *Nature* 422(6933): 753-8.

HUANG2008: Huang K, Huang D, Fu S, Yang C, Liao Y. Abnormal calcium "Sparks" in cardiomyocytes of post-myocardial infarction heart. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28(4):401-8.

HUBMAYR1996 : Hubmayr RD, Shore SA, Fredberg JJ, Planus E, Panettieri RA, Jr., Moller W, Heyder J, and Wang N. Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271:C1660-C1668, 1996.

JANMEY1995 : Janmey, P. A. and C. Chaponnier (1995). "Medical aspects of the actin cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* 7(1): 111-7.

JOHNSON1985 : Johnson, K. L. 1985. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge. 452 pp.

KLANN2006 : E. Klann, P. Maaß, R. Ramlau. Two-step regularization methods for linear inverse problems. *Journal of Inverse and Ill-posed Problems*. Volume 14, Issue 6, Pages 583–607

KOJIMA1994 : Kojima, T., N. Sawada, et al. (1994). "Rapid appearance of connexin 26-positive gap junctions in centrilobular hepatocytes without induction of mRNA and protein synthesis in isolated perfused liver of female rat." *J Cell Sci* 107 (Pt 12): 3579-90.

LAI2008 : Lai, F. P., M. Szczodrak, et al. (2008). "Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia." *EMBO J* 27(7): 982-92.

LAURENT2002 : Laurent, V. M., S. Henon, et al. (2002). "Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers." *J Biomech Eng* 124(4): 408-21.

LE SANT2002 : Y. Le Sant, M. Marchand, P. Millan and J. Fontaine. *An overview of infrared thermography techniques used in large wind tunnels*. *Aerospace Science and Technology*, Vol 6 Issue 5. Pages 355-366, September 2002.

LEADSHAM2008 : Leadsham, J. E. and C. W. Gourlay (2008). "Cytoskeletal induced apoptosis in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1406-12.

LENORMAND2001 : Lenormand, G., Hénon, S., Richert, A., Siméon, J. and Gallet, F., 2001. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 81, 43-56.

LEVENBERG1944 : K. Levenberg, "A method for the solution of certain nonlinear problems in least squares," *Quart. Appl. Math.*, vol. 2, pp. 164-166, 1944.

LI1995 : LI W. ; SALARI E., Successive elimination algorithm for motion estimation. IEEE transactions on image processing. 1995, vol. 4, n°1, pp. 105-107.

LIN2005 : Lin DC, Yurke B, Langrana NA., Use of rigid spherical inclusions in Young's moduli determination: application to DNA-crosslinked gels. J Biomech Eng. 2005 Aug;127(4):571-9.

LOUGHREY2003: Loughrey CM, MacEachern KE, Cooper J, Smith GL. Measurement of the dissociation constant of Fluo-3 for Ca²⁺ in isolated rabbit cardiomyocytes using Ca²⁺ wave characteristics. Cell Calcium 2003;34(1):1-9.

MA2007: Ma Q, He B. Investigation on magnetoacoustic signal generation with magnetic induction and its application to electrical conductivity reconstruction. Phys Med Biol 2007;52(16):5085-99.

MAHAFFY2004 : Mahaffy, R. E., S. Park, et al. (2004). "Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy." Biophys J 86(3): 1777-93.

MAIWALD2008: Maiwald T, Timmer J. Dynamical Modeling and Multi-Experiment Fitting with PottersWheel. Bioinformatics 2008.

MAKSYM2000 : Maksym, G. N., B. Fabry, et al. (2000). "Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz." J Appl Physiol 89(4): 1619-32.

MALTSEV1998 : Maltsev, V. A., H. N. Sabbah, et al. (1998). "Relationship between action potential, contraction-relaxation pattern, and intracellular Ca²⁺ transient in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure." Cell Mol Life Sci 54(6): 597-605.

MARTEL2007 : Martel AL, Froh MS, Brock KK, Plewes DB, Barber DC. Evaluating an optical-flow-based registration algorithm for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the breast. Phys Med Biol 2007;52(13):3803-16.

MATHUR2000 : Mathur, A. B., G. A. Truskey, et al. (2000). "Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells." Biophys J 78(4): 1725-35.

MAURER1993 : Maurer, Calvin R. and Fitzpatrick, J. Michael. (1993) *A review of medical image registration.* in Interactive Image-Guided Neurosurgery

MIJAILOVICH2002 : Mijailovich, S. M., M. Kojic, et al. (2002). "A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting." *J Appl Physiol* 93(4): 1429-36.

MITCHISON1954 : Mitchison, J.M., Swann, M.M., 1954. The mechanical properties of the cell surface I. The cell elastimeter. *Journal of Experimental Biology* 31, 443–460.

MIURA1993 : Miura M, Ishide N, Oda H, Sakurai M, Shinozaki T, Takishima T. Spatial features of calcium transients during early and delayed afterdepolarizations. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 2):H439-44.

MODERSITZKI2004 : Modersitzki, J., *Numerical methods for image registration*, Oxford University Press, New York, 2004.

MOTASSADEQ2007 : EL MOTASSADEQ Ahmed; CHEHOUANI Hassan; Étude du transfert de chaleur dans l'air sous un disque horizontal par interférométrie de shearographie, *Comptes rendus. Physique*, 2007, vol. 8, n°7-8, pp. 929-936.

MURAT1997 : A. Murat. *Tekalp Digital Video Processing* Prentice Hall 1995

NIEDERER2006 : Niederer SA, Hunter PJ, Smith NP. A quantitative analysis of cardiac myocyte relaxation: a simulation study. *Biophys J* 2006;90(5):1697-722.

NISHIMURA2004 : Nishimura S, Yasuda S, Katoh M, Yamada KP, Yamashita H, Saeki Y, Sunagawa K, Nagai R, Hisada T, Sugiura S. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(1):H196-202.

OHAYON2005 : Ohayon, J. and P. Tracqui (2005). "Computation of adherent cell elasticity for critical cell-bead geometry in magnetic twisting experiments." *Ann Biomed Eng* 33(2): 131-41.

OLIVARES1992 : Olivares J, Dubus I, Barrieux A, Samuel JL, Rappaport L, Rossi A. Pyrimidine nucleotide synthesis is preferentially supplied by exogenous cytidine in adult rat cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24(11):1349-59.

ORKISZ1996 : ORKISZ M. ; CLARYSSE P.; Estimation du flot optique en présence de discontinuités : une revue, *Traitement du signal*, volume 13, n° 5 (1996), pp. 489-513.

PARK2005: Park, S., D. Koch, et al. (2005). "Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts." *Biophys J* 89(6): 4330-42.

PETERSEN1982 : Petersen, N.O., McConnaughey, W.B., Elson, E.L., 1982. Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin B. *PNAS* 79 (17), 5327–5331.

PHOTOMECAIQUE2007 : 5ème édition francophone (Photomécanique 2007) Congrès Français de Mécanique (CFM2007) à Grenoble (France) du 27 au 31 août 2007.

PRIEBE1998 : Priebe L, Beuckelmann DJ. Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 1998;82(11):1206-23.

PUSTOC'H2005: Pustoc'h A, Ohayon J, Usson Y, Kamgoue A, Tracqui P. An integrative model of the self-sustained oscillating contractions of cardiac myocytes. *Acta Biotheor* 2005;53(4):277-93.

RASTOGI1991: RASTOGI P. K. ; BARILLOT M. ; KAUFMANN G. H. ; Comparative phase shifting holographic interferometry. *Applied optics* 1991, vol. 30, n°7, pp. 722-728

ROCKWELL1999: Rockwell PL, Storey BT. Determination of the intracellular dissociation constant, $K(D)$, of the fluo-3. $Ca(2+)$ complex in mouse sperm for use in estimating intracellular $Ca(2+)$ concentrations. *Mol Reprod Dev* 1999;54(4):418-28

ROHR2001 : Rohr, K.; Stiehl, H.S.; Sprengel, R.; Buzug, T.M.; Weese, J.; Kuhn, M.H. Landmark-based elastic registration using approximating thin-plate splines. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* Volume 20, Issue 6, June 2001 Page(s):526 - 534

ROTINAT2001 : Rotinat, R., Tie Bi, R., Valle, V. & Dupré, J.C. 2001 Three optical procedure for local large strain measurement. *Strain*. **Vol 37, N°3**, 89-98

RUPP2005 : Rupp, C.J., Fux, C.A., and Stoodley, P., 2005. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl. Env. Microbiol.* **71**(4), 2175–2178.

SABATIER2000 : Pierre C. Sabatier, Past and future of inverse problems. *J. Math. Phys.* **41**, 4082 (2000); DOI:10.1063/1.533336

SAMBRIDGE2003 : Sambridge M. Geophysics. An ensemble view of Earth's inner core. *Science* 2003;299(5606):529-30.

SCHOLEY2003 : Scholey, J. M., I. Brust-Mascher, et al. (2003). "Cell division." *Nature* 422(6933): 746-52.

SCHREIER2000 : Schreier, H.W. , Braasch, J. R. and Sutton, M. 2000 Systematic errors in digital image correlation caused by intensity interpolation *Optical Engineering* 39 2915—2921

SEKINO2007 : Sekino, Y., N. Kojima, et al. (2007). "Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis." *Neurochem Int* 51(2-4): 92-104.

SHOU2008 : Shou G, Xia L, Jiang M, Wei Q, Liu F, Crozier S. Truncated total least squares: a new regularization method for the solution of ECG inverse problems. *IEEE Trans Biomed Eng* 2008;55(4):1327-35.

SIEDNER2003 : Siedner S, Kruger M, Schroeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, Hescheler J, Pfitzer G, Stehle R. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 2003;548(Pt 2):493-505.

SITTIKIYOTHIN2004 : Sittikijyothin, W., Torres, D. and Gonçalves, M.P., 2005. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* 59, 339–350

SLAWNYCH1998 : Slawnych MP, Morishita L, Bressler BH. Image-analysis-based assessment of the effects of the "Ca²⁺-jump" technique on sarcomere uniformity. *J Appl Physiol* 1998;85(3):955-61.

SLEEP1999 : Sleep J, Wilson D, Simmons R, Gratzer W. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. *Biophys J* 1999;77(6):3085-95.

SMALL2002 : Small, J. V., T. Stradal, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." *Trends Cell Biol* 12(3): 112-20.

SNEDDON1965 : I. N. Sneddon. The relaxation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int.J.Engng.Sci.*, 3:47–57, 1965.

SOKHANVAR2008 : S Sokhanvar, J Dargahi, M Packirisamy. Hyperelastic modelling and parametric study of soft tissue embedded lump for MIS applications. *Int J Med Robot.* 2008

STAMENOVIC1999 : Stamenovic, D. and M. F. Coughlin (1999). "The role of prestress and architecture of the cytoskeleton and deformability of cytoskeletal filaments in mechanics of adherent cells: a quantitative analysis." *J Theor Biol* 201(1): 63-74.

STILLER1999: C. Stiller, J. Konrad, Estimating motion in image sequences: a tutorial on modeling and computation of 2D motion. *IEEE Signal Process. Magazine* 16 (1999) 70-91.

STUYVERS2005 : Stuyvers BD, Dun W, Matkovich S, Sorrentino V, Boyden PA, ter Keurs HE. Ca²⁺ sparks and waves in canine purkinje cells: a triple layered system of Ca²⁺ activation. *Circ Res* 2005;97(1):35-43

SUBRAMANIAN2001 : Subramanian, S., S. Viatchenko-Karpinski, et al. (2001). "Underlying mechanisms of symmetric calcium wave propagation in rat ventricular myocytes." *Biophys J* 80(1): 1-11.

SUGIURA2006 : Sugiura S, Nishimura S, Yasuda S, Hosoya Y, Katoh K. Carbon fiber technique for the investigation of single-cell mechanics in intact cardiac myocytes. *Nat Protoc* 2006;1(3):1453-7.

SUTTON2000 : M. A. Sutton, S. R. McNeill, J. D. Helm et H. W. Schreier. Computer vision applied to shape and deformation measurement. Dans *International Conference on Trends in Optical Nondestructive Testing and Inspection, Elsevier Science*, pp. 571-589, Lugano (Suisse), mai 2000.

TAN2003 : Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K. and Chen, C.S., 2003. Cell lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**:1484-1489.

TARANTOLA2005 : Inverse Problem Theory and Methods for Model Parameter Estimation. Albert Tarantola SIAM, 2005

THERET1988 : Theret, D.P., Levesque, M.J., Sato, M., Nerem, R.M. and Wheeler, L.T., 1988. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial

cell micropipette measurements. *J. Biomech. Eng.* **110**, 190-199.

THOUMINE1997: Thoumine O, Ott A, Cardoso O, Meister JJ. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods* 1999;39(1-2):47-62.

TRIFFA2007 : Mohamed TRIFA, *Analyse du comportement contractile de cardiomyocytes issus de rats nouveaux nés :Etude expérimentale et théorique*. Mémoire de recherche MASTER 2007, sous la direction P. Tracqui et L. Riou.

TU1964 : Tu, Y.-O., and D. C. Gazis. 1964. The contact problem of a plate pressed between two spheres. *J. Appl. Mech.* 31:659–666.

TZVETKOVA-CHEVOLLEAU2008 : Tzvetkova-Chevolleau T, Stephanou A, Fuard D, Ohayon J, Schiavone P, Tracqui P. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* 2008;29(10):1541-51.

VILELA2008 : Vilela M, Chou IC, Vinga S, Vasconcelos AT, Voit EO, Almeida JS. Parameter optimization in S-system models. *BMC Syst Biol* 2008;2:35.

VOIT2004 : Voit EO, Almeida J. Decoupling dynamical systems for pathway identification from metabolic profiles. *Bioinformatics* 2004;20(11):1670-81.

WAKAYAMA2005 : Wakayama Y, Miura M, Stuyvers BD, Boyden PA, ter Keurs HE. Spatial nonuniformity of excitation-contraction coupling causes arrhythmogenic Ca²⁺ waves in rat cardiac muscle. *Circ Res* 2005;96(12):1266-73.

WANG1993 : Wang, N., Butler, J.P. and Ingber, D.E., 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124-1127.

WANG2007: Wang, W., 2007. Change in properties of the glycocalyx affects the shear rate and stress distribution on endothelial cells. *J. Biomech. Eng.* **129**(3), 324-9

WAXMAN1985 :A. M. Waxman and K. Wohn. Contour evolution, neighbourhood deformation, and global image flow: planar surfaces in motion. *Int. J. of Robotics Res.*,4(3):95-108, 1985.

WENDLING2002: Wendling, S., P. CaNadas, et al. (2002). "Interrelations between elastic energy and strain in a tensegrity model: contribution to the analysis of the mechanical response in living cells." *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 5(1): 1-6.

WOLLMAN2008 : Wollman, R., G. Civelekoglu-Scholey, et al. (2008). "Reverse engineering of force integration during mitosis in the *Drosophila* embryo." *Mol Syst Biol* 4: 195.

YANG1992 : Ying YANG. *Mesure du champ de déplacement des matériaux sous charge mécanique par analyse des images*. Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées (France), septembre 1992.

YAN2008 : Yan, W., D. Hwang, et al. (2008). "Quantitative proteomic analysis to profile dynamic changes in the spatial distribution of cellular proteins." *Methods Mol Biol* 432: 389-401.

YATES2005 : Yates, J. R., 3rd, A. Gilchrist, et al. (2005). "Proteomics of organelles and large cellular structures." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9): 702-14.

YIN2005 : Yin S, Zhang X, Zhan C, Wu J, Xu J, Cheung J. Measuring single cardiac myocyte contractile force via moving a magnetic bead. *Biophys J* 2005;88(2):1489-95.

YUAN2007 : Yuan Z, Jiang H. Three-dimensional finite-element-based photoacoustic tomography: reconstruction algorithm and simulations. *Med Phys* 2007;34(2):538-46.

ZENINA1999 : Zenina, A., Dupré, J.C. & Lagarde, A. 1999 Separation of isochromatic and isoclinic patterns of slice optically isolated in a 3-D photoelastic medium. *Eur. J. of Mech. A/Solids* **18**, 633-640

ZHANG2007: Zhang, J., Johnson, P.C. and Popel, A.S., 2007. Red blood cell aggregation and dissociation in shear flows simulated by lattice Boltzmann method. *J. Biomech.*

ZHAO2007 : Zhao Y, Lim CC, Sawyer DB, Liao R, Zhang X. Simultaneous orientation and cellular force measurements in adult cardiac myocytes using three-dimensional polymeric microstructures. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007;64(9):718-25.

ZHAO2008 : Dong Zhao, Hideyuki Sakoda, W. Gregory Sawyer. Predicting Knee Replacement Damage in a Simulator Machine Using a Computational Model With a Consistent Wear Factor. *J. Biomech. Eng.* February 2008 Volume 130, Issue 1

Estimation of Cell Young's Modulus of Adherent Cells Probed by Optical and Magnetic Tweezers: Influence of Cell Thickness and Bead Immersion

Alain Kamgoué

e-mail: Alain.Kamgoue@imag.fr

Jacques Ohayon¹

e-mail: Jacques.Ohayon@imag.fr

Philippe Tracqui¹

e-mail: Philippe.Tracqui@imag.fr

Laboratoire TIMC-IMAG,

Equipe DynaCell,

CNRS UMR 5525,

Institut de l'Ingénierie de l'Information de Santé,

Faculté de Médecine,

38706 La Tronche Cedex, France

*A precise characterization of cell elastic properties is crucial for understanding the mechanisms by which cells sense mechanical stimuli and how these factors alter cellular functions. Optical and magnetic tweezers are micromanipulation techniques which are widely used for quantifying the stiffness of adherent cells from their response to an external force applied on a bead partially embedded within the cell cortex. However, the relationships between imposed external force and resulting bead translation or rotation obtained from these experimental techniques only characterize the apparent cell stiffness. Indeed, the value of the estimated apparent cell stiffness integrates the effect of different geometrical parameters, the most important being the bead embedding angle 2γ , bead radius R , and cell height h . In this paper, a three-dimensional finite element analysis was used to compute the cell mechanical response to applied force in tweezer experiments and to explicit the correcting functions which have to be used in order to infer the intrinsic cell Young's modulus from the apparent elasticity modulus. Our analysis, performed for an extensive set of values of γ , h , and R , shows that the most relevant parameters for computing the correcting functions are the embedding half angle γ and the ratio $h_u/2R$, where h_u is the under bead cell thickness. This paper provides original analytical expressions of these correcting functions as well as the critical values of the cell thickness below which corrections of the apparent modulus are necessary to get an accurate value of cell Young's modulus. Moreover, considering these results and taking benefit of previous results obtained on the estimation of cell Young's modulus of adherent cells probed by magnetic twisting cytometry (MTC) (Ohayon, J., and Tracqui, P., 2005, *Ann. Biomed. Eng.*, **33**, pp. 131–141), we were able to clarify and to solve the still unexplained discrepancies reported between estimations of elasticity modulus performed on the same cell type and probed with MTC and optical tweezers (OT). More generally, this study may strengthen the applicability of optical and magnetic tweezers techniques by insuring a more precise estimation of the intrinsic cell Young's modulus (CYM).*

[DOI: 10.1115/1.2746374]

Keywords: cell stiffness, finite element method, cell thickness, mechanical properties, hyperelastic model

1 Introduction

It is now widely recognized that cell mechanical properties and the associated level of tensional forces in the cytoskeleton are key elements of the mechanochemical signaling pathways, which control a variety of fundamental cell functions [1–5]. Thus, during the past 10 years, characterization of cell rheological properties has been conducted with the aid of a quite large spectrum of micromanipulations techniques, including micropipette aspiration [6–9], cell poking [10–12], atomic force microscopy [13–16], microplates [17–19], optical tweezers (OT) [20–27], optical stretchers [28–30], magnetic tweezers [31–34], magnetic twisting cytometry (MTC) [2,22,35–45] or particle tracking [46–48]. Nevertheless, despite the real advances on characterization of cell mechanical properties generated by these experimental studies, there is still a need for more accurate and reliable estimates of cell

mechanical moduli, since the values derived from experimental data still appear to largely depend on the micromanipulation technique used.

Such discrepancies may have multiple origins, not only related to differences in the cell type or in experimental conditions, but also to generally unconsidered various geometrical factors linked to the probing system itself and to cell morphologies. Thus, Mijailovich et al. [49] pointed out such a dramatic influence of geometrical factors, exhibiting that apparent cell stiffness might vary with cell height and bead embedding angle. More recently, Ohayon and Tracqui [41] extended this analysis by considering the mechanical response of adherent cells probed by MTC. By providing explicit relationships which allow to derive the cell Young's modulus (CYM) from the apparent elasticity modulus given by MTC experimental data, they showed that a fivefold increase of CYM could be made if the influence of geometrical factors is neglected.

In this framework, we developed a new theoretical analysis of the error which can be made on CYM estimation when adherent cells are probed with optical and magnetic tweezers. The me-

¹Authors to whom correspondence should be addressed.

Contributed by the Bioengineering Division of ASME for publication in the JOURNAL OF BIOMECHANICAL ENGINEERING. Manuscript received July 25, 2006; final manuscript received December 7, 2006. Review conducted by Clark T Hung.

chanical stimulation generated by both micromanipulations techniques indeed follows the same simplified principle: a spherical bead, attached to the cell, is submitted to an external force and exerts a mechanical deformation to the cell. Beads are prefunctionalized to insure their attachment to the cell surface. Usually, a pre-coating with the peptidic RGD (arginine-glycine-aspartate) sequence is used to insure the bead binding to integrin transmembrane receptors and thus to the cell cytoskeleton. Typically, silica microbeads (2.1–5.5 μm diameter) are used for optical tweezers traps [21,24], while magnetic tweezers experiments make use of ferromagnetic beads (2–4.5 μm diameter) [31,50]. In both techniques, an unidirectional force is slowly applied to the attached bead, which generates a combination of bead rotation and translation up to an equilibrium point where the cell resistive stress counterbalances the external force.

In this work, we developed a 3D analysis of the optical tweezers and magnetic tweezers experiments, based on a finite element computation of the cell mechanical response. We assumed the cell behaves as a hyperelastic material, whose mechanical behavior is modelled by a strain energy function already proposed in cell biomechanical studies [17]. Our aim is to estimate possible over or under estimation of the real CYM, compared to the apparent cell stiffness inferred from experimental data. More precisely, we extend and generalize the computation of the CYM by establishing, in the whole range of experimental values taken by the bead embedding angle 2γ , cell height h and bead radius R , analytical expressions of the necessary correcting functions. In this extensive analysis of a large set of different cell/probing system geometries, we determine critical values of the cell height below which such functions are required to correct the apparent elasticity modulus value. Furthermore, we were able to show that, once properly corrected on the basis of our results, the still unexplained discrepancies between different techniques like MTC and OT is reduced. More generally, we finally discussed how this study may strengthen the applicability of optical and magnetic tweezers techniques by providing a more accurate estimation of the Young's modulus of the probed cell.

2 Methods

Computations of the bead translation and rotation induced by the applied force were performed by using a finite element method (Ansys 10 software, Ansys, Inc., Cannonsburg, PA).

2.1 Finite Element Analysis

2.1.1 Cell-Bead Geometries. The cell-bead geometry is modeled by a parallelepipedic cellular volume of size ($l \times l \times h$) with an embedded bead of radius R at its upper surface. Interestingly, by using the symmetrical plane passing across the center of the bead, we restricted our analysis to half the cellular-bead volume (Fig. 1). The main parameters defining this geometrical model and affecting the mechanical response are (Fig. 1): the cell size l , the cell thickness h , the bead radius R , and the immersion (or embedding) angle 2γ (see inset of Fig. 1). In agreement with experimental data [22,51], we simulated the cell response for approximately 300 different realistic cell-bead geometries, each corresponding to a given triplet of parameter values for R ($R=1-5 \mu\text{m}$ by the step of $2 \mu\text{m}$), γ ($\gamma=15 \text{ deg}$ and 20 deg to 90 deg by a step of 10 deg) and h ($h=1-6 \mu\text{m}$ by a step of $1 \mu\text{m}$ and $8 \mu\text{m}$ to $20 \mu\text{m}$ by a step of $4 \mu\text{m}$). All possible combinations of these values have been considered as far as they correspond to realistic topologies, i.e., with the bead remaining above the substrate. Notice that the bead was modeled as a rigid shell since its stiffness is of several orders of magnitude larger than the cell stiffness.

2.1.2 Cell Material Properties. As in the previous studies of Caille et al. [17] and of Ohayon et al. [41], the cellular medium is assumed to be homogeneous and quasi-incompressible (initial

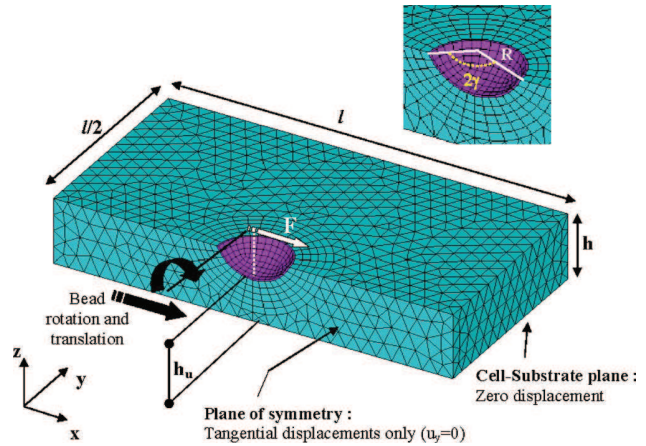


Fig. 1 Finite element mesh of the half cell volume of size $l/2 \times l \times h$. The arrows indicate the orientations of the bead rotation, bead translation, and force applied at the bead center. Free boundary conditions are considered except for displacement conditions explicitly indicated in the figure. Bead neighborhood has been enlarged for clarity, with the bead radius R and the bead embedding angle 2γ being specified in this enlargement.

Poisson's ratio 0.49). The following neo-Hookean strain energy function W was used to model the hyperelastic cell mechanical behavior [52],

$$W = a(I_1 - 3) \quad (1)$$

where a is the material constant (in Pa), while I_1 is the first invariant of the right Cauchy-Green strain tensor \mathbf{C} ($I_1 = \text{Trace}(\mathbf{C})$ [52]).

For such a quasi-incompressible medium, an explicit relationship between the CYM E_{cell} and the material constant a exists, which reads $E_{\text{cell}} = 2a(2 + \lambda^{-3})$, where λ is the extension ratio in the direction of the uniaxial stress. Notice that in our case, i.e., for small extension ratio ($\lambda \sim 1$), this expression reduces to $E_{\text{cell}} \sim 6a$.

2.1.3 Mesh. The structural mesh is composed approximately of 13,000 nodes and 7,800 tetrahedral solid elements (Ansys, solid187), specifically designed to compute the behavior of hyperelastic materials.

2.1.4 Boundary Conditions. The boundary conditions, specified on half of the cell-bead geometry (Fig. 1), are as follows:

- (i) to model the assumed complete attachment of the cell membrane to the underlying rigid substrate, zero displacement condition was imposed to the basal cell surface.
- (ii) due to the symmetry condition of our problem, zero normal displacement was imposed on the cell-bead section belonging to the plane of symmetry.
- (iii) free boundary conditions were assumed for all the remaining cell surfaces.
- (iv) as external loading, an horizontal force parallel to the plane of symmetry is applied on the center of the bead.
- (v) full adhesion, with no-slip condition, is imposed at the bead/cell interface.

2.2 Background for the Calculation of Apparent Cell Stiffness From Bead Displacements. In the case of a spherical bead fully embedded in an infinite linear elastic and incompressible medium, one can obtain an analytical relationship between the applied mechanical force F and the resulting bead translation U , as a function of the cell's Young modulus E and bead radius R [53],

$$F = \frac{1}{2}ES\delta \quad (2)$$

where $S=4\pi R^2$ is the bead surface and δ is the normalized bead translation U/R .

Since in tweezer experiments, the apparent cell elastic modulus E_{ap} may be computed from either lateral normalized bead translation δ or associated bead rotation θ , we considered the following relationships [41,49]:

$$E_{ap}^{\delta} = \frac{2F}{S\delta} \quad (3)$$

$$E_{ap}^{\theta} = \frac{2F}{S\theta} \quad (4)$$

Obviously, these apparent material moduli are not the intrinsic Young's modulus of the cell, because they incorporate the effects of the geometrical parameters h , R , and γ on the mechanical response. Thus, once may assume that it exists some correcting functions α and β , depending at least on the geometrical parameters h , R , and γ , which relate apparent and real cell elastic modulus through relationships of the form [41,49]:

$$E_{ap}^{\delta} = \alpha(h, R, \gamma)E_{cell} \quad (5)$$

$$E_{ap}^{\theta} = \beta(h, R, \gamma)E_{cell} \quad (6)$$

In order to assess the magnitude of these correcting functions, it is crucial to study their modifications with regard to the geometrical parameters values and to explicit their expression as functions of h , R , and γ .

2.3 Identification of Relevant Dimensionless Geometrical Parameters. In tweezer experiments, the bead diameter ($2R$) is typically ten times smaller than the length of the basal surface. Therefore, the length l was taken to be equal to $20R$. Interestingly, we found from our calculations that the ratio $h_u/2R$, i.e., the under bead cell thickness divided by the bead diameter (Fig. 1), appears as a key dimensionless geometrical parameter for the quantification of the cell response. This result indicates that the geometrical factors influencing the mechanical response are only $h_u/2R$ and γ . For the 300 considered geometries previously defined, these two parameters appear to be in the following ranges: $0.1 \leq h_u/2R \leq 10$ and $15 \text{ deg} \leq \gamma \leq 90 \text{ deg}$.

3 Results

Using the previously defined finite element model, the bead motion and associated cell deformation have been simulated for each of the 300 parameter sets we considered. In optical and magnetic tweezers experiments, both bead translation and bead rotation can be observed and may be reasonably measured. Thus, we showed how CYM can be obtained from our computation knowing the imposed force and the measurement of either the bead translation or the bead rotation.

3.1 Influence of Cell Thickness on Intracellular Strain Distribution. The importance of the cell thickness on the spatial distributions of effective strains within the cell is clearly highlighted in Fig. 2. Considering the typical values of bead radius and embedding angle reported in micromanipulation experiments [22], we showed in Fig. 2 the simulated cell response obtained with $R=2.5 \mu\text{m}$ and $\gamma=65 \text{ deg}$, respectively. The magnitude of the horizontal force imposed on the bead center was 50 pN, in agreement with the range of forces obtained by optical traps [21]. In these simulations, the CYM has been fixed to $E_{cell}=6a=500 \text{ Pa}$.

Figure 2 shows that decreasing cell height h from $6.5 \mu\text{m}$ (i.e., $h_u/2R=1.011$) to $2 \mu\text{m}$ (i.e., $h_u/2R=0.111$) has a major effect on the spatial effective strain distribution, but does not affect the amplitude of the maximal strain. The influence of the bead embedding is more precisely analyzed in the next paragraph.

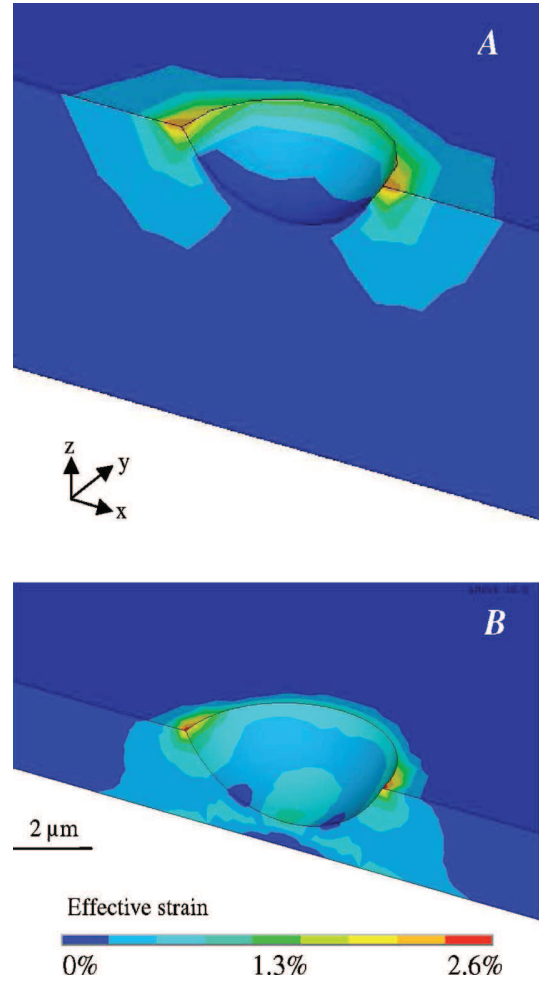


Fig. 2 Influence of cell thickness on the mechanical response of the cell to the applied force; 3D color maps show the deformed shapes of the cell and the spatial distributions of the effective strains e_{eff} in the neighborhood of the bead ($e_{eff} = \sqrt{2e_{ij}e_{ij}}/3$, with e_{ij} the components of the deviatoric strain tensor). Two different cell-bead geometries have been considered for fixed values $\gamma=65 \text{ deg}$, $R=2.5 \mu\text{m}$, and $l=20R$. For each geometry, a force of 50 pN has been imposed, giving rise to a lateral bead translation U and rotation θ . Cell thickness values are, respectively, (A) $h=6.5 \mu\text{m}$. (B) $h=2 \mu\text{m}$. The bead has been removed in order to visualize more clearly the spatial strain distributions in the neighborhood of the cell-bead contact area.

3.2 Expressions of the Nonlinear Correcting Functions $\alpha(h_u/2R, \gamma)$ and $\beta(h_u/2R, \gamma)$. The values of the correcting functions $\alpha(h_u/2R, \gamma)$ and $\beta(h_u/2R, \gamma)$ have been computed from Eqs. (3) and (5) and Eqs. (4) and (6), respectively (Fig. 3). In the particular case of a half-embedded bead ($\gamma=90 \text{ deg}$) in a semi-infinite medium (approximated here by a cell thickness of $20R$, which gives a ratio value $h_u/2R=9.5$, see Fig. 3 (A), we found a correcting coefficient α equal to 0.486, in agreement with the analytical estimation of 0.5 previously reported in [22].

Notice that the highest values of the correcting coefficients are observed for smallest values of $h_u/2R$ and largest values of γ (Fig. 3). Indeed, with such geometries, the mechanical cell's response is very sensitive to the boundary condition imposed on the basal surface (i.e., full cell attachment to the rigid substrate), which increases the apparent cell stiffness.

A complete set of values for the functions $\alpha(h_u/2R, \gamma)$ and

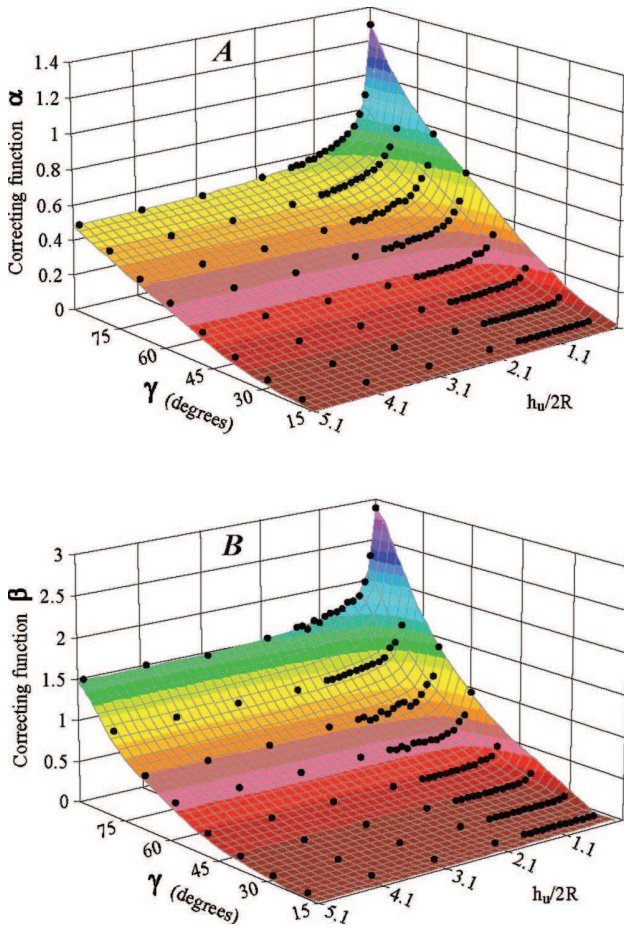


Fig. 3 Influence of the bead embedding half angle γ and normalized under bead thickness $h_u/2R$ on the two correcting coefficients α and β . Solid points correspond to isovalues of bead embedding angle when $h_u/2R$ is varied.

$\beta(h_u/2R, \gamma)$ has to be provided in order to estimate the intrinsic Young's modulus of adherent cell probed by optical and magnetic tweezers. Therefore, a series of fit has been performed, for fixed embedding half angles and increasing ratio $h_u/2R$, against the computed values of α and β . As in the work of Ohayon et al. [41], a very satisfactory fit (exemplified in Fig. 4 for $\gamma=80$ deg) has been obtained when assuming for each embedding half angle γ_i hyperbolic relationships of the form

$$\alpha(\gamma_i, h_u/2R) = A_\alpha(\gamma_i) + \frac{B_\alpha(\gamma_i)}{h_u/2R} \quad (7)$$

$$\beta(\gamma_i, h_u/2R) = A_\beta(\gamma_i) + \frac{B_\beta(\gamma_i)}{h_u/2R} \quad (8)$$

Accordingly, polynomial expressions of the functions $A_\alpha(\gamma)$, $B_\alpha(\gamma)$, $A_\beta(\gamma)$, and $B_\beta(\gamma)$ have been derived in order to obtain a complete description of the correcting functions $\alpha(h_u/2R, \gamma)$ and $\beta(h_u/2R, \gamma)$. The best fit (Fig. 5) to the simulated cell response for the 300 cell/bead geometries we considered is obtained when considering the following polynomial expression of the functions $A_\alpha(\gamma)$, $B_\alpha(\gamma)$, $A_\beta(\gamma)$, and $B_\beta(\gamma)$:

$$A_\alpha(\gamma) = A_{\alpha 0} + A_{\alpha 1}\gamma + A_{\alpha 2}\gamma^2 + A_{\alpha 3}\gamma^3 \quad (9)$$

$$B_\alpha(\gamma) = B_{\alpha 0} + B_{\alpha 1}\gamma + B_{\alpha 2}\gamma^2 + B_{\alpha 3}\gamma^3 \quad (10)$$

$$A_\beta(\gamma) = A_{\beta 0} + A_{\beta 1}\gamma + A_{\beta 2}\gamma^2 + A_{\beta 3}\gamma^3 \quad (11)$$

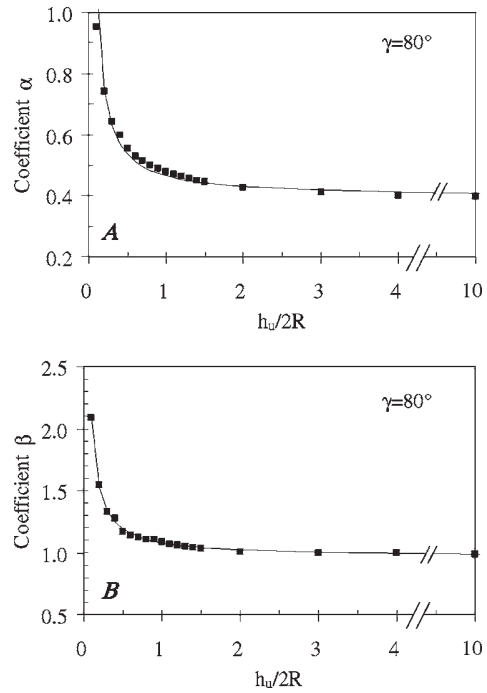


Fig. 4 Best fits obtained for the two correcting hyperbolic functions $\alpha(h_u/2R)$ ((A), $r^2=0.990$) and $\beta(h_u/2R)$ ((B), $r^2=0.995$) for the fixed value $\gamma=80$ deg of the bead embedding half angle

$$B_\beta(\gamma) = B_{\beta 0} + B_{\beta 1}\gamma + B_{\beta 2}\gamma^2 + B_{\beta 3}\gamma^3 \quad (12)$$

An excellent goodness of fit has been obtained with the values reported in Table 1.

3.3 Parametric Domain in Which a Correction of Cell Apparent Stiffness is Required. A direct benefit of our study is to allow a precise determination of the thresholds beyond which a correction of cell apparent stiffness is required. Allowing a relative error of at most 25% on the CYM estimation, we established in Fig. 6 the domains in which the value of the CYM E_{cell} must be corrected. The domain boundaries have been computed by considering the critical values of the ratio $h_u/2R$ and the embedding half angle for which the values of the coefficient α (Eq. (5)) becomes larger than 1.25 and smaller than 0.75.

3.4 Nonlinear Geometric Effects. To investigate the influence of the geometrical nonlinearity on the cellular response during OT micromanipulations, we performed additional computations of the force-bead displacement using a linear elastic stress-strain law instead of Eq. (1) to model the mechanical cell behavior. Interestingly, it appears that for the 300 bead/cell geometries previously defined, the relationship between the bead displacement and the applied force always remains linear, even under large cell strains (i.e., up to 30%), which indicates that the geometrical nonlinearity effects are negligible in this study.

4 Discussion

Cell elasticity values derived from micromanipulations experiments exhibit large dispersions, as pointed out in the literature [54]. One can infer that such dispersions may be related not only to the specificity of the used micromanipulation technique, to variations of experimental conditions or cell types, but also to geometrical factors. However, systematic and quantitative analyses of such discrepancy are still largely lacking. In the work of Laurent et al. [22], only the influence of the bead embedding angle was considered. Interestingly, Karcher et al. [55] also

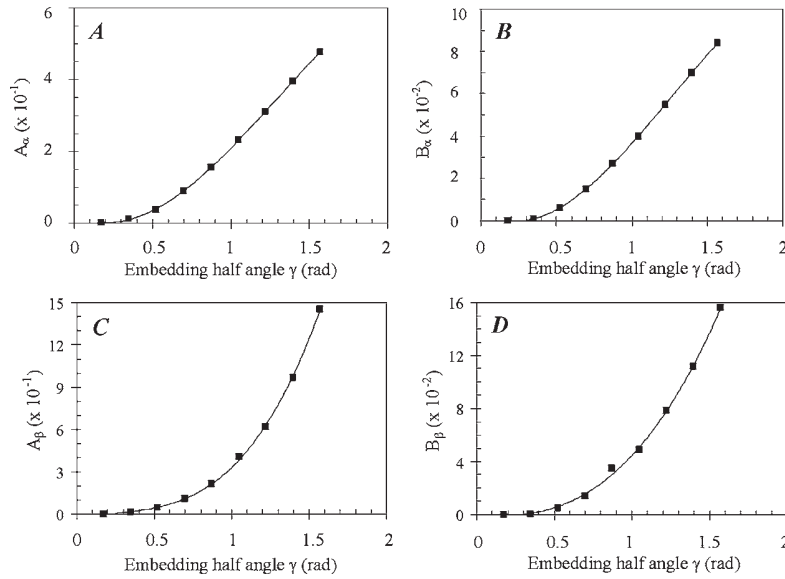


Fig. 5 Best polynomial fits of the four functions $A_\alpha(\gamma)$ ((A), $r^2=0.999$), $B_\alpha(\gamma)$ ((B), $r^2=0.999$), $A_\beta(\gamma)$ ((C), $r^2=0.999$), and $B_\beta(\gamma)$ ((D), $r^2=0.999$) given in Eqs. (9)–(12) and used for the estimation of the two correcting functions α and β (see Eqs. (7) and (8)). In these functions, γ is expressed in radian.

pointed out the importance of cell thickness, but without providing explicit quantification of its influence on the Young's modulus estimation of the probed cell.

In this work, we provide a rather extensive and quantitative analysis of the cell mechanical response in optical and magnetic tweezers experiments which enables first, to know if correction of apparent stiffness derived from experimental data is necessary and second, to give explicit correcting functions which insure a more accurate derivation of the CYM from the experimental data. Let us notice that this estimation can be made from measurements of either bead translation or bead rotation.

Considering the cell as a linear and quasi-incompressible hyperelastic material, our finite element analysis established that the bead embedding angle 2γ and the normalized ratio $h_u/2R$ are the

Table 1 Values of the polynomial coefficients obtained from the best fits (see Fig. 4) of the four functions $A_\alpha(\gamma)$, $B_\alpha(\gamma)$, $A_\beta(\gamma)$, and $B_\beta(\gamma)$ given in Eqs. (9)–(12) and used for the estimation of the two correcting coefficient α and β (Eqs. (7) and (8))

α	$15 \text{ deg} \leq \gamma \leq 90 \text{ deg}$
$A_{\alpha 0}$	2.321×10^{-2}
$A_{\alpha 1}$	-2.054×10^{-1}
$A_{\alpha 2}$	5.250×10^{-1}
$A_{\alpha 3}$	-1.338×10^{-1}
$B_{\alpha 0}$	4.788×10^{-3}
$B_{\alpha 1}$	-4.314×10^{-2}
$B_{\alpha 2}$	1.020×10^{-1}
$B_{\alpha 3}$	-2.698×10^{-2}
β	$15 \text{ deg} \leq \gamma \leq 90 \text{ deg}$
$A_{\beta 0}$	-5.522×10^{-2}
$A_{\beta 1}$	3.008×10^{-1}
$A_{\beta 2}$	-4.953×10^{-1}
$A_{\beta 3}$	5.807×10^{-1}
$B_{\beta 0}$	0
$B_{\beta 1}$	-9.293×10^{-3}
$B_{\beta 2}$	2.900×10^{-2}
$B_{\beta 3}$	2.559×10^{-2}

more relevant geometrical parameters for the computation of the correcting functions. This second geometrical factor was not considered up to now in the analysis of data obtained in tweezer micromanipulation experiments, which lead us to consider its relevance and impact on previously published results.

Thus, we compared the values of the correcting function α derived from our model (Eq. (7)), to those computed from the analytical solution which has been proposed by Laurent et al. [22], namely,

$$\alpha_{La}(\gamma) = \frac{4 \sin^3(\gamma)}{3(3 \sin^2(\gamma) + 2 \cos(\gamma))} \quad (13)$$

Figure 7 shows that, globally, this correcting function α_{La} tends to overestimate the amplitude of the CYM. Indeed, the plotted difference ($\alpha_{La} - \alpha$) (Fig. 7) shows that the function α_{La} provides a good correction of the apparent cell stiffness in two cases only: (i) for high values of $h_u/2R$ (i.e., in a geometrical configuration equivalent to a semi-infinite medium), and (ii) for small values of

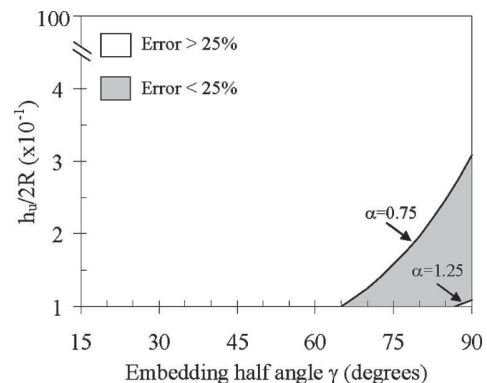


Fig. 6 Critical domain (white area) specifying the values $h_u/2R$ and γ for which the apparent stiffness must be corrected according to a relative error on cell stiffness larger than 25%. On the contrary, the dark domain gives the values of $h_u/2R$ and γ for which the relative error is smaller than 25%.

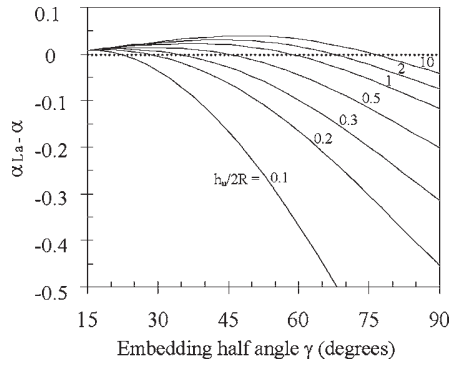


Fig. 7 Comparison between the correcting functions $\alpha(\gamma, h_u/2R)$, defined in this study and $\alpha_{La}(\gamma)$ proposed by Laurent et al. [22]. The curves represent the difference of these two corrections for fixed values of $h_u/2R$ when the bead embedding half angle γ is increased.

the bead embedding half angle γ , with an upper threshold around 30 deg. In other situations, the overestimation of the CYM becomes significant and increases rapidly with decreasing values of $h_u/2R$ (i.e., when the influence of cell thickness can not be longer neglected).

4.1 Coherence Between Cell Young's Modulus Estimations Made From Both Twisting Magnetocytometry and Optical Tweezers Micromanipulations. Laurent et al. [22] previously highlighted an unexplained and significant difference between the two mean cell stiffness obtained when the same type of cells were probed with OT ($E_{cell,La}^{OT} = 125$ Pa) and with MTC, for small amplitudes of the applied torques ($E_{cell,La}^{MTC} = 34$ Pa). Interestingly, gathering the present results and those obtained previously on the estimation of cell Young's modulus of adherent cells probed by MTC [41], we were able to reconsider these two above mean values (Table 2, column 2) in the following way.

Starting with the correcting functions established by Laurent et al. [22] (Table 2, column 3), we inferred the corresponding values of the apparent cell stiffness (Table 2, column 4). Considering additionally a cell thickness $h = 3.66 \mu\text{m}$ (Table 2, column 5) and taking the benefit of the more accurate functions we established both for MTC experiments [41] and for OT (Eq. (7)), we computed in Table 2 (column 6) the correcting values α corresponding to the geometrical bead/cell interface parameters given in Table 2 (columns 1). This correcting procedure leads to a resulting cell stiffness of 48 Pa with MTC probing and of 103 Pa with OT probing (Table 2, column 7), which already decreases by twofold the discrepancy initially reported in Laurent et al. [22].

Then, one may hypothesize that this still remaining difference between the two estimated cell stiffness values can be due to a variation in cell thickness. Indeed, in OT experiments, microma-

nipulated beads are located at the cell periphery, which is a relatively flat area for spread cells [56]. Therefore, the cell thickness is then smaller than in MTC experiments, where beads appear more likely located in the central (and thicker) part of the cell body [40]. Taking these experimental features into consideration, the cell thickness was treated as an unknown in our simulations and we tried to identify a value of parameter h leading to a CYM of 48 Pa, i.e., equal to the one derived from MTC data. Thus, by considering a correcting coefficient α equal to the ratio $E_{ap}/E_{cell} = 35/48$, we found as a solution of this identification problem a cell thickness $h^* = 1.78 \mu\text{m}$, which satisfies the experimental constraints quoted above since:

- (i) h^* is smaller than the $3.66 \mu\text{m}$ cell thickness considered in MTC,
- (ii) h^* falls in the range of cell thickness values reported in OT experiments (S. Henon, personal communication).

Taken as a whole, this work thus provides a refined analyze of the influence of cell thickness and bead immersion on CYM estimation when a homogenized description of the cellular medium is considered. We also assumed that the duration of the force application is short enough to avoid significant remodeling of the cytoskeleton. However, this analysis does not consider explicitly additional structural factors that might influence this estimation and which deserve to be discussed. First, the cell nucleus, which is roughly ten times stiffer than the cytoskeleton, obviously tends to harden the cell body. However, a recent paper of Ananthakrishnan et al. [28], based on cell micromanipulations with optical stretchers, reported that a three-layered model, which explicitly takes into account the nucleus, gives only a limited improvement of the fit to the deformed shape of fibroblasts when compared to the fit obtained with a simplified thick shell model. Such results are similar to the ones we reported previously in the case of adherent cells probed by MTC [57]. In this last work, two kinds of simulations were performed for the same rheology of the cell cortex: in the first one, the nucleus is much stiffer than the cortex (heterogeneous cell), while in the second case the elasticity modulus of the nucleus is equal to the cortex modulus (homogeneous cell). As expected, the homogeneous cell is more compliant than the heterogeneous cell, but the two nonlinear torque-bead rotation response curves remain rather close, even for large torque values.

Secondly, this study does not analyze the influence of the potential anisotropy of the cell cytoskeleton. When probing adherent and elongated cells with stress fibers by MTC, Hu et al. [58] observed that the mechanical stiffness transverse to the long axis of the cell was roughly half that parallel to the long axis. This indicates that the CYM estimation must be evaluated in the light of additional data obtained on the orientation of actin stress fibers in the probed cells.

Boundary conditions, at the cell/substrate interface, might also significantly affect the cell response. In the case of adherent cells probed with MTC, we thus showed that the adhesion area and

Table 2 Revisited correction of cell Young's moduli from experimental data previously reported in Laurent et al. [22]. See the text for the meaning of each column and for the procedure which drive the progression from left to right in the table. MTC: magnetic twisting cytometry; OT: optical tweezers; $E_{cell,La}$, α_{La} : cell Young's moduli and correcting functions proposed by Laurent et al. [22]; E_{ap} : apparent cell stiffness; h : cell thickness; α , E_{cell} : correcting functions and cell Young's moduli obtained in this study

		Without considering the influence of cell thickness [22]			With the influence of cell thickness		
	Bead/cell geometries	Reported cell Young's moduli $E_{cell,La}$	Reported correcting functions $\alpha_{La} = E_{ap}/E_{cell,La}$	Apparent cell stiffness E_{ap}	Cell thickness h	Revised correcting functions $\alpha = E_{ap}/E_{cell}$	Revisited cell Young's moduli E_{cell}
MTC	$\gamma = 67$ deg $R = 2.25 \mu\text{m}$	$E_{cell,La}^{MTC} = 34$ Pa	$\alpha_{La} = \sin^3 \gamma / 2$	13 Pa	$3.66 \mu\text{m}$ [40]	$\alpha = 0.263$ [41]	$E_{cell} = 48$ Pa
OT	$\gamma = 65$ deg $R = 2.5 \mu\text{m}$	$E_{cell,La}^{OT} = 125$ Pa	$\alpha_{La} = 4 \sin^3 \gamma / (3(3 \sin^2 \gamma + 2 \cos \gamma))$	35 Pa	$3.66 \mu\text{m}$ [40] $1.78 \mu\text{m}$	$\alpha = 0.339$ (Eq. (7)) $\alpha = 0.729$ (Eq. (7))	$E_{cell} = 103$ Pa $E_{cell} = 48$ Pa

relative orientation with respect to the mechanical torque significantly affect the cell mechanical response [40]. Once again, additional data on the spatial heterogeneity of cellular adhesion patterns of the probed cells have to be considered if still more accurate estimation of the CYM is required.

Another limitation of our approach focuses on the static elastic response of the cell. Considering that tweezers micromanipulations are also often used to analyze the viscoelastic response of cells [11,18,20,31,39,43,50], it is worth underlying that our study may be extended to correct the linear viscoelastic properties of the cytoskeletal medium [59–61]. Indeed, because the correcting functions $\alpha(h_u/2R, \gamma)$ and $\beta(h_u/2R, \gamma)$ are only geometry-dependent, the computed results can be generalized such that $\tilde{E}_{ap}^{\delta}(f) = \alpha(\gamma, h_u/2R) \tilde{E}(f)$ and $\tilde{E}_{ap}^{\theta}(f) = \beta(\gamma, h_u/2R) \tilde{E}(f)$, where \tilde{E}_{ap}^{δ} , \tilde{E}_{ap}^{θ} and \tilde{E} are complex moduli and f is the excitation frequency [59].

Thus, this study may strengthen the applicability of optical and magnetic tweezers techniques by insuring a more precise estimation of the intrinsic cell elastic modulus in different context. In particular, the correcting functions we established may be especially relevant when a precise characterization of cell elastic properties is used as a landmark of cellular pathologies as well as a characterization of the efficiency of their treatment [38].

Acknowledgment

We gratefully acknowledge Daniel Isabey, François Gallet, and Sylvie Henon for helpful discussions. Alain Kamgoue is supported by a grant from Fondation d'Entreprise Groupe Banque Populaire, Programme 2006: Bâtir votre Projet - Jeunes Handicapés Physiques.

References

- Ingber, D. E., 2006, "Cellular Mechanotransduction: Putting All the Pieces Together Again," *FASEB J.*, **20**(7), pp. 811–827.
- Fabry, B., Maksym, G. N., Shore, S. A., Moore, P. E., Panettieri, R. A. Jr., Butler, J. P., and Fredberg, J. J., 2001, "Selected Contribution: Time Course and Heterogeneity of Contractile Responses in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells," *J. Appl. Physiol.*, **91**(2), pp. 986–994.
- Matthews, B. D., Overby, D. R., Mannix, R., and Ingber, D. E., 2006, "Cellular Adaptation to Mechanical Stress: Role of Integrins, Rho, Cytoskeletal Tension and Mechanosensitive Ion Channels," *J. Cell. Sci.*, **119**(Pt 3), pp. 508–518.
- Wang, N., and Ingber, D. E., 1995, "Probing Transmembrane Mechanical Coupling and Cytomechanics Using Magnetic Twisting Cytometry," *Biochem. Cell Biol.*, **73**(7-8), pp. 327–335.
- Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J. J., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrellykke, I. M., Polte, T., Mannix, R., and Ingber, D. E., 2001, "Mechanical Behavior in Living Cells Consistent With the Tensegrity Model," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**(14), pp. 7765–7770.
- Boudou, T., Ohayon, J., Armitz, Y., Finet, G., Picart, C., and Tracqui, P., 2006, "An Extended Modeling of the Micropipette Aspiration Experiment for the Characterization of the Young's Modulus and Poisson's Ratio of Adherent Thin Biological Samples: Numerical and Experimental Studies," *J. Biomech.*, **39**(9), pp. 1677–1685.
- Guilak, F., Alexopoulos, L. G., Upton, M. L., Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A., and Haider, M. A., 2006, "The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1068**, pp. 498–512.
- Liao, D., Sevcencu, C., Yoshida, K., and Gregersen, H., 2006, "Viscoelastic Properties of Isolated Rat Colon Smooth Muscle Cells," *Cell Biol. Int.*, **30**(10), pp. 854–858.
- Sato, M., Theret, D. P., Wheeler, L. T., Ohshima, N., and Nerem, R. M., 1990, "Application of the Micropipette Technique to the Measurement of Cultured Porcine Aortic Endothelial Cell Viscoelastic Properties," *ASME J. Biomech. Eng.*, **112**(3), pp. 263–268.
- Coughlin, M. F., and Stamenovic, D., 2003, "A Prestressed Cable Network Model of the Adherent Cell Cytoskeleton," *Biophys. J.*, **84**(2 Pt 1), pp. 1328–1336.
- Duszyk, M., Schwab, B. 3rd, Zahalak, G. I., Qian, H., and Elson, E. L., 1989, "Cell Poking: Quantitative Analysis of Indentation of Thick Viscoelastic Layers," *Biophys. J.*, **55**(4), pp. 683–690.
- Goldmann, W. H., Galneder, R., Ludwig, M., Kromm, A., and Ezzell, R. M., 1998, "Differences in F9 and 5.51 Cell Elasticity Determined by Cell Poking and Atomic Force Microscopy," *FEBS Lett.*, **424**(3), pp. 139–142.
- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepat, X., Fabry, B., Farre, R., and Navajas, D., 2003, "Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy," *Biophys. J.*, **84**(3), pp. 2071–2079.
- Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B., and Chadwick, R. S., 2002, "Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope," *Biophys. J.*, **82**(5), pp. 2798–2810.
- Dulinska, I., Targosz, M., Strojny, W., Lekka, M., Czuba, P., Balwierz, W., and Szymonski, M., 2006, "Stiffness of Normal and Pathological Erythrocytes Studied by Means of Atomic Force Microscopy," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **66**(1-3), pp. 1–11.
- Shroff, S. G., Saner, D. R., and Lal, R., 1995, "Dynamic Micromechanical Properties of Cultured Rat Atrial Myocytes Measured by Atomic Force Microscopy," *Am. J. Physiol.*, **269**(1 Pt 1), pp. C286–C292.
- Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., and Meister, J. J., 2000, "Contribution of the Nucleus to the Mechanical Properties of Endothelial Cells," *J. Biomech.*, **35**(2), pp. 177–187.
- Desprat, N., Richert, A., Simeon, J., and Asnacios, A., 2005, "Creep Function of a Single Living Cell," *Biophys. J.*, **88**(3), pp. 2224–2233.
- Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, A., and Meister, J. J., 1999, "Microplates: A New Tool for Manipulation and Mechanical Perturbation of Individual Cells," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **39**(1-2), pp. 47–62.
- Balland, M., Richert, A., and Gallet, F., 2005, "The Dissipative Contribution of Myosin II in the Cytoskeleton Dynamics of Myoblasts," *Eur. Biophys. J.*, **34**(3), pp. 255–261.
- Henon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F., 1999, "A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers," *Biophys. J.*, **76**(2), pp. 1145–1151.
- Laurent, V. M., Henon, S., Planus, E., Fodil, R., Balland, M., Isabey, D., and Gallet, F., 2002, "Assessment of Mechanical Properties of Adherent Living Cells by Bead Micromanipulation: Comparison of Magnetic Twisting Cytometry vs Optical Tweezers," *ASME J. Biomech. Eng.*, **124**(4), pp. 408–421.
- Lenormand, G., Henon, S., Richert, A., Simeon, J., and Gallet, F., 2001, "Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton," *Biophys. J.*, **81**(1), pp. 43–56.
- Lenormand, G., Henon, S., Richert, A., Simeon, J., and Gallet, F., 2003, "Elasticity of the Human Red Blood Cell Skeleton," *Biorheology*, **40**(1-3), pp. 247–251.
- Mills, J. P., Qie, L., Dao, M., Lim, C. T., and Suresh, S., 2004, "Nonlinear Elastic and Viscoelastic Deformation of the Human Red Blood Cell With Optical Tweezers," *Mech. Chem. Biosyst.*, **1**(3), pp. 169–180.
- Sheetz, M. P., 1998, "Laser Tweezers in Cell Biology. Introduction," *Methods Cell Biol.*, **55**, pp. 11–12.
- Svoboda, K., and Block, S. M., 1994, "Biological Applications of Optical Forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, pp. 247–285.
- Ananthakrishnan, R., Guck, J., Wottawah, F., Schinkinger, S., Lincoln, B., Romeyke, M., Moon, T., and Kas, J., 2006, "Quantifying the Contribution of Actin Networks to the Elastic Strength of Fibroblasts," *J. Theor. Biol.*, **242**(2), pp. 502–516.
- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C., and Kas, J., 2001, "The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells," *Biophys. J.*, **81**(2), pp. 767–784.
- Wottawah, F., Schinkinger, S., Lincoln, B., Ananthakrishnan, R., Romeyke, M., Guck, J., and Kas, J., 2005, "Optical Rheology of Biological Cells," *Phys. Rev. Lett.*, **94**(9), pp. 098103.
- Bausch, A. R., Moller, W., and Sackmann, E., 1999, "Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers," *Biophys. J.*, **76**(1 Pt 1), pp. 573–579.
- de Vries, A. H., Krenn, B. E., van Driel, R., and Kanger, J. S., 2005, "Micro Magnetic Tweezers for Nanomanipulation Inside Live Cells," *Biophys. J.*, **88**(3), pp. 2137–2144.
- Ter-Oganesian, N., Pink, D. A., and Boulbitch, A., 2005, "Active Microrheology of Networks Composed of Semiflexible Polymers: Theory and Comparison With Simulations," *Phys. Rev. E*, **72**(4 Pt 1), pp. 041511.
- Walter, N., Selhuber, C., Kessler, H., and Spatz, J. P., 2006, "Cellular Unbinding Forces of Initial Adhesion Processes on Nanopatterned Surfaces Probed With Magnetic Tweezers," *Nano Lett.*, **6**(3), pp. 398–402.
- Fabry, B., Maksym, G. N., Hubmayr, R. D., Butler, J. P., and Fredberg, J. J., 1999, "Implications of Heterogeneous Bead Behavior on Cell Mechanical Properties Measured With Magnetic Twisting Cytometry," *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, pp. 120–125.
- Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., and Fredberg, J. J., 2001, "Scaling the Microrheology of Living Cells," *Phys. Rev. Lett.*, **87**(14), pp. 148102.
- Fereol, S., Fodil, R., Labat, B., Galiacy, S., Laurent, V. M., Louis, B., Isabey, D., and Planus, E., 2006, "Sensitivity of Alveolar Macrophages to Substrate Mechanical and Adhesive Properties," *Cell Motil. Cytoskeleton*, **63**(6), pp. 321–340.
- Hubmayr, R. D., Shore, S. A., Fredberg, J. J., Planus, E., Panettieri, R. A. Jr., Moller, W., Heyder, J., and Wang, N., 1996, "Pharmacological Activation Changes Stiffness of Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells," *Am. J. Physiol.*, **271**(5 Pt 1), pp. C1660–C1668.
- Lenormand, G., Millet, E., Fabry, B., Butler, J. P., and Fredberg, J. J., 2004, "Linearity and Time-Scale Invariance of the Creep Function in Living Cells," *J. R. Soc. Interface*, **1**(1), pp. 91–97.
- Ohayon, J., Tracqui, P., Fodil, R., Fereol, S., Laurent, V. M., Planus, E., and Isabey, D., 2004, "Analysis of Nonlinear Responses of Adherent Epithelial Cells Probed by Magnetic Bead Twisting: A Finite Element Model Based on a Homogenization Approach," *ASME J. Biomech. Eng.*, **126**(6), pp. 685–698.
- Ohayon, J., and Tracqui, P., 2005, "Computation of Adherent Cell Elasticity for Critical Cell-Bead Geometry in Magnetic Twisting Experiments," *Ann.*

- Biomed. Eng., **33**(2), pp. 131–141.
- [42] Potard, U. S., Butler, J. P., and Wang, N., 1997, "Cytoskeletal Mechanics in Confluent Epithelial Cells Probed Through Integrins and E-cadherins," *Am. J. Physiol.*, **272**(5 Pt 1), pp. C1654–C1663.
- [43] Puig-de-Morales, M., Millet, E., Fabry, B., Navajas, D., Wang, N., Butler, J. P., and Fredberg, J. J., 2004, "Cytoskeletal Mechanics in Adherent Human Airway Smooth Muscle Cells: Probe Specificity and Scaling of Protein-Protein Dynamics," *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.*, **287**(3), pp. C643–C654.
- [44] Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E., 1993, "Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton," *Science*, **260**(5111), pp. 1124–1127.
- [45] Wang, N., and Ingber, D. E., 1994, "Control of Cytoskeletal Mechanics by Extracellular Matrix, Cell Shape, and Mechanical Tension," *Biophys. J.*, **66**(6), pp. 2181–2189.
- [46] Lau, A. W., Hoffman, B. D., Davies, A., Crocker, J. C., and Lubensky, T. C., 2003, "Microrheology, Stress Fluctuations, and Active Behavior of Living Cells," *Phys. Rev. Lett.*, **91**(19), pp. 198101.
- [47] Salamon, P., Fernandez-Garcia, D., and Gomez-Hernandez, J. J., 2006, "A Review and Numerical Assessment of the Random Walk Particle Tracking Method," *J. Contam. Hydrol.*, **87**, pp. 277–305.
- [48] Tseng, Y., Kole, T. P., and Wirtz, D., 2002, "Micromechanical Mapping of Live Cells by Multiple-Particle-Tracking Microrheology," *Biophys. J.*, **83**(6), pp. 3162–3176.
- [49] Mijailovich, S. M., Kojic, M., Zivkovic, M., Fabry, B., and Fredberg, J. J., 2002, "A Finite Element Model of Cell Deformation During Magnetic Bead Twisting," *J. Appl. Physiol.*, **93**(4), pp. 1429–1436.
- [50] Feneberg, W., Aepfelbacher, M., and Sackmann, E., 2004, "Microviscoelasticity of the Apical Cell Surface of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Within Confluent Monolayers," *Biophys. J.*, **87**(2), pp. 1338–1350.
- [51] Fodil, R., Laurent, V., Planus, E., and Isabey, D., 2003, "Characterization of Cytoskeleton Mechanical Properties and 3D-Actin Structure in Twisted Adherent Epithelial Cells," *Biorheology*, **40**(1-3), pp. 241–245.
- [52] Holzapfel, G., 2001, *Nonlinear Solid Mechanics*, Wiley, NY.
- [53] Phan-Thien, N., 1993, "Rigid Spherical Inclusion: The Multipole Expansion," *J. Elast.*, **32**, pp. 243–252.
- [54] Maksym, G. N., Fabry, B., Butler, J. P., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Laporte, J. D., and Fredberg, J. J., 2000, "Mechanical Properties of Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells From 0.05 to 0.4 Hz," *J. Appl. Physiol.*, **89**(4), pp. 1619–1632.
- [55] Karcher, H., Lammerding, J., Huang, H., Lee, R. T., Kamm, R. D., and Kaazempur-Mofrad, M. R., 2003, "A Three-Dimensional Viscoelastic Model for Cell Deformation With Experimental Verification," *Biophys. J.*, **85**(5), pp. 3336–3349.
- [56] Rotsch, C., Jacobson, K., and Radmacher, M., 1999, "Dimensional and Mechanical Dynamics of Active and Stable Edges in Motile Fibroblasts Investigated by Using Atomic Force Microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**(3), pp. 921–926.
- [57] Tracqui, P., and Ohayon, J., 2004, "Influence of the Cellular Nucleus on the Cell Mechanical Response During Magnetic Bead Twisting," *Acta Biotheor.*, **52**(4), pp. 323–341.
- [58] Hu, S., Eberhard, L., Chen, J., Love, J. C., Butler, J. B., Fredberg, J. J., Whitesides, G. M., and Wang, N., 2004, "Mechanical Anisotropy of Adherent Cells Probed by a Three-Dimensional Magnetic Twisting Device," *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.*, **287**, pp. 1184–1191.
- [59] Djordjevic, V. D., Jaric, J., Fabry, B., Fredberg, J. J., and Stamenovic, D., 2003, "Fractional Derivatives Embody Essential Features of Cell Rheological Behavior," *Ann. Biomed. Eng.*, **31**(6), pp. 692–699.
- [60] Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., Taback, N. A., Millet, E. J., and Fredberg, J. J., 2003, "Time Scale and Other Invariants of Integrative Mechanical Behavior in Living Cells," *Phys. Rev. E*, **68**(4 Pt 1), pp. 041914.
- [61] Trickey, W. R., Vail, T. P., and Guilak, F., 2004, "The Role of the Cytoskeleton in the Viscoelastic Properties of Human Articular Chondrocytes," *J. Orthop. Res.*, **22**(1), pp. 131–139.

Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of CytometryQuantification of Cardiomyocyte Contraction
Based on Image Correlation AnalysisA. Kamgoué,¹* J. Ohayon,¹* Y. Usson,² L. Riou,³ P. Tracqui¹*

¹Equipe DynaCell, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Institut de l'Ingénierie et de l'Information de Santé, (In3S), Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France

²Equipe RFMQ, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Institut de l'Ingénierie et de l'Information de Santé, (In3S), Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France

³INSERM U877, Radiopharmaceutique biocliniques, Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France

Received 26 June 2008; Revision Received 28 October 2008; Accepted 25 November 2008

Contract grant sponsors: Fondation d'Entreprise Groupe Banque Populaire, Bâtir votre Projet—Jeunes Handicapés Physiques

*Correspondence to: J. Ohayon Jacques, Equipe DynaCell, Laboratoire TIMC-IMAG, In3S, Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France. Email: ohayon@imag.fr or P. Tracqui Philippe, Equipe DynaCell, Laboratoire TIMC-IMAG, In3S, Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France

Email: tracqui@imag.fr

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.20700

© 2008 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Quantification of cardiomyocyte contraction is usually obtained by measuring globally cell shortening from the displacement of cell extremities. We developed a correlation-based optical flow method, which correlates the whole-cell temporal pattern with a precise quantification of the intracellular strain wave at the sarcomeres level. A two-dimensional image correlation analysis of cardiomyocytes phase-contrast images was developed to extract local cell deformations from videomicroscopy time-lapse sequences. Test images, synthesized from known intensity displacement fields, were first used to validate the method. Intracellular strain fields were then computed from videomicroscopy time-lapse sequences of single adult and neonatal cardiomyocytes. The propagation of the sarcomeres contraction-relaxation wave during cell contraction has been successfully quantified. The time-varying patterns of intracellular displacement were obtained accurately, even when cardiomyocyte bending occurred in pace with contraction. Interestingly, the characterization of the successive 2D displacement allows a direct quantification of the variation with time of intracellular strains anywhere in the cell. The proposed method allows a quantitative analysis of cardiomyocyte contraction without requiring wave tracking with the use of fluorescent calcium probes. Thus, our algorithmic approach provides a fast and efficient tool for analyzing the correlation between global cell dynamical behavior and mechanosensitive intracellular processes. © 2008 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

optical flow; contraction wave; image sequence analysis; intracellular strain

INTRACELLULAR Ca^{2+} waves play an integral part in the process of excitation-contraction coupling within mammalian cardiomyocytes. Ca^{2+} waves might spontaneously arise from a triggering pulse of Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum, which under certain circumstances propagates throughout the cell (1–3). The qualitative and quantitative characterization of Ca^{2+} waves, including amplitude, frequency, and propagation velocity, is thus a central issue for understanding both normal and pathological contractile cell behavior, such as the correlation of spontaneous Ca^{2+} waves with arrhythmic electrical activity (4–6). Despite obvious limitations, such analyses are usually conducted on isolated single cardiac cells. Indeed, within the myocardium, the cardiomyocytes are arranged in a complex network. Thus, correlating accurately forces and length changes with intracellular Ca^{2+} waves is rather difficult. Monitoring Ca^{2+} waves has then been made possible by using fast confocal microscopy techniques, which image the intensity variation of calcium fluorescent probes such as Fluo-3 (7,8). In addition, such probes have been proven to be highly valuable for analyzing the dynamic of intracellular Ca^{2+} components, like ryanodine receptors (9,10).

On the other hand, the direct quantification of sarcomere mechanical status becomes highly valuable to get insights into the regulation of cardiac muscle contraction mediated by the mechanosensitivity of biochemical processes or molecular interactions, which depend on the sarcomere length or on actin-myosin filaments spacing. Sarcomeres length measurements are usually based on laser diffraction techniques



International Society for Advancement of Cytometry

Cytometry Part A • 00A: 000–000, 2008

ORIGINAL ARTICLE

(11), but this approach is not well suited for the analysis of the spatio-temporal variation of the sarcomeres length at the cell level, especially when the dynamic of the cardiomyocyte contraction wave has to be characterized.

To overcome these limitations, we developed an optical flow approach aiming at characterizing the spatio-temporal variation of intracellular strain fields associated with sarcomeres contraction–relaxation over the course of cardiomyocyte contraction. Even though optical flow methods are rather widely applied in several engineering or bioengineering fields, only a few attempts have yet been made to apply them to single cell dynamics analysis (12–14), mostly because animal cells are highly deformable objects. Among the rather large spectrum of optical flow methods implementations (15,16), Image Correlation Method (ICM) (17–19) seemed to us a quite relevant approach for characterizing intracellular strain fields during cardiomyocyte contraction. Indeed, the highly structured and anisotropic organization of the cell sarcomeres defines a very precise and repetitive spatial pattern, which may be used in a rather discriminating way by ICM when looking for a similarity between two successive patches of the region of interest (ROI) within cell images. Thus, we were expecting that such *a priori* optimality can be quantitatively assessed by developing an image-processing algorithm that takes benefit of the specific grey level patterns generated by phase contrast observation of contracting cardiac cells.

In this article, we propose and validate a complete procedure which provides an accurate estimation of the 2D displacement fields at any cardiomyocyte location from the analysis of time-lapse sequences of single cell contraction recorded using phase contrast and differential interface contrast (DIC) videomicroscopy. An essential step in this procedure is to find the displacement field, which optimizes the prediction of the light intensity pattern which will be observed when considering two successive images of the sequence. The first part of the article focuses on the method implementation. Then, our method reliability and accuracy is assessed by analyzing different sets of synthesized pair of images, constructed from known intensity displacement fields. The second part of the article is devoted to the analysis of experimental time-lapse sequences showing different spatio-temporal patterns of spontaneously contracting adult rat cardiomyocytes. For each considered experiment, the spatial distribution of intracellular strain fields has been characterized at several times during the cardiomyocyte contraction. In the discussion section, the robustness of our approach is discussed by considering less textured contracting objects. For this purpose, image sequences of spontaneously contracting neonatal cardiomyocytes are analyzed, since at this stage of development, the cytoskeleton of these cells lacks the regular sarcomere organization present in adult cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Adult rat cardiomyocytes were kindly provided by the LBFA laboratory (Joseph Fourier University, Grenoble).

Briefly, cells were isolated from rat heart ventricles by enzymatic dissociation as described in Ref. 20.

Time-Lapse Video Microscopy

The spontaneous and periodic contractions of the isolated adult rat cardiomyocytes were recorded by DIC and phase contrast time-lapse videomicroscopy using an imaging workstation composed of an inverted microscope (Zeiss AchroStigmat Axiovert 135) equipped with a 10× objective (Zeiss Acroplan), automated shutters (Uniblitz) and a CCD camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific). Image acquisition was controlled via a computer using a dedicated software (Metaview, Roper Scientific). Microscope calibration was performed using a micrometric slide (PRESS-PRO21). The size of the images we analyzed was 442 × 161 pixels. Images were taken every 110 ms at room temperature.

Image Correlation Analysis and Displacement Field Computation

An ICM was used to compute the displacement field $w(u, v)$ between a pair of successive images taken at time t and $t + \Delta t$, and labeled for convenience as *Image 1* and *Image 2*, respectively. Let us consider a small window area *Wind1* in *Image 1* (Fig. 1). Then, the aim of the algorithm is to find the matching window *Wind2* in *Image 2*, i.e., the position to which *Wind1* has moved during the time interval Δt . For this purpose, *Wind1* is compared with windows belonging to the same neighborhood *Neigh2* in *Image 2* (Fig. 1). *Neigh2* is also called the ROI or zone of interest (ZOI). For each window *Wind2*, a similarity measure is computed. The window exhibiting the highest similarity, i.e. the best correlation with *Wind1*, is then retained as the matching window *Wind2**.

More formally, let us denote I_{W1} the illumination intensity matrix of *Wind1*, and I_{W2} the illumination intensity matrix of any current window *Wind2* of the ROI, respectively, with

$$I_{W1} = \begin{pmatrix} I_t^{ij} \end{pmatrix} = I_t(i, j) \quad I_{W2} = \begin{pmatrix} I_{t+\Delta t}^{ij} \end{pmatrix} = I_{t+\Delta t}(i + u, j + v) \tag{1}$$

where the integer $I_t(i, j)$ defines the reference grey level value at time t of the pixel located at (i, j) in *Image 1*, while $I_{t+\Delta t}(i + u, j + v)$ defines the corresponding current grey level value of the pixel located at $(i + u, j + v)$ in *Image 2*, corresponding to time $t + \Delta t$.

For any window *Wind1*, we are looking for an optimum window *Wind2** such that

$$C(I_{W1}, I_{W2^*}) = \max_{(u^*, v^*)/ROI} \{C(I_{W1} I_{W2})\} \tag{2}$$

where

$$I_{W2^*} = \begin{pmatrix} I_{t+\Delta t}^{ij} \end{pmatrix} = I_{t+\Delta t}(i + u^*, j + v^*) \tag{3}$$

and (u^*, v^*) are the two unknown components of the optimum displacement vector $w^*(u^*, v^*)$ with respect to the chosen similarity or discrete cross-correlation function $C(.,.)$.

Among all different similarity functions proposed, we chose a variance-normalized cross-correlation function $C_v(.,.)$, since

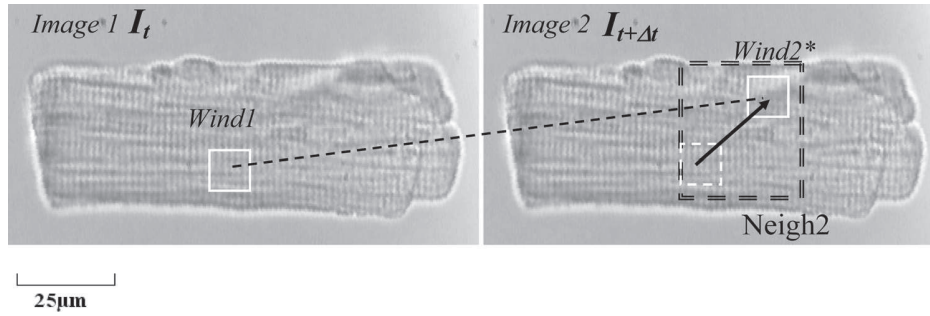


Figure 1. Background for the Image Correlation Method (ICM) developed for analyzing two successive cardiomyocyte images of a videomicroscopy sequence. This optical flow method is based on the computation of a cross-correlation function between a given window *Wind1* in *Image 1* taken at time t (left), and all the possible matching windows *Wind2* of the same size included in a neighbourhood *Neigh2* (dashed line boundaries) defined in the next image of the sequence, called *Image 2* and corresponding to time $t + \Delta t$ (right). In this figure, the best correlation with the image area *Wind1* has been obtained with the matching window labeled *Wind2**. The resulting displacement vector is then given by the arrow linking *Wind1* and *Wind2** centers.

such weighted criterion has been shown to be more robust (21,22).

Considering two matrices I_{W1} and I_{W2} with dimension (N, M) , the similarity function $C_V(.,.)$ is computed for each successive pair of the image sequence as

$$C_V(I_{W1}, I_{W2}) = \frac{\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [I_t^{ij} - \bar{I}_t] [I_{t+\Delta t}^{ij} - \bar{I}_{t+\Delta t}]}{\sqrt{\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} [I_t^{ij} - \bar{I}_t]^2 [I_{t+\Delta t}^{ij} - \bar{I}_{t+\Delta t}]^2}} \quad (4)$$

where \bar{I}_t and $\bar{I}_{t+\Delta t}$ represent the respective means of I_t and $I_{t+\Delta t}$ defined as

$$\bar{I}_{W1} = \frac{\sum_{ij} I_t^{ij}}{M \times N} \quad \bar{I}_{W2} = \frac{\sum_{ij} I_{t+\Delta t}^{ij}}{M \times N} \quad (5)$$

The algorithmic strategy used for computing $w(u, v)$ follows different guidelines. A major point is to limit the size of the ROI in order to optimize the speed, robustness, and accuracy of our algorithm. Indeed, dealing with small displacements requires considering neighborhood of small size and imposes large computational times, but choosing too large neighborhoods would likely lead to non-meaningful displacement solutions, as illustrated below.

Optimization of the ROI

Detection of the matching window *Wind2** must take care of both the displacement amplitude and of the background noise in the illumination maps, this latter originating from different sources. These include fluctuations of illumination intensity with object displacement (departure from illumination conservation assumption), as well as fluctuations of the focusing plane in the case of a contracting 3D object like a cardiac cell. This problem has been handled by considering an optimal size of the ROI in association with an optimum value of the similarity function $C_v(I_{W1}, I_{W2})$, according to the following procedure: taking a square window *Wind1* of size $(si \times si)$

and centered at (X_t^{kl}) in *Image 1*, we defined a ROI centered at $(X_{t+\Delta t}^{kl}, Y_{t+\Delta t}^{kl})$ in *Image 2* with size $(si + (ka \times si)) \times (si + (ka \times si))$, where ka is a dilation scale-factor ($ka \geq 1$). We started the search of the optimum displacement vector w^* by considering a ROI two times larger than *Wind1* ($ka = 1$). This gives a first value δ_1 of $C_v(I_{W1}, I_{W2})$. Then, the value of the scaling factor ka is increased by an integer value of 1, which generates increasing values δ_{ka} that tend to plateau toward the best reachable correlation value δ_{opt} of $C_v(I_{W1}, I_{W2})$, with $\delta_{opt} \leq 1$. The larger is the value of δ_{opt} , the more accurate is the detection of the matching window *Wind2**. This point is illustrated in Figure 3 introduced below. A global estimation of a correlation threshold δ was obtained by averaging all the values δ_{opt} over *Image 1*.

F3

Construction of Pairs of Test Images

To test the accuracy and precision of the method, different pairs of test images were constructed by applying specific and known spatial displacement fields on a textured square object with size $[0,1] \times [0,1]$ [*Image 1*, Fig. 2(A)] to get corresponding deformed objects [*Image 2*, Figs. 2(B) and 2(C)]. The size of *Image 1* is 256×256 pixels. Meshing the square with 2D triangular elements defines a set of nodes where the known displacements have been applied.

F2

Case 1: On each node, a linear spatial distribution of the displacement field was applied in the Ox direction as $u(x, y) = 0.1x$, while the left boundary of the deforming square remains fixed (i.e. $u(0, y) = v(0, y) = 0$). Both upper and lower sides of the square were free to move (zero-stress boundary conditions). The associated component $v(x, y)$ of the displacement vector was computed using a finite element analysis software (Comsol Multiphysics©), assuming that the square behaves as a 2D linear elastic membrane with Poisson's ratio 0.49 and Young modulus 500 kPa.

Case 2: The second set of test images was obtained by imposing to the textured squared object a more complex displacement field, defined by $u(x, y) = 0.1y$ and $v(x, y) = 0.1x$ [Fig. 2(C)].

ORIGINAL ARTICLE

COLOR

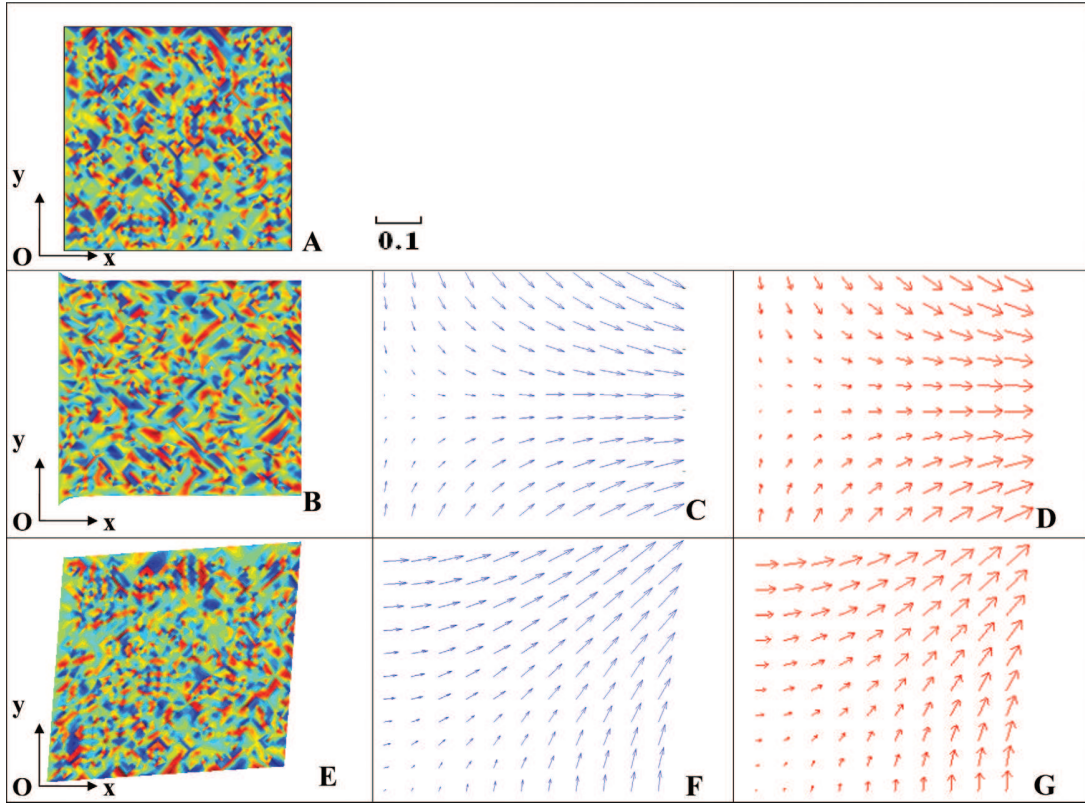


Figure 2. Analysis performed on pairs of test images, constructed from an initial 2D image exhibiting heterogeneous (textured) intensity map. **A:** Initial image *Image 1*. **B:** *Image 2* resulting from the transformation of *Image 1* by application of a displacement field defined by $u(x,y)=0.1x$. **C:** Associated displacement field computed by ICM. **D:** Corresponding theoretical displacement field. **E:** Second pair of test images we considered. Here, *Image 2* has been synthesized after imposing the displacements $u(x,y) = 0.1y$ and $v(x,y) = 0.1x$ to *Image 1*. **F:** Associated displacement field computed by ICM. **G:** Corresponding theoretical displacement field. In Figures 2(C)–2(F), the optimization procedure of the ICM has been conducted with a research window *Wind1* of 10×10 pixels, a correlation threshold $\delta = 0.95$, a dilation-scale factor $ka = 3$ and ROI size of 40×40 pixels.

AQ2

Derivation of the Strain Field Associated with the ICM Computed Displacement Field

For each matching window *Wind2**, centered at $(X_{t+\Delta t}^{kl}, Y_{t+\Delta t}^{kl})$ and associated with a reference window *Wind1* centered at (X_t^{kl}, Y_t^{kl}) at time t , we derived the displacement field $w_{t,t+\Delta t}^{kl}$ between times t and $t+\Delta t$ as:

$$w_{t,t+\Delta t}^{kl} = \begin{pmatrix} u_{t,t+\Delta t}^{kl} \\ v_{t,t+\Delta t}^{kl} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} X_{t+\Delta t}^{kl} - X_t^{kl} \\ Y_{t+\Delta t}^{kl} - Y_t^{kl} \end{pmatrix} \quad (6)$$

To describe the transformation of any window, located at (k,l) , between times t and $t+\Delta t$, we used the deformation gradient tensor $F_{t,t+\Delta t}^{kl}$ given by

$$F_{t,t+\Delta t}^{kl} = \begin{pmatrix} \frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial x} & \frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial y} \\ \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial x} & \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial y} \end{pmatrix} \quad (7)$$

The relation between the Green-Lagrange strain tensor $E_{t,t+\Delta t}^{kl}$ and the deformation gradient tensor is given by (23):

$$E_{t,t+\Delta t}^{kl} = \frac{1}{2} \left(\left(F_{t,t+\Delta t}^{kl} \right)^T F_{t,t+\Delta t}^{kl} - Id \right) \quad (8)$$

where *Id* is the identity tensor and $(\cdot)^T$ denotes the tensor transposition.

The strain field with regard to the initial (or undeformed) configuration at t_0 , i.e. for generally large deformations, is given at any time t by the Green-Lagrange strain tensor $E_{t_0,t}^{kl}$ computed from the composition of the successive deformation gradient tensors:

$$F_{t_0,t}^{kl} = F_{t_0,t_0+\Delta t}^{kl} \bullet F_{t_0+\Delta t,t_0+2\Delta t}^{kl} \bullet \dots \bullet F_{t-2\Delta t,t-\Delta t}^{kl} \bullet F_{t-\Delta t,t}^{kl} \quad (9)$$

with

$$E_{t_0,t}^{kl} = \frac{1}{2} \left(\left(F_{t_0,t}^{kl} \right)^T F_{t_0,t}^{kl} - Id \right) \quad (10)$$

from which we obtained the normal strains components $E_{xx,D}$, $E_{yy,t}$ and shear strain component $E_{xy,D}$ where the subscript t_0 has been omitted to simplify notations.

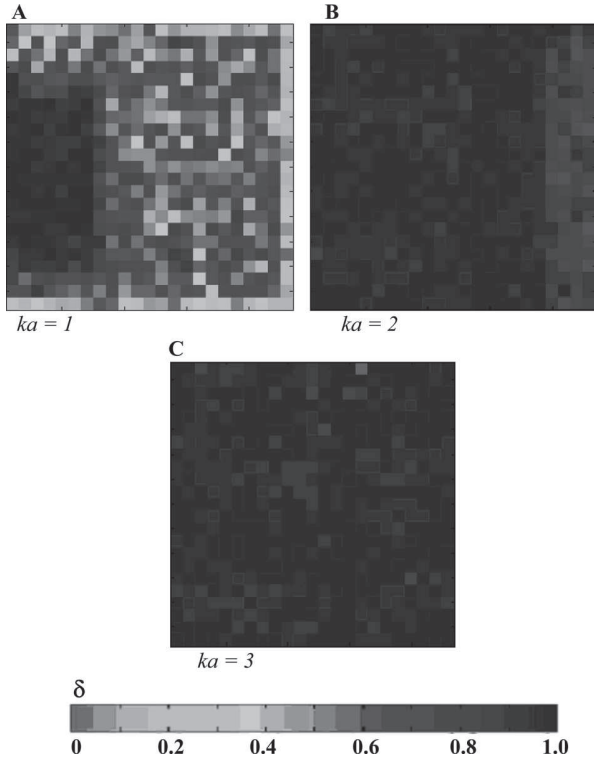


Figure 3. Search for an optimum size of both research window *Wind1* and ROI illustrated with the first pair of test images we considered in the previous figure [Figs. 2(A) and 2(B)]. Best correlations are obtained when the correlation threshold δ reaches the value $\delta \sim 1$. With a scale factor $ka = 1$ [Fig. 3(A)] a good correlation is only obtained on the left side of the deforming surface, i.e. in small displacement regions. Correlation significantly improves with $ka = 2$ [Fig. 3(B)] but with still weak correlation in regions experiencing large displacements. Optimum in correlation optimum is obtained with $ka = 3$ [Fig. 3(C)], i.e. with a ROI size of 40×40 pixels.

When deformations are computed between two consecutive images, small deformations analysis was performed. We then evaluated the associated linearized normal $\epsilon_{xx,t}$, $\epsilon_{yy,t}$ and shear strains $\epsilon_{xy,t}$ between two successive images as

$$\begin{aligned} \epsilon_{xx,t} &= \frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial x}; & \epsilon_{yy,t} &= \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial y}; \\ \epsilon_{xy,t} &= \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_{t,t+\Delta t}}{\partial y} + \frac{\partial v_{t,t+\Delta t}}{\partial x} \right) \end{aligned} \quad (11)$$

These derivatives were computed numerically using the following finite differences approximations

$$\begin{aligned} \epsilon_{xx,t}^{kl} &= \frac{u_{t,t+\Delta t}^{k+1,l} - u_{t,t+\Delta t}^{k-1,l}}{X^{k+1,l} - X^{k-1,l}}; & \epsilon_{yy,t}^{kl} &= \frac{v_{t,t+\Delta t}^{k,l+1} - v_{t,t+\Delta t}^{k,l-1}}{Y^{k,l+1} - Y^{k,l-1}}; \\ \epsilon_{xy,t}^{kl} &= \frac{1}{2} \left(\frac{u_{t,t+\Delta t}^{k,l+1} - u_{t,t+\Delta t}^{k,l-1}}{Y^{k,l+1} - Y^{k,l-1}} + \frac{v_{t,t+\Delta t}^{k+1,l} - v_{t,t+\Delta t}^{k-1,l}}{X^{k+1,l} - X^{k-1,l}} \right) \end{aligned} \quad (12)$$

RESULTS

Accuracy, Robustness, and Optimal Window Size of the Optical Flow Algorithm

Both pairs of test images were analyzed using our optical flow algorithm. Accuracy and robustness were assessed from comparison of the computed displacement vector fields with the corresponding known numerical or analytical solutions [case 1, Fig. 2(B); case 2, Fig. 2(E)]. Figures 2(D) and 2(G) present the known displacement field imposed for synthesis of each *Image2* of the test images pairs. In both cases, the present algorithm successfully reconstructed the corresponding displacement maps [Figs. 2(C)–2(F)], with a maximum error of 15% on the computed displacements.

These test images have been also used to determine the optimal size of the research window. When considering the first pair of test images [Figs. 2(A) and 2(B)], our computations showed (Fig. 3) that the optimum size for square window *Wind1* is close to (10×10) pixels, while the best correlation threshold δ has been obtained with a dilation scale-factor $ka = 3$, corresponding to a ROI in *Image 2* with size of (40×40) pixels.

Quantification of Cardiomyocyte Shortening from Computed Contraction Waves

This section presents the analysis of two typical spontaneous contractions of isolated adult rat cardiomyocytes. It is known that cell contractions triggered by calcium sparks can appear spontaneously, i.e. in the absence of external stimulation, and randomly within the cell when cardiomyocytes are cultured in vitro (24).

We will focus here on two different contraction patterns that we observed in our in vitro experiments. In the first contraction sequence (seq1), the contraction wave started from the left side of the cell and propagated up to the right boundary [Figs. 4(1A)–4(1E)]. Interestingly, the same cardiomyocyte later exhibited a rather different contraction pattern (seq2), the contraction being then initiated at the center of the cell (Figs. 5(2A)–5(2E)). In this contraction pattern, two strain waves now propagated in opposite directions, toward the cardiomyocyte extremities. A measured time lag of 18.34 s separated the two cell contractions.

Global Quantification of Single Cardiomyocyte Shortening

Figure 6A shows the dynamics of the cardiomyocyte shortening recorded by sequences seq1 and seq2, respectively. The cell shortening was measured in three different ways. First, a global evaluation of the cell length was performed, for both seq1 and seq2, by finding the length of the smallest rectangle surrounding the cardiomyocyte (Fig. 6(A), solid lines). Alternatively, cardiomyocyte shortening in seq1 was computed from the integration, along a longitudinal middle-cell cross-section, of the local intracellular strains derived from the ICM approach (Fig. 6(A) left, square markers). Such one-dimensional integration from local to global cell length is not valid for seq2, since then the cardiomyocyte underwent significant

ORIGINAL ARTICLE

COLOR

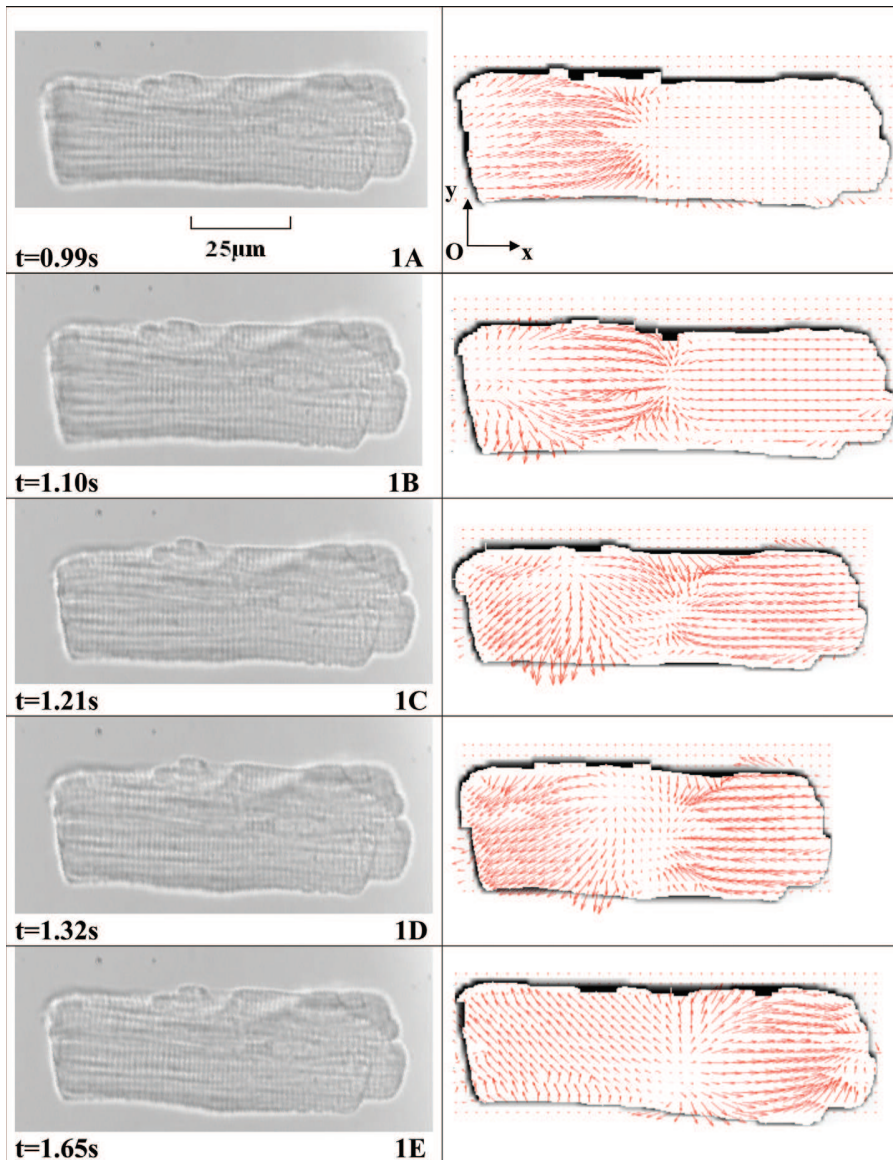


Figure 4. Evolution with time of the displacement field $w(u,v)$ computed for the first cardiomyocyte contraction sequence, defined as seq1 in the main text. In seq1, the cell contraction starts from the left side [Fig. 4(1A)], generating in both cell extremities displacements that develop in opposite directions (1B–1D). After a maximum shortening, cell relaxation takes place on the left side (1E). Parameters of the ICM computation are as follow: *Wind1* size is 9×9 pixels, $ka=2$, ROI size of 27×27 pixels and $\delta = 0.85$.

bending during contraction. In this case, the quantification of the cell shortening from the ICM approach was restricted to the consideration of windows *Wind1* located at both cell borders (Fig. 6(A) right, circular markers).

During the first contraction (seq1), the cell contraction/relaxation took place within 2.05 s and represents 6% (7.13 μm) of the maximum cell length (112.05 μm). The contraction/relaxation phase was shorter (1.21 s) and two times larger (13.69 μm) in seq2, since then the two cell sides contracted simultaneously.

The times needed to reach the maximum amplitude of contraction were 0.57 s and 0.33 s in seq1 and seq2 respectively. In seq1, contraction/relaxation began on the left side. During the left side relaxation contraction/relaxation occurs in right cases. In addition, we checked that the image analysis results given by moving windows located at the adult cardio-

myocyte extremities gave realistic and accurate antagonistic displacement profiles for both cardiomyocyte extremities [Figs. 6(B) and 6(C)]. These windows exhibited the same profiles as those of attachment carbon fibers reported in previous studies (25,26).

The agreement between globally based and locally based measurements methods is quite satisfactory, and thus illustrates that an accurate and combined analysis of the cell contraction and associated intracellular displacement fields is provided by the ICM-based analysis, as detailed below.

Characterization of the Associated Intracellular Contraction Patterns

The strain waves, which propagate through the contracting cardiomyocyte, have been tracked for the two contractile behaviors recorded in the time-lapse sequences seq1 and seq2.

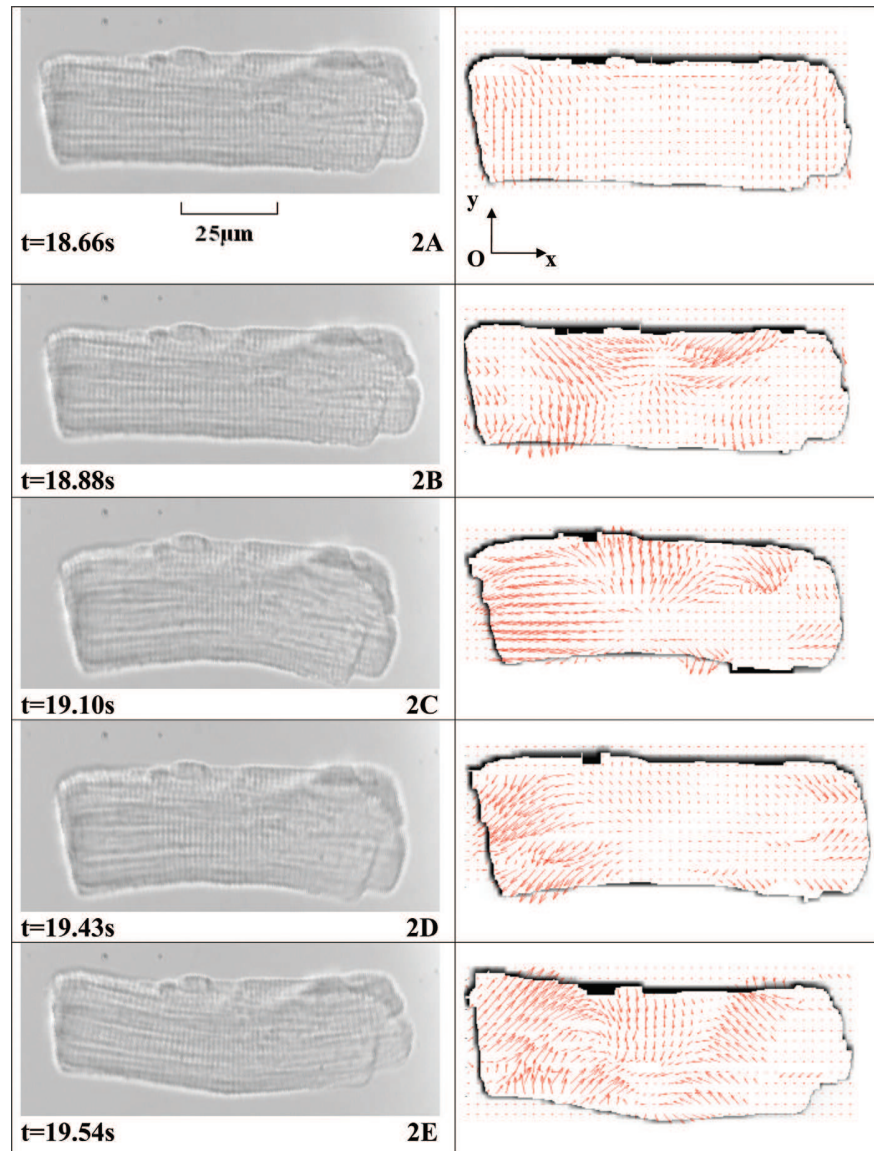


Figure 5. Evolution with time of the displacement field $w(u,v)$ computed for the second cardiomyocyte contraction sequence, defined as seq2 in the main text. In seq2, a twitch appears at the cell centre (2B). It propagates towards both cell extremities, while inducing an intracellular torque that generates a transient upward, then downward bending of both cell sides (2C–2D). In this case, sarcomeres exhibit significant curvature during the maximum cell shortening, but then recover their resting length during the relaxation phase (2E). Parameters of the ICM computation are as follow: *Wind1* size is 9×9 pixels, $ka = 2$, ROI size of 27×27 pixels and $\delta = 0.85$.

Thanks to our optical flow analysis, the local displacement field could be computed in any part of the cardiomyocyte, thus giving access to intracellular mechanical features of intracellular contraction/relaxation at the sarcomere level. In this analysis, the size of *Wind1* is 10×10 pixels, while a ROI-scale factor $ka = 2$ and a ROI of 30×30 pixels were chosen.

In the first videomicroscopy sequence, the computed motion field revealed four main steps during cell contraction. The first one was characterized by the cell contraction starting on the left cell side, the right cell side remaining at rest during 440 ms [Fig. 4(1A)]. In the second stage (220 ms), sarcomere contractions occurred on both sides of the propagating front [Fig. 4(1C)]. In the third stage, sarcomere relaxation began on the left cell side, while contraction still proceeded on the right side, during 330 ms [Fig. 4(1D)]. Finally, complete relaxation took place on the right cell side (550 ms) [Fig. 4(1E)].

Analysis of the second time-lapse sequence (seq2) highlights two main phases during cardiomyocyte contraction/relaxation. During the first phase, an asymmetric distribution of intracellular stresses at the cell center lifted the cell extremities upwards (550 ms) [Figs. 5(2A) and 5(2B)]. However, this twisted motion was immediately followed by a reverse torque, which tended to shift the cell back, probably as a result of homogenization of calcium concentrations within the cell (550 ms) [Figs. 5(2C) and 5(2D)].

Analysis of Intracellular Strains

A main benefit of our approach is its ability to provide a quantification of the intracellular strains everywhere within the cardiac cell. This section presents the estimated strain fields we derived from the displacement fields computed by the optical flow method, using Eq. (10).

ORIGINAL ARTICLE

COLOR

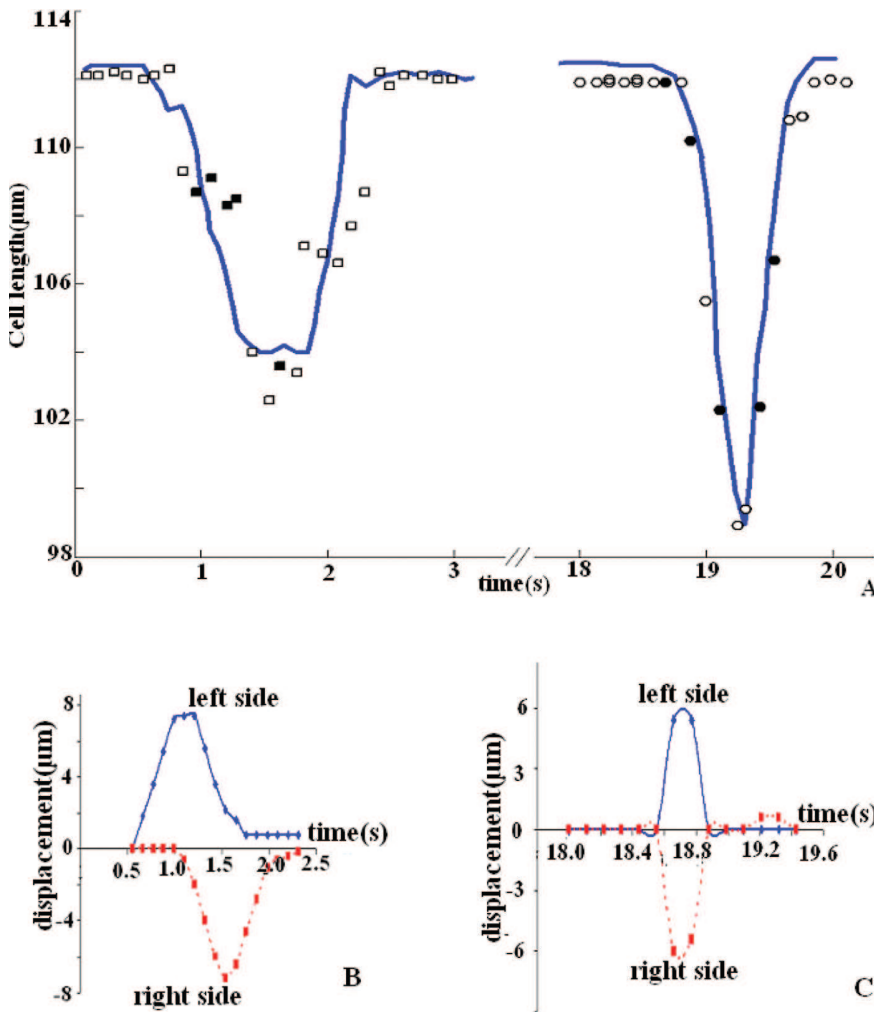


Figure 6. Dynamics of the cardiomyocyte shortening during contraction wave propagation, corresponding to seq1 and seq2 analyzed in Figures 4 and 5. The figure compares cell shortening measurements performed both globally and with ICM, as explained in the text. Globally, the time-varying cardiomyocyte length has been evaluated as the length of the smallest rectangular envelope that surrounds the cardiomyocyte (solid lines) in both seq 1 [Fig. 6(A), left part] and seq 2 [Fig. 6(A), right part]. Thanks to the ICM approach, cell contraction amplitude has also been computed – in seq1, from the integration of the intracellular strain $E_{xx,t}$ along a cell cross-section taken in the middle of the cell (square markers) – in seq2, from image correlation analysis restricted to both cell extremities (circular markers). The relative and corresponding displacement of each extremity of the cardiomyocyte has been detailed in Figures 6(B) and 6(C). Filled squares and circles correspond to the observation times presented in Figures 4 and 5 for both contraction sequences. In seq1, the propagation of the contraction wave from left to right induces a phase shift in cell extremities displacements [Fig. 6(B)]. Conversely, both extremities move almost in phase in seq 2 when cardiomyocyte contraction is initiated from the cell centre [Fig. 6(C)].

F7 For two observed typical contractile behaviors of isolated cardiomyocytes, we reported in Figure 7 the components of the 2D strain tensor, namely (i) horizontal strain $E_{xx,t}$ along the cell length, i.e. in the sarcomere direction and (ii) transverse strain $E_{yy,t}$ along the cell width. Local cell stretching is characterized by a positive strain, while a negative strain indicates a cell twitch.

When contraction propagated from left to right (seq1), the wave front was preceded by negative values of strains $E_{xx,t}$ $E_{yy,t}$ [Figs. 7(1A)–7(1C)] and followed by positive strain values. Absolute strains values were in the range $E_{xx,t} = 12$ –15%, with $E_{yy,t} = 8\%$.

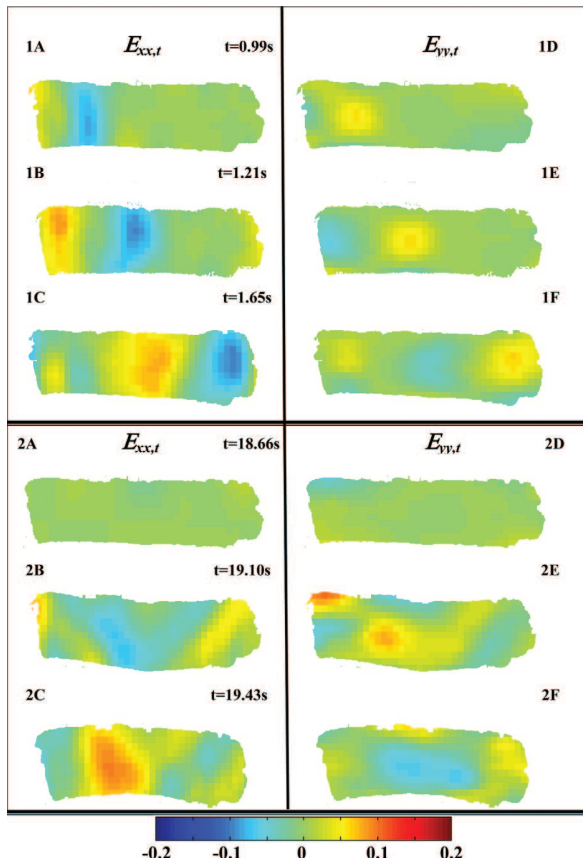
In the second videomicroscopy sequence seq2, the contraction wave, which emerges in the middle of the cardiomyocyte, was associated with negative strains along both propagating directions. This contraction traveled along the cell horizontally and vertically [Figs. 7(2A)–7(2C)]. Immediately after this contraction wave, a dilation wave front started from the cell center and was characterized by positive strains. Corresponding strains values were $E_{xx,t} = 15$ –20% and $E_{yy,t} = 7$ –10% for both contraction waves.

Let us notice that the shear strain value $E_{xy,t}$ was not negligible, with $E_{xy,t} \sim 10\%$ for both sequences. In seq1, the wave propagation occurred mainly along the sarcomere direction and a significant shear strain developed in the cell corner during cell contraction. In seq2, shear strains were more homogeneously distributed and appeared all along the cell (data not shown).

Evaluation of the Algorithm Performances When Analyzing Time-Lapse Sequences Including Less Textured Images of the Cardiac Cell Contraction

Neonatal cardiomyocytes present a less organized intracellular architecture than adult cardiac myocytes, and thus provide an interesting application field to evaluate our approach in the case of less textured images. Thus, we analyzed time-lapse sequences of contracting rat neonatal cardiomyocytes, isolated from the ventricles by enzymatic dissociation (27), and computed the strain fields generated during cell contraction. The cell contraction occurred with higher frequency, the contraction motion being then mainly centripetal (Fig. 8). The strains values have been still computed accurately

F8



COLOR

Figure 7. Amplitude of the strain field components computed by ICM for the two contraction sequences seq1 [Figs. 7(1A)–7(1F)] and seq2 [Figs. 7(2A)–7(2F)]. With seq1, the strain field $E_{xx,t}$ computed along the x -direction [Figs. 7(1A)–7(1C)] highlights the uniaxial feature of the wave propagation, characterized by negative strains followed by positive strains. Variations of the normal strain component $E_{yy,t}$ in the y -direction [Figs. 7(1D)–7(1F)] reflect the cardiomyocyte incompressibility. The spatio-temporal strain distribution in seq2 appears more complicated both along x direction [Figs. 7(2A)–7(2C)] and y -direction [Figs. 7(2D)–7(2F)], the contraction wave propagating from the cell centre in an oblique manner. Parameters for the ICM computations are: $Wind19 \times 9$ pixels, $ka = 2$, ROI size of 27×27 pixels and $\delta = 0.85$.

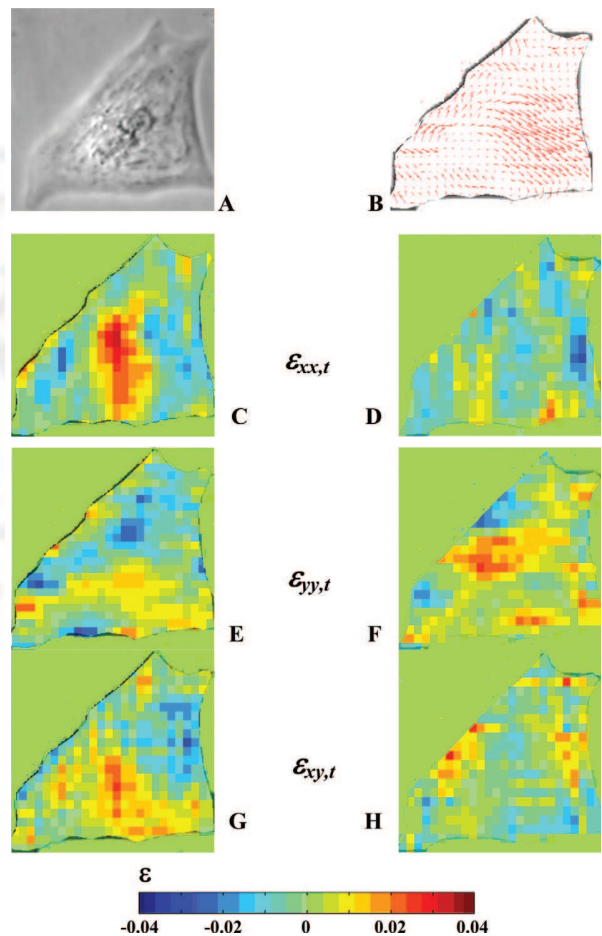
by the optical flow method, with absolute values in the range of 1–3% for $\epsilon_{xx,t}$ and $\epsilon_{yy,t}$ with shear strains $\epsilon_{xy,t}$ in the order of $\sim 2\%$. This indicates that adult rat cardiomyocytes generate intracellular strains two to three times larger than neonatal cells. These results compares quite well with the 3-fold increase in force normalized to the cross-sectional area (F_{CSA}) reported for murine skinned cardiomyocytes (28) and skinned trabeculae from rat ventricles (29).

DISCUSSION

In this study, a correlation-based optical flow method has been developed to analyze time-lapse sequences of contracting cardiomyocytes and to quantify originally spatio-temporal variations of intracellular strains generated at a sarcomere scale. The proposed image processing method allowed a precise tracking of the strain wave traveling along the cardiac cell

by analyzing the correlation of grey level patterns between consecutive pairs of images.

While belonging to a class of image processing methods rather widely used for analyzing objects motions from image sequences (16), few applications have been reported in the context of cell dynamics to date (12–14). Indeed, the association of the usually limited contrast of videomicroscopy images with large cell deformations defines a challenging framework for implementation of optical flow methods. Thus, in order to obtain a 2D vector representation of image pixels displacements, regularization conditions are usually added to constrain the search for the optimum displacement field solution. The method developed here presents substantial improve-



COLOR

Figure 8. Quantification by ICM of the linearized strain components developed by contracting rat neonatal cardiomyocytes imaged by phase contrast videomicroscopy. At this stage of development, the cardiac cells lack the well-organized band-like arrangement observable in adult cells (Fig. 1), leading to less textured 2D images [Fig. 8(A)]. However, our ICM approach still successfully quantifies the rather complicated cell contraction/relaxation kinematics [Fig. 8(B)]. Cell contraction appears rather centripetal [Fig. 8(E)], with significant normal strains $\epsilon_{xx,t}$ [Figs. 8(C) and 8(D)] and $\epsilon_{yy,t}$ [Figs. 8(E) and 8(F)], but also with zones of shear strains $\epsilon_{xy,t}$ [Figs. 8(G) and 8(H)] that indicates localized cell cytoskeleton torsion. Parameters for the ICM computations are: $Wind19 \times 9$ pixels, $ka = 1$, ROI size of 18×18 pixels and $\delta = 0.75$.

ORIGINAL ARTICLE

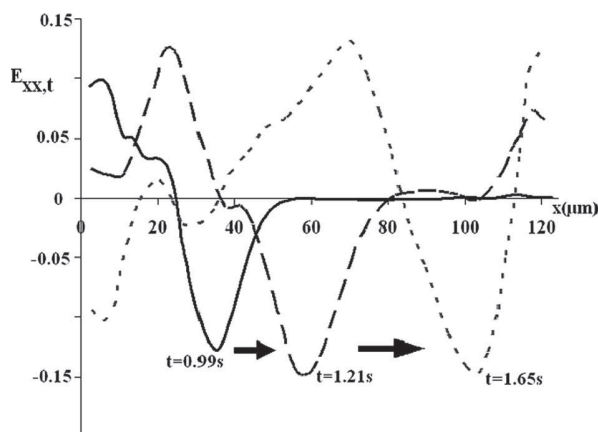


Figure 9. Scan-line of the propagation pattern in seq1 of the axial large strain component $E_{xx,t}$ of the intracellular strain field computed by ICM along a cardiomyocyte section crossing the middle of the cell from one extremity to the other. The successive profiles shown at time $t = 0.99$ s $t = 1.21$ s and $t = 1.65$ s can be viewed as a mirror images of the underlying profile of intracellular concentrations which would have been obtained if tracking calcium wave propagation with the aid of fluorescent probes. Parameters for the ICM computations are as in Figure 7.

ments compared with the method used in other studies (13,30), since it avoids the need for choosing regularization constraints. In fact, our method takes benefit of the landmarks provided by the sarcomeres structural organization, and thus provides a precise characterization of cardiomyocyte contraction and deformation without requiring the coupling of phase contrast observation with intracellular calcium imaging by fluorescent probes. There is also no need for linking specific markers, such as microbeads, on the cell surface to track complex cell distortions (31–33).

Our approach also differs from other optical flow approaches developed for analyzing oscillatory dynamics of cell protrusions (12) or tissue contractions (34), which model the flow by a linear transformation. As a result, one gets a compact and global measurement of the biological object deformation from the time evolution of motion descriptors associated with the different types of singular points, characterizing the velocity field computed between two consecutive images (19).

In the present study, we were looking for a simple and efficient way to link observations made at the whole-cell level to dynamical features exhibited at the sarcomere level. The proposed approach appears rather powerful and satisfactory since the integration of the displacement fields computed at this sub-cellular scale are in excellent agreement with the global measurements of cardiomyocyte shortening obtained by tracking the motion of both cell extremities. As a consequence, we were able to accurately identify the amplitude and spatio-temporal variations of the strains wave that characterize successive sarcomere contraction/relaxation.

The accuracy of the method already insures that displacements of a few microns can be reliably detected. However, our algorithm can still be extended to allow sub-pixel accuracy.

The temporal resolution of the method obviously depends on the sampling rate of image acquisition, and can take benefit of the ultra-fast cameras already used to image intracellular calcium dynamics.

Finally, we would like to discuss possible implications of our image analysis approach. First, we can notice that the propagation of the negative longitudinal strains $E_{xx,t}$ (Fig. 9), corresponding to a localized intracellular compression, can be viewed as a mirror image of the underlying propagating peak of cytosolic calcium that drives the cell-contracting twitch (35).

Second, we might wonder if such similarity-based optical flow approach still remains reliable when analyzing mechanical deformation of cells, which do not exhibit regular and organized grey-level intensity patterns when observed by phase contrast or DIC microscopy. As a reply, we considered the contraction of cardiomyocytes taken at an earlier developmental stage. Although rat neonatal cardiomyocytes lack the well-organized band-like arrangement observable in adult cells, our ICM approach still successfully quantified the rather complicated cell dynamics, including phases of centripetal contraction and generation of localized intracellular shear strain.

In conclusion, the proposed approach offers significant improvements to the classical ways of quantifying single cardiomyocyte deformations dynamics and using either force transducers, lasers diffraction techniques or fluorescent probes. By providing a direct and noninvasive access to intracellular strain at the sarcomere scale, this image processing method provides information on both active and passive mechanical properties of cardiac cell in a noninvasive way, i.e. without requiring the use of external probes, as it is the case in micro-manipulation experiments like MTC experiments (36). More fundamentally, this optical flow method might also help to investigate the influence of mechanosensitive biochemical processes, depending on sarcomere stretching or interfilament spacing (37), which control the contractility and efficiency of cardiomyocyte contraction (38).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. R.S. Chadwick (NINDS-National Institutes of Health) and Dr. C. Hongxue (Northwestern University) for their useful comments, as well as Drs. N. Béreaud, J. Olivares (LBFA, Univ. J. Fourier), and M. Trifa (CNRS, TIMC) for their technical support.

LITERATURE CITED

1. Belevych A, Kubalova Z, Terentyev D, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorko S. Enhanced ryanodine receptor-mediated calcium leak determines reduced sarcoplasmic reticulum calcium content in chronic canine heart failure. *Biophys J* 2007;93:4083–4092.
2. Cagalinec M, Chorvat D Jr, Mateasik A, Bacharova L. Sustained spiral calcium wave patterns in rat ventricular myocytes. *J Cell Mol Med* 2007;11:598–599.
3. Dupont G, Combettes L, Leybaert L. Calcium dynamics: Spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int Rev Cytol* 2007;261:193–245.
4. Miura M, Ishide N, Oda H, Sakurai M, Shinozaki T, Takishima T. Spatial features of calcium transients during early and delayed afterdepolarizations. *Am J Physiol* 1993;265(2 Part 2):H439–H444.
5. Priebe L, Beuckelmann DJ. Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 1998;82:1206–1223.

6. Wakayama Y, Miura M, Stuyvers BD, Boyden PA, ter Keurs HE. Spatial nonuniformity of excitation-contraction coupling causes arrhythmogenic Ca^{2+} waves in rat cardiac muscle. *Circ Res* 2005;96:1266–1273.
7. Loughrey CM, MacEachern KE, Cooper J, Smith GL. Measurement of the dissociation constant of Fluo-3 for Ca^{2+} in isolated rabbit cardiomyocytes using Ca^{2+} wave characteristics. *Cell Calcium* 2003;34:1–9.
8. Rockwell PL, Storey BT. Determination of the intracellular dissociation constant, $K(D)$, of the fluo-3. $Ca(2+)$ complex in mouse sperm for use in estimating intracellular $Ca(2+)$ concentrations. *Mol Reprod Dev* 1999;54:418–428.
9. Zhao Y, Lim CC, Sawyer DB, Liao R, Zhang X. Simultaneous orientation and cellular force measurements in adult cardiac myocytes using three-dimensional polymeric microstructures. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007;64:718–725.
10. Yin S, Zhang X, Zhan C, Wu J, Xu J, Cheung J. Measuring single cardiac myocyte contractile force via moving a magnetic bead. *Biophys J* 2005;88:1489–1495.
11. Slawnych MP, Morishita L, Bressler BH. Image-analysis-based assessment of the effects of the “ Ca^{2+} -jump” technique on sarcomere uniformity. *J Appl Physiol* 1998;85:955–961.
12. Germain F, Doisy A, Ronot X, Tracqui P. Characterization of cell deformation and migration using a parametric estimation of image motion. *IEEE Trans Biomed Eng* 1999;46:584–600.
13. Cai H, Richter CP, Chadwick RS. Motion analysis in the hemicochlea. *Biophys J* 2003;85:1929–1937.
14. Collin O, Tracqui P, Stephanou A, Usson Y, Clement-Lacroix J, Planus E. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: Influence of substrate flexibility. *J Cell Sci* 2006;119 (Part 9):1914–1925.
15. Martel AL, Froh MS, Brock KK, Plewes DB, Barber DC. Evaluating an optical-flow-based registration algorithm for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the breast. *Phys Med Biol* 2007;52:3803–3816.
16. Barron JL, Fleet D, Beauchemin S. Performance of optical flow techniques. *Int J Comput Vis* 1994;12:43–77.
17. Bergonnier S, Hild F, Rieunier J, Roux S. Strain heterogeneities and local anisotropy in crimped glass wool. *J Mater Sci* 2005;40:5949–5954.
18. Besnard G, Hild F, Roux S. “Finite-Element”. Displacement fields analysis from digital images: Application to Portevin-Le Châtelier Bands. *Exp Mech* 2006;46:789–803.
19. Boerboom RA, Rubbens MP, Driessen NJ, Bouten CV, Baaijens FP. Effect of strain magnitude on the tissue properties of engineered cardiovascular constructs. *Ann Biomed Eng* 2008;36:244–253.
20. Olivares J, Dubus I, Barrioux A, Samuel JL, Rappaport L, Rossi A. Pyrimidine nucleotide synthesis is preferentially supplied by exogenous cytidine in adult rat cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:1349–1359.
21. McKenna S, McGillis W. Performance of digital image velocimetry processing techniques. *Exp Fluids* 2002;32:106–115.
22. Ma S, Jin G. New correlation coefficients designed for digital speckle correlation method (DSCM). *SPIE* 2003;5058:25–33.
23. Holzapfel GA. *Nonlinear Solid Mechanics*. NY: Wiley; 2001.
24. Stuyvers BD, Dun W, Matkovich S, Sorrentino V, Boyden PA, ter Keurs HE. Ca^{2+} sparks and waves in canine purkinje cells: A triple layered system of Ca^{2+} activation. *Circ Res* 2005;97:35–43.
25. Nishimura S, Yasuda S, Katoh M, Yamada KP, Yamashita H, Saeki Y, Sunagawa K, Nagai R, Hisada T, Sugiura S. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H196–H202.
26. Sugiura S, Nishimura S, Yasuda S, Hosoya Y, Katoh K. Carbon fiber technique for the investigation of single-cell mechanics in intact cardiac myocytes. *Nat Protocol* 2006;1:1453–1457.
27. Riou L, Ghezzi C, Mouton O, Mathieu JP, Pasqualini R, Comet M, Fagret D. Cellular uptake mechanisms of ^{99m}TcN -NOET in cardiomyocytes from newborn rats: Calcium channel interaction. *Circulation* 1998;98:2591–2597.
28. Siedner S, Kruger M, Schroeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, Hescheler J, Pfister G, Stehle R. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 2003;548 (Part 2):493–505.
29. Niederer SA, Hunter PJ, Smith NP. A quantitative analysis of cardiac myocyte relaxation: a simulation study. *Biophys J* 2006;90:1697–1722.
30. Hu X, Evans BN, Dallos P. Direct visualization of organ of corti kinematics in a hemicochlea. *J Neurophysiol* 1999;82:2798–2807.
31. Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 1999;76:2307–2316.
32. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 2001;153:1175–1186.
33. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, et al. Force and focal adhesion assembly: A close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 2001;3:466–472.
34. Zoccolan D, Giachetti A, Torre V. The use of optical flow to characterize muscle contraction. *J Neurosci Methods* 2001;110:65–80.
35. Pustoc'h A, Ohayon J, Usson Y, Kamgoue A, Tracqui P. An integrative model of the self-sustained oscillating contractions of cardiac myocytes. *Acta Biotheor* 2005;53:277–293.
36. Lammerding J, Kazarov AR, Huang H, Lee RT, Hemler ME. Tetraspanin CD151 regulates $\alpha\beta1$ integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7616–7621.
37. Hoshijima M, Knoll R, Pashmforoush M, Chien KR. Reversal of calcium cycling defects in advanced heart failure toward molecular therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(9Suppl 1):A15–A23.
38. Tracqui P, Ohayon J, Boudou T. Theoretical analysis of the adaptive contractile behaviour of a single cardiomyocyte cultured on elastic substrates with varying stiffness. *J Theor Biol* 2008;255:92–105.

AQ1

Author Proof

AQ1: Journal style is to generally list out all authors. Kindly replace “et al.” in reference 33 with the missing author names.

AQ2: If you want Figures 2, 4, 5, 6, 7, 8 printed in color, please inform the editor when you return materials.



Author Proof