



HAL
open science

Etude des propriétés mécaniques de sphéroïdes multicellulaires tumoraux à l'aide d'ondes acoustiques

Antony Bazir

► **To cite this version:**

Antony Bazir. Etude des propriétés mécaniques de sphéroïdes multicellulaires tumoraux à l'aide d'ondes acoustiques. Acoustique [physics.class-ph]. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1212 . tel-03279282

HAL Id: tel-03279282

<https://theses.hal.science/tel-03279282>

Submitted on 6 Jul 2021

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

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

N°d'ordre NNT :
2020LYSE1212



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 52
Ecole doctorale de physique et d'astrophysique

Spécialité de doctorat : Physique

Soutenue publiquement le 03/11/2020, par :
Anthony BAZIR

**Études des propriétés mécaniques de
sphéroïdes multicellulaires
tumoraux à l'aide d'ondes acoustiques**

Devant le jury composé de :

Mme.Émilie FRANCESCHINI, chargée de recherche - CNRS
M. Frédéric JENOT, professeur - Université Polytechnique Hauts de France
Mme.Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU, chargée de recherche - CNRS
M. Jean-Christophe BÉRA, professeur - Université de Lyon
M. Laurent BELLIARD, professeur - Sorbonne Université
M. Thomas DEHOUX, chargé de recherche - CNRS

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Directeur de
thèse



PHAST
PHYSIQUE
ET ASTROPHYSIQUE
UNIVERSITÉ DE LYON



thèse présentée à

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

par **Antony BAZIR**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET D'ASTROPHYSIQUE

SPÉCIALITÉ : **Physique**

Soutenue publiquement le 3 Novembre 2020

**Études des propriétés mécaniques de sphéroïdes multicellulaires
tumoraux à l'aide d'ondes acoustiques**

sous la direction de : M. Thomas DEHOUX

Membres du jury

Mme. Émilie FRANCESCHINI, chargée de recherche - CNRS	Rapporteure
M. Frédéric JENOT, professeur - Université Polytechnique Hauts de France	Rapporteur
Mme. Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU, chargée de recherche - CNRS	Examinatrice
M. Jean-Christophe BÉRA, professeur - Université de Lyon	Examineur
M. Laurent BELLIARD, professeur - Sorbonne Université	Examineur
M. Thomas DEHOUX, chargé de recherche - CNRS	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie Thomas DEHOUX, chargé de recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli et encadré tout au long de ce travail de thèse. Je le remercie pour sa patience et ses encouragements. Ce travail qui se termine est autant le sien que le mien.

Merci à Émilie FRANCESCHINI et à Frédéric JENOT d'avoir accepté de lire et d'examiner mon manuscrit de thèse et merci à Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU, Jean-Christophe Béra et Laurent BELLIARD d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs.

Un grand merci à l'équipe Biophysique et aussi à l'équipe Liquides et Interfaces pour une ambiance de travail agréable tout au long de ces 3 années parsemées de déménagements divers et d'autres moments conviviaux comme les pots de thèses, les anniversaires, le beaujolais nouveau et les restos et barbecues d'équipes. Encore merci à l'équipe Biophysique pour des conseils et des retours toujours utiles sur mon travail et des encouragements toujours appréciés. Mention spéciale pour Jérémie et Guqi avec qui j'ai beaucoup aimé discuter et travailler.

Merci à tous les thésards, post-docs et stagiaires que j'ai pu cotoyer au cours de ces 3 années. Merci notamment à TeamDoc d'avoir assuré un peu de cohésion sociale dans ce grand labo. Merci à Ronan, Manu, Quentin, Marie-Émeline, Laurent, Audrey et Florine pour leur accueil et les nombreux déjeuners et bières partagées. Merci aussi à la génération suivante d'avoir repris le flambeau, notamment Malèke et Grégoire sans qui les pauses déjeuner seront forcément un peu moins drôles. Un mot également pour Dolachai et Leonel puisqu'on a un peu traversé tout ça ensemble.

Je voudrais aussi remercier Olivier et toute la team Camomille de m'avoir fait découvrir et aimer Lyon (sa pêcherie et son abreuvoir) et de m'amuser comme rarement. La finale de la coupe du monde restera une des soirées les plus mémorables de cette période. Merci à Romain pour tout. Tout ce qu'on a pu faire et se raconter, et tout ce qu'on a encore à faire et qu'on se racontera. Et pour finir merci à Charlotte qui m'a accompagné chaque fois qu'elle a pu et dont le soutien m'a été inestimable.

Je remercie également mes amis. Ceux qui m'ont suivi et me suivent depuis plus ou moins longtemps. Florian, Laurent, et Thomas mais aussi Alexia, Aurélien, Oriane, Gaël, Guilherme, Ljubica, Tijana et Chloé. Chaque moment passé avec vous a été un plaisir ! Merci aussi à la

petite équipe du mercredi soir, Paul, Dylan, Clément, Fabrice et Rémy qui ont toujours su me changer les idées et à Elen qui a rendu tout ça possible chaque semaine.

Pour finir, un énorme merci à mes parents, Gilles et Laurette. Ce succès est aussi le leur et je mesure bien toute la chance que j'ai de pouvoir le partager avec eux aujourd'hui. Merci au reste de ma famille pour leurs encouragements et leur soutien. Un mot particulier pour Raphaël. Merci pour ton accueil pendant le confinement et pour tous les bons moments qu'on a passé. On en avait vraiment besoin et ces souvenirs sont chers à mon cœur.

Ce manuscrit vous est tous un peu dédié. Mais je le dédie aussi à Anita et Gabou que j'aurais vraiment aimé revoir en tant que docteur.

Merci à tous et pour tout en attendant de vous revoir.

Table des matières

1	Introduction générale	1
1.1	Mesures propriétés mécaniques échantillons biologiques	3
1.1.1	Importance des propriétés mécaniques dans les pathologies et le développement	4
1.1.2	Sphéroïdes tumoraux pour l'étude de la biophysique du cancer	6
1.1.3	Mesures mécaniques à l'échelle de la cellule et du tissu : défis et solutions techniques	8
1.2	Utilisation ondes acoustiques sur échantillons biologiques	14
1.2.1	Application aux cellules	15
1.2.2	Application aux sphéroïdes tumoraux	18
2	Montage expérimental et test sur l'eau	21
2.1	Génération d'ultrasons par méthode optoacoustique	23
2.1.1	Génération en régime thermoélastique	24
2.1.2	Génération en régime d'ablation	27
2.1.3	Dispositif expérimental de génération d'impulsions acoustiques	29
2.2	Détection par interférométrie	31
2.2.1	Principes de détection de déplacement par interférométrie	31
2.2.2	Interféromètre de Michelson Stabilisé	34
2.2.3	Mesure de signal sur une plaque d'aluminium et traitement du signal	38
2.3	Calibration et Traitement du signal	41
2.3.1	Lamelle de verre traitée et montage pour les mesures ultrason laser dans l'eau.	41
2.3.2	Signaux dans une couche d'eau	43
2.3.3	Spectres en énergie et décomposition en fréquence	45
2.3.4	Extraction de la vitesse du son	48
2.3.5	Évaluation de l'erreur sur la mesure de vitesse du son	51
2.3.6	Conclusions sur les mesures de vitesse	53
2.4	Étude de l'amplitude des signaux acoustiques	54
2.4.1	Rappels sur l'amplitude et l'atténuation acoustique	54
2.4.2	Extraction des amplitudes	55

2.4.3	Gamme fréquentielle de l'étude en amplitude	57
2.4.4	Résultats d'atténuation acoustique sur des couches d'eau	58
2.5	Conclusions générales	60
3	Analyse de Sphéroïdes Multicellulaires	61
3.1	Sphéroïdes Multicellulaires Tumoraux	62
3.1.1	Structure des sphéroïdes et des lignées cellulaires étudiées	62
3.1.2	Structure des sphéroïdes	63
3.1.3	Différences entre les lignées HCT116 et HT29	64
3.1.4	Protocole de préparation et de mise en place sur le montage expérimental	65
3.2	Estimation de la vitesse du son dans les sphéroïdes	67
3.2.1	Analyse des signaux acoustiques	67
3.2.2	Traitement du signal acoustique enregistré dans un sphéroïde multicel- lulaire tumoral	71
3.2.3	Mesure de vitesse du son sur les sphéroïdes multicellulaires tumoraux . .	74
3.2.4	Vitesse du son dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux lors de cycles compression/décompression	76
3.2.5	Effet du diamètre sur la vitesse du son mesurée dans les sphéroïdes . . .	77
3.2.6	Conclusions sur les mesures de vitesse du son dans les sphéroïdes	78
3.3	Mesures diamètres et volume pendant compression	78
3.3.1	Évolution du diamètre en fonction de la compression	79
3.3.2	Conclusions sur les mesures de diamètre	82
3.4	Résultats amplitude obtenus sur sphéroïdes tumoraux	83
3.4.1	Résultats d'atténuation sur les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 . . .	86
3.4.2	Résultats d'atténuation sur les sphéroïdes issus de la lignée HT29	87
3.4.3	Comparaison des deux lignées et bilan	88
3.5	Conclusions générales	90
4	Discussion et perspectives	93
4.1	Rappel résultats	94
4.1.1	Rappel des résultats à l'aides des ultrasons lasers	95

4.1.2	Mesures de diffusion Brillouin sur les sphéroïdes tumoraux	96
4.2	Modèles théoriques et conclusions	102
4.2.1	Modèles Viscoélastiques	102
4.2.2	Modèles Poroélastiques	104
4.2.3	Modèles en loi de puissance	110
4.2.4	Conclusions des discussions sur les modèles théoriques	112
4.2.5	Conclusions générales de l'étude	113
4.3	Perspectives et Expériences futures	115
4.3.1	Atténuation acoustique dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux . .	115
4.3.2	Mesure optoacoustique par le biais d'un étalon Fabry-Pérot	117
4.3.3	Expériences de mesure Brillouin en compression	124
4.3.4	Résumé des perspectives	126

CHAPITRE 1

Introduction générale

Les cellules et les tissus biologiques ont des formes et des fonctions très diverses. En effet, lors du développement, les cellules d'un organisme vont se différencier et voir leurs caractéristiques et leur organisation évoluer selon leur fonction dans l'organisme. Ces caractéristiques peuvent être la durée du cycle cellulaire, la forme de la cellule, le fait qu'elle soit dans une configuration épithéliale ou mésenchymale (c'est-à-dire fixe dans un tissu dense ou mobile dans un échafaudage de biopolymères) ou bien ses propriétés mécaniques et/ou rhéologiques. L'ensemble de ces caractéristiques va donc permettre de décrire les différents types cellulaires. Mais toutes ces propriétés qui caractérisent les cellules et les tissus ne sont pas figées au cours de la vie d'un organisme. Elles peuvent évoluer, notamment en fonction de l'environnement mais également si des cellules de l'organisme mutent et que les mécanismes de régulation changent, notamment lors du développement de pathologies.

Un exemple de pathologie provoquant une évolution des propriétés des cellules et des tissus est celui du cancer. Lorsque les cellules évoluent en cellules cancéreuses, elles vont se diviser plus que les cellules normales et consommer plus d'énergie.[1] Selon les types cellulaires, les propriétés mécaniques des cellules vont également évoluer au fur et à mesure que les cellules deviennent des cellules cancéreuses.[2][3] Un exemple qui permet de comprendre ce phénomène est la méthode de dépistage du cancer du sein. On dépiste souvent les tumeurs en recherchant une masse dure dans les glandes mammaires, ce qui témoigne bien de l'évolution des propriétés mécaniques des tissus lorsqu'ils deviennent cancéreux. Cette évolution des propriétés se retrouve aussi à l'échelle de la cellule. Dans le cas du cancer du sein, les cellules du tissu deviennent plus contractiles, c'est-à-dire qu'elles exercent des forces plus importantes sur leur environnement que les cellules saines.[4] C'est en se basant sur ce type d'observations que s'est développé un champ de recherche dédié aux mesures physiques des cellules et des tissus biologiques. Les propriétés incluent par exemple les vitesses de migrations moyennes, les modules mécaniques, l'adhésion ou la tension de surface.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe Biophysique à l'Institut Lumière Matière (ILM). Dans le cadre décrit précédemment, Les travaux de l'équipe s'inscrivent entre autres dans une démarche d'étude des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses à l'aide d'outils physiques. Ces données mécaniques rassemblées, permettant ensuite d'échanger avec des collaborateurs spécialistes de la biologie du cancer. En particulier, un des outils de caracté-

sation développé depuis 2015 est l'utilisation d'ondes ultrasonores pour sonder les propriétés mécaniques. C'est dans cet axe que s'inscrit ce travail de thèse.

Pour introduire ce travail de thèse on propose dans la section suivante un panorama des mesures de propriétés mécaniques sur les échantillons biologiques. On commencera par détailler l'importance des propriétés mécaniques dans certaines pathologies ainsi que l'importance du microenvironnement dans le développement des cellules et la détermination de leur état physiologique. On présentera notamment le phénomène de mécanotransduction, qui est le mécanisme par lequel les cellules et les tissus peuvent sonder les contraintes mécaniques et les convertir en signaux électrochimiques. On présentera ensuite des notions théoriques importantes pour la compréhension des mesures mécaniques dans les échantillons biologiques ainsi qu'un certain nombre de techniques expérimentales disponibles pour réaliser ces mesures. On conclura cette section en présentant brièvement les sphéroïdes cellulaires tumoraux qui ont été choisis comme système modèle pour notre étude.

La seconde section de ce chapitre introductif se concentrera plus spécifiquement sur la mise en œuvre de techniques expérimentales basées sur les ondes acoustiques. On commencera par introduire les ondes acoustiques dans le domaine biomédical en général. Puis on se concentrera plus spécifiquement sur leur utilisation dans le domaine de la biophysique, et notamment afin de caractériser mécaniquement des cellules biologiques. On conclura ensuite le chapitre introductif en présentant l'état de l'art des mesures de propriétés mécaniques par le biais d'ondes acoustiques sur les sphéroïdes tumoraux ce qui nous permettra de situer notre étude dans le contexte du champ de recherche auquel elle appartient.

1.1 Mesures des propriétés mécaniques d'échantillons biologiques

Dans cette section, on présentera d'abord l'importance des propriétés mécaniques, en détaillant comment certaines pathologies peuvent influencer sur les propriétés mécaniques des tissus, mais aussi comment l'application de contraintes sur les tissus peut modifier leur développement. L'objet de cette première sous-section est d'expliquer le rôle des propriétés mécaniques dans la compréhension des tissus biologiques. On verra dans la deuxième sous-section dans

quelle mesure les ondes acoustiques permettent de réaliser ce type d'étude et pourquoi ces dernières constituent une bonne solution technique pour l'étude des propriétés mécaniques des sphéroïdes cellulaires.

1.1.1 Importance des propriétés mécaniques dans les pathologies et le développement

Dans de nombreuses pathologies, on peut relier la perte de fonction des tissus à un changement de propriétés mécaniques. En dehors de l'exemple des tissus cancéreux déjà mentionnés, le kératocône, une pathologie qui cause une perte de sphéricité de la cornée, est relié à une perte de rigidité du réseau de collagène dans la cornée, qui peut être mesurée par diffusion Brillouin.[5][6] Un autre exemple est la dégradation de la structure des dents lorsqu'elles sont cariées, qui est également mesurable par diffusion Brillouin.[7] L'ostéoporose est aussi un exemple de pathologie qui change les propriétés mécaniques et la structure des os.[8]

Dans les exemples précédents, les tissus voient leur propriétés mécaniques modifiées par une pathologie, mais il existe également des exemples où l'application d'efforts mécaniques sur le tissu va affecter le développement du tissu. Un exemple concret est l'observation de la dégénérescence musculaire chez les premiers astronautes à leur retour de mission.[9] L'absence prolongée de gravité et de sollicitation provoque une dégénérescence du tissu musculaire. Une modification des flux sanguins, et donc de la distribution de pressions dans les vaisseaux, peut également provoquer un changement des caractéristiques mécaniques du réseau vasculaire menant à des lésions athérosclérotiques.[10][11]

La mécanotransduction, qui peut jouer un rôle dans le type de phénomènes décrits précédemment, se met en place lorsque des efforts sont appliqués sur le cytosquelette. ce dernier est le réseau de biopolymères à l'origine de la cohésion et la résistance mécanique des cellules, et qui est notamment impliqué dans les processus de migration cellulaire.[12][13] La conversion des contraintes mécaniques en signaux biologiques s'effectue lorsque des protéines impliquées dans les processus biologiques voient leur conformation changer du fait de ces contraintes mécaniques qu'elles subissent.[14] Ce changement de conformation va permettre de nouvelles réactions électrochimiques et donc influencer l'état physiologique de la cellule ou du tissu.[15] La mécanotransduction est donc un phénomène dont les effets se ressentent à toutes les échelles

spatiales présentes dans les systèmes biologiques, allant de la cellule à l'organe entier, et qui illustre lui aussi l'importance des contraintes et des propriétés mécaniques pour la compréhension de certaines pathologies.

Le fait que le microenvironnement d'une cellule joue un rôle déterminant dans son état physiologique et son évolution va avoir une conséquence importante. L'organisation spatiale d'un tissu va avoir une incidence sur ses caractéristiques biologiques. Pour cette raison, les cultures de cellules tridimensionnelles (3D) sont considérées dans certains cas comme plus pertinentes que les cultures bidimensionnelles, notamment pour l'étude de la biophysique du cancer.[16] Une des raisons à cela étant qu'une cellule posée sur une surface plane, sur une plaque de verre ou un autre substrat, et entourée d'autres cellules, ne subit ni les mêmes contraintes mécaniques, ni la même exposition aux nutriments, qu'une cellule entourée de matrice extracellulaire ou dans un tissu.[17] Ainsi, dans un agrégat sphérique de cellules on va pouvoir observer des gradients de concentrations en nutriments, en pH ou en CO₂ qu'on n'observerait pas dans une culture bidimensionnelle (2D).[18][19] De la même manière, lorsqu'un agrégat tridimensionnel de cellules est mis en présence d'une molécule donnée, l'effet de cette molécule sera potentiellement moins important que sur une culture 2D des mêmes cellules car la molécule ne pourra pas atteindre les cellules au centre de l'agrégat.[20] Du fait de la mécanotransduction, ces gradients chimiques peuvent également avoir un effet sur les propriétés mécaniques des cellules dans le tissu 3D.

Dans ce projet on s'intéresse particulièrement à l'évolution de la rigidité des tissus cancéreux. L'exemple du cancer du sein cité plus haut suit en fait une tendance assez générale. Les tissus cancéreux sont généralement plus rigides que les tissus sains pour un type cellulaire donné. [21][22] Cette augmentation de la rigidité du tissu est provoquée par une modification du comportement des fibroblastes pendant l'évolution du tissu en tissu cancéreux qui se mettent à produire plus de matrice extracellulaire.[21][23][24] À l'inverse, les cellules cancéreuses sont plus déformables que les cellules saines car le cytosquelette voit ses propriétés modifiées.[25][26] Il y a donc une certaine corrélation entre les propriétés mécaniques des cellules et des tissus cancéreux et leur évolution biologique.

L'importance des propriétés mécaniques dans la compréhension du comportement des cellules biologiques et notamment dans l'évolution du cancer a mené à de nombreuses mesures de

la rigidité des cellules et des tissus réalisées ces dernières années. Dans la sous-section suivante nous allons présenter les sphéroïdes multicellulaires tumoraux et expliquer en quoi ils sont un système modèle pertinent pour l'étude que nous souhaitons mener.

1.1.2 Sphéroïdes tumoraux pour l'étude de la biophysique du cancer

Maintenant que nous avons expliqué et développé l'importance des propriétés mécaniques des échantillons biologiques, nous allons maintenant présenter le système modèle qui est au centre de notre étude : les sphéroïdes multicellulaires tumoraux.

Les sphéroïdes multicellulaires sont des agrégats tridimensionnels de cellules. Ces derniers se forment à partir de cellules par le biais de mécanismes d'adhésion. Les cellules, si elles sont suffisamment proches les unes des autres, vont former un premier agrégat peu compact par le biais des contacts intégrines-Matrice Extracellulaire. C'est ensuite l'expression des cadhérines et les interactions entre les cadhérines des cellules qui va générer la compaction du sphéroïde au fur et à mesure de sa croissance.[27] Les premiers sphéroïdes multicellulaires ont été fabriqués dans les années 1950 à partir de cellules prélevées sur des organes d'embryons de poulet.[28] Les agrégats formés à partir de ces cellules présentaient des propriétés assez similaires à celles des tissus *in vivo*. Depuis, des sphéroïdes cellulaires ont été fabriqués à partir de nombreux types cellulaires et notamment à partir de cellules cancéreuses dans les années 70.[29] Dans le cas des sphéroïdes tumoraux, la structure tridimensionnelle des agrégats va donner lieu à un développement comportant de nombreuses similitudes avec celle d'une tumeur *in vivo*. On va notamment observer l'établissement de nombreux gradients chimiques au sein de l'agrégat tels que des gradients d'oxygène, et d'Adénosine TriPhosphate (ATP) qui sont des nutriments pour les cellules, et des gradients de lactase et CO₂ qui sont les déchets des cellules.[27][30] Ces gradients donnent aussi lieu à des gradients physiologiques. Pour les sphéroïdes d'un diamètre de 500 µm et plus, les cellules au cœur de l'agrégat forment un cœur nécrotique, c'est à dire qu'elles sont en état de mort cellulaire. Lorsqu'on s'éloigne du centre et que la concentration en oxygène et en nutriments remonte on passe dans une zone intermédiaire où les cellules sont quiescentes. Enfin, en périphérie de l'agrégat, les cellules ont un phénotype prolifératif.[19] S'ils dépassent une certaine taille, les sphéroïdes tumoraux vont devoir développer des vaisseaux sanguins afin de pouvoir continuer leur croissance, un phénomène qui se produit également

dans les tumeurs *in vivo*. [31] Tous les phénomènes cités précédemment font parties des raisons pour lesquelles les sphéroïdes sont source d'intérêt dans l'étude du cancer.

Une autre raison qui permet d'expliquer l'utilisation fréquente des sphéroïdes tumoraux dans l'étude du cancer est la facilité avec laquelle on peut les fabriquer. L'échantillon biologique le plus pertinent pour l'étude de cancer est celui qui a été prélevé sur un patient atteint de la maladie. Pour des raisons éthiques et pratiques il n'est pas toujours possible d'avoir accès à ce type d'échantillon. Mais comme on l'a vu dans le paragraphe précédent, les sphéroïdes multicellulaires reproduisent assez bien certains comportements observés *in vivo*. Il existe plusieurs méthodes de fabrication des sphéroïdes. On peut par exemple déposer les cellules dans un puits à fond rond et dont le fond est traité pour empêcher l'adhésion des cellules. Les cellules vont alors spontanément s'agréger en sphéroïdes. [32] Une telle plaque multipuits peut être remplacée par un microsystème en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) où les cellules vont venir se déposer dans un réseau de micropuits où elles pourront s'agréger en sphéroïdes et croître. [33] Les sphéroïdes peuvent également être formés par le biais d'émulsions dans des canaux microfluidiques, [34] grâce à des ondes acoustiques, [35] ou par des méthodes de gouttes pendantes dans lesquelles le sphéroïde va se former. [36] Toutes ces méthodes peuvent permettre de mieux intégrer les sphéroïdes à des montages de mesures physiques une fois fabriqués. Cependant, si la fabrication des sphéroïdes tumoraux est relativement simple par rapport à l'obtention d'une biopsie, leur caractérisation est plus complexe que celle de cultures 2D.

Une grande partie des défis posés par la caractérisation des sphéroïdes cellulaires est liée à leur taille. Une cellule unique a une taille de l'ordre de 20 μm alors qu'un sphéroïde est au moins 10 fois plus gros. Cela pose par exemple des problèmes lorsque l'on veut enregistrer des signaux de fluorescence en profondeur pour obtenir des informations sur les processus biologiques. Des techniques telles que la transparisation [37] ou l'utilisation de coupes [38] ont été utilisées comme solution à ce problème mais il faut fixer les échantillons dans les deux cas, ce qui veut dire qu'on ne pourra pas obtenir d'informations sur des échantillons vivants. De la même manière, lorsqu'on va réaliser des mesures mécaniques par Microscopie à Force atomique (AFM) sur des sphéroïdes, on ne sondera que la réponse mécanique des cellules proches de la surface (la partie proliférative). [39]

Des expériences visant à obtenir les constantes mécaniques des sphéroïdes ont déjà été

menées. Par exemple des sphéroïdes tumoraux ont été comprimés entre deux plaques parallèles afin d'évaluer leur réponse à une compression uniaxiale.[40] Des sphéroïdes ont également été comprimés par le biais d'un choc osmotique. Le déplacement résultant des cellules, mesuré par exemple par tomographie en cohérence optique, a permis de mettre en évidence une anisotropie dans l'organisation cellulaire et d'extraire un module de compression isostatique. [41] Une étude de la rigidité de sphéroïdes tumoraux a également été menée à l'aide de micropinces et a mis en évidence une rigidité plus élevée chez les sphéroïdes tumoraux que sur ceux fabriqués à partir de cellules saines.[42] Des mesures par microscopie à force atomique ont également été réalisées sur des sphéroïdes.[39]

Afin de bien contextualiser notre étude, notamment par rapport aux résultats cités précédemment, nous allons présenter dans la sous-section l'état de l'art des mesures mécaniques sur les échantillons biologiques. Avant cela on rappellera quelques notions utiles de mécanique des milieux continus, puis on développera les différentes familles de méthodes existantes.

1.1.3 Mesures mécaniques à l'échelle de la cellule et du tissu : défis et solutions techniques

Nous allons commencer cette sous-section par quelques rappels de mécanique des milieux continus. Ces notions sont utiles pour l'interprétation et la comparaison de mesures réalisées avec différents montages expérimentaux. On présentera ensuite les familles de méthodes de mesures des propriétés mécaniques des cellules et des tissus biologiques dans les cas des cultures 2D et des cultures 3D. On abordera la question de la variabilité de ces mesures en fonction du type d'échantillon et du système de mesure.

En mécanique des milieux continus, on appelle module élastique d'un matériau la grandeur définie par le rapport entre la contrainte appliquée au matériau et la déformation résultante. Selon le type d'effort appliqué on peut définir plusieurs modules mécaniques pour un matériau homogène et isotrope :

- **le module d'Young** (E) est défini comme le rapport entre une contrainte uniaxiale et la déformation. Contrairement au module de compression isostatique M , c'est un module macroscopique.
- **le module de cisaillement** (G) donne le rapport entre une contrainte de cisaillement

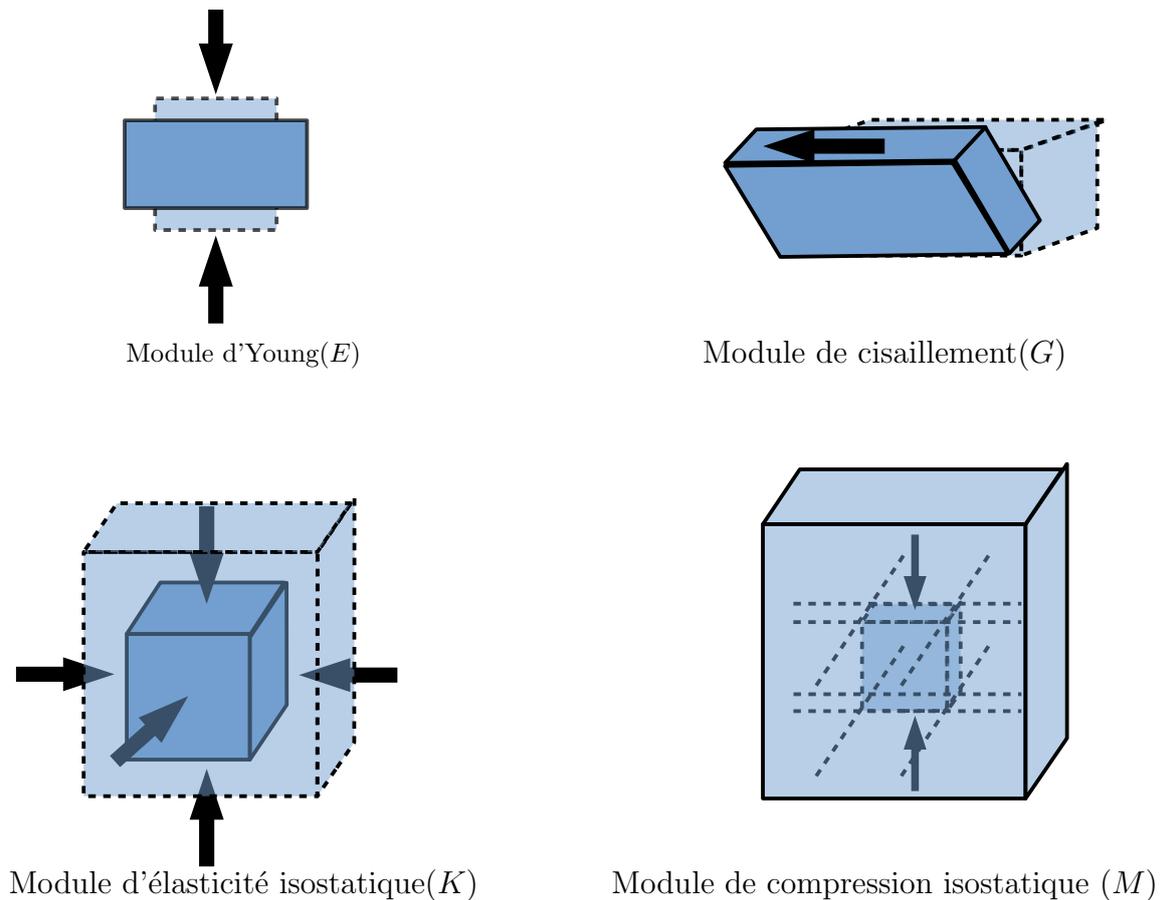


FIGURE 1.1 – Illustration des différents modules mécaniques.

appliquée et la déformation mesurée à volume constant.

- le **module d'élasticité isostatique** (K) définit le rapport de la contrainte appliquée suivant les 3 directions d'espace sur la variation de volume d'un matériau.
- le **module de compression isostatique** (M) traduit le rapport entre la contrainte uniaxiale et la déformation d'un élément de volume du matériau lorsque celui est contraint suivant les autres axes. Ce cas correspond à la propagation des ondes acoustiques.
- le **coefficient de Poisson** (ν) est défini comme le rapport entre la déformation imposée au matériau suivant un axe d'espace et la déformation observée suivant les deux axes orthogonaux.

On représente schématiquement chaque module en figure 1.1. Chacun de ces modules correspond donc à une situation physique bien précise et leurs valeurs peuvent être très différentes pour même matériau. Par exemple, on ne peut pas mesurer un module d'Young pour l'eau. En revanche, on peut définir un module d'élasticité isostatique et un module de compression iso-

statique. Maintenant qu'on a défini un cadre théorique pour ce qu'on avait ici jusqu'ici qualifié de rigidité, on va pouvoir présenter les différentes méthodes expérimentales mises en œuvre pour mesurer ces coefficients.

De nombreuses techniques existent pour sonder les propriétés mécaniques des cellules. Elles sont réparties en deux familles : les techniques par application de force et les techniques par détection de force.[43] Dans les techniques à application de force, on utilise un dispositif qui permet d'imposer une contrainte à la cellule et on mesure la réponse de la cellule. Dans les techniques à détection de force, on utilise le dispositif pour mesurer des forces exercées par la cellule sur son environnement proche. On représente en figures 1.2 et 1.3 les différentes techniques appartenant à chaque famille. Si on souhaite remonter au module mécanique de la cellule, il faut utiliser une technique à application de force.

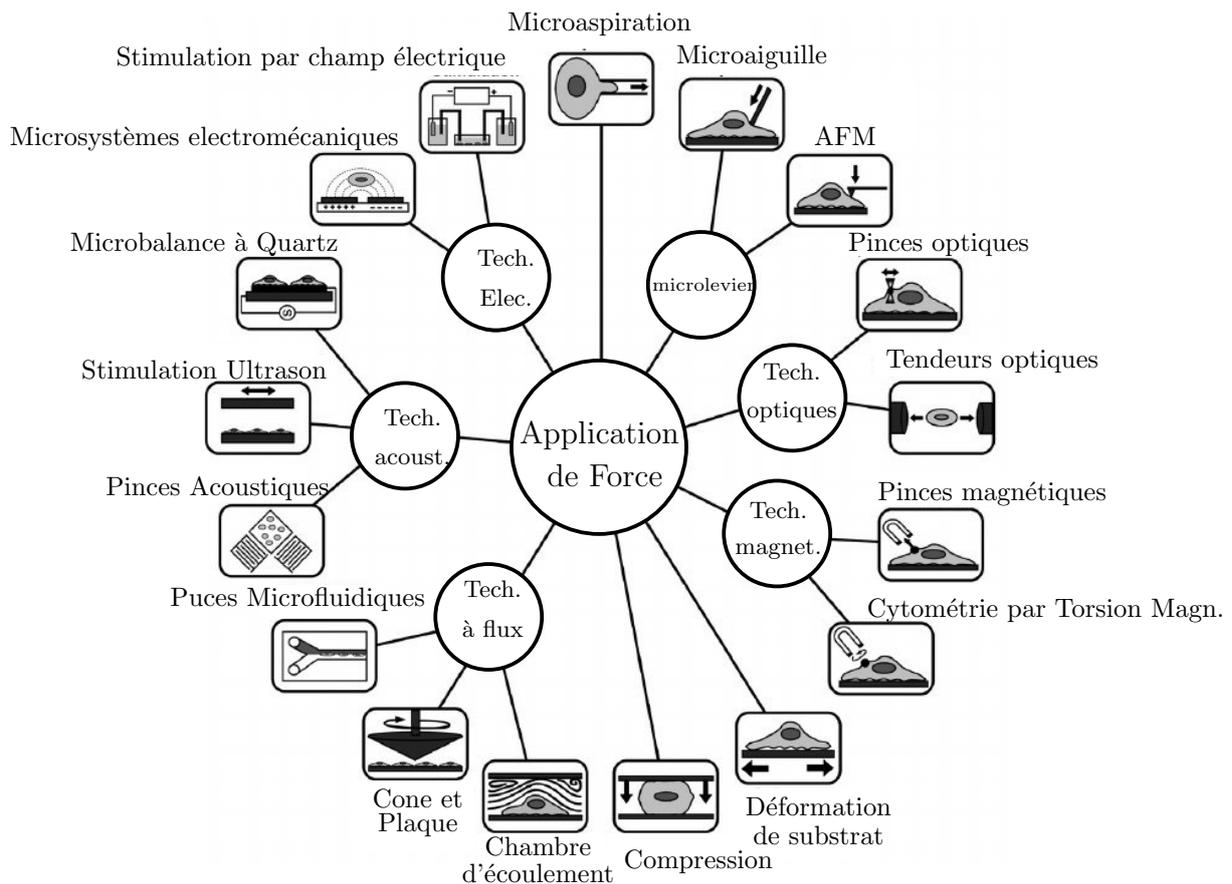


FIGURE 1.2 – Techniques à application de force. (Adapté de Rodriguez *et al.*)

Parmi les méthodes de caractérisation par application de force on trouve notamment les mesures par pincés magnétiques ou par pincés optiques.[44][45] Dans les deux cas, on vient

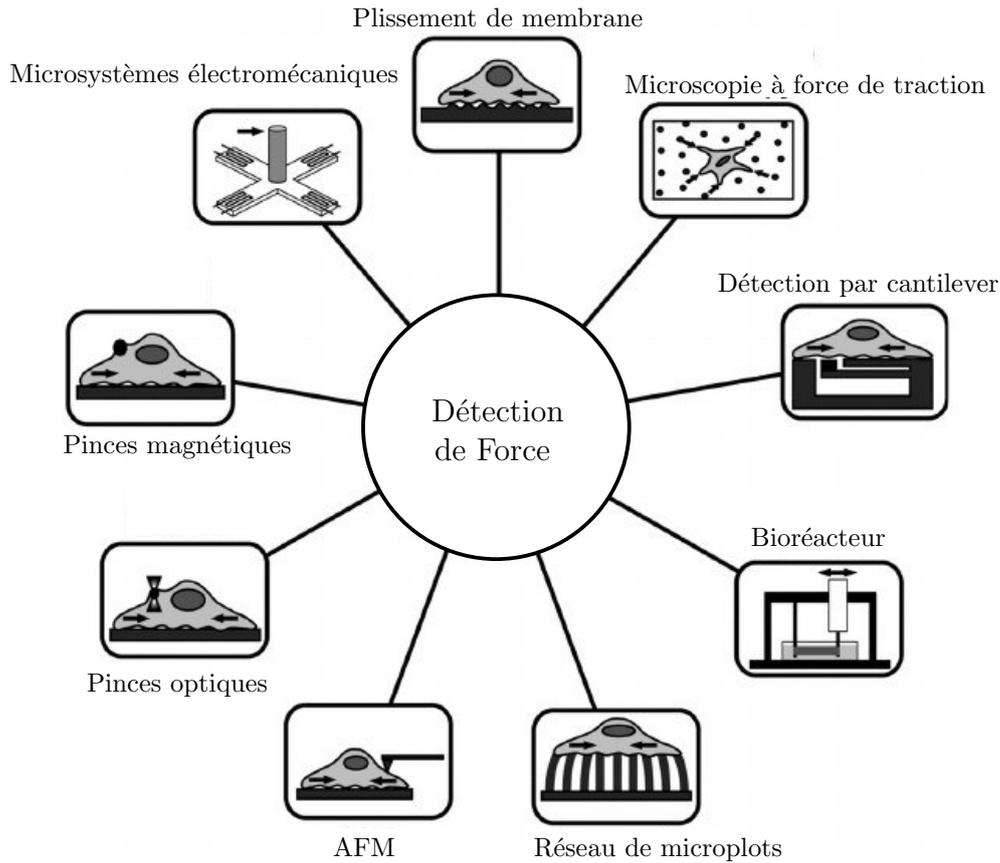


FIGURE 1.3 – Techniques à détection de force. (Adapté de Rodriguez *et al.*)

manipuler avec la pince une bille traitée chimiquement pour adhérer à la surface de la cellule et on mesure le déplacement la bille lorsqu'on impose une force donnée. Un exemple de méthode par pince magnétique est celui utilisé de l'expérience de B. Fabry *et al.* qui utilisait un champ magnétique oscillant pour faire vibrer une bille accrochée sur des cellules dans différentes conditions.[46] Avec ces méthodes, on peut extraire des modules mécaniques proches d'un module d'Young ou d'un module de cisaillement des cellules selon le mouvement imposé à la bille. On peut également utiliser un microscope à force atomique (AFM). Ce type de dispositif se base sur les forces de répulsion atomiques entre la surface à caractériser et le micro-levier de l'AFM. Si on connaît le module de flexion du micro-levier, on peut remonter à une approximation du module d'Young du matériau étudié à partir de la déflexion de micro-levier lorsqu'on l'approche de la surface du matériau.[47] Cette technique a été utilisée pour extraire des modules d'Young sur des cellules biologiques.[48] Une autre type d'expérience permettant d'extraire des constantes mécaniques pour les cellules sont les expériences de microaspiration

par pipette.[2][49] Dans ce type d'expériences, on aspire la cellule partiellement avec une pipette et on applique une pression au niveau de la pipette. Le gradient de pression résultant va déformer la cellule et en mesurant cette déformation on peut remonter à des constantes mécaniques. Il existe également des techniques basées sur des compressions entre des plaques parallèles ou par le biais de gels, et des techniques basées sur des dispositifs microfluidiques.[50] Le choix de la méthode va dépendre de plusieurs paramètres, tels que la résolution spatiale, l'amplitude de la contrainte qu'on souhaite appliquer ou encore le module mécanique que l'on souhaite mesurer.

En ce qui concerne les tissus, pour les cultures 2D beaucoup des méthodes utilisées sur les cellules uniques peuvent également l'être sur des cultures monocouches bidimensionnelles. Le fait que les cellules fassent partie d'un tissu peut changer leur réponse mécanique, mais les configurations de mesure restent globalement identiques. Pour les cultures tridimensionnelles, la forme du tissu considéré ainsi que ses dimensions peuvent rendre certaines techniques plus difficiles à mettre en œuvre, notamment si on cherche à obtenir de l'information au cœur du tissu. Un exemple de méthode développée afin de caractériser des sphéroïdes multicellulaires tumoraux est l'utilisation de chocs osmotiques couplées à des microbilles de polymères intégrées au tissu afin de mesurer la réponse des sphéroïdes à un effort de compression.[51] D'autres techniques par tomographie en cohérence optique (OCT) ont également été développées.[41]

Il existe ainsi une multitude de méthodes expérimentales pour mesurer les propriétés mécaniques d'une cellule ou d'un tissu biologique, mais puisque ces méthodes utilisent différents types de sollicitations mécaniques (Compression, cisaillement, etc.), les modules mécaniques qu'on va en extraire ne seront pas forcément directement comparables. Par exemple le module de compression isostatique mesuré lors d'expériences de compression de sphéroïdes par choc osmotique sera de l'ordre du kPa, alors que des mesures de diffusion Brillouin vont donner des modules élastiques de l'ordre du GPa.[52],[41] La différence entre les deux valeurs provient du fait que dans le cas du choc osmotique l'eau peut s'échapper de l'agrégat alors que dans le cas de la mesure par diffusion Brillouin la compressibilité de l'eau est comprise dans la réponse mécanique mesurée. Cet exemple illustre bien le fait que la mesure et la modélisation des propriétés mécaniques des tissus soulève beaucoup de problèmes techniques. La présence de fluide dans les tissus et son interaction avec le cytosquelette soulève encore de nombreuses questions en terme

de modélisation et d'interprétation des résultats expérimentaux. Des modèles viscoélastiques et poroélastiques ont été mis en œuvre pour tenter d'élucider cette question.[53][54] Mais pour valider ou infirmer ces modèles, il faut disposer d'un maximum de données expérimentales.

Les ondes acoustiques sont présentes dans la famille des méthodes à application de force et nous allons détailler spécifiquement leur utilisation dans la section suivante. Elles ont un rôle à jouer dans cette étude puisqu'elles sont les seules à permettre de mesurer le module élastique M . De plus, la possibilité d'utiliser divers régimes de fréquence d'excitation acoustique va nous permettre d'étudier de potentiels effets de la fréquence sur les propriétés mécaniques du tissu.

1.2 Utilisation des ondes acoustiques sur des échantillons biologiques

Depuis les études de Paul Langevin et les travaux de Lord Rayleigh dans *The theory of Sound*, les ultrasons ont trouvé un grand nombre d'applications. Ces applications vont des premiers sonars à l'étude des ondes sismiques en passant par l'acoustique structurelle et la caractérisation des matériaux. Dans cette sous-section, on va principalement aborder l'utilisation des ondes acoustiques dans le cadre de la caractérisation des matériaux. On commencera par rappeler quelques notions fondamentales sur la propagation des ondes ainsi que des bases théoriques pour comprendre comment les ondes acoustiques permettent de caractériser les matériaux. On présentera ensuite quelques exemples d'utilisation des ondes acoustiques dans le contexte de l'étude des tissus biologiques. On se concentrera ensuite plus spécifiquement sur leur utilisation pour la caractérisation des cellules et ensuite dans les sphéroïdes tumoraux.

Pour commencer cette partie, on rappelle l'expression d'une onde plane progressive dans un milieu à une dimension :

$$s(t) = Ae^{j(\omega t - kx)} \quad (1.1)$$

Dans cette expression, A est l'amplitude, ω est la pulsation de l'onde, et k est son nombre d'onde. ω décrit la périodicité temporelle et k décrit sa périodicité spatiale. On peut alors définir la vitesse de phase de l'onde comme :

$$v_p = \frac{\omega}{k} \quad (1.2)$$

Dans le cas d'une onde acoustique c'est cette vitesse de phase qui va être définie comme la vitesse du son du matériau pour une onde de pulsation ω . Dans le cadre de la théorie de l'élasticité linéaire, cette vitesse de phase va dépendre de s constantes mécaniques du matériau étudié ainsi que de la polarisation de l'onde considérée. Par exemple, pour une onde de compression

longitudinale, la vitesse du son va s'écrire :

$$v_L = \frac{\omega}{k} = \sqrt{\frac{M}{\rho}} \quad (1.3)$$

où M est le module d'onde longitudinale défini précédemment et où ρ est la densité du matériau.

Pour une onde de cisaillement la vitesse du son va s'écrire :

$$v_T = \frac{\omega}{k} = \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (1.4)$$

où G est le module de cisaillement. Donc en mesurant la vitesse du son dans un matériau on peut remonter à son module d'élasticité. Il est possible que le module élastique dépende de la fréquence, ce qui est décrit par différents modèles tels que les modèles viscoélastiques ou poroélastiques qui seront abordés plus tard dans cette étude. En propageant des ondes à différentes fréquences dans un matériau on peut remonter à ces modules mécaniques.

Les ondes ultrasonores, sont utilisées depuis les années 1950 dans diverses applications. On peut par exemple utiliser les ultrasons pour la détection de défauts dans les coques de bateau, les fuselages d'avion, ou les échographies.[55] On peut également mesurer la vitesse du son grâce à une étude en temps de vol,[56] ou l'atténuation acoustique si on enregistre l'amplitude des signaux.[57] Les propriétés de diffusion des ondes ultrasonores ont également été utilisées afin de caractériser les matériaux tels que des ciments.[58] Beaucoup de ces méthodes initialement développées pour des métaux, des céramiques des minéraux ont depuis été transposées aux matériaux biologiques. Dans la sous-section suivante nous allons détailler les résultats trouvés dans la littérature sur des caractérisations de cellules biologiques par le biais d'ondes acoustiques.

1.2.1 Application aux cellules

La sous-famille des techniques acoustiques dans la famille des techniques à applications de force présentées par M. L. Rodriguez (voir figure 1.2), n'est pas utilisée afin d'obtenir directement des propriétés mécaniques, mais plutôt afin d'étudier l'effet d'une stimulation acoustique sur des processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'activité génétique, ou encore l'organisation de la matrice extracellulaire.[43] Dans cette sous-section on va présenter des techniques de mesures acoustiques permettant de remonter aux modules mécaniques de

cellules biologiques.

Les ondes acoustiques ont déjà été utilisées pour étudier les propriétés mécaniques de cellules ou de groupes de cellules. Par exemple E. Strohm et al. ont couplé deux méthodes d'imagerie basées sur les ondes acoustiques afin d'étudier les leucocytes.[59] La première méthode, la microscopie acoustique à balayage, consiste à envoyer une impulsion ultrasonore sur les cellules et à mesurer le signal rétrodiffusé à l'aide d'un transducteur tandis que la seconde méthode, la microscopie photoacoustique, consiste à focaliser un laser sur l'échantillon, ce qui va créer une onde acoustique par effet photoacoustique qui sera détectée par le même transducteur que les ultrasons.[60] Ces expériences ont notamment permis de mettre en évidence des différences de contraste acoustique entre différents types de leucocytes.[59] Cette technique a aussi permis de mesurer le rapport de taille cytoplasme/noyau dans des cellules cancéreuses,[61] ainsi que d'étudier les variations d'oxygénation dans des tumeurs.[62] Les ondes ultrasonores ont également été utilisées pour mesurer la vitesse du son et l'atténuation dans des culots de cellules HT29 en l'absence de nutriments et ont montré que la vitesse du son des cellules augmentait graduellement sur une période de 56 h sans nutriments.[63] Toutes ces expériences utilisent des ondes sonores à des fréquences de l'ordre du MHz mais il existe des outils pour venir sonder les propriétés des cellules à des fréquences de l'ordre du GHz et même du THz.

L'acoustique picoseconde est une technique utilisée pour la première fois par Maris et al. en 1984.[64] Le principe est de générer et de détecter des ondes acoustiques à l'aide d'impulsions laser ayant des largeurs temporelles de l'ordre de la centaine de femtosecondes. Des impulsions de cette durée vont générer par effet photoélastique des fréquences acoustiques allant jusqu'au THz ce qui permet de caractériser mécaniquement des matériaux à une résolution submicronique et donc d'étudier la structure interne de la cellule. Depuis la fin des années 2000, cette technique a également été utilisée sur des cellules individuelles afin d'étudier leur propriétés mécaniques.[65][66] Cette technique a en outre permis d'imager les différentes structures d'une cellule en tirant parti de leur différence d'impédance acoustique pour obtenir du contraste acoustique.[67] L'acoustique picoseconde a également permis de sonder les propriétés mécaniques d'une cellule unique au niveau de sa zone contact avec un substrat.[68] Cette technique peut être utilisée comme un échographe si on souhaite imager en profondeur mais on peut également obtenir une mesure absolue des propriétés mécaniques comme l'atténuation

acoustique ou le module M de cellules.[69]

Une méthode permettant de mesurer quantitativement le module mécanique d'un tissu est l'élastographie. Le principe de l'élastographie est de générer une déformation dans le tissu et de mesurer la déformation dans le tissu. Ensuite, moyennant une hypothèse sur la modélisation du tissu, on peut alors remonter au module mécanique du tissu. [70][71] Cette méthode est utilisée en général pour imager des organes entiers dans le but de détecter des tumeurs chez les patients,[72] ou de suivre de manière non-invasive l'évolution des propriétés mécaniques des tissus après certains traitements.[73][74]. Cette méthode a également été appliquée à des cellules uniques.[75] Une pipette vibrant à 15 kHz est mise en contact avec une cellule et, grâce à l'utilisation d'un algorithme rapide de détection optique, le module élastique de cisaillement G de la cellule peut être cartographié en temps réel. Cette technique a notamment permis d'observer la diminution du module de cisaillement G due à un traitement à la cytochalasine B.

Une autre technique acoustique utilisée pour caractériser mécaniquement les cellules biologiques est la diffusion Brillouin. Le principe de cette méthode est de tirer parti du phénomène de diffusion Brillouin en analysant un faisceau de lumière monochromatique cohérente diffusée par un matériau. Ici ce sont les fluctuations thermiques qui vont constituer l'excitation acoustique permettant de remonter aux constantes mécaniques du système.[76][77] Depuis la fin des années 2000, cet outil a été appliqué à l'étude des tissus biologiques.[78] L'utilisation de cette technique a notamment permis de cartographier les propriétés mécaniques des cellules lorsqu'elles sont soumises à un choc osmotique.[79] Le fait que la diffusion Brillouin permette d'avoir une résolution spatiale de quelques microns dans le plan et son caractère non-invasif en font un excellent moyen de sonder l'évolution des propriétés mécaniques des cellules, cependant certains aspects théoriques sur la nature des constantes mesurées et l'influence potentielle de l'indice optique sont encore des sujets de débat dans la communauté.[77][80]

La fréquence des ondes acoustique utilisée pour étudier les objets biologiques va déterminer la longueur caractéristique des objets étudiés. Au MHz, on sonde la cellule dans son ensemble, et au GHz et au THz on sépare les composants internes de la cellule. Grâce à ces techniques on peut créer des images dont le contraste est basé sur les variations spatiales des propriétés acoustiques dans l'objet étudié. Cela permet de mettre en évidence la structure des objets et

renseigne sur les différences de rigidité entre deux points de la zone d'intérêt. On peut, dans certaines configurations, avoir une mesure absolue des constantes mécaniques.

Ici, nous avons développé les méthodes basées sur les ondes acoustiques pour les cellules uniques. Nous allons maintenant nous intéresser à celles disponibles pour les sphéroïdes tumoraux.

1.2.2 Application aux sphéroïdes tumoraux

La première utilisation des ondes acoustiques sur des sphéroïdes date de 1987, lorsque Shear et al. ont utilisé un dispositif de microscopie acoustique pour réaliser une image acoustique d'un sphéroïde tumoral.[81] La microscopie acoustique est une technique qui utilise une lentille acoustique pour focaliser les ondes acoustiques haute fréquence(jusqu'au GHz), et ainsi imager un échantillon en utilisant les variations de propriétés mécaniques comme contraste avec une résolution sub-micronique.[82] Ils ont ainsi pu mettre en évidence des variations de l'amplitude du signal rétrodiffusé par des sphéroïdes entre les bords et le centre de l'agrégat qui sont corrélées à des changements de structure du tissu. Plus récemment, Margueritat et al. ont réalisé des mesures de diffusion Brillouin sur des sphéroïdes afin de remonter au module d'onde longitudinale de sphéroïdes tumoraux. Leurs mesures ont permis de mettre en évidence une variation du module élastique M du sphéroïde après exposition à un traitement anti-cancéreux.[52]

Comme on l'a vu précédemment, le module mécanique mesuré dépend du type de sollicitation appliquée et toutes les expériences de caractérisation mécanique sur les tissus biologiques peuvent donner des résultats très différents en terme de module élastique selon les conditions expérimentales. En particulier sur les sphéroïdes, le module K mesuré lors de chocs osmotiques est de l'ordre du kPa,[41] alors que le module M mesuré par diffusion Brillouin est de l'ordre du GPa.[52] Outre les différences liées au type de module élastique, cela vient du fait que les sphéroïdes sont des systèmes très hétérogènes comportant de nombreuses longueurs caractéristiques (cellules, biopolymères etc...) qui peuvent se traduire mécaniquement pour l'émergence de plusieurs temps de relaxation lorsqu'on soumet le système à une excitation acoustique. Un des moyens les plus simples pour étudier l'ensemble de ces longueurs et de ces temps caractéristiques est d'exciter le système sur une large gamme de fréquences grâce à des ondes acoustiques. C'est l'objectif du projet dans lequel s'inscrit ce travail de thèse.

Nous allons présenter dans ce manuscrit la mise en œuvre d'un dispositif ultrason laser pour venir caractériser mécaniquement des sphéroïdes. On va utiliser une source laser impulsionnelle pour générer des ultrasons sur une gamme de fréquence allant de 0 à 120 MHz. On va utiliser une détection acoustique par interférométrie afin de mesurer les ondes acoustiques après propagation dans les sphéroïdes tumoraux. Le traitement du signal nous permettra alors d'obtenir une mesure directe de la vitesse du son et l'atténuation acoustique dans les sphéroïdes. Il s'agit, dans l'état actuel de nos connaissances, des premières mesures directes et quantitatives de vitesse du son et d'atténuation sur les sphéroïdes tumoraux.

Le premier chapitre de ce manuscrit portera sur les principes physiques de génération d'ondes acoustiques par la technique ultrason laser, et sur la mise en œuvre de la détection acoustique par interférométrie. Une fois les systèmes de génération et de détection présentés, on présentera les méthodes d'analyse des signaux acoustiques. On détaillera notamment l'analyse en temps de vol permettant de remonter à une vitesse du son et l'analyse en amplitude permettant de remonter une atténuation acoustique et leur mise en œuvre sur une couche d'eau pour calibrer notre système.

Dans le second chapitre nous présenterons dans un premier temps les sphéroïdes multicellulaires tumoraux utilisés dans cette étude ainsi que leur méthode de fabrication. On présentera ensuite les résultats des mesures réalisées sur les sphéroïdes multicellulaires tumoraux.

On conclura ensuite l'étude par un chapitre où on mettra en regard ces résultats avec les autres données disponibles afin de les discuter en s'appuyant sur des modèles théoriques fréquemment utilisés dans la communauté. On exposera enfin les conclusions de notre étude puis des perspectives d'approfondissement à partir de nos résultats.

CHAPITRE 2

Montage expérimental et test sur l'eau

Dans ce chapitre, nous allons présenter le montage expérimental utilisé dans ce travail de thèse.

Nous présenterons d'abord en détail le principe de génération optoacoustique utilisé pour générer les signaux. La génération optoacoustique tire parti de l'interaction lumière-matière. On apporte de l'énergie au matériau par le biais d'un rayonnement électromagnétique et cette énergie est convertie en onde acoustique. Cette technique est notamment utilisée pour sonder les propriétés mécaniques des matériaux car elle est sans contact et permet de générer des ondes acoustiques avec une large bande passante. On présentera d'abord les différents régimes de génération optoacoustique, puis on détaillera la mise en application de cette technique de génération dans le cadre de notre étude.

On poursuivra en présentant la détection de déplacement par interférométrie utilisée pour enregistrer les signaux acoustiques sur les échantillons. Notre choix s'est porté sur cette méthode car elle permet elle aussi d'avoir une large bande passante. On s'assure ainsi d'être compatible avec la bande passante du système de génération optoacoustique. On présentera les bases physiques de la mesure de déplacement par interférométrie, puis on poursuivra en présentant l'interféromètre conçu pour cette étude. On évaluera ensuite la bande passante des signaux acoustiques générés à l'aide de ce montage expérimental.

On présentera ensuite la routine de traitement du signal utilisée sur nos signaux afin de remonter aux propriétés mécaniques de l'échantillon étudié. Ce traitement du signal se base sur un algorithme de décomposition des signaux acoustiques sur la famille des ondelettes de Morlet, notamment utilisées en géologie et en sismologie pour l'analyse de signaux acoustiques. L'algorithme de traitement du signal sera ensuite appliqué à des signaux acoustiques obtenus sur des couches d'eau afin de tester notre système de mesure. On présentera une méthode d'extraction de vitesse du son sur une gamme de fréquence allant de 20 à 120 MHz pour des couches d'eau ainsi qu'une méthode d'extraction basée sur la transformée de Fourier pour les fréquences entre 0 et 20 MHz. On présentera aussi une méthode d'analyse de l'amplitude des signaux acoustiques mesurés avec pour objectif d'extraire une atténuation acoustique.

2.1 Génération d'ultrasons par méthode optoacoustique

La génération d'ondes acoustiques à l'aide d'ondes électromagnétiques a été étudiée pour la première fois par Bell lorsqu'il a mis au point son photophone.[83] Une expérience et un modèle pour la génération d'ondes acoustiques à l'aide d'un laser dans une plaque d'aluminium seront ensuite proposés par White en 1963.[84]

La génération optoacoustique se base sur l'interaction entre une impulsion électromagnétique et le matériau dans lequel on souhaite générer l'onde acoustique. L'énergie lumineuse déposée sur la surface est convertie, par le biais de divers mécanismes, en déplacement. Le mécanisme de conversion d'énergie dépend de la puissance par unité de surface (fluence) déposée dans le matériau et des propriétés du matériau. Pour de faibles fluences, le matériau va se dilater ce qui va générer des contraintes mécaniques : c'est ce qu'on appelle le régime thermoélastique. Pour des quantités d'énergies importantes, le matériau est vaporisé et éjecté de la surface ce qui va générer des contraintes à l'endroit où le matériau est enlevé. C'est ce qu'on appellera le régime d'ablation ou régime plasma. Cette technique de génération a l'avantage de générer sans contact des ondes acoustiques avec large spectre fréquentiel qui sont nécessaires pour cette étude.

Les travaux de revue de S. Manohar et D. Razansky[85] et de V. Gusev et al.[86] résument l'état de l'art actuel sur la génération d'ondes acoustiques à l'aide d'ondes électromagnétiques. Cette méthode est notamment utilisée en test non-destructifs sur des métaux ou d'autres solides, afin de détecter des défauts. Elle peut aussi permettre de sonder la structure interne des matériaux comme par exemple des échantillons de roches.[87] Elle permet également la caractérisation de couches minces, comme par exemple une surface recouverte d'un composite de nanofils de nitrure et de polymères.[88] Les lasers impulsionsnels peuvent également être utilisés comme source d'ultrasons en microscopie acoustique.[89]

Dans les sous-sections suivantes, nous allons présenter le régime thermoélastique, le régime d'ablation, puis nous allons présenter les caractéristiques de la source optoacoustique que nous avons utilisée.

2.1.1 Génération en régime thermoélastique

En figure 2.1. on illustre la génération en régime thermoélastique : le matériau absorbe le rayonnement électromagnétique impulsionnel, ce qui provoque une élévation de température dans la zone irradiée (1). Cette élévation de température locale provoque une dilatation thermique et génère des contraintes mécaniques (2). La relaxation de ces contraintes mécaniques entraîne la génération d'une onde acoustique (3). Dans ce régime, l'absorption du rayonnement

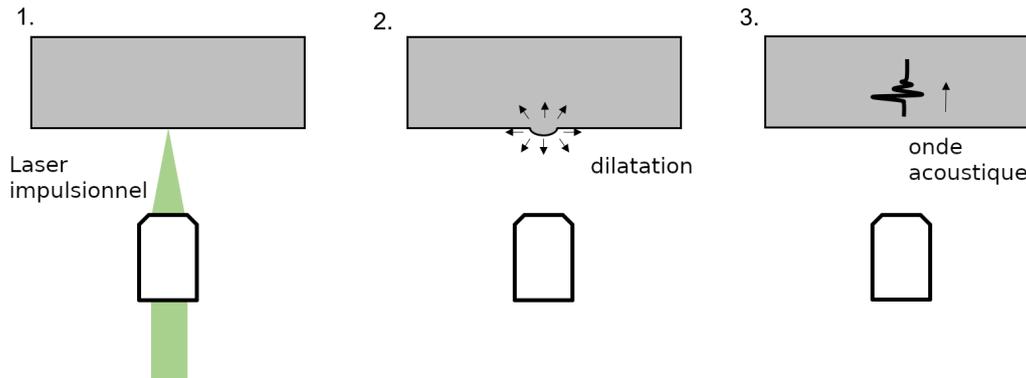


FIGURE 2.1 – Illustration du principe de la génération en régime thermoélastique.

électromagnétique ne change pas les propriétés du matériau. L'ensemble de l'énergie absorbée va provoquer une dilatation du matériau dont l'amplitude sera déterminée par le coefficient de dilatation linéaire Λ du matériau considéré. Les caractéristiques de l'onde acoustique générée vont également dépendre des propriétés optiques, mécaniques et thermiques du matériau, telles que son indice optique n_{opt} à la longueur d'onde optique λ_{opt} , la vitesse du son du matériau V et sa diffusivité κ . Tous ces paramètres vont influencer sur la forme des signaux acoustiques générés.

Pour modéliser ce type de génération, il faut décrire l'absorption du rayonnement électromagnétique par le matériau et son effet sur la distribution de température du matériau. Le modèle thermique le plus simple néglige les effets de la diffusion thermique et relie l'élévation de température du matériau à la quantité d'énergie absorbée[90] :

$$\Delta T(\mathbf{x}, t) = \int_0^t \frac{Q(\mathbf{x}, t')}{\rho C_p} f(t') dt' \quad (2.1)$$

où ρ est la densité du matériau, C_p sa capacité calorifique et $Q(\mathbf{x}, t)$ correspond à l'énergie thermique apportée par l'impulsion laser. $Q(\mathbf{x}, t)$ va dépendre de l'indice optique du matériau

n_{opt} , ce qui va déterminer la quantité de rayonnement effectivement absorbée ainsi que la profondeur de pénétration du rayonnement. $f(t)$ est le profil temporel de l'impulsion lumineuse. Une fois qu'on a déterminé la distribution de température dans le matériau, on peut calculer le déplacement. Pour calculer le déplacement on commence par poser l'équation de conservation de la quantité de mouvement :

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho \mathbf{v} + \nabla \cdot \sigma = 0 \quad (2.2)$$

où ρ est la densité du matériau et \mathbf{v} la vitesse de l'élément de volume considéré. On considère ici qu'aucune force extérieure ne s'applique sur l'élément de volume. Pour obtenir une équation sur le vecteur déplacement \mathbf{u} , il nous faut une relation entre le déplacement et le tenseur des contraintes σ . Les gradients de température vont générer des contraintes qu'on modélise en modifiant la relation déformation-contrainte du matériau pour y ajouter un terme qui dépend des variations de température. Ainsi, la loi de comportement déformation-contrainte s'écrit :

$$\sigma = C : \epsilon - (C : \alpha)T \quad (2.3)$$

où ":" représente le produit tensoriel doublement contracté et où ϵ est le tenseur des déformations du matériau, qui s'écrit :

$$\epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \quad (2.4)$$

où u_i est la projection orthogonale du vecteur déplacement \mathbf{u} suivant le vecteur x_i . Le tenseur des contraintes représente les efforts mécaniques que subit un élément de volume du matériau suivant chaque direction de l'espace. Si on injecte l'équation 2.3 dans l'équation 2.2 on obtient :

$$\rho \frac{\partial^2 \mathbf{u}}{\partial t^2} + \nabla \cdot (C : \epsilon) = \nabla \cdot [C : \alpha T] \quad (2.5)$$

On peut voir que cette équation comporte un terme associé au déplacement généré par le gradient de température $\nabla \cdot [C : \alpha T]$. On peut alors résoudre cette équation en y injectant l'équation 2.4 et obtenir le déplacement \mathbf{u} en fonction du temps en tout point de l'espace.

Un autre aspect important des sources optoacoustiques est leur directivité, c'est-à-dire la

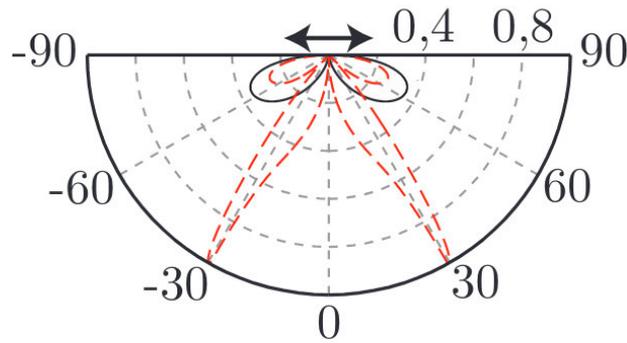


FIGURE 2.2 – Diagramme de directivité des ondes de compression (traits pleins) et de cisaillement (traits pointillés) pour une génération surfacique en régime thermoélastique (adapté du manuscrit de thèse de S. Raetz [91])

dépendance angulaire de l'amplitude acoustique rayonnée par une source. Le diagramme de directivité des ondes de compression générées par une source thermoélastique est représenté en trait plein en figure 2.2. Ce diagramme est obtenu en modélisant la source thermoélastique comme un dipôle de forces orienté parallèlement à la surface de génération. On peut voir que l'énergie acoustique se répartit principalement dans deux lobes centrés à un angle de 60° par rapport à la normale à la surface de génération.[91]

Comme dit précédemment, il existe des modélisations plus raffinées pour les équations thermiques et mécaniques. Le choix de modélisation va notamment dépendre des propriétés du matériau considéré. Par exemple, pour un matériau où la diffusion thermique a un temps caractéristique très long par rapport à la durée de l'impulsion laser utilisée, on pourra négliger la diffusion thermique. On peut également considérer que la source optoacoustique est une source surfacique si la profondeur de pénétration optique est très faible par rapport aux longueurs d'ondes acoustiques générées. En revanche, si on utilise un matériau transparent ou un semi-conducteur le modèle devra être adapté en conséquence. Un lecteur intéressé par une modélisation complète de ce type de phénomène peut se référer aux travaux de thèse de S. Raetz pour plus de précisions.[91]

En figure 2.3, on représente l'amplitude en fonction du temps pour un signal acoustique enregistré en régime thermoélastique dans une plaque d'aluminium de 3 mm. Vers $0.43 \mu\text{s}$ on peut voir un pic dans le signal qui correspond à l'arrivée de la composante longitudinale de l'impulsion acoustique générée dans le matériau (cadre pointillé). On appellera ce pic la composante L . On observe une "marche" vers $1 \mu\text{s}$. La marche, représentée par un T sur la figure, correspond à la composante du déplacement normal au niveau de la surface dû à

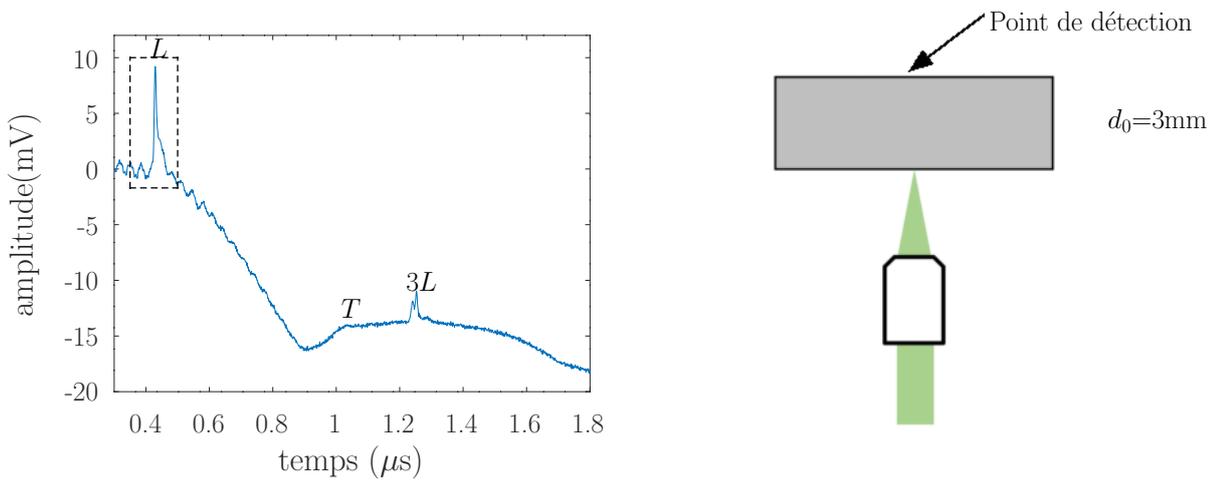


FIGURE 2.3 – Signal acoustique généré par une source laser focalisée ponctuellement sur une plaque d'aluminium

la conversion de l'onde transverse générée dans le matériau par la source optoacoustique en onde longitudinale au niveau de la surface du matériau. Le second pic, représenté par un $3L$, observé vers $1.2 \mu\text{s}$ en figure 2.3 correspond à la composante longitudinale ayant réalisé 3 trajets dans la couche de métal avant d'être détectée. Les deux composantes longitudinales L et $3L$ se propagent à la vitesse du son longitudinale v_L tandis que la composante T a traversé le système à la vitesse du son transverse v_T qui est généralement moins élevée que la vitesse du son longitudinale.[90]

2.1.2 Génération en régime d'ablation

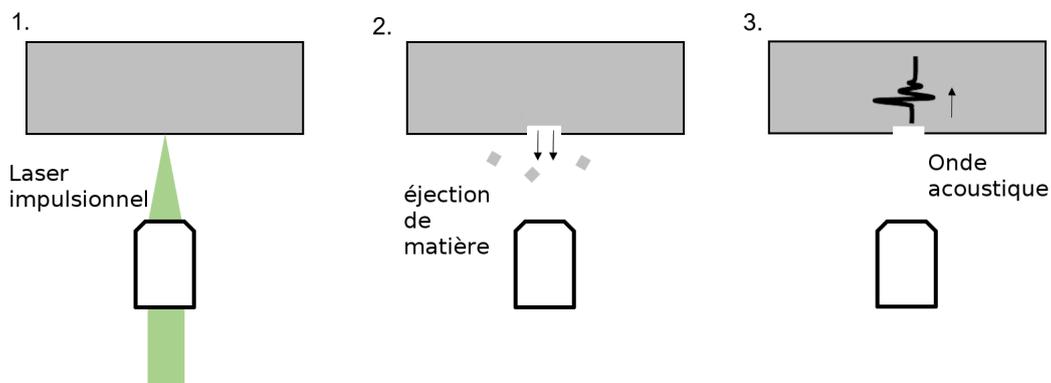


FIGURE 2.4 – Illustration du principe de la génération en régime d'ablation.

En figure 2.4 on illustre le principe de la génération optoacoustique en régime d'ablation. Si la fluence du faisceau laser incident dépasse un certain seuil, la température du matériau va s'élever au dessus de la température de fusion (1). Si on continue à augmenter la puis-

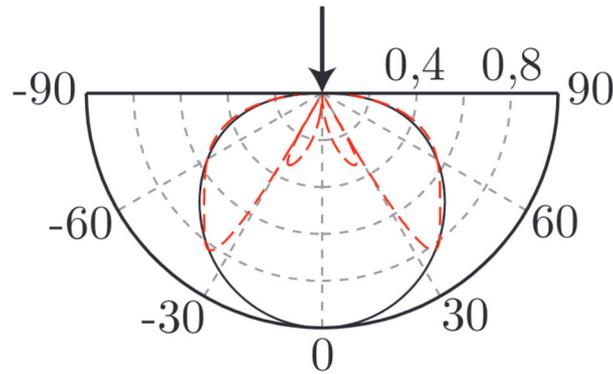


FIGURE 2.5 – Diagramme de directivité des ondes de compression (traits pleins) et de cisaillement (traits pointillés) pour une génération surfacique en régime d'ablation (adapté du manuscrit de thèse de S. Raetz [91])

sance lumineuse, on va provoquer la fusion puis la vaporisation d'une couche de matériau en surface(2).[92] L'expulsion de matière de la surface de l'échantillon va générer un déplacement similaire à celui généré par un piston(3).

Le diagramme de directivité des ondes de compression générées par une source en régime d'ablation est représenté en trait plein en figure 2.5. Ce diagramme est obtenu en considérant la source comme une force appliquée suivant la normale à la surface de génération. Dans ce cas, le maximum d'énergie acoustique est rayonné coaxialement à la normale. L'énergie rayonnée diminue graduellement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la normale à la surface et atteint zéro à 70° par rapport à la normale à la surface de génération.

En figure 2.6 on peut voir l'amplitude en fonction du temps pour quatre signaux acoustiques enregistrés dans une plaque d'aluminium pour quatre fluences différentes : 200 MW/cm^2 , 300 MW/cm^2 , 400 MW/cm^2 et 600 MW/cm^2 . Pour une fluence de 200 MW/cm^2 on retrouve les caractéristiques principales des signaux en régime thermoélastique, c'est-à-dire le pic L et la marche due à la composante transverse T . Le pic L a cependant une amplitude bien plus élevée qu'en régime thermoélastique et une augmentation de la puissance lumineuse déposée augmente l'amplitude du pic L sans augmenter l'amplitude de la marche associée à la composante T . On a donc une superposition d'une génération thermoélastique due à la dilatation thermique et une génération en ablation due à la vaporisation d'une partie du matériau à l'interface.[92] L'effet "piston" du régime d'ablation génère significativement plus de déplacement dans la direction normale à la surface que la dilatation thermique ce qui fait que, pour les puissances lumineuses élevées où on vaporise beaucoup de matériau, on peut négliger le régime thermoélastique.[92]

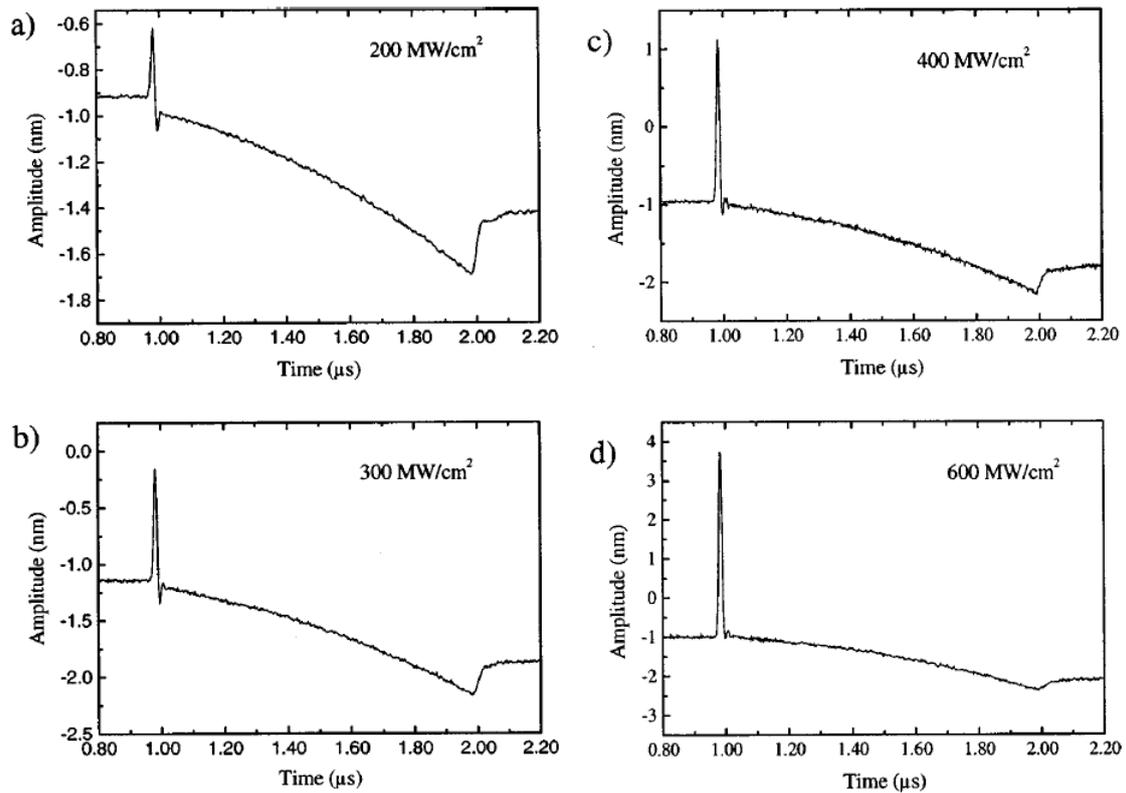


FIGURE 2.6 – Exemples de signaux acoustiques issus de l'étude de Murray *et al.* [92] générés en régime d'ablation dans un échantillon d'aluminium de 6 mm d'épaisseur pour des puissances de 200 MW/cm²(a), 300 MW/cm²(b), 400 MW/cm²(c) et 600 MW/cm² (d).

Le régime d'ablation présente l'intérêt de permettre la génération d'amplitudes de déplacement normal bien plus importantes que le régime thermoélastique. Mais ce gain se fait au prix d'une dégradation de l'échantillon dans lequel on génère le signal.

2.1.3 Dispositif expérimental de génération d'impulsions acoustiques

Pour notre montage expérimental, nous avons choisi de travailler proche du régime d'ablation. Ce choix est dû à nos contraintes en termes de rapport signal/bruit et à notre système de détection qu'on présentera dans la suite. Nous avons utilisé un laser Nd:YAG doublé à une longueur d'onde de 532 nm. Les impulsions laser ont une largeur temporelle de 2.9 ns et un taux de répétition de 30 Hz. Le spot de génération a un diamètre de 1 mm. Nous avons fait varier l'énergie déposée entre 10 mJ/impulsion et 25 mJ/impulsion. Cette intervalle s'explique par le fait qu'après plusieurs tirs l'état de surface du spot de génération se dégrade et nécessite davantage de puissance pour obtenir le même rapport signal/bruit. La fluence utilisée varie donc de 100 MW/cm² à 275 MW/cm². Le matériau utilisé pour la génération de signaux

acoustiques dans l'ensemble de ce manuscrit est l'aluminium.

Afin de discuter précisément du contenu fréquentiel de nos signaux, il est nécessaire de détailler également la méthode de détection utilisée. Avant cela, on peut cependant estimer une limite haute pour le contenu fréquentiel à partir des paramètres du laser et du matériau de génération. La largeur temporelle de l'impulsion acoustique τ_a se calcule de la manière suivante[93] :

$$\tau_a = \sqrt{\tau_L^2 + \tau_l^2} \quad (2.6)$$

$$(2.7)$$

avec :

$$\tau_l = \frac{1}{\beta v_L} \quad (2.8)$$

où τ_L est la largeur temporelle de l'impulsion laser et τ_l le temps que l'onde acoustique met à traverser la source optoacoustique. β est l'inverse de l'épaisseur de pénétration optique du rayonnement dans le matériau et v_L la vitesse du son des ondes longitudinales dans le matériau. Pour de l'aluminium, $\beta = 1.5 \cdot 10^8 \text{ m}^{-1}$ et $v_L = 6400 \text{ m/s}$, on obtient donc $\tau_l = 0.001 \text{ ns}$ et $\tau_L = 2.9 \text{ ns}$ ce qui correspond à une bande passante de l'ordre de $f = \frac{1}{\tau_a} = 340 \text{ MHz}$. Donc, notre système devrait générer des impulsions acoustiques de 2.9 ns et avoir une bande passante de génération de 340 MHz. Cependant cette valeur dépend également de l'état de surface du matériau de génération. En effet, si des rugosités de surface sont présentes elles vont générer de la diffraction, ce qui affectera les hautes fréquences lors de la génération. Il peut également y avoir de la diffraction pendant la propagation due à la taille des grains dans le bloc d'aluminium si ce dernier est polycristallin.[93]

2.2 Détection par interférométrie

Dans la section précédente nous avons détaillé la solution technique choisie pour générer des impulsions acoustiques ultrasonores à large contenu fréquentiel. Pour la détection des impulsions acoustiques, on aurait pu choisir d'utiliser un hydrophone ou un autre capteur piézoélectrique. Cependant, notre objectif de sonder les propriétés mécaniques des échantillons sur une large gamme de fréquences fait que les dispositifs piézoélectriques ne sont pas les meilleurs candidats à cause de leur bande passante limitée.[94] Un autre point critique est qu'on souhaite pouvoir prendre des images en vue de dessus durant les expériences notamment afin de pouvoir repérer visuellement les sphéroïdes dont le diamètre est généralement de quelques centaines de microns. Les transducteurs piézoélectriques n'étant généralement pas transparents,[95][96] nous avons préféré nous tourner vers d'autres solutions.

Le dispositif de génération présenté en section 2.1.3 a une bande passante théorique de 340 MHz et la littérature présente les méthodes optiques de détection du déplacement comme ayant une bande passante plus importante que les autres types de capteurs.[94][96] Le principe est d'utiliser une onde électromagnétique pour détecter le passage de l'onde acoustique dans le matériau. La technique optique que nous avons choisie est l'interférométrie, car elle répondait aux deux critères principaux de cette étude : une large bande passante et une possibilité de rendre le détecteur partiellement transparent.[96] Cette technique se base sur la modulation d'intensité lumineuse due aux interférences entre deux faisceaux de lumière cohérente. Dans la suite nous allons développer le principe de mesure ainsi que sa réalisation dans le cadre du montage expérimental ultrason laser.

2.2.1 Principes de détection de déplacement par interférométrie

La mesure par interférométrie sur base sur le phénomène d'interférences. Les interférences se produisent lorsque deux faisceaux de lumière cohérente sont superposés sur un chemin optique donné. S'ils ont la même polarisation, alors l'intensité du champ résultant va dépendre de la différence de phase entre les deux faisceaux en suivant la relation [96] :

$$I_{interf} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\Delta\phi) \quad (2.9)$$

où I_1 et I_2 sont respectivement l'intensité du premier et du second faisceau. La différence de phase entre les deux faisceaux $\Delta\phi$ s'exprime :

$$\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = \frac{2\pi n(l_1 - l_2)}{\lambda_{opt}} = \frac{2\pi n\delta l}{\lambda_{opt}} \quad (2.10)$$

où n est l'indice optique du milieu de propagation, l_1 et l_2 les longueurs de chemin optique des 2 faisceaux et λ_{opt} la longueur d'onde du faisceau utilisé. Si δl varie au cours du temps alors, alors l'intensité lumineuse I_{interf} va également varier. Donc en suivant la variation de temporelle de I_{interf} on peut remonter à la variation temporelle de δl . C'est sur ce principe que se base la mesure par interférométrie.

Un interféromètre est un dispositif permettant de générer des interférences à partir d'une source lumineuse et de mesurer les caractéristiques de ces interférences. On classe les interféromètres selon 3 critères spécifiques :

- homodyne/hétérodyne : Les interféromètres homodynes font interférer deux faisceaux lumineux à la même longueur d'onde. Dans un interféromètre hétérodyne on utilise généralement un dispositif optique pour décaler légèrement la fréquence d'un des faisceaux ce qui va induire un déphasage supplémentaire.
- à chemin commun/à chemins multiples : Les interféromètres à chemin commun sont ceux pour lesquels les interférences sont générées grâce au déphasage entre les réflexions multiples d'un même faisceau initial sur un chemin optique unique. Pour les interféromètres à chemins multiples le déphasage est généré en séparant les deux faisceaux sur des chemins optiques distincts de longueurs différentes. Un exemple classique d'interféromètre à chemin commun est l'interféromètre de Sagnac. Un exemple d'interféromètre à chemin multiple est l'interféromètre de Michelson.[97]
- à division de front ou à division d'amplitude : Les interféromètres à division d'amplitude sont les dispositifs où l'onde lumineuse initiale est divisée en plusieurs faisceaux. Les interféromètres à division d'amplitude sont les dispositifs où l'interférence est obtenue à partir d'un seul faisceau. Les fentes d'Young sont un dispositif à division du front d'onde et l'interféromètre de Mach-Zehnder est un dispositif à division d'amplitude.[97]

Dans notre cas, on va s'intéresser spécifiquement aux interféromètres utilisés pour pouvoir mesurer des déplacements acoustiques. De nombreuses méthodes de détection de déplacement

par interférométrie ont été développées en se basant, par exemple, sur les interféromètres de Michelson, de Mach-Zehnder et de Sagnac.[97][98][99]. Notre choix s'est porté sur le Michelson car il a une structure plus simple que les autres familles d'interféromètres mentionnées.[97] Il conserve cependant les propriétés importantes pour les expériences que nous souhaitons réaliser. Il peut disposer d'une sensibilité de l'ordre du nanomètre sur l'ensemble de la gamme de fréquences étudiées.

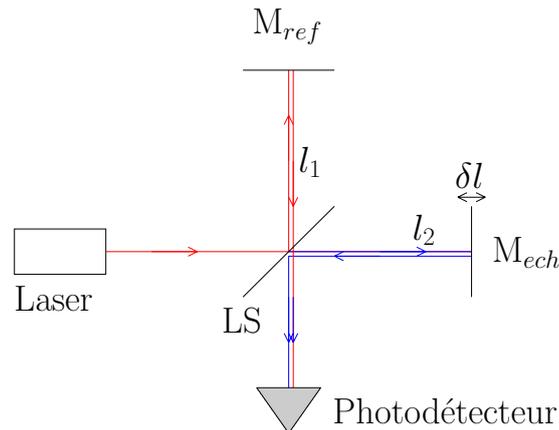


FIGURE 2.7 – Schéma d'un interféromètre de Michelson utilisé pour la mesure de déplacement. LS : lame séparatrice, M_{ref} : miroir de référence, M_{ech} : miroir échantillon

En figure 2.7 on représente la configuration la plus simple d'un interféromètre de Michelson pour la mesure de déplacement. Le faisceau initial est séparé en deux au niveau d'une lame séparatrice. Le premier faisceau se réfléchit sur la lame séparatrice (LS), se propage jusqu'au miroir M_{ref} . Le faisceau se réfléchit sur le miroir M_{ref} et retourne vers la lame séparatrice. Une partie de l'intensité est alors transmise par la séparatrice et se dirige vers le photodétecteur. Dans le second chemin, le faisceau est transmis par la séparatrice à l'aller puis réfléchi par cette dernière au retour après réflexion sur le miroir M_{ech} . Les deux faisceaux sont ensuite réunis et envoyés sur un photodétecteur qui va mesurer l'intensité lumineuse du faisceau résultant. Pour mesurer un déplacement il faut alors coupler un des deux miroirs au déplacement à mesurer. M_{ech} , le miroir "échantillon", sera couplé au déplacement δl . Le miroir M_{ref} , miroir de référence, sera supposé fixe.

Si on considère un interféromètre de Michelson à 2 bras de longueurs égales (ou dont la différence de longueur est faible devant la longueur de cohérence du laser), fixes, éclairés par un faisceau parfaitement collimaté, on peut utiliser l'équation 2.9 pour tracer l'intensité I_{interf} en

fonction de la différence de longueur entre les deux bras de l'interféromètre. En figure 2.8, on

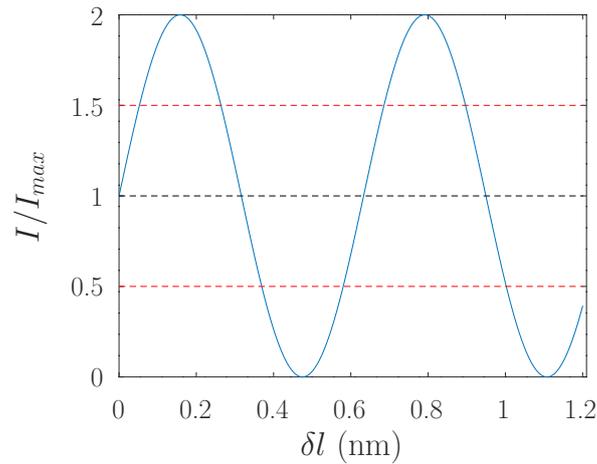


FIGURE 2.8 – Courbe de fonctionnement d'un interféromètre de Michelson pour une source ayant une longueur d'onde de 633 nm

représente l'intensité normalisée $\frac{I_{interf}}{I_{max}}$ en fonction du déplacement δl du miroir M_{ech} (voir figure 2.7). On a délimité arbitrairement la zone linéaire comme une zone large d'un quart de longueur d'onde centrée sur la quadrature (pointillés). Pour un laser He:Ne cela représente une largeur δ_{lin} d'environ 180 nm. Si on fait varier δl , l'intensité lumineuse va varier entre 0 et I_{max} . Si on est proche de la quadrature, c'est-à-dire un déphasage de $\pi/4$ entre les deux faisceaux et une intensité de $I_{max}/2$, alors la relation déplacement-intensité lumineuse pourra être approximée par une relation linéaire. La gamme dynamique de l'interféromètre est alors définie comme étant la gamme de déplacement sur laquelle l'interféromètre reste en zone linéaire. Idéalement, l'interféromètre au repos se trouve donc à la quadrature et mesure des déplacements dont l'amplitude est comprise dans sa gamme linéaire. Dans la suite nous allons présenter notre réalisation technique de l'interféromètre de Michelson pour la détection d'ondes acoustiques.

2.2.2 Interféromètre de Michelson Stabilisé

En figure 2.9 on présente le schéma de l'interféromètre de Michelson que nous avons utilisé pour la mesure d'ondes acoustiques. La source laser utilisée est un laser He:Ne continu stabilisé en amplitude à une longueur d'onde de 632 nm avec une puissance de 1,5 mW et une longueur de cohérence de 3 m. Le faisceau est envoyé vers un cube polarisant sur lequel sont montées une lame mi-onde(LM) sur la face d'entrée du faisceau et deux lames quart d'onde(LQ) sur chaque face de sortie. L'ensemble remplit le même rôle que la lame séparatrice décrite en figure 2.7. Le

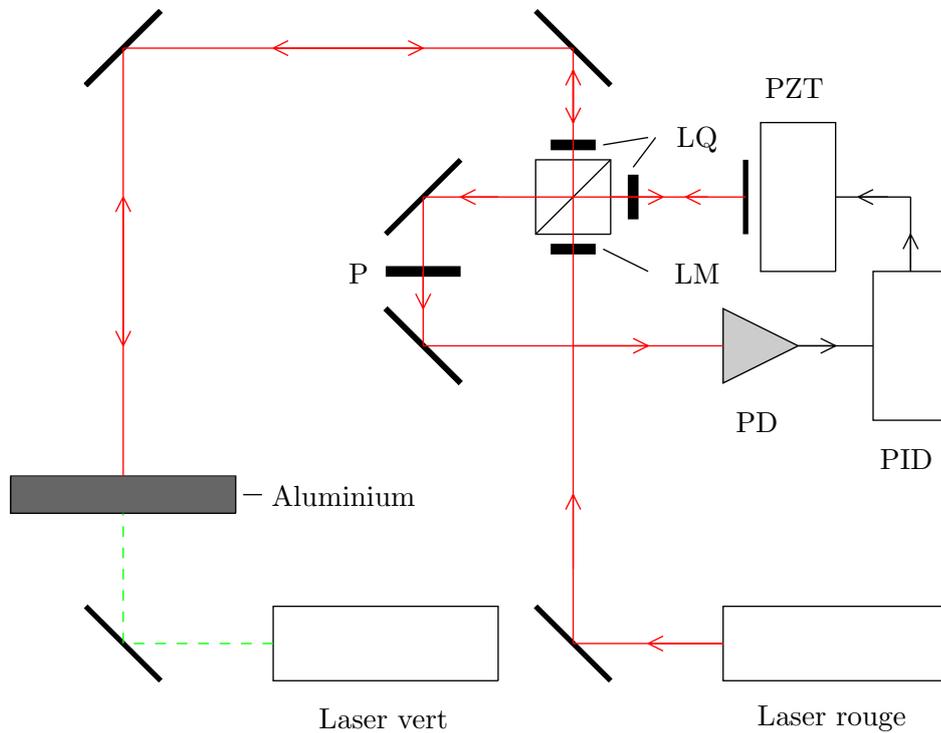


FIGURE 2.9 – Schéma complet de l'interféromètre de Michelson pour la mesure de signaux acoustiques dans une plaque de métal

P : polariseur

LQ : lame quart d'onde

LM : lame mi-onde

PD : photodétecteur

PID : correcteur proportionnel intégral dérivé

PZT : transducteur piézoélectrique

Le cube sépare le faisceau initial en deux faisceaux de polarisations orthogonales. L'avantage du cube polarisant associé à la lame mi-onde est qu'il permet de choisir la répartition d'intensité entre les deux bras ce qui nous permettra de maximiser l'intensité lumineuse en sortie de l'interféromètre.

Le rôle des lames quart d'onde est de faire tourner le plan de polarisation de $\pi/4$ lors du premier passage des faisceaux. Lors de leur retour après réflexion, leur plan de polarisation tourne à nouveau de $\pi/4$ ce qui veut dire que les polarisations des faisceaux au retour dans le cube sont orthogonales à celles de départ. Au retour, le faisceau initialement transmis par le cube est donc réfléchi et le faisceau initialement réfléchi est cette fois transmis. Les 2 faisceaux

sont donc réunis. Les polarisations des deux rayons sont encore orthogonales à ce stade, il faut donc utiliser un polariseur(P) pour projeter leurs deux polarisations dans le même plan afin de pouvoir observer une interférence. Puisqu'il s'agit d'une projection et non d'une rotation du plan de polarisation on perd 50 % de la puissance de chaque faisceau à cette étape.

Après le polariseur, les faisceaux sont focalisés sur une photodiode. La photodiode a une bande passante de 0 à 350 MHz ce qui est compatible avec la gamme fréquentielle de 340 MHz du signal acoustique présenté en section 2.1.3. Le signal est échantillonné et digitalisé par une carte d'acquisition Gagescope EON avec une fréquence d'acquisition maximale de 1 GHz.

Si, en théorie, la seule source de variation d'intensité lumineuse devrait être le déplacement du miroir échantillon dû à l'onde acoustique, l'intensité lumineuse fluctue en fait de manière importante au cours du temps à cause de variation de température et du bruit acoustique généré par l'environnement. Il faut donc stabiliser l'interféromètre pour qu'il fonctionne près de la quadrature et qu'on puisse enregistrer des signaux acoustiques. Pour résoudre ce problème on stabilise l'interféromètre à l'aide d'un correcteur Proportionnel-Intégral-Dérivé(PID) et d'un transducteur piézoélectrique(PZT). Le transducteur piézoélectrique utilisé a une fréquence de résonance de 5 kHz et une course de 9 μm . Cela permet de filtrer toutes les fluctuations de longueur du bras de référence d'une fréquence inférieure à 5 kHz. On fixe le miroir du bras de référence de l'interféromètre de Michelson sur le transducteur piézoélectrique. On va utiliser le PID pour commander sa position au cours du temps afin de compenser les fluctuations de longueur des bras de l'interféromètre et le maintenir sur un point de fonctionnement proche de la quadrature. [97][100]

En figure 2.10, on illustre le principe de régulation du correcteur PID. La tension en sortie de la photodiode U_{mes} est utilisée comme tension d'entrée du correcteur. La tension est envoyée à un comparateur qui la compare à une valeur de consigne U_{cons} fixe qu'on a déterminée en réglant l'interféromètre à la quadrature. La tension de sortie du comparateur est l'erreur $e = U_{mes} - U_{cons}$, c'est-à-dire l'écart entre la tension de consigne et la tension mesurée. Cette erreur est envoyée à l'étage de correction comprenant les correcteurs proportionnel (P), intégral (I) et dérivé (D). En sortie de l'étage de correction, la tension de sortie U_{out} est envoyée au transducteur piézoélectrique(PZT) qui contrôle la position du miroir M_{ref} .

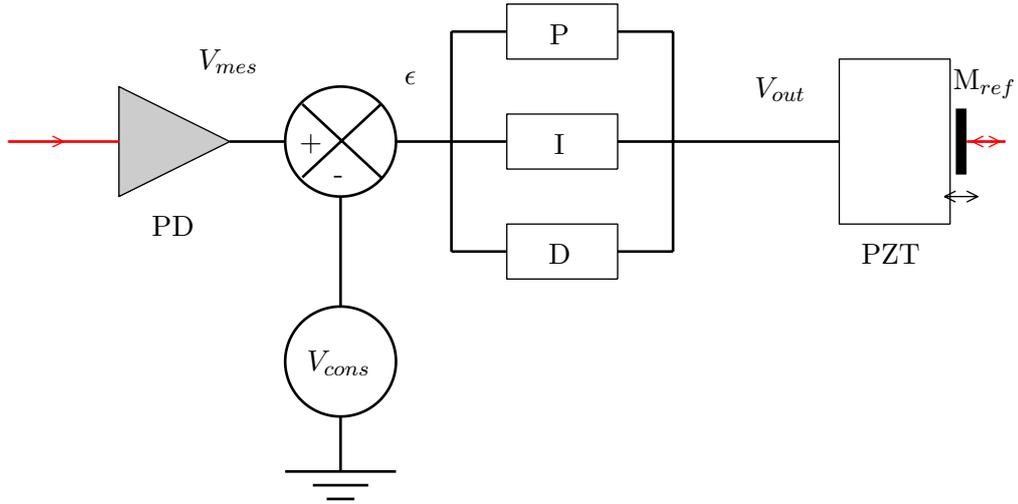


FIGURE 2.10 – Schéma de fonctionnement du correcteur PID appliqué à notre système

PD : Photodétecteur de l'interféromètre

PZT : Transducteur Piézoélectrique

M_{ref} : Miroir de référence de l'interféromètre

La tension de sortie U_{out} du PID est calculée de la manière suivante[101] :

$$U_{out} = Pe + I \int edt + D \frac{de}{dt} \quad (2.11)$$

Le terme proportionnel(P) effectue une correction simple en amplifiant l'erreur e d'un facteur P . Mais cette correction est rarement satisfaisante car elle n'assure pas que l'erreur statique soit nulle, c'est-à-dire que l'erreur e tende vers zéro pour un temps infini. Dans notre cas c'est un critère important puisque l'interféromètre doit rester proche de la quadrature. Nous avons donc ajouté un terme de correction intégrale I qui intègre e sur un certain intervalle de temps. De ce fait, si le signal subit des fluctuations basse fréquence autour de la valeur de consigne U_{cons} , la correction intégrale aura une contribution plus élevée et fera tendre e vers zéro. Le terme dérivée lui joue plutôt le rôle d'un filtre haute fréquence et corrige les variations rapides puisqu'il suit la dérivée du signal. Il est nécessaire de trouver le bon jeu de valeurs pour les coefficients du PID pour assurer la stabilité de l'interféromètre le temps de l'acquisition de nos signaux. Ces coefficients ont été déterminés de manière empirique car ils dépendent fortement de l'environnement. Par exemple, le réglage du PID ne sera pas le même si le laser de génération est éteint ou non car le bruit du système d'alimentation a un impact

sur la stabilité de l'interféromètre. Afin de s'assurer que la correction fonctionne bien le signal de l'interféromètre est systématiquement affiché sur un oscilloscope dédié durant les mesures.

Maintenant que nous avons présenté les systèmes de génération et de détection on peut commencer à discuter des signaux acoustiques enregistrés sur le montage. Dans la partie suivante nous allons analyser la structure des signaux acoustiques enregistrés sur une plaque de métal.

2.2.3 Mesure de signal sur une plaque d'aluminium et traitement du signal

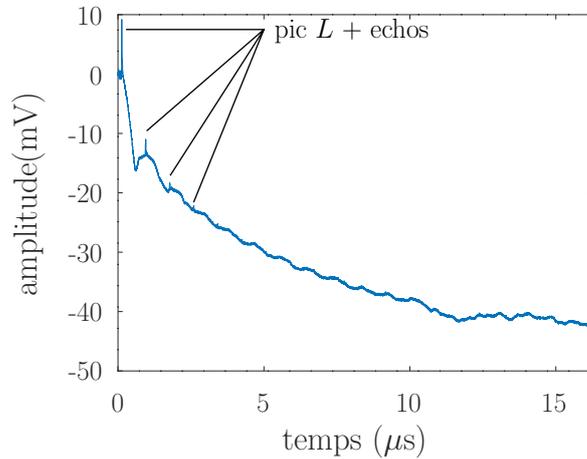


FIGURE 2.11 – Signal acoustique complet enregistré sur la plaque d'aluminium de 3 mm

En figure 2.11 on a tracé le signal acoustique enregistré sur une plaque d'aluminium de 3 mm. On peut y voir le pic longitudinal L , la composante T et le pic $3L$ déjà mis en évidence en figure 2.3. On peut également observer d'autres pics longitudinaux régulièrement espacés en temps qui correspondent aux allers-retours de la composante longitudinale dans la couche d'aluminium (voir flèches).

En figure 2.12a on peut observer le signal déjà présenté en figure 2.3 avec les composantes L , T et $3L$. En figure 2.12b on présente spécifiquement le pic longitudinal L du signal dont on peut extraire la largeur à mi-hauteur τ_a^{exp} qui est ici de 10 ns. Or, si on reprend l'équation 2.6 présentée en section 2.1.3, on obtient une largeur à mi-hauteur de l'impulsion acoustique [93] :

$$\tau_a = 2.9ns \quad (2.12)$$

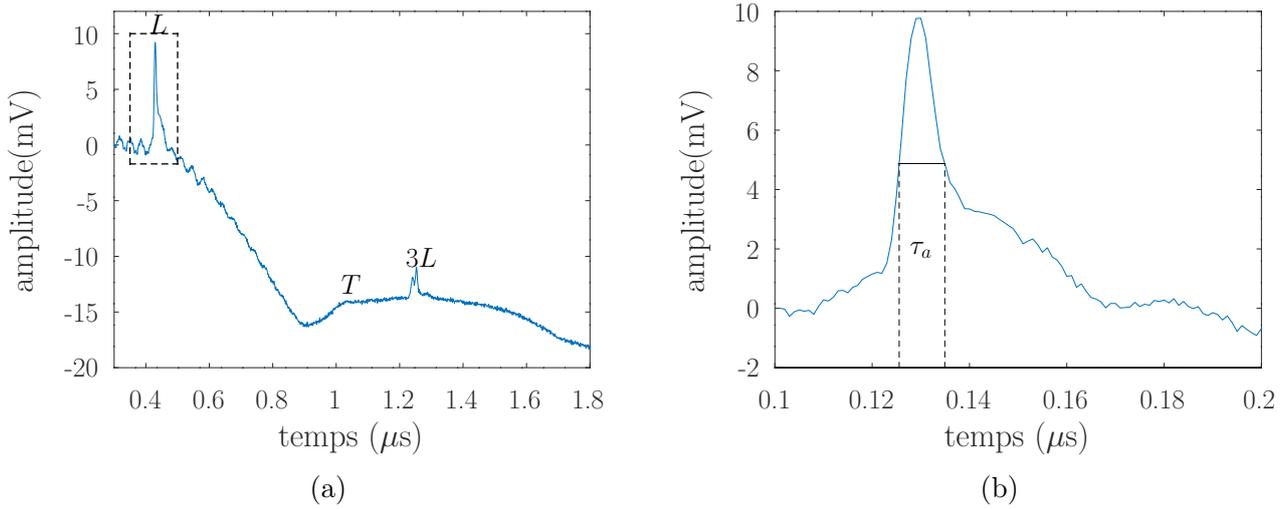


FIGURE 2.12 – a) Début d'un signal typique enregistré dans la plaque d'aluminium avec mise en évidence des différentes composantes acoustiques mentionnées en partie 2.1.1. b) Zoom sur le pic longitudinal L dans le signal enregistré sur la plaque d'aluminium

Comme précisé en section 2.1.2, la largeur temporelle de l'impulsion acoustique générée peut notamment être affectée par l'état de surface. Dans notre cas, on sait que l'état de surface de la plaque d'aluminium était dégradé. En effet, un bon état de surface est difficile à maintenir car on travaille proche du régime d'ablation. Cette dégradation va générer de la diffraction pour les longueurs d'ondes proches de la taille caractéristique des rugosités de la surface de génération.

En figure 2.13a on représente le module de la transformée de Fourier du signal complet. On se limite ici à la gamme de fréquence 0-20 MHz car au delà les composantes ont une amplitude très faible. Le pic le plus important se situe à une fréquence de 0.77 MHz. Le second pic remarquable est un pic vers 1.16 MHz d'amplitude 2 fois moins élevée que le pic à 0.77. On observe également des lobes de faibles amplitudes comprenant eux même des pics régulièrement espacés d'environ 1.2 MHz. La plaque d'aluminium dans laquelle le signal a été enregistré avait une épaisseur de 3 mm. La fréquence de résonance mi-onde f_r d'une plaque de métal de 3mm pour des ondes longitudinales se calcule comme :

$$f_r = \frac{V_L}{2d} \quad (2.13)$$

où V_L est la vitesse du son des ondes longitudinales dans le métal et d l'épaisseur de la plaque. Dans le cas de notre plaque d'aluminium, si on prend une vitesse de 6400 m/s[102], on obtient une fréquence $f_r = 1.07$ MHz. Cela veut dire que le pic fondamental sera situé à cette fréquence

dans le spectre et que les harmoniques seront distants de f_r en fréquence. Cette fréquence est assez proche du lobe à 1.16 MHz observé en figure 2.13a. On peut donc supposer qu'on observe la résonance mi-onde du métal et ses harmoniques.

En figure 2.13b on représente le module de la transformée de Fourier du pic L . Dans ce cas on observe une seule composante dominante. Cette composante a une bande passante à $1/e^2$ de 75 MHz ce qui est cohérent avec la largeur de pic τ_a mesurée dans le signal.

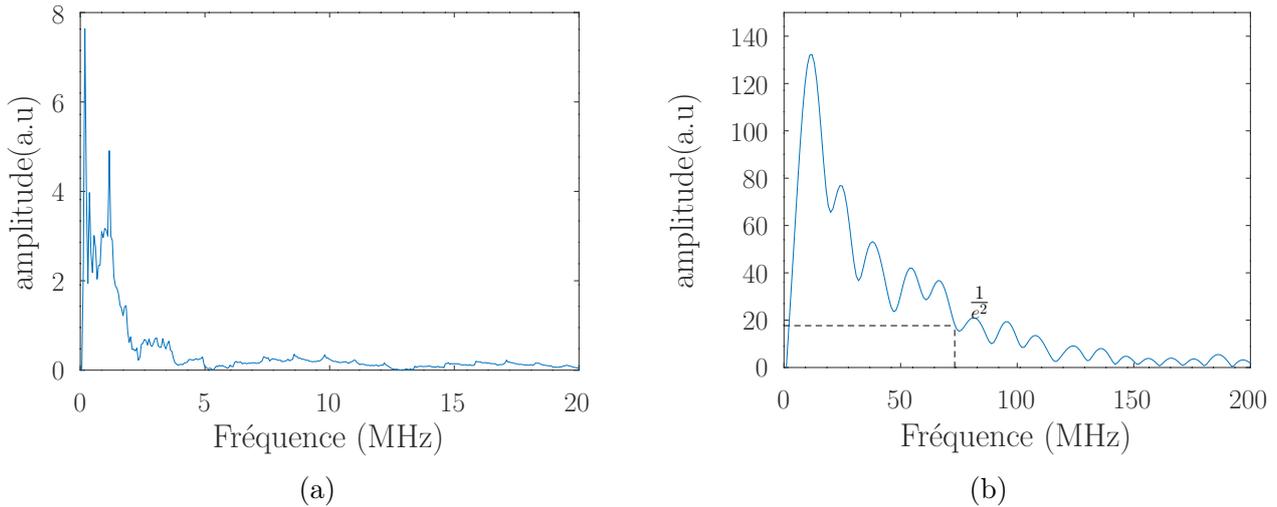


FIGURE 2.13 – a) Spectre du signal complet de 0 à 40 MHz b) Spectre du pic L dans le signal de plaque

Le pic dominant à une fréquence de 0.77 MHz en figure 2.13a ne correspond pas à une résonance mi-onde de la composante longitudinale ou de la composante transverse et nous n'avons pas pu le relier clairement à un mécanisme physique ou un type d'onde particulier. Ce n'est cependant pas un problème puisqu'on verra dans la suite que cette composante ne gênera pas notre analyse.

Maintenant qu'on a caractérisé la génération d'ondes acoustiques dans la plaque de métal seule, on peut modifier le montage expérimental afin de pouvoir enregistrer des signaux acoustiques à travers des fluides afin, plus tard, de pouvoir mesurer des signaux acoustiques à travers des sphéroïdes qui doivent être immergés. Dans la section suivante, on va commencer par présenter la modification du montage permettant les mesures dans les fluides. On présentera ensuite les mesures d'ondes acoustiques réalisées sur des couches d'eau. Pour finir on présentera notre méthode d'extraction de la vitesse du son.

2.3 Calibration et Traitement du signal

Dans cette section, nous allons présenter la version modifiée du montage permettant de réaliser des mesures dans des couches d'eau ainsi que les mesures réalisées sur des gouttes d'eau pour calibrer le système et tester la configuration de mesure en environnement liquide. Dans un premier temps, nous allons présenter la lamelle de verre qui a été fabriquée afin de permettre les mesures sur des échantillons biologiques. Après avoir présenté et analysé les signaux obtenus sur une couche d'eau nous présenterons les procédés de traitement du signal et les résultats de mesures de vitesses du son avec notre système.

2.3.1 Lamelle de verre traitée et montage pour les mesures ultrason laser dans l'eau.

Les signaux présentés dans la partie précédente ont été obtenus sur une plaque d'aluminium. Le miroir échantillon de l'interféromètre était alors la face polie supérieure de la plaque d'aluminium. Si on souhaite mesurer des signaux à travers une couche d'eau ou un sphéroïde il nous faut un nouvel élément réfléchissant qui fasse office de miroir et qu'on puisse coupler mécaniquement aux échantillons, tout en conservant une transparence suffisante pour pouvoir observer l'échantillon lors de la compression. Nous avons choisi de fabriquer une lamelle semi-réfléchissante à partir d'une lamelle couvre-objet de 12 mm de diamètre et d'environ 150 μm d'épaisseur. Afin d'obtenir un compromis optimal entre la puissance lumineuse disponible pour l'interféromètre et la lumière utilisable pour repérer l'échantillon sur le montage, la lamelle a été recouverte d'un ensemble de couches diélectriques permettant de réfléchir l'ensemble des longueurs d'onde inférieures à celle du laser He:Ne de l'interféromètre (i.e. un filtre passe-bas avec une fréquence de coupure de 633 nm).

En figure 2.14, on représente la courbe de transmission du revêtement diélectrique. Ce revêtement a été conçu et réalisé par E. Barthélémy-Mazot et B. Sassolas au Laboratoire des Matériaux Avancés (LMA-IP2I). En figure 2.15 on a représenté le montage pour la mesure ultrason laser sur une couche d'eau. La lamelle de verre est fixée à l'aide d'un tube creux sur un bras qui est lui même fixé au bâti du microscope et dont la position verticale est réglable à l'aide d'une vis micrométrique. En haut du bâti, nous avons monté la caméra CCD permettant

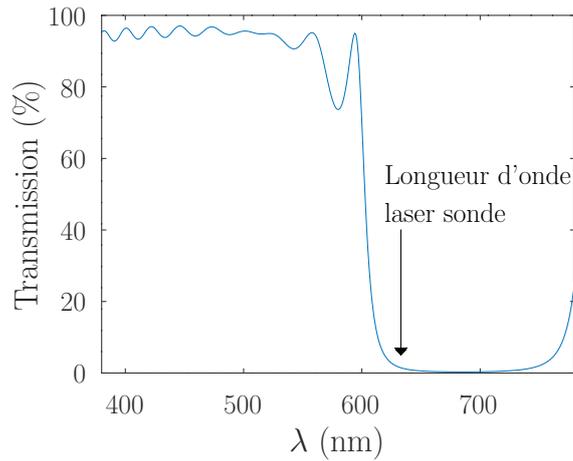


FIGURE 2.14 – courbe de transmission de la lamelle du miroir échantillon de l'interféromètre.

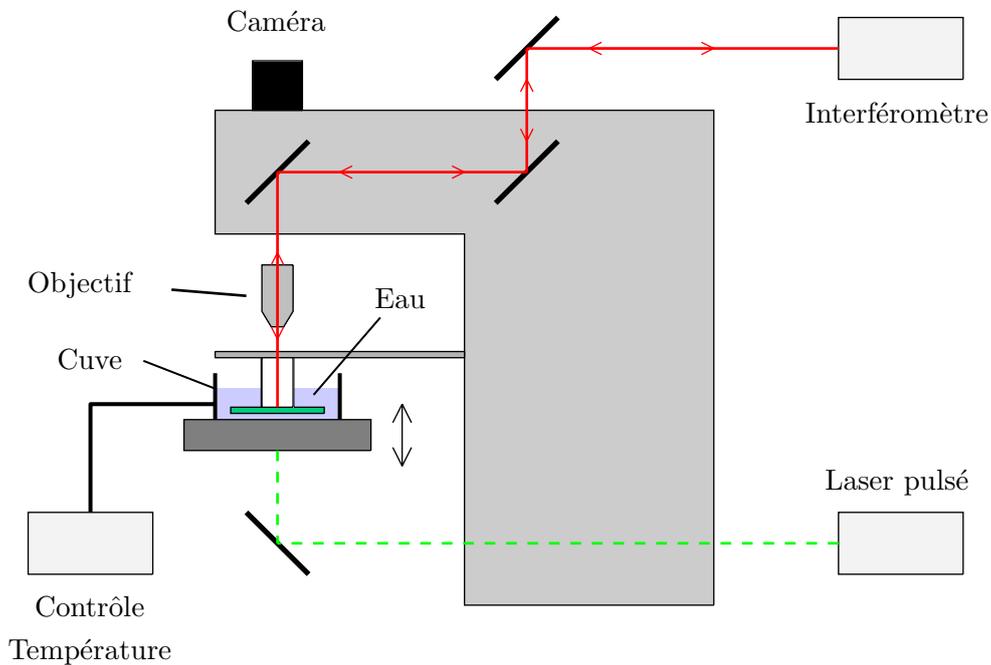


FIGURE 2.15 – Montage pour les mesures ultrasons laser dans l'eau

de visualiser l'échantillon au travers de la lamelle. On peut contrôler la position verticale de la platine sur laquelle est placée l'échantillon à grâce à un moteur Thorlabs Z825B. On a également ajouté un objectif 4X sur le trajet de la sonde pour focaliser le spot laser de l'interféromètre afin que son diamètre soit plus petit que celui de la zone de contact entre le sphéroïde et la lamelle de verre. Nous avons mesuré un diamètre de $70\ \mu\text{m}$ pour le spot sonde. Dans les travaux de compression entre des plaques parallèles, Marmottant et al. ont observé des surfaces de contact représentant plus de 75% du diamètre pour des compression de 27%. [40] Les sphéroïdes les plus petits que nous ayons mesurés ont un diamètre de $250\ \mu\text{m}$. En se basant sur ces ordres

de grandeurs on peut supposer que même pour de faibles taux de compression, une partie significative du spot recouvre la zone de contact verre/sphéroïde et non le fluide adjacent, ce qui permet de réaliser la mesure de vitesse. Il est difficile l'estimer par le biais d'un modèle de type Hertz car on ne connaît pas le module d'Young du sphéroïde, ni la force appliquée par la lamelle sur le sphéroïde. Pour pouvoir mesurer le diamètre de nos échantillons nous avons calibré notre système en plaçant une lamelle de Malassez dans le champ de la caméra.

Afin de pouvoir réguler la température nous avons conçu un système de contrôle de température pour la cuve de mesure. La température du fluide dans la cuve est mesurée par une résistance PT100. Cette dernière est connectée à un contrôleur PID fonctionnant de façon similaire à celui présenté en figure 2.10. Le contrôleur PID prend en entrée la tension aux bornes de la résistance PT100 qui est proportionnelle à sa température. Le PID mesure l'écart à la valeur de consigne et corrige l'erreur en alimentant une résistance chauffante Thorlabs HT10K collée à la paroi externe de la cuve cylindrique en aluminium dans laquelle on place les échantillons.

Dans la partie suivante on va présenter les mesures ultrasons laser réalisées sur ce montage.

2.3.2 Signaux dans une couche d'eau

Les signaux présentés dans cette partie ont été enregistrés sur des couches d'eau de différentes épaisseurs. Le but de ces expériences étant de calibrer le système de mesure.

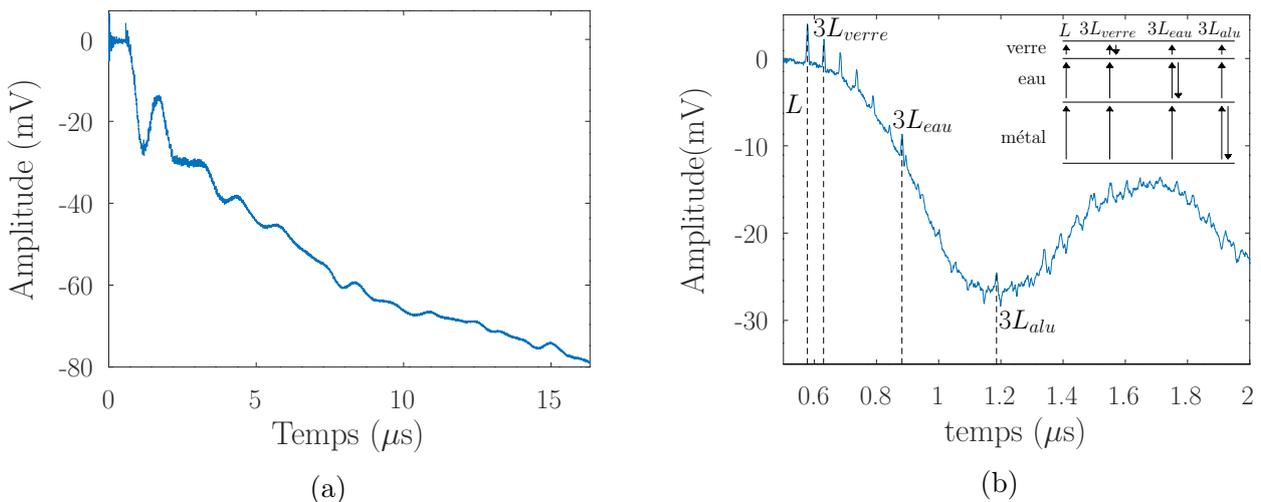


FIGURE 2.16 – (a) Signal acoustique complet enregistré à travers une couche d'eau. (b) Zoom sur les deux premières microsecondes du signal où on a mis en évidence l'ensemble des composantes longitudinales

En figure 2.16a, on présente le signal complet enregistré au travers d'une couche d'eau

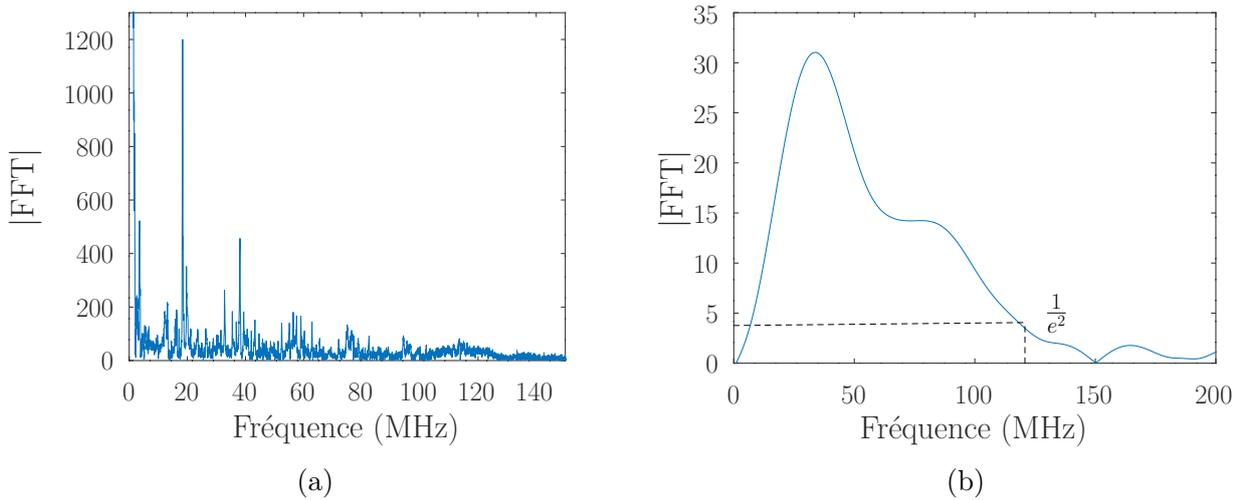


FIGURE 2.17 – (a) Module de la transformée de Fourier d'un signal acoustique enregistré à travers une couche d'eau. (b) Spectre du premier pic longitudinal sur un signal dans de l'eau à 20°C

d'environ 400 μm d'épaisseur. La forme du signal est légèrement différente de celle obtenue sur la plaque de métal seule. On peut observer des oscillations qui sont la composante la plus importante du signal complet et dont la période est proche d'une microseconde. Vers 1 μs on peut voir l'arrivée de plusieurs pics. Le premier pic longitudinal L correspond à la composante longitudinale du signal acoustique qui a traversé directement la couche de métal, la couche d'eau et la lamelle de verre après avoir été généré dans la plaque de métal. Afin d'analyser la structure de cet ensemble de pics, on représente les deux premières microsecondes du signal en figure 2.16a. On peut y voir un ensemble de pics d'amplitude décroissante, espacés de 55 ns. Cette série de pics régulièrement espacés qui suit le premier pic L est due aux allers-retours de la composante longitudinale dans la lamelle de verre. On a désigné le premier pic de cette série comme le $3L_{\text{verre}}$. Vers 0.9 μs un pic d'amplitude plus importante apparaît dans cette première série de pics. Ce pic, désigné comme $3L_{\text{eau}}$ correspond à un aller-retour supplémentaire de la composante longitudinale dans la couche d'eau. Vers 1.2 μs on observe l'arrivée d'une nouvelle série de pics de forme légèrement différente par rapport à la première. Dans cette deuxième série, les pics sont également espacés de 55 ns. Le premier pic de cette seconde série, désigné par $3L_{\text{alu}}$ correspond à un aller-retour supplémentaire dans la couche d'aluminium. Ces correspondances ont été déduites en calculant le temps de trajet de la composante longitudinale de l'onde acoustique dans chacune des couches grâce à leur épaisseur et leur vitesse du son théorique. Maintenant qu'on a analysé les signaux temporels, on peut analyser leur contenu fréquentiel.

En figure 2.17a, on représente le module de la transformée de Fourier du signal complet. Le pic le plus important est de nouveau à une fréquence de 0.77 MHz.¹ Entre 0 et 150 MHz, on peut observer un ensemble de pics séparés d'environ 18 MHz. Entre ces pics on peut distinguer des pics de plus faibles amplitudes. Les pics espacés de 18 MHz correspondent à une résonance mi-onde dans la lamelle de verre. En effet pour le verre, en supposant une vitesse du son de 5200 m/s et une épaisseur de 150 μm à partir des données fournies par le fabricant, on obtient $f_r = 17.3$ MHz, ce qui correspond à l'écart interpics observé en figure 2.17a. Donc la forme du spectre ici est principalement due à une résonance du verre. On devrait également observer des résonances associées à la couche d'eau et à la couche de métal à des fréquences fondamentales de 1.87 MHz pour l'eau et 1.16 MHz pour le métal. Mais le niveau de bruit dans le spectre les rend difficiles à identifier. On note que l'amplitude des pics espacés de 18 MHz décroît avec la fréquence jusqu'à atteindre zéro à 150 MHz. En figure 2.17b, on trace le module de la transformée de Fourier du premier pic, L . Comme dans le métal, on a un spectre constitué d'une seule composante et la bande passante à $1/e^2$ est de 120 MHz.

Dans cette section nous avons présenté le montage pour les mesures ultrasons laser sur des couches d'eau et analysé les signaux acoustiques enregistrés sur ce montage. Dans la sous-section suivante nous allons présenter la méthode d'extraction des temps de vol et son utilisation pour le calcul de la vitesse du son à partir des signaux acoustiques.

2.3.3 Spectres en énergie et décomposition en fréquence

Pour pouvoir extraire une vitesse du son on doit définir précisément le temps de vol des pics L , $3L_{alu}$, $3L_{eau}$ et $3L_{verre}$ mis en évidence dans la figure 2.16b. On souhaite également pouvoir étudier la dépendance en fréquence du temps de vol et/ou de la vitesse du son. De façon classique, on utilise un algorithme de décomposition en fréquence sur la famille des ondelettes de Morlet. L'ondelette mère de cette famille d'ondelette est définie par[103][104] :

$$\Phi_{\omega_0}(t) = e^{-\frac{t^2\omega_0^2}{2G^2}} e^{j\omega_0 t} \quad (2.14)$$

L'ondelette est une sinusoïde de pulsation ω_0 modulée en amplitude par une gaussienne de largeur $G\omega_0$. G est le paramètre qui définit le nombre de périodes du signal sous l'enveloppe

1. Son amplitude élevée nous oblige à le saturer si on souhaite observer les autres composantes du spectre.

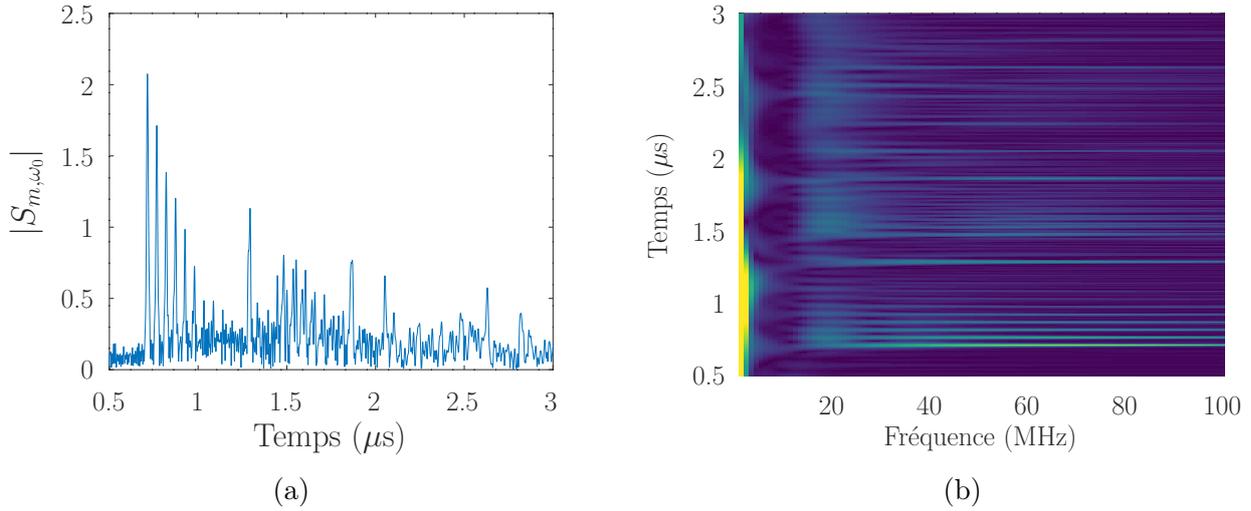


FIGURE 2.18 – (a) Répartition temporelle de l'énergie acoustique à une fréquence de 90 MHz dans un signal acoustique enregistré sur notre montage. (b) Carte des spectres de répartition temporelle de l'énergie dans le signal en fonction de la fréquence pour les 3 premières secondes du signal présenté en figure 2.16b.

gaussienne. Plus on prend de périodes sous l'enveloppe, meilleure sera la résolution fréquentielle de la démodulation mais la résolution temporelle s'en trouvera réduite. À l'inverse une valeur de G faible donnera une meilleure résolution temporelle au prix d'une faible résolution fréquentielle. G est généralement pris entre 3 et 5,[105] et dans notre cas on prend la valeur 3 car on donne la priorité à la résolution temporelle. Soit $s(t)$ notre signal acoustique, on définit $s_{m,\omega_0}(t)$ comme la convolution du signal acoustique avec une ondelette de Morlet de fréquence ω_0 :

$$s_{m,\omega_0}(t) = s(t) \circ \Phi_{\omega_0}(t) = \int s(t)\Phi_{\omega_0}(t - \tau)d\tau \quad (2.15)$$

En prenant le module de $s_{m,\omega_0}(t)$, on obtient un spectre en énergie qui représente la localisation temporelle de l'énergie acoustique à une fréquence ω_0 dans le signal.

On trace en figure 2.18a le spectre en énergie du signal présenté en figure 2.16b pour une fréquence de 90 MHz. Chaque pic du signal temporel est associé à un lobe gaussien dans le spectre en énergie, et le temps de vol d'un pic du signal temporel est défini comme le temps correspondant au maximum du lobe gaussien. On peut identifier dans le spectre les pics correspondant aux composantes L , $3L_{verre}$, $3L_{eau}$ et $3L_{metal}$ qu'on observait dans le signal brut.

En figure 2.18b on représente une carte de l'ensemble des spectres de répartition temporelle

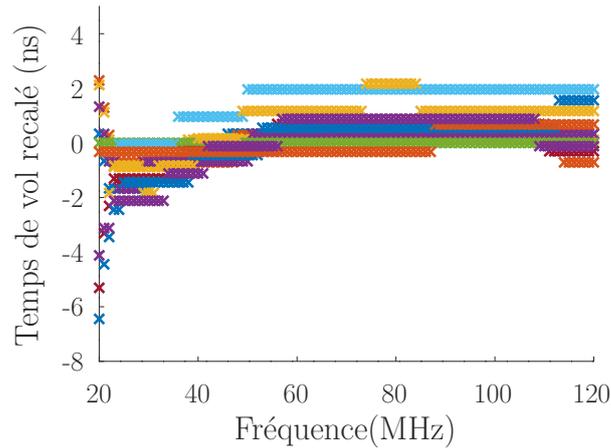


FIGURE 2.19 – Temps de vol recalés en fonction de la fréquence acoustique pour différentes positions.

de l'énergie sur l'ensemble de la bande passante (0-120 MHz). On peut voir les différents pics s'élargir et fusionner au fur et à mesure que la fréquence de l'ondelette diminue. Cela vient du fait que l'enveloppe gaussienne recouvre plusieurs échos en même temps lorsque la fréquence descend en dessous d'une certaine valeur. Dans notre cas, les pics successifs sont espacés de $\Delta t_{pic} = 55$ ns. Ici $G = 3$, donc l'ondelette devient plus large que Δt_{pic} pour une fréquence $f_{min} = 3/2\pi\Delta t_{pic} = 9$ MHz. Par sécurité, on limite l'analyse par ondelette aux fréquences supérieures à f_{min} .

Il est important de noter que les temps d'arrivée des pics L , $3L_{verre}$, $3L_{eau}$ et $3L_{metal}$ ne dépendent pas significativement de la fréquence de l'ondelette utilisée pour la convolution. Cette tendance est illustrée en figure 2.19 où on a tracé les temps de vol recalés du pic L en fonction de la fréquence à différentes positions. On a recalé les temps de vol en soustrayant le temps de vol moyen sur l'ensemble de la bande passante afin de pouvoir comparer clairement les tendances. On peut voir que le temps de vol diminue légèrement en moyenne, mais comme c'est le cas dans tous les pics cela n'aura pas d'effet sur la vitesse du son extraite. Cela signifie que le temps de vol et donc la vitesse du son du matériau ne dépend pas significativement de la fréquence de l'onde acoustique sur la gamme 20-120 MHz dans le cas des expériences réalisées sur une couche d'eau.

Maintenant qu'une méthode de mesure du temps de vol a été proposée, nous allons pouvoir relier ces temps de vol à des distances pour pouvoir extraire des vitesses du son à partir des signaux acoustiques dans la sous-section suivante.

2.3.4 Extraction de la vitesse du son

Dans la section précédente, nous avons montré comment mesurer le temps de vol. Nous pourrions en déduire immédiatement la vitesse du son si on connaissait la distance absolue entre les deux plaques. Lors de nos expériences on ne connaît pas cette distance, mais on peut contrôler précisément la distance entre 2 points de mesures, grâce au moteur qui contrôle la position verticale de la platine sur laquelle est montée la plaque de génération (voir figure 1.13). Initialement la plaque de génération et de détection sont espacées d'une distance d_0 inconnue. Si on extrait le temps de vol d'un pic, on obtient un temps de vol t_0 . On déplace ensuite la platine d'une distance Δz connue et on enregistre un second signal. Cette fois le premier pic longitudinal arrivera à un temps t_1 . On peut alors extraire la vitesse du son :

$$V = \left| \frac{\Delta z}{t_1 - t_0} \right| \quad (2.16)$$

On pourrait limiter nos mesures à deux positions et extraire la vitesse avec deux positions. Mais dans les faits on enregistre souvent 10 ou 20 points différents pour les raisons suivantes :

- Évaluer si la compression a un effet sur la vitesse du son, ce qui sera un point important lorsqu'on fera des mesures sur les sphéroïdes
- Augmenter la précision si la compression n'a pas d'effet sur la vitesse du son.

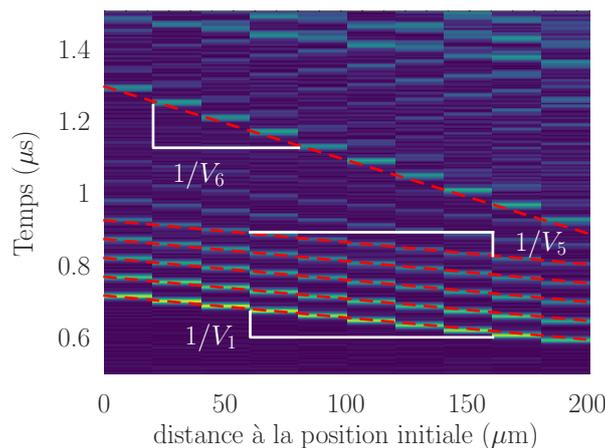


FIGURE 2.20 – Répartition temporelle d'énergie dans le signal en fonction de l'épaisseur de la couche d'eau à 90 MHz

En figure 2.20 on trace une carte représentant les spectres en énergie à 90 MHz pour différentes positions lors d'une même expérience. Sur cette carte, on voit que le temps de vol

du pic L en fonction de la position forme une droite dont l'inverse de la pente est la vitesse du son (voir pointillés rouges). Le pic $3L_{verre}$ et les échos successifs dans la lamelle de verre forment des droites parallèles à celle formée par les temps de vol de pic L en fonction de l'épaisseur. Si on désigne chaque écho par un indice j et chaque position par un indice i alors on peut calculer une vitesse du son V_j associée à chaque écho j en ajustant un polynôme d'ordre 1 sur l'ensemble des temps de vol $t_{i,j}$. La vitesse du son de l'échantillon mesurée V est alors prise comme étant la moyenne des V_j extraites des différents échos :

$$V = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} V_j \quad (2.17)$$

On voit également un écho dont la pente est plus importante que celle du pic L (voir pointillés bleus). Cet écho correspond au pic $3L_{eau}$. Puisque le pic $3L_{eau}$ fait un aller-retour de plus comparé au pic L qui fait le trajet direct, lorsque l'épaisseur augmente ou diminue, le temps de vol de pic $3L_{eau}$ varie 3 fois plus que celui du pic L . Sachant cela, on peut également extraire une vitesse du son de l'écho $3L_{eau}$. Le procédé est le même que pour extraire la vitesse du son du pic L à ceci près qu'il faut multiplier la vitesse du son obtenue par 3 pour tenir compte du fait que l'onde a parcouru 3 fois la longueur de l'échantillon.

Nous avons écrit un algorithme qui extrait l'ensemble des pics longitudinaux des spectres en énergie des signaux acoustiques enregistrés aux différentes positions. Cet algorithme nous permet de rassembler les temps de vol correspondant à un même pic j pour différentes positions i . L'algorithme détecte les droites formées par les pics dans les cartes de temps de vol en utilisant deux critères : le premier est un encadrement sur la valeur de la pente et le second est la somme des erreurs quadratiques (SEQ) de la droite ajustée sur les données. Lorsqu'on souhaite détecter les pics L , on ne conserve donc que les droites dont la pente correspond à une vitesse du son comprise entre 1000 et 2000 m/s et dont la SEQ est inférieure à un seuil fixé arbitrairement. Pour l'extraction des vitesses associées aux pics $3L$ on fixe le seuil entre 400 m/s et 1000 m/s et on multiplie par 3 la valeur extraite. On extrait généralement entre 3 et 5 vitesses grâce aux pics L , et entre 1 et 3 vitesses grâce aux pics $3L$.

Une fois qu'on a extrait l'ensemble des temps de vol $t_{i,j}$ on peut calculer la vitesse du son pour des fréquences allant de 20 à 120 MHz. En figure 2.21, on trace la moyenne et l'écart type des V_j pour l'expérience présentée en figure 2.20. Entre 50 et 120 MHz, la moyenne des

V_j pour un échantillon est stable à 1482 m/s. En dessous de 50 MHz des effets en fréquence apparaissent. L'écart type augmente et la valeur moyenne diminue. Ces changements peuvent être dûs au fait que l'ondelette recouvre plusieurs pics à ces fréquences. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la littérature n'indique aucune dépendance en fréquence de la vitesse du son pour l'eau à nos fréquences de travail.[90] On n'extrait pas de vitesses à des vitesses inférieures à 20 MHz avec cet algorithme, car en dessous de ces fréquences, l'algorithme ne fonctionne plus. On ne va pas au dessus de 120 MHz, car au delà de cette limite, le rapport signal sur bruit devient trop faible.

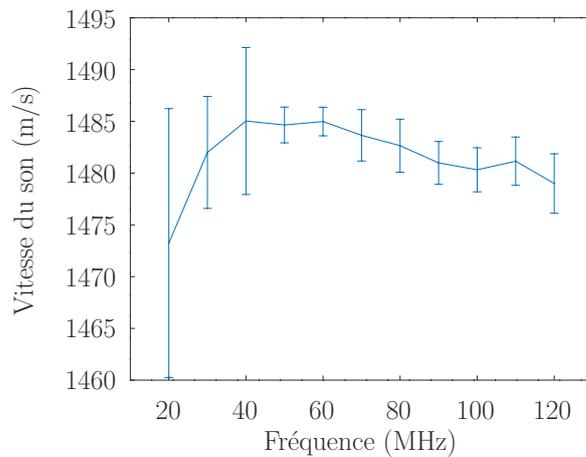


FIGURE 2.21 – Moyennes et écarts types des vitesses du son extraites sur les différents échos à différentes fréquences sur le groupe de mesures dont fait partie le signal acoustique présenté en figure 2.16b.

Afin d'affiner ces résultats, nous avons réalisé 20 mesures de vitesse du son sur des couches d'eau à 20°C, et 20 mesures à 35°C. Pour chacune de ces mesures, on peut extraire la vitesse du son V qui est la moyenne des vitesses V_j extraites sur les différents pics de chaque mesure. En figure 2.22a, on trace la moyenne et l'écart type des vitesses du son V extraites autour de 20°C et autour de 35°C sur l'ensemble des mesures. La tendance en fréquence observée sur la figure 2.21 n'est plus présente ici. Cependant on note quand même un écart type plus important à 20 et 30 MHz qu'aux autres fréquences.

Puisqu'il n'y a pas de dépendance en fréquence dans l'eau sur ces mesures moyennées, on représente un histogramme correspondant à la moyenne de ces mesures entre 20 et 120 MHz. Les barres d'erreurs sur les figures sont l'écart type de l'ensemble des valeurs mesurées. On peut y voir que la valeur moyenne pour les mesures à 20 °C est de 1484 m/s avec un écart type de 7 m/s. Pour les mesures réalisées à 35°C on obtient une moyenne de 1515 m/s et un écart

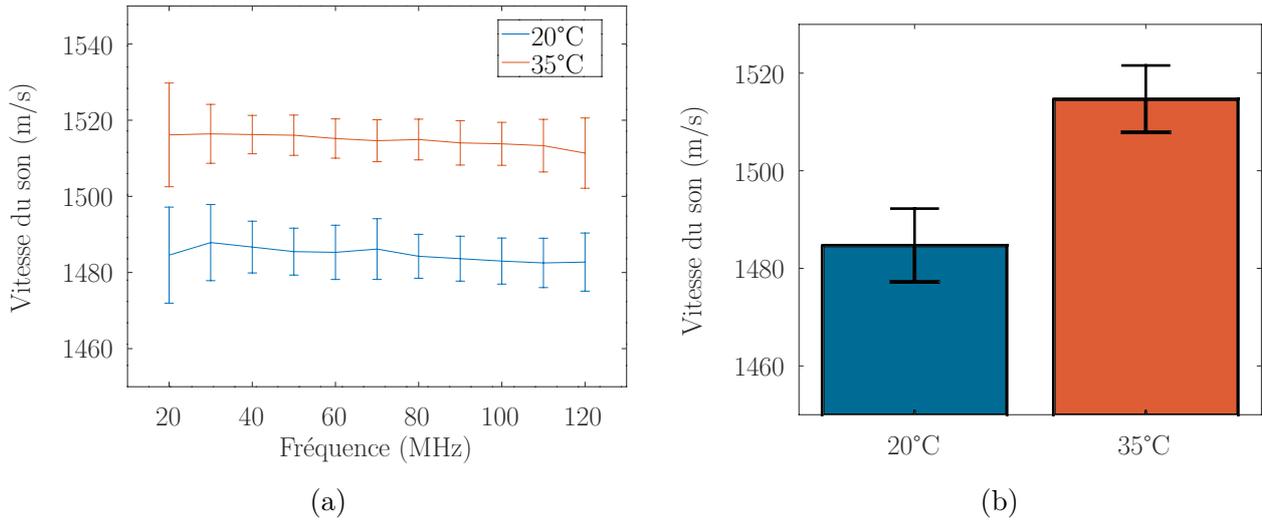


FIGURE 2.22 – (a) Moyennes et écarts types des vitesses du son dans des couches d’eau à différentes fréquences à 20°C et à 35°C (b) Moyennes et écarts types des vitesses du son à 20°C et à 35°C

type de 7 m/s. Ces deux valeurs sont compatibles avec celles trouvées dans la littérature pour de l’eau à ces températures : 1483 m/s à 20°C et 1520 m/s à 35°C.[56] Les valeurs de vitesses du son trouvées aux deux températures sur 20 mesures semblent donc satisfaisantes. Mais nous n’avons pas encore estimé l’erreur de mesure sur notre montage. C’est ce qui va faire l’objet de la section suivante.

2.3.5 Évaluation de l’erreur sur la mesure de vitesse du son

Il existe plusieurs sources d’erreur dans la mesure de vitesse du son sur le montage ultrasons laser utilisé dans cette étude. L’écart à la valeur théorique peut venir d’une erreur sur les pas en épaisseur ou une erreur sur la détection du temps d’arrivée. On évalue la vitesse en ajustant une droite sur les mesures de temps de vol $t_{i,j}$ de la forme :

$$t_{i,j}^f = a_j x_{i,j} + b_j \quad (2.18)$$

où $t_{i,j}^f$ est la valeur de la droite ajustée à la position $x_{i,j}$, a_j est la pente de la droite pour le pic j et b_j son ordonnée à l’origine. La précision de cet ajustement peut être évaluée en étudiant le comportement de la somme des erreurs quadratiques pour un pic (SEQ) :

$$SEQ_j = \sum_i (t_{i,j} - t_{i,j}^f)^2 = \sum_i (t_{i,j} - a_j x_{i,j} - b_j)^2 \quad (2.19)$$

en fonction de la variation des coefficients de la droite ajustée.[68] Dans notre cas, on fixe une tolérance arbitraire de 5 % sur la SEQ. Notre précision sera l'intervalle de valeur de a_j le plus important pour lequel la somme des erreurs quadratiques n'excède pas son minimum de plus de 5 %. Si l'intervalle est large cela signifie que le système d'acquisition est très imprécis. À l'inverse si une petite variation de a_j provoque une variation importante de la SEQ, on sait que l'ajustement est précis. En figure 2.23 on a tracé pour une carte donnant la valeur de la somme des erreurs quadratiques en fonction de a_j et de b_j . Pour la mesure réalisée ici dans de

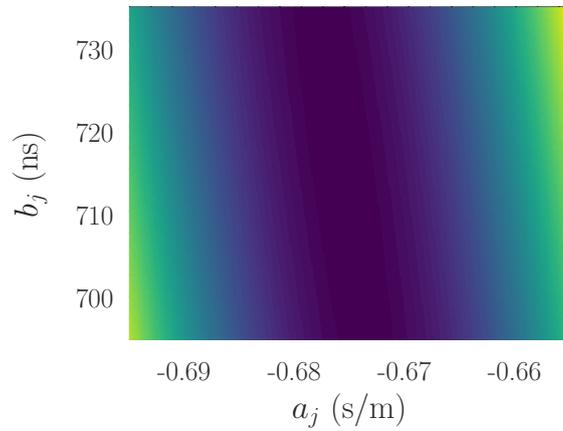


FIGURE 2.23 – Exemple de carte de l'erreur quadratique en fonction des paramètres de l'ajustement

l'eau à 20°C, on cherche l'intervalle de valeur de a pour lequel la SEQ reste inférieure à 1.05x sa valeur minimum. L'intervalle de valeur de a dépend de la valeur de b . On prend l'intervalle le plus large dans carte des valeurs pour estimer l'erreur sur la mesure de vitesse. Dans le cas de la mesure présentée ici on trouve :

$$V = 1482 \pm 5 \text{ m/s} \quad (2.20)$$

On trouve une précision de l'ajustement proche de l'écart aux valeurs présentes dans la littérature et de l'écart type dans les mesures réalisées sur 20 échantillons aux deux températures étudiées. On peut en déduire que la méthode de mesure de vitesse du son présente une précision satisfaisante dans l'eau. Dans la partie suivante nous allons étudier la transformée de Fourier afin d'obtenir des informations sur la vitesse du son pour des vitesses inférieures à 20 MHz.

2.3.6 Conclusions sur les mesures de vitesse

En utilisant un algorithme de décomposition de nos signaux basé sur les ondelettes de Morlet, on a pu extraire les temps de vol des échos présents dans les signaux acoustiques enregistrés à différentes épaisseurs de la couche d'eau entre la plaque de génération et la lamelle de détection. Grâce à ces temps de vol on a pu extraire une vitesse du son à des fréquences allant de 20 à 120 MHz. Mais à des fréquences inférieures à 40 MHz la méthode perd en précision. On dispose donc la vitesse du son sur la gamme 20-120 MHz. Maintenant que nous avons étudié l'information en temps sur les signaux nous allons nous intéresser à leur amplitude. Cela nous permettra de remonter à l'atténuation acoustique des échantillons mesurés.

2.4 Étude de l'amplitude des signaux acoustiques

Dans les sections précédentes, nous avons étudié les signaux et extrait les informations de temps de vol. Cela nous a permis d'obtenir la vitesse du son. Dans cette section, nous utilisons l'amplitude des spectres afin d'obtenir des informations sur l'atténuation acoustique. Dans un premier temps, nous allons rappeler les définitions pertinentes pour l'amplitude et l'atténuation. On présentera ensuite les méthodes d'extraction et d'analyse pour nos signaux acoustiques et on finira par présenter les résultats d'atténuation obtenus pour l'eau.

2.4.1 Rappels sur l'amplitude et l'atténuation acoustique

De manière analogue au temps de vol, on définit l'amplitude d'un pic comme l'amplitude du lobe gaussien correspondant à ce pic dans le spectre en énergie du signal à une fréquence donnée. On peut voir en figure 2.24 l'amplitude du pic L , a_L , et l'amplitude du pic $3L$, a_{3L} , pour un signal enregistré dans l'eau. Définissons maintenant l'atténuation acoustique.

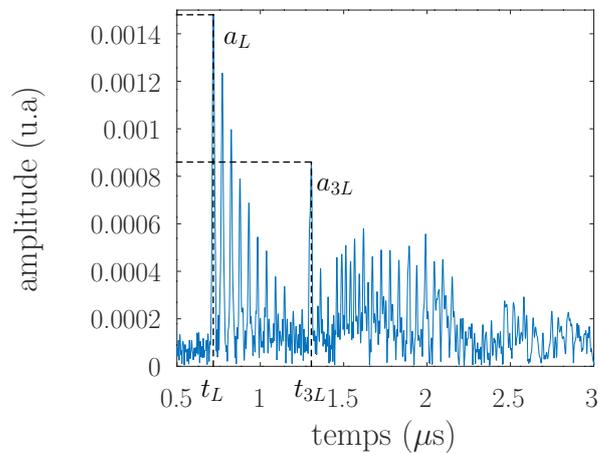


FIGURE 2.24 – Représentation de l'amplitude des pics L et $3L$ dans le spectre en énergie d'un signal acoustique enregistré dans une couche d'eau à 37°C .

Soit une onde plane progressive :

$$s(x, t) = Ae^{j(\omega t - kx)} \quad (2.21)$$

avec A l'amplitude de l'onde, ω sa pulsation et k son vecteur d'onde. Cette expression correspond à la propagation de l'onde dans un milieu sans atténuation. Une des modélisations

possibles de l'atténuation consiste à donner une valeur complexe au nombre d'onde k : [90]
 $k = k' + j\alpha$, on obtient une nouvelle expression pour $s(t)$:

$$s(x, t) = Ae^{-\alpha x} e^{j(\omega t - k'x)} \quad (2.22)$$

où α est l'atténuation acoustique du matériau considéré. Si on souhaite mesurer l'atténuation d'un milieu acoustique on peut se contenter d'utiliser un seul signal acoustique. En effet dans nos signaux acoustiques, les amplitudes a_L et a_{3L}^{eau} s'écrivent :

$$a_L = A_0 e^{-(\alpha_m d_m + \alpha_e d_e + \alpha_v d_v)} \quad (2.23)$$

$$a_{3L}^{eau} = A_0 r_{e,m} r_{e,v} e^{-(\alpha_m d_m + 3\alpha_e d_e + \alpha_v d_v)} \quad (2.24)$$

où A_0 est une amplitude déterminée par la génération laser. $r_{e,m}$ et $r_{e,v}$ sont les coefficients de réflexion aux interfaces eau/métal et eau/verre respectivement. α_m , α_e et α_v sont respectivement les atténuations acoustiques du métal, de l'eau et du verre. On peut alors extraire l'atténuation acoustique de la couche d'eau à partir du rapport de ces deux amplitudes :

$$\frac{a_{3L}}{a_L} = r_{e,m} r_{e,v} e^{-2\alpha_e d_e} \quad (2.25)$$

$$\Leftrightarrow \alpha_e = -\frac{1}{2d_e} \log\left(\frac{a_{3L}}{a_L} \frac{1}{r_{e,m} r_{e,v}}\right) \quad (2.26)$$

Ainsi, pour pouvoir extraire l'atténuation acoustique de nos différents signaux, il nous faut une méthode d'extraction de l'amplitude des pics L et $3L_{eau}$

2.4.2 Extraction des amplitudes

Dans cette sous-partie nous allons présenter le principe d'extraction de l'amplitude des pics L et $3L$ dans les signaux acoustiques.

En figure 2.25 on représente une carte des spectres de répartition temporelle de l'énergie dans les signaux enregistrés à différentes positions lors d'une même expérience. Dans cette carte, le pic L forme la première droite sur la carte. On extrait ce pic en détectant tous les maxima supérieurs à un certain seuil et en prenant le premier pic détecté dans chaque spectre, car c'est toujours le pic le plus intense. L'ensemble des pics L est indiqué par des croix bleues

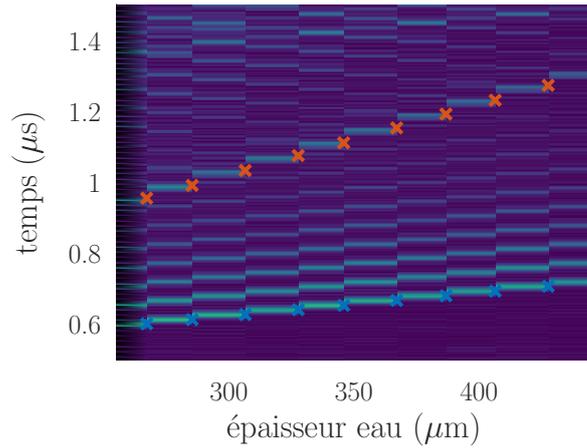


FIGURE 2.25 – Carte des spectres en énergie à 90 MHz à différentes épaisseurs dans une couche d'eau avec en croix bleues le pic L et en croix rouges le pic $3L$.

sur la figure 2.25.

On peut également reconnaître la composante $3L$ qui forme une droite de pente plus importante que le pic L . On a marqué la droite $3L$ avec des croix rouges sur la figure 2.25. Mais il faut pouvoir déterminer son amplitude automatiquement. Voici la méthode que nous avons retenue. Les temps de vol des composantes L et $3L$ s'écrivent :

$$t_L = t_m + t_e + t_v \quad (2.27)$$

$$t_{3L} = t_m + 3t_e + t_v \quad (2.28)$$

avec t_m , t_e et t_v respectivement les temps de vol dans les couches de métal, d'eau et de verre. Le temps qui sépare les pics L et $3L$ est :

$$t_{3L} - t_L = 2t_e \quad (2.29)$$

On peut utiliser les échos $3L_{verre}$ et $3L_{metal}$, t_v et t_m dans chaque signal pour obtenir t_m et t_v et les soustraire à t_L : on obtient alors une estimation de t_e . On cherche alors dans chaque spectre en énergie le maximum le plus proche de $t_L + 2t_e$ et on extrait son amplitude.

En utilisant cette technique on peut donc extraire l'atténuation acoustique de nos échantillons. Il est possible d'extraire une valeur d'atténuation en fonction de la fréquence pour chaque position où on a enregistré un signal acoustique. L'atténuation acoustique d'un échantillon est alors la moyenne des valeurs obtenues à différentes positions.

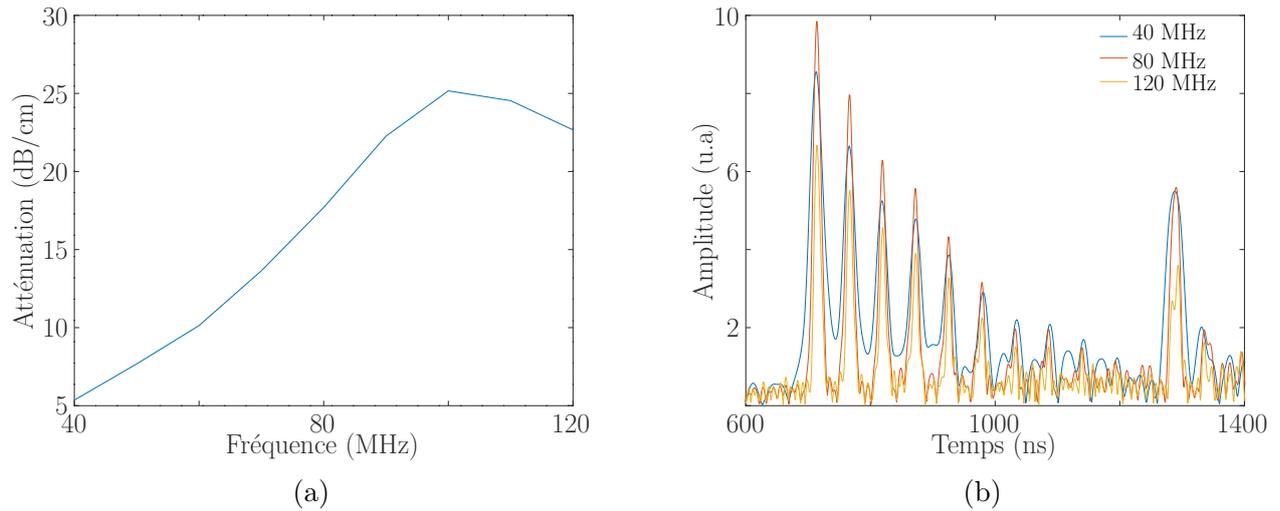


FIGURE 2.26 – a) Courbe d’atténuation mesurée sur une couche d’eau. b) Spectre de répartition temporelle de l’énergie correspondant à un signal enregistré dans une couche d’eau à 3 fréquences différentes.

2.4.3 Gamme fréquentielle de l’étude en amplitude

On peut voir en figure 2.26a que, lorsqu’on mesure l’atténuation à différentes fréquences pour un signal dans l’eau, la courbe s’infléchit nettement à partir de 90 MHz. On peut voir en figure 2.26b qu’à 100 MHz le lobe unique qui correspondait au pic $3L_{spheroid}$ vers 1300 ns dans le signal acoustique enregistré s’est divisé en deux lobes. Il devient alors difficile d’interpréter les données puisqu’on ne dispose pas de critère de choix entre ces deux lobes. Ce dédoublement se produit car la largeur de l’ondelette utilisée commence à se rapprocher de la largeur du pic qu’on cherche à analyser ce qui rend les résultats difficiles à analyser.[107] Pour cette raison, on limitera donc nos analyses aux fréquences inférieures à 90 MHz puisqu’au delà les spectres deviennent difficiles à analyser et que notre méthode ne donne pas de bons résultats. On note également qu’en dessous de 40 MHz, l’algorithme présenté précédemment pour l’extraction des pics rencontre des problèmes ce qui signifie que notre bande passante pour l’analyse en fréquence des données d’amplitudes et l’extraction de l’atténuation est limitée à la bande 40-80 MHz. Dans la sous-section suivante, nous allons présenter les résultats d’atténuation obtenus sur des couches d’eau à deux températures différentes.

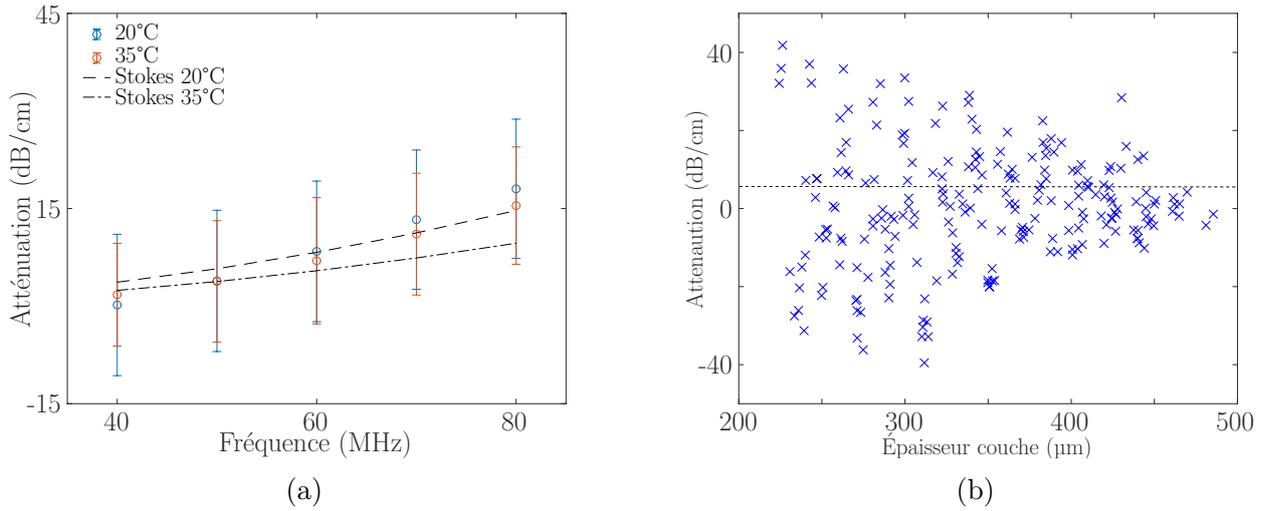


FIGURE 2.27 – (a) Moyenne et écart type de l'atténuation sur des couches d'eau à 20°C (N=19) et à 35°C (N=18) en fonction de la fréquence entre 40 et 80 MHz. (b) Atténuation acoustique en fonction de l'épaisseur de couche à 40 MHz pour l'ensemble des mesures à 20°C. Ligne pointillée : valeur théorique obtenue par la loi de Stokes.

2.4.4 Résultats d'atténuation acoustique sur des couches d'eau

Nous avons utilisé notre algorithme et notre méthode de traitement sur des signaux enregistrés sur des couches d'eau à 20°C et à 35°C. Afin de calculer l'atténuation à partir de la formule présentée en équation 2.26, il nous faut une valeur pour les coefficients de réflexion aux interfaces eau/verre et eau/métal. Pour cela nous reprenons les valeurs utilisées dans les calculs de la section précédente :

$$Z_m = 17.28 \cdot 10^6 \text{ Rayl} ; \quad Z_e = 1.480 \cdot 10^6 \text{ Rayl} ; \quad Z_v = 14.55 \cdot 10^6 \text{ Rayl} \quad (2.30)$$

$$\rightarrow r_{e,m} = 0.843 \quad \rightarrow r_{e,v} = 0.815 \quad (2.31)$$

et pour estimer l'épaisseur de la couche d'eau on utilise la relation :

$$\frac{2d_e}{V_e} = t_{3L} - t_L \rightarrow d_e = \frac{1}{2}(t_{3L} - t_L)V_e \quad (2.32)$$

En figure 2.27a, on présente les résultats d'atténuation sur plusieurs mesures effectuées sur des couches d'eau. Nous avons comparé ces mesures à la loi de Stokes pour l'atténuation

acoustique : [108][109]

$$\alpha_e = \frac{\omega\eta_L}{2\rho V^3} \quad (2.33)$$

$$\eta_L = \eta_b + 4/3\eta_s \quad (2.34)$$

avec η_L la viscosité longitudinale de l'eau, η_b la viscosité de volume l'eau et η_s la viscosité de cisaillement. On constate un écart entre la valeur théorique et nos mesures ainsi qu'une dispersion de 7 à 12 dB/cm autour de la valeur moyenne. Afin de vérifier qu'il n'y a pas de dépendance de l'atténuation par rapport à l'épaisseur on représente en figure 2.27b pour différents échantillons à 20°C l'atténuation acoustique en fonction de l'épaisseur de la couche d'eau à 40 MHz. On peut voir que la dispersion des valeurs diminue avec l'épaisseur de couche, ce qui semble logique puisque une épaisseur de couche plus importante implique une différence d'amplitude plus importante et donc un meilleur rapport signal sur bruit.

Si on se fie aux figures 2.27a et 2.27b on peut conclure que la mesure est globalement fiable entre 40 et 80 MHz et que la dispersion provient des variations induites à la fois par le système de mesure et l'algorithme de traitement. Dans le chapitre suivant, on va donc pouvoir appliquer cette méthode aux mesures réalisées sur les sphéroïdes multicellulaires tumoraux en tenant compte des contraintes exposées précédemment.

2.5 Conclusions générales

Dans ce chapitre nous avons présenté le montage expérimental. La méthode de génération acoustique a été présentée et sa mise en œuvre sur le montage expérimental a été détaillée. En utilisant un laser Nd:YAG d'une longueur d'onde de 532 nm on génère des impulsions acoustiques d'une largeur temporelle d'environ 10 ns. On détecte ces impulsions acoustiques à l'aide d'un interféromètre de Michelson stabilisé. En insérant une couche d'eau entre la plaque d'aluminium utilisée pour la génération et le miroir utilisé pour mesurer le déplacement à l'aide de l'interféromètre de Michelson, on a pu mesurer la vitesse du son dans cette couche d'eau. On a pu extraire la vitesse du son à des fréquences allant de 20 à 120 MHz. Pour cela on a utilisé un algorithme de décomposition sur la famille d'ondelette de Morlet. Ces mesures ont montré que notre système permettait de mesurer des valeurs de vitesse du son dans l'eau en accord avec la littérature. Nous avons également étudié l'amplitude de nos signaux ce qui nous a permis d'extraire une atténuation acoustique entre 40 et 80 MHz. Dans le chapitre suivant nous allons mettre en œuvre les méthodes expérimentales et le traitement du signal présentés ici pour mesurer la vitesse du son et l'atténuation dans des sphéroïdes multicellulaires tumoraux.

CHAPITRE 3

Analyse de Sphéroïdes Multicellulaires

Dans cette partie, nous allons présenter en premier lieu les sphéroïdes multicellulaires tumoraux utilisés pour cette étude. On exposera les points communs et les différences entre les deux lignées que nous avons étudiées et on discutera de leur structure et des potentielles implications de cette dernière sur le comportement mécanique des sphéroïdes. On présentera ensuite les résultats des mesures réalisées avec le montage présenté dans le chapitre précédent. Nous allons ensuite présenter les résultats des mesures de vitesses du son réalisées sur un sphéroïde. Afin d'analyser l'impact de la variabilité biologique des échantillons sur la précision des mesures, nous considérerons des résultats obtenus sur un sphéroïde puis sur la moyenne de nombreuses mesures. Afin de valider notre approche, nous analyserons l'impact potentiel du taux de compression sur la vitesse. Pour cela nous évaluerons également le volume des sphéroïdes lors de la compression. Nous présenterons enfin des images enregistrées en vue de dessus afin de suivre l'évolution du diamètre des agrégats lors de la compression et lors de la décompression. Pour finir nous présenterons les résultats d'atténuation acoustique dans les sphéroïdes.

3.1 Sphéroïdes Multicellulaires Tumoraux

Dans cette section, on présentera d'abord les deux types d'échantillons élaborés à partir des lignées cellulaires étudiées. Leurs propriétés générales seront abordées et les différences existant entre les deux types cellulaires seront présentées. On présentera ensuite la méthode de culture cellulaire utilisée pour la préparation des échantillons.

3.1.1 Structure des sphéroïdes et des lignées cellulaires étudiées

Nous avons réalisé nos mesures sur des sphéroïdes fabriqués à partir des lignées cellulaires HCT116 et HT29. Ce sont deux lignées épithéliales d'adénocarcinomes issues de l'être humain et impliquées dans le développement du cancer colorectal.[110][111] Dans notre étude on s'intéressera principalement aux différences de comportement mécanique entre les deux lignées. On va donc présenter les différences physiologiques et structurelles trouvées dans la littérature afin d'expliquer les choix de modélisation mécanique qui seront faits par la suite.

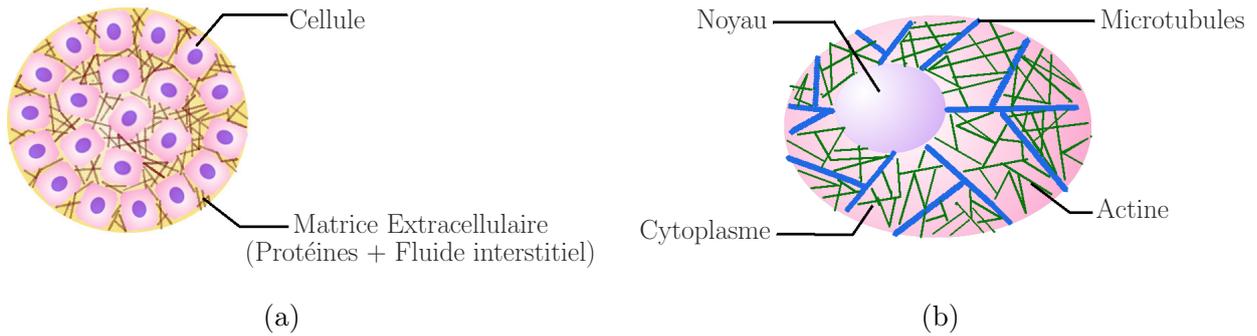


FIGURE 3.1 – illustration de la structure globale de a) un sphéroïde et b) une cellule.

3.1.2 Structure des sphéroïdes

Si on souhaite comprendre les choix de modélisation des sphéroïdes multicellulaires tumoraux, il est important de connaître leur structure afin de déterminer les éléments pouvant influencer sur leur réponse mécanique. Les sphéroïdes ont deux composants principaux : les cellules et la matrice extracellulaire. Les cellules peuvent être vues comme des poches de fluides contenant des protéines, des organelles et des biopolymères formant le cytosquelette. Dans ces poches beaucoup de composants cellulaires peuvent participer à une réponse mécanique complexe. Certaines protéines, telles que l'actine et la tubuline, forment des structures filamenteuses pour créer le cytosquelette. Ainsi, les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules vont jouer un rôle prépondérant dans la réponse mécanique de la cellule individuelle.[2] La matrice extracellulaire est également un réseau issu de l'assemblage de différents polymères dans lequel les cellules évoluent. Le composant principal de la matrice extracellulaire est le collagène qui constitue la base de sa structure. Les Glycosaminoglycans (GAGs) jouent également un rôle majoritaire dans la matrice extracellulaire. Ces larges chaînes carbonées négativement chargées vont absorber de grandes quantités d'eau et leur dilatation va occuper l'espace tout en offrant à la structure globale une résistance aux efforts et en régulant les processus de diffusion des molécules dans le fluide interstitiel.[112][113] La fibrilline et l'élastine sont également des composants de la matrice extracellulaire qui confèrent aux tissus leur élasticité. C'est grâce à ces protéines que les tissus retrouvent leur forme après une déformation.[112] Pour les agrégats, la matrice extracellulaire est généralement considérée en première approche comme une matrice de collagène saturée de fluide interstitiel.

Maintenant qu'on a listé les composants principaux des sphéroïdes il faut se poser la ques-

tion de la relation entre ces composants. Les cellules sont reliées entre elle par des jonctions cellules-cellules formées principalement par les protéines d'adhésion cellulaires, les cadhérines, les intégrines et les sélectines.[112] Les cellules sont également reliées à la matrice extracellulaire par un complexe de protéines qui relie le cytosquelette des cellules au réseau de collagène. La plus connue de ces protéines est la fibronectine qui joue un rôle primordial dans l'adhésion des cellules individuelles au microenvironnement. Donc pour résumer leur structure globale, les sphéroïdes sont constitués de cellules qui peuvent être vues comme des sacs de fluides plus ou moins visqueux. Ces sacs de fluide sont reliés entre eux de façon plus ou moins compacte par des jonctions cellules-cellules. Les cellules sont également connectées à la matrice extracellulaire qu'on considèrera ici comme un réseau de collagène relié aux cellules par des complexes de protéines et saturée par du fluide interstitiel.

Cette structure en réseau de biopolymères connectés par des jonctions et baignant dans du fluide est assez semblable à un celle d'un gel. C'est pour cette raison que les cellules et les tissus sont souvent décrits comme des systèmes viscoélastiques, c'est-à-dire ayant une réponse partiellement visqueuse et partiellement élastique. Le fait que le fluide interstitiel puisse s'écouler hors du tissu et l'effet de cet écoulement sur la réponse mécanique de l'ensemble a aussi donné lieu à des modèles poroélastiques qui décrivent la réponse d'un système constitué d'un squelette élastique baignant dans un fluide. Ces modèles seront présentés plus loin dans ce chapitre. La structure très hétérogène des tissus a également une influence sur la réponse mécanique qui se traduit souvent par l'apparition de loi de puissance pour les modules mécaniques, qui seront également abordées dans ce chapitre.[46]

3.1.3 Différences entre les lignées HCT116 et HT29

Une des différences importantes entre les deux lignées de cellules sur le plan fonctionnel est l'invasivité des tumeurs formées par ces dernières, c'est-à-dire la propension des cellules individuelles à se détacher de l'ensemble pour former des métastases. On quantifie ce comportement en affectant un grade de potentiel métastatique aux cellules. Les cellules HCT116 forment des tumeurs à fort potentiel métastatique (grade IV) alors que les HT29 ont un potentiel métastatique plus faible (grade I).[2] Les cellules HT29 forment plus de jonctions cellules-cellules que les cellules HCT116, ce qui résulte en une structure plus compacte des sphéroïdes HT29.[114]

Une expérience pour illustrer cela consiste à poser les agrégats sur une plaque recouverte de collagène,[32] très présent dans l'environnement *in vivo* des tumeurs. La mise en contact des tumeurs avec cette couche de collagène simule la configuration des tumeurs *in vivo*. Si la tumeur est très invasive alors les cellules vont s'étaler rapidement sur la surface recouverte de collagène. Les cellules provenant de tumeurs peu invasives auront tendance à rester groupées. Dans cette situation les sphéroïdes HT29 s'étalent beaucoup moins vite que les sphéroïdes HCT116, ce qui illustre la plus grande cohésivité des cellules. Ces deux lignées présentent également une réponse différente aux traitements thérapeutiques.[32] Par ailleurs, on sait que si on bloque ou dégrade les jonctions cellules-cellules dans les sphéroïdes, l'efficacité des traitements anticancéreux augmente car les molécules pénètrent mieux dans l'agrégat de cellules.[115] Cela suggère que la cohésivité des sphéroïdes joue un rôle primordial dans la réponse aux agents thérapeutiques et de manière plus générale dans la détermination de l'évolution biologique des tumeurs.

La différence entre les deux lignées n'intervient pas seulement lors de leur organisation en sphéroïdes. Les cellules uniques présentent également des différences. Une étude comparative des propriétés mécaniques des cellules HT29 et SW480 (une lignée de grade IV, proche des HCT116) a montré grâce à des expériences de microaspiration que les cellules de grade IV (SW480) étaient jusqu'à 5 fois plus déformables que les cellules HT29.[2] Cette différence de comportement mécanique est liée au fait que le rapport entre la densité d'actine et la densité de microtubules est plus élevé chez les cellules HT29.[2] En résumé, les cellules HT29 forment des agrégats plus compacts constitués de cellules moins déformables que la lignée HCT116.

3.1.4 Protocole de préparation et de mise en place sur le montage expérimental

Le point de départ de la préparation des échantillons est une flasque de culture dans laquelle on cultive les cellules sous atmosphère contrôlée à une température de 37°C et une concentration de CO₂ de 5%. Cette flasque contient 5 mL de milieu de culture DMEM complété avec 10% sérum de veau foetal (FBS) et 1% de Pénicilline/streptomycine. Les cellules se divisent et adhèrent au fond de la flasque. Lorsqu'on souhaite utiliser les cellules pour fabriquer des sphéroïdes, on utilise alors de la trypsine pour les décoller de la flasque. Après plusieurs rinçages

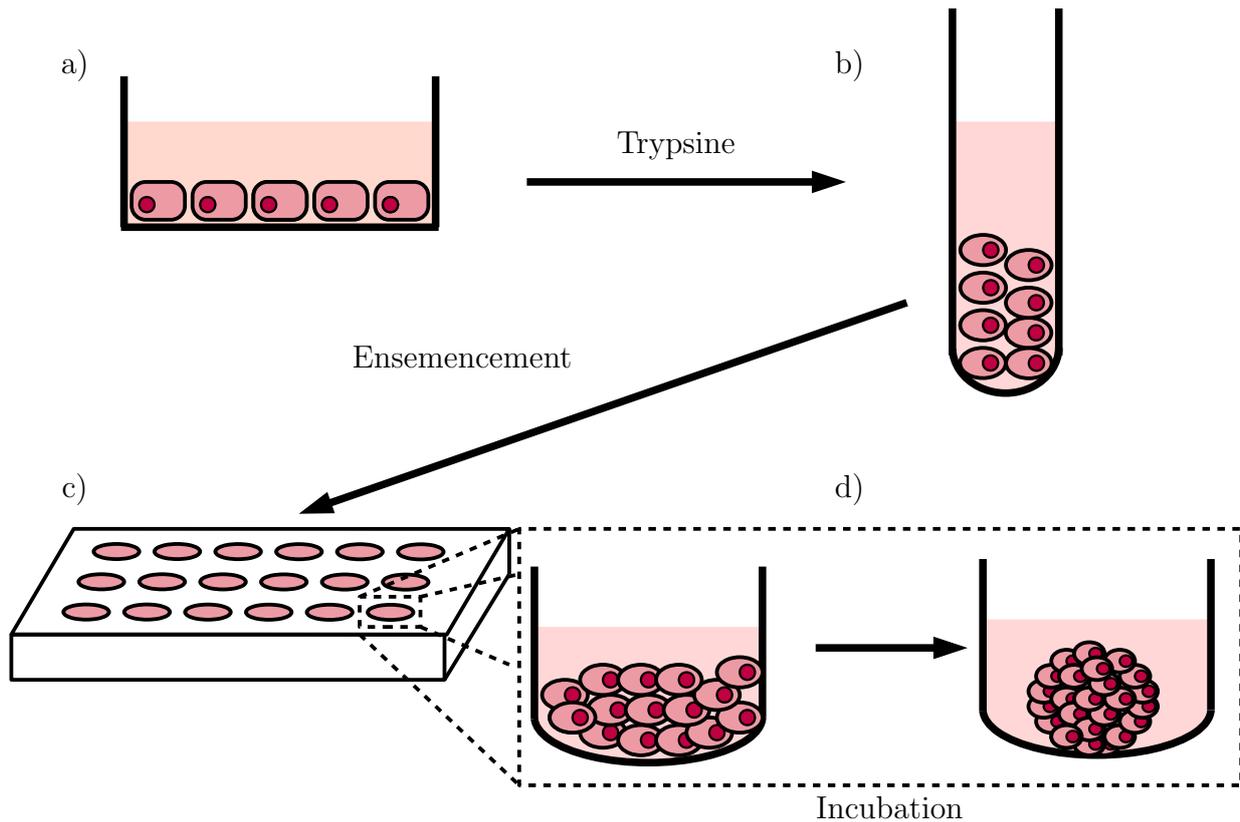


FIGURE 3.2 – Illustration de la préparation des échantillons. a) Cellules en culture en environnement contrôlé (37 °C, 5% CO₂). b) Récupération dans une éprouvette après trypsinisation et rinçage. c) Répartition dans des puits individuels à fond anti adhésif à une concentration de 2400 cellules/mL. d) Agrégation des cellules en sphéroïdes après 3 à 7 jours d’incubation en environnement contrôlé.

au tampon phosphate salin (PBS), on obtient une solution de cellules concentrée. On va alors diluer cette solution pour obtenir une concentration de 2400 cellules/mL. On répartit ensuite cette solution dans des plaques 96-puits à fonds ronds. Ces fonds sont recouverts d’une couche empêchant l’adhésion des cellules. Chaque puits contient 200 μ L de solution de cellules à 2400 cellules/mL. Les cellules vont se regrouper au fond du puits et la couche anti-adhésive va favoriser leur organisation en agrégats. Une fois la solution de cellules répartie dans les différents puits, la plaque est placée dans un incubateur pendant 3 à 7 jours.[32] Les différentes étapes de ce processus sont illustrées en figure 3.2.

Une fois que les sphéroïdes font au minimum 200 μ m de diamètre, on les transfère de la plaque de culture vers la cuve où on va réaliser les expériences. Étant donné qu’on ne peut pas contrôler la concentration de CO₂, on utilise un milieu de culture contenant de l’acide 4-

(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) qui permet de s'affranchir de cette contrainte. Pour cette raison, doit attendre 30 minutes après le transfert des sphéroïdes dans la cuve avant de commencer les mesures afin que les cellules puissent s'adapter au changement de milieu.[116]

Maintenant que les deux lignées, leur structure et leur mode de préparation ont été présentés, on va pouvoir présenter les résultats de mesures de vitesses du son sur des sphéroïdes de ces deux lignées.

3.2 Estimation de la vitesse du son dans les sphéroïdes

Dans cette partie nous allons d'abord analyser qualitativement les signaux ultrasonores mesurés à travers les sphéroïdes cellulaires formés à partir des lignées HCT116 et HT29. On va ensuite présenter les résultats de mesures de vitesse du son en utilisant la méthode basée sur la décomposition sur une famille d'ondelette de Morlet et l'extraction du temps de vol. On commencera d'abord par présenter les résultats de vitesse du son pour un seul agrégat. On présentera ensuite des mesures de vitesses sur les deux lignées pour des fréquences allant de 20 à 120 MHz, ce qui correspond à la bande passante à $1/e^2$ du contenu fréquentiel de nos signaux. Notre mesure de vitesse est basée sur une compression des sphéroïdes. On présentera donc également des résultats de vitesses du son sur des cycles compression/décompression et de mesures de diamètres équatoriaux des agrégats, afin de vérifier que le volume des agrégats ne varie pas et que la compression ne modifie pas les propriétés acoustiques des sphéroïdes.

3.2.1 Analyse des signaux acoustiques

Sur les figures 3.3a et 3.3b, on a tracé un signal acoustique enregistré dans un sphéroïde tumoral. On peut voir que le signal acoustique est très proche de ceux enregistrés dans l'eau et présentés dans le chapitre précédent. On peut y retrouver les composantes qu'on avait identifiées dans les signaux enregistrés dans l'eau : L , $3L_{verre}$, $3L_{metal}$ et $3L_{sphero}$ qui correspond cette fois à 3 trajets dans le sphéroïde. On voit également que les oscillations avec une période de l'ordre de 1 μ s sont aussi présentes dans les signaux enregistrés à travers les sphéroïdes. Comme pour les signaux enregistrés dans les couches d'eau, la fréquence de ces oscillations

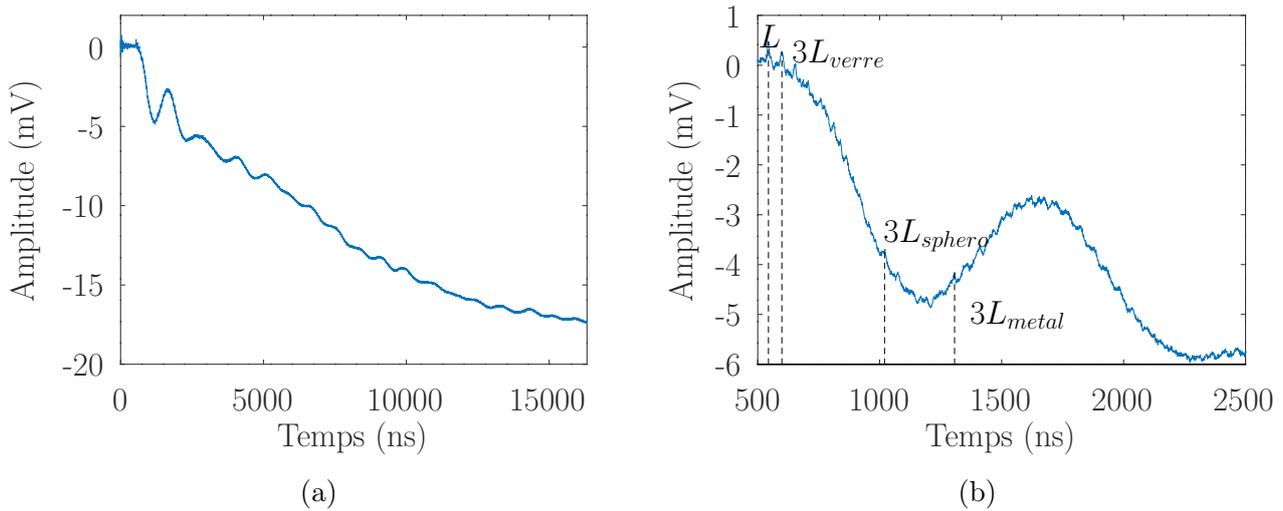


FIGURE 3.3 – Signal acoustique enregistré dans un sphéroïde : a) Signal complet et b) Zoom sur les 2.5 premières microsecondes.

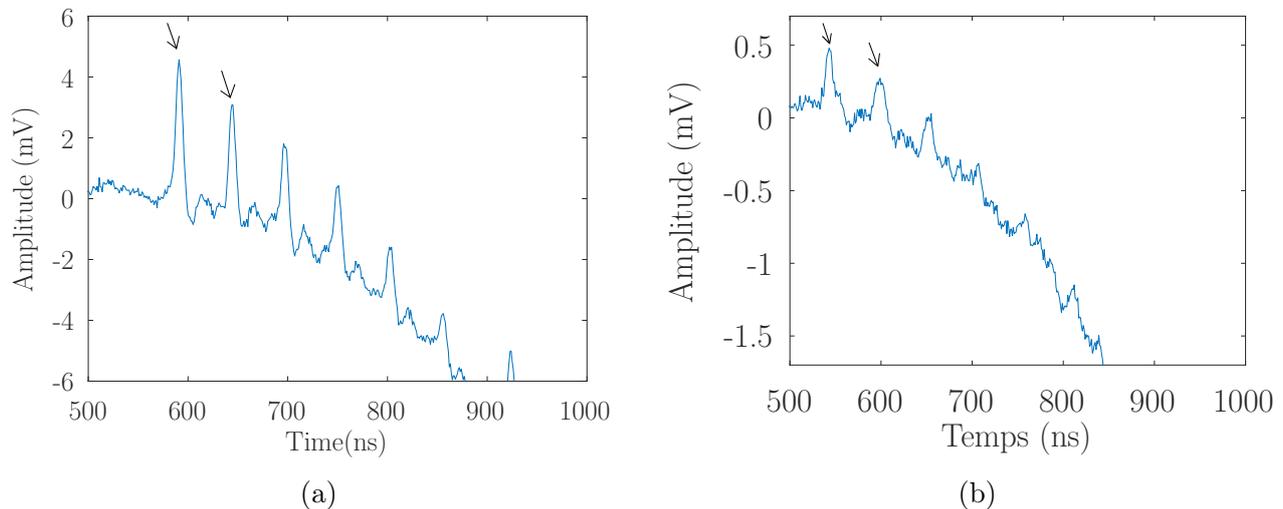


FIGURE 3.4 – Comparaison entre un signal acoustique enregistré à travers a) une couche d'eau et b) à travers un sphéroïde.

et leur amplitude augmente au fur et à mesure que l'espacement entre les plaques diminue. Comparons les structures visibles entre les signaux enregistrés à travers une couche d'eau et ceux enregistrés à travers des sphéroïdes, tracés en figures 3.4a et 3.4b respectivement. On constate que les pics ont une forme similaire dans les deux cas mais que dans le cas du sphéroïde le rapport signal sur bruit est plus faible. Ainsi dans l'eau on peut distinguer 5 pics nets alors que dans le sphéroïde, le quatrième pic a déjà une amplitude proche de celle du bruit. On constate également que les pics s'élargissent dans le cas du sphéroïde. On va donc analyser le contenu fréquentiel du pic L et du pic $3L$ afin d'étudier cet effet sur un ensemble d'échantillons et savoir s'il s'agit d'un artefact ou d'une tendance générale.

Pour analyser cela, comparons le module de la transformée de Fourier d'un signal typique enregistré dans un sphéroïde avec le spectre du signal enregistré dans l'eau. On trace en figure

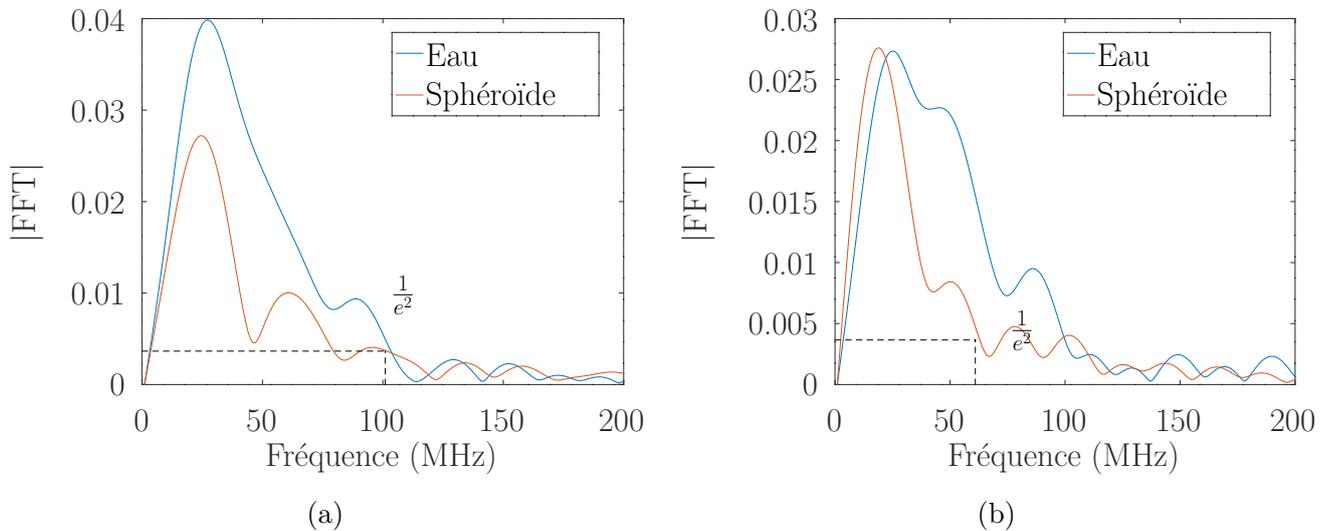


FIGURE 3.5 – a) Spectre de la composante L du signal acoustique enregistré dans l'eau (bleu) et dans le sphéroïde (rouge). b) Spectre de la composante $3L_{verre}$ du signal acoustique enregistré dans l'eau (bleu) et dans le sphéroïde (rouge).

3.5a le module de la transformée de Fourier des composantes L pour un signal dans l'eau et dans un sphéroïde. On peut voir que le signal enregistré sur le sphéroïde a un spectre légèrement différent de celui du signal de l'eau, avec un contenu un peu plus basse fréquence. En figure 3.5b, on trace le module de transformée de Fourier du deuxième pic dans les deux signaux présentés en figure 3.4 (voir flèches). On peut constater que la bande passante à $1/e^2$ diminue de 100 à 60 MHz pour le second pic après 3 trajets dans la lamelle de verre. Cela signifie que lors de la réflexion une partie du contenu haute fréquence du signal est perdu, ce qui est probablement dû à la nature irrégulière de l'interface entre la lamelle de verre et le sphéroïde.

On souhaite savoir si cette différence observée entre ces deux signaux est significative statistiquement. Pour cela on fait la moyenne des modules des transformées de Fourier du pic L pour l'ensemble des sphéroïdes HCT116 et HT29. On compare ces spectres moyens pour les deux lignées à ceux enregistrés dans l'eau à 35°C. En figure 3.6a, on ne constate aucune différence entre les spectres moyens de l'eau à 37 °C et ceux des deux lignées.

En figure 3.6b, on compare cette fois les spectres moyens du pic L pour des sphéroïdes HCT116 et HT29 comprimés de 100 μm . On peut voir que les spectres moyens pour les sphéroïdes comprimés et non comprimés sont similaires ce qui suggère que la compression n'a pas d'effet sur le contenu fréquentiel de la composante L dans les sphéroïdes.

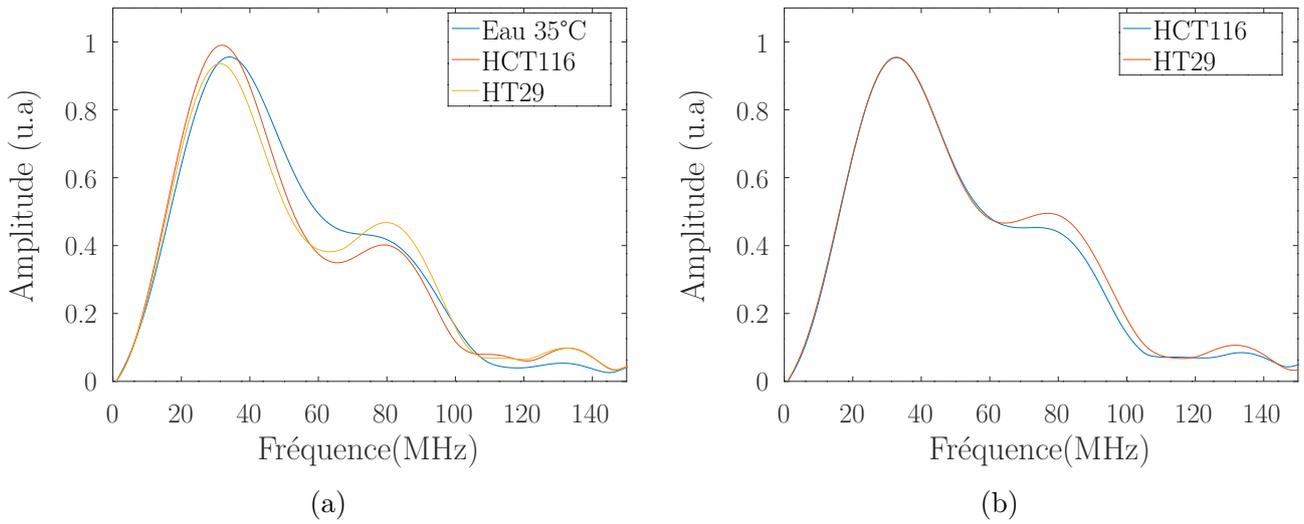


FIGURE 3.6 – a) Moyenne du module des transformées de Fourier du pic L pour de l'eau à 37 °C et pour des sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29. b) Moyenne du module des transformées de Fourier du pic L pour des sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29, comprimés.

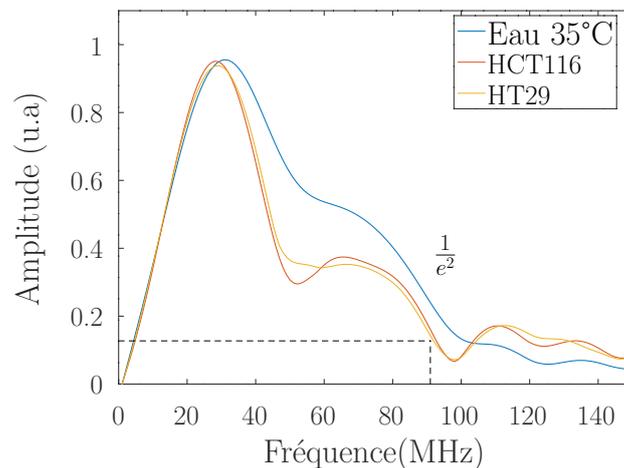


FIGURE 3.7 – moyenne du module des transformées de Fourier du pic $3L_{verre}$ pour des sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29.

En figure 3.7, on trace les spectres moyens pour le pic $3L_{verre}$ sur des échantillons d'eau et des sphéroïdes HCT116 et HT29. On peut constater que pour les deux lignées le contenu fréquentiel du second pic diminue à haute fréquence. En revanche, on ne constate pas de différence entre les deux lignées. Cela confirme la tendance observée en figure 3.5b.

On a montré dans cette sous-section que les échos dûs aux réflexions multiples dans la lamelle de verre voyaient leur contenu fréquentiel varier par rapport au pic initial dans les sphéroïdes. On a cependant aussi montré que le contenu fréquentiel des différents échos dans la lamelle de verre ne variait pas avec la position. Notre algorithme d'ondelette reste donc applicable aux signaux enregistrés dans les sphéroïdes. Dans la sous-section suivante nous allons appliquer

notre traitement du signal à un signal typique enregistré sur un sphéroïde tumoral.

3.2.2 Traitement du signal acoustique enregistré dans un sphéroïde multicellulaire tumoral

Nous allons d'abord étudier l'évolution d'un spectre en énergie pour un signal typique en fonction de la fréquence utilisée dans l'algorithme de décomposition en ondelette. Nous allons ensuite présenter les résultats d'extraction du temps de vol pour des signaux enregistrés sur un sphéroïde.

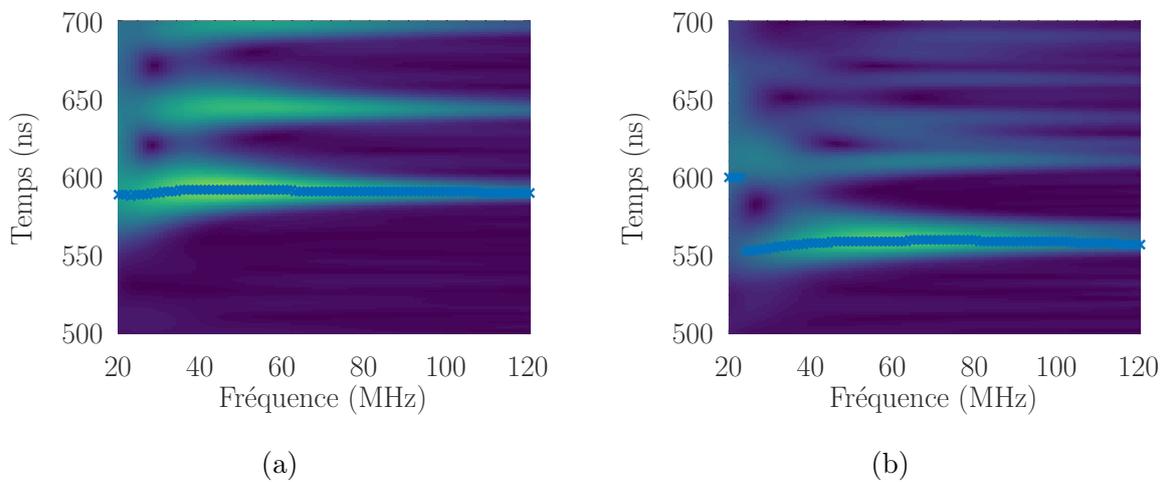


FIGURE 3.8 – Spectres en énergie pour un signal enregistré a) dans l'eau et b) dans un sphéroïde. Les croix bleues indiquent le temps de vol de la composante L du signal acoustique.

En figures 3.8a et 3.8b respectivement, on trace une carte du spectre en énergie du signal dans l'eau a) et du signal enregistré dans un sphéroïde entre 20 et 120 MHz b). On a également représenté par des croix bleues le temps de vol de la composante L du signal à chaque fréquence. On peut voir que le temps de vol de la composante L suit la même tendance en fréquence dans les deux cas. En figure 3.9 on trace les temps de vol recalés des pics L en fonction de la fréquence pour l'eau et pour le sphéroïde. On recalcule en soustrayant le temps de vol moyen sur l'ensemble des fréquences étudiées pour pouvoir comparer les deux tendances obtenues. En dessous de 40 MHz les lobes dans les spectres changent de forme et le maximum détecté pour le premier pic varie en conséquence. Mais la tendance est globalement la même pour le sphéroïde et pour l'eau. L'ensemble des signaux obtenus suit globalement cette tendance et comme on a pu le voir sur l'eau cela n'affecte que peu la valeur moyenne sur plusieurs mesures. Cela veut dire que cet artefact dû au traitement du signal ne nous empêche pas d'extraire une vitesse du son

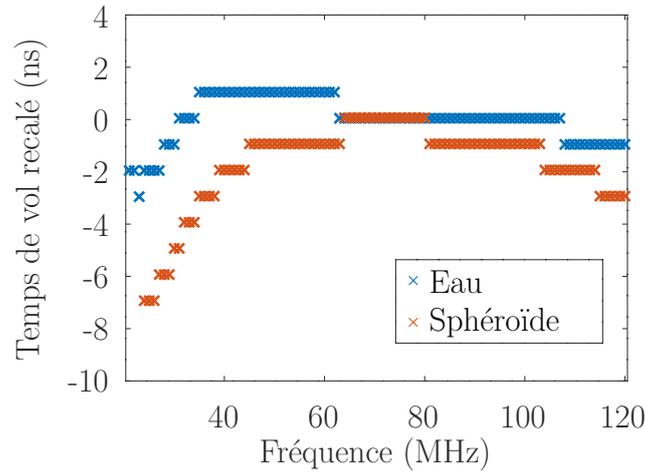


FIGURE 3.9 – Temps de vol recalés pour l’eau (bleu) et le sphéroïde (rouge) en fonction de la fréquence.

mais diminue un peu sa précision aux fréquences inférieures à 50 MHz.

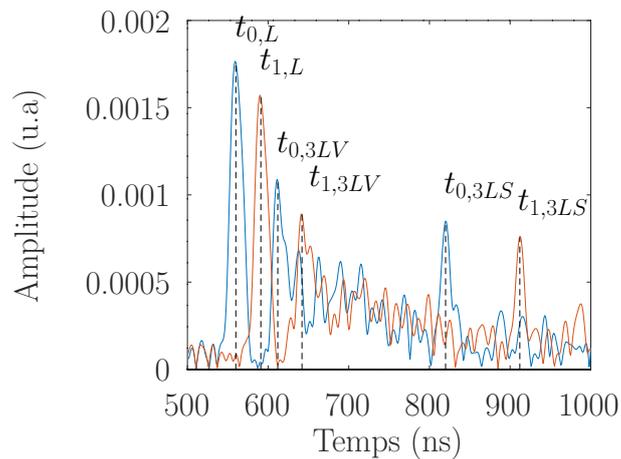


FIGURE 3.10 – Spectre de répartition temporelle de l’énergie dans le signal à 90 MHz à une épaisseur d_0 (bleu) et à une épaisseur d_1 (rouge).

En figure 3.10 on a tracé le spectre de répartition temporelle en énergie des signaux acoustiques enregistrés dans le même sphéroïde à 2 positions différentes. On peut isoler les mêmes composantes L , $3L_{verre}$ et $3L_{sphero}$ aux 2 positions. On peut donc extraire une vitesse du son pour chaque composante en reliant l’évolution du temps de vol de chaque composante à la distance entre les deux positions d’enregistrement des signaux, comme expliqué précédemment.

En figure 3.11a, on trace les spectres d’énergie pour une fréquence de 90 MHz à toutes les positions pour le sphéroïde étudié. On a également mis en évidence les temps de vol $t_{i,L}$ de la composante L aux différentes positions (lignes). En figure 3.11b trace uniquement les temps de

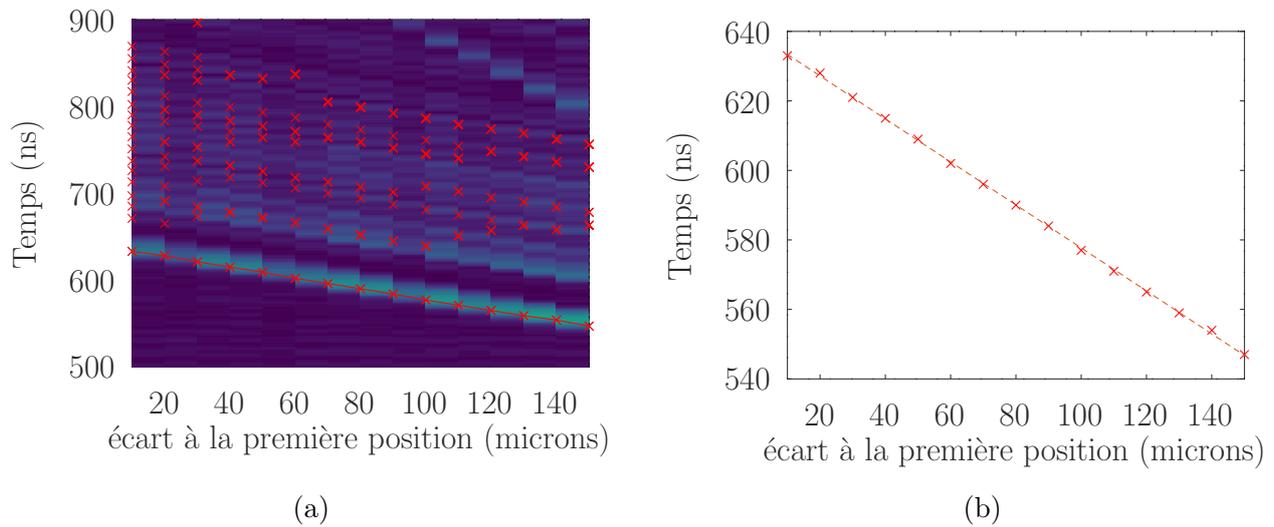


FIGURE 3.11 – a) Présentation des spectres en énergie pour un échantillon et extraction du temps de vol des différents pics à 90 MHz à chaque épaisseur sur un sphéroïde HT29 avec en rouge le temps de vol de la composante L du signal acoustique aux différentes positions. b) Tracé des temps de vol en fonction de la position L .

vol en fonction de la position. On peut voir dans cette figure que la pente de la droite formée par les temps de vol en fonction de la position ne change pas significativement avec la position ce qui signifie qu'on peut extraire les vitesses du son dans les sphéroïdes comme on l'a fait dans l'eau au chapitre précédent. La vitesse du son du sphéroïde est alors prise comme la moyenne des V_j suivant la méthode déjà présentée au chapitre 2.

On a tracé en figure 3.12 la médiane et les quartiles des vitesses sur les différentes V_j aux différentes fréquences sur un sphéroïde donné. On voit que la médiane des vitesses extraites

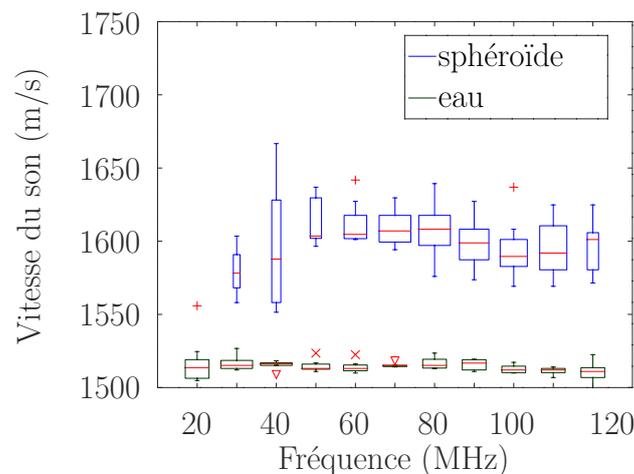


FIGURE 3.12 – Tracé des valeurs de vitesses du son extraites pour les différents pics sur la gamme de fréquence 20-120 MHz pour un sphéroïde (bleu) et de l'eau à 35°C (noir).

varie autour de 1600 m/s pour le sphéroïde. La médiane pour la mesure dans l'eau à 35 °C

est proche de 1520 m/s, ce qui est la valeur usuelle dans la littérature.[56] On constate que les V_j pour le sphéroïde donnent une plus grande dispersion que les mesures effectuées dans l'eau. En dessous de 60 MHz, l'écart type augmente fortement ce qui est dû au fait qu'aux basses fréquences le changement de forme des pics rend les courbes de temps de vol plus bruitées. De façon à limiter cet effet, on sélectionne les courbes de temps de vol en fixant un seuil pour la somme des erreurs quadratiques pour chaque composante V_j . À 20 MHz, l'absence de boîte indique que l'algorithme n'a pu extraire qu'une seule vitesse du son. Aucun écho n'a donc rempli le critère de sélection de l'algorithme, ce qui indique le changement de forme des pics à basse fréquence réduit la précision de l'algorithme. Nous allons maintenant extraire la vitesse du son en fonction de la fréquence pour l'ensemble des échantillons que nous avons mesurés.

3.2.3 Mesure de vitesse du son sur les sphéroïdes multicellulaires tumoraux

Dans cette partie nous allons présenter les mesures des vitesses du son sur des sphéroïdes des lignées HT29 et HCT116. Nous avons mesuré la vitesse du son de 42 sphéroïdes HT29 et 31 sphéroïdes HCT116. Pour toutes ces mesures, on mesure la vitesse V_j de chaque pic en utilisant les temps de vol $t_{i,j}$ associés à 10 positions espacées de 10 μm ou 20 positions espacées de 5 μm . Ces valeurs sont choisies pour limiter la durée des expériences, puisque chaque position de mesure demande 40 secondes. Une autre raison est que si la distance entre deux positions est trop faible la variation de temps de vol entre deux positions va devenir proche l'incertitude sur la mesure du temps de vol. Toutes les mesures ont été réalisées sur des sphéroïdes placés dans du milieu DMEM (HEPES) comme détaillé dans la partie 3.1.4. Le choix de ce milieu de culture nous permet de ne pas avoir à réguler la concentration à CO_2 dans la cuve utilisée pour réaliser les mesures. Ce milieu est maintenu à 37°C durant les mesures. Le diamètre des sphéroïdes pour les deux lignées varie entre 200 et 600 μm . Les sphéroïdes de taille inférieure à 200 μm sont trop difficiles à manipuler pour qu'on puisse les utiliser sur le montage. On fixe la limite supérieure à 600 μm pour limiter la taille du cœur nécrotique au centre de l'agrégat.[113]

Dans les figures 3.13a et 3.13b, on représente pour plusieurs fréquences la distribution des vitesses du son mesurées sur l'ensemble des échantillons pour les deux lignées cellulaires

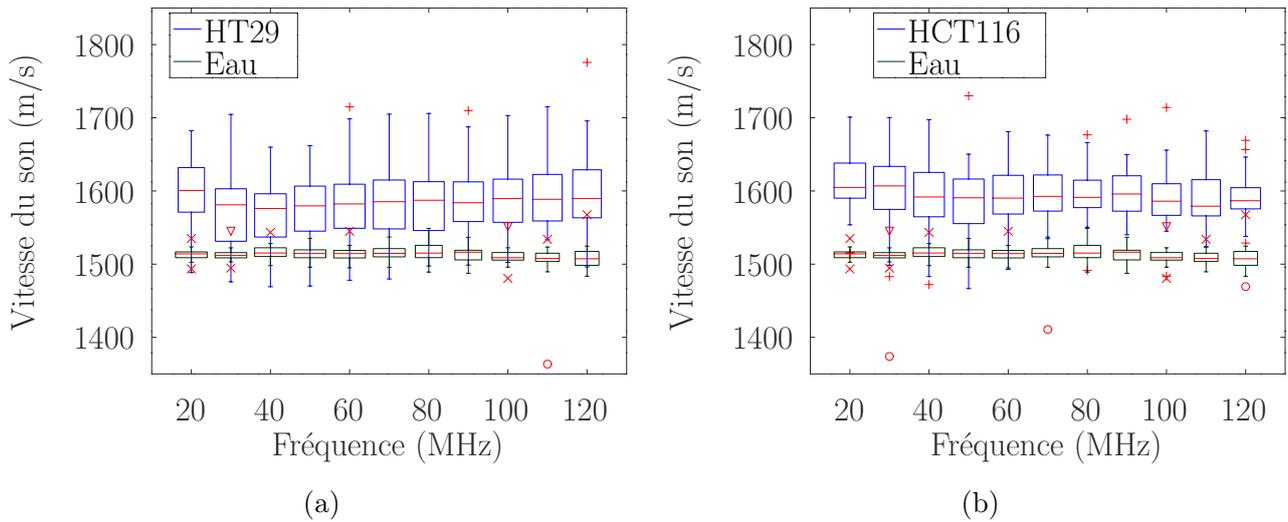


FIGURE 3.13 – Distribution des vitesses du son mesurées à différentes fréquences comparée à l'eau à 35°C pour a) la lignée HT29 et b) la lignée HCT116.

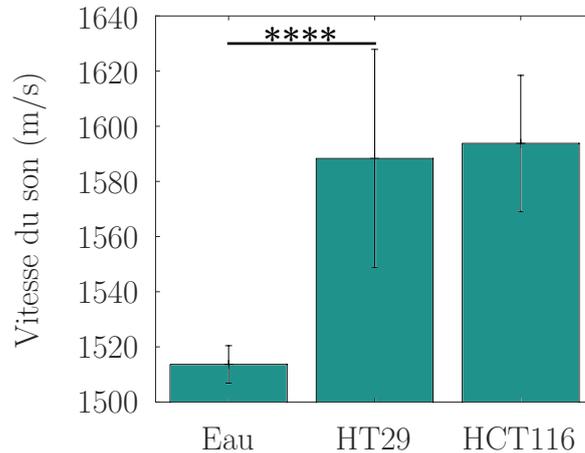


FIGURE 3.14 – Moyenne et écart des vitesses du son mesurées dans l'eau à 35°C et les sphéroïdes HCT116 et HT29. Le couple eau-HT29 donne une p-valeur de $p = 0.0001$. Le couple eau-HCT116 donne une p-valeur de $p = 0.005$

étudiées. On trace également les résultats pour les mesures dans l'eau. On peut voir que les deux lignées présentent une vitesse moyenne de l'ordre de 1600 m/s et que dans les deux cas, la vitesse ne dépend pas significativement de la fréquence. Cela signifie que la tendance observée sur un sphéroïde unique en figure 3.12 n'est pas significative. Puisqu'il n'y a pas de dépendance claire en fréquence entre 20 et 120 MHz, on trace les moyennes et les écarts types des vitesses du son mesurées sur l'ensemble des échantillons pour de l'eau à 35°C et pour les deux lignées de sphéroïdes en figure 3.14. On constate que l'écart type pour les mesures sur les sphéroïdes est plus élevé que pour les mesures dans l'eau, ce qu'on interprète comme la variabilité entre échantillons. On calcule les p-valeurs des distributions pour un test de Student

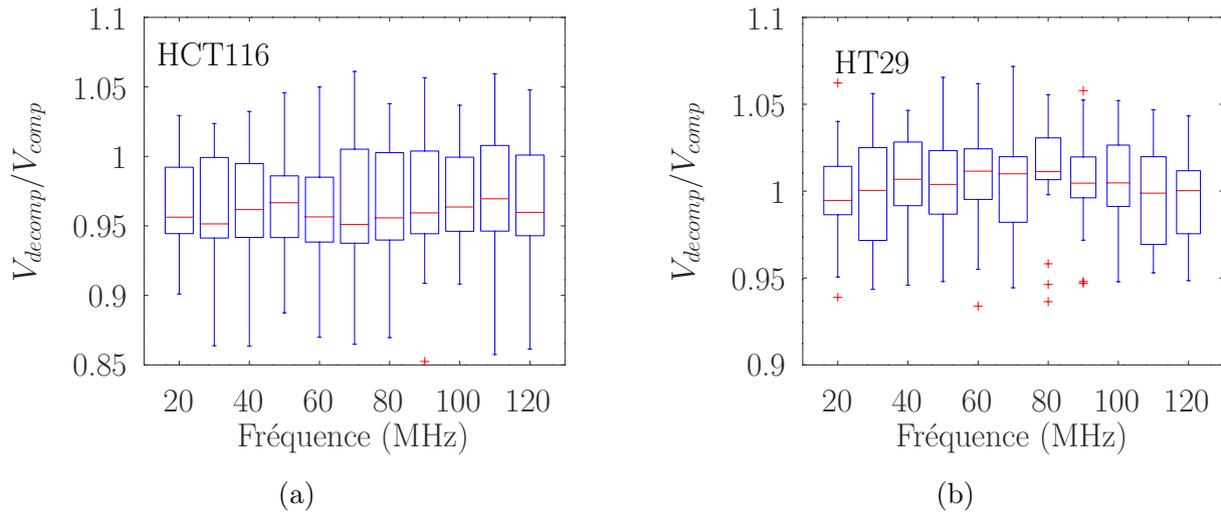


FIGURE 3.15 – Rapport entre la vitesse mesurée lors de la compression et la vitesse mesurée lors de la décompression pour un cycle de compression/décompression sur des sphéroïdes des lignées a) HCT116 ($N = 15$) et b) HT29 ($N = 22$).

de façon à comparer leurs statistiques. La p -valeur pour le couple HCT116 et HT29 donne 0.3, ce qui indique que les deux lignées ne sont pas significativement différentes. Pour le couple eau-HCT116 et le couple eau-HT29 on trouve respectivement $p = 0.005$ et $p = 0.0001$ ce qui signifie que les moyennes sont significativement différentes dans les deux cas. On observe donc l'absence de différence entre les deux lignées et leur différence avec l'eau à 35 °C.

3.2.4 Vitesse du son dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux lors de cycles compression/décompression

Nous avons choisi de comprimer sur 100 μm en enregistrant un signal tout les 10 μm afin de vérifier que la vitesse du son ne dépend pas de la compression. Une fois la compression effectuée, on a remonté la lamelle en suivant les mêmes positions jusqu'à revenir au point de départ. Nous avons réalisé un cycle compression/décompression sur les deux lignées. On présente les résultats des expériences compression/décompression pour les deux lignées en figures 3.15a et 3.15b. Dans ces figures on trace pour chaque sphéroïde le rapport entre la vitesse mesurée lors de la décompression V_{decomp} et celle mesurée lors de la compression initiale V_{comp} . On constate que la vitesse mesurée reste constante lors du cycle pour les HT29 et les HCT116. On observe donc pas d'effet d'un cycle compression/décompression sur la vitesse du son mesurée dans les sphéroïdes des deux lignées, ce qui confirme la validité de notre approche pour la mesure de vitesse du son.

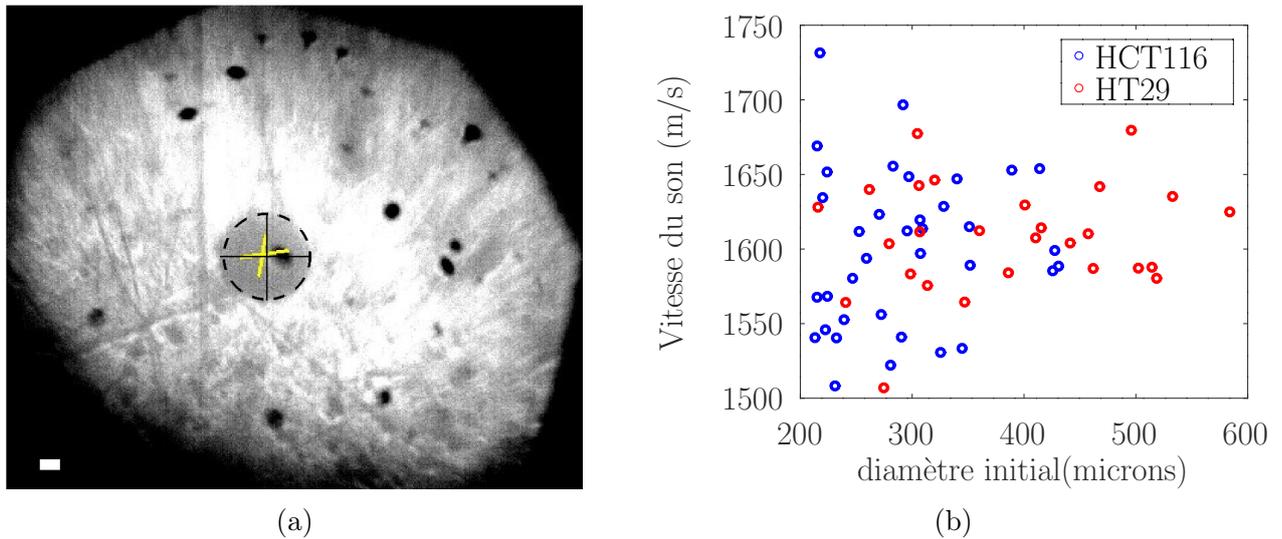


FIGURE 3.16 – a) Image en contraste de phase d'un sphéroïde avec l'ajustement d'une ellipse utilisé pour la mesure de diamètre (barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$). b) Répartition de la vitesse des sphéroïdes en fonction de leur diamètre initial.

3.2.5 Effet du diamètre sur la vitesse du son mesurée dans les sphéroïdes

Dans cette partie, nous étudions l'effet du diamètre initial du sphéroïde sur la vitesse du son mesurée lors de la compression initiale afin de déterminer si l'écart type obtenu sur les mesures de vitesse dans les sphéroïdes provient de la distribution des tailles. Dans leur étude de 2019, Guillaume *et al.* ont mis en évidence que, pour des sphéroïdes HCT116, l'état de surface de l'agrégat et son module d'Young mesuré par AFM dépendait des conditions de croissance du sphéroïde. Ils ont montré qu'à diamètre égal, un sphéroïdeensemencé avec 500 cellules qu'on laisse grandir 6 jours est plus "lisse" et a un module d'Young plus élevé qu'un agrégat qu'un agrégatensemencé avec 5000 cellules qu'on laisse grandir deux jours. [39] Le fait que dans cette étude la durée de croissance du sphéroïde ait un impact sur les propriétés mécaniques mesurées nous a poussé à nous interroger sur l'impact du temps de croissance des sphéroïdes. Dans notre cas, puisqu'on utilise la même concentration de cellules pour tous les agrégats, on affiche les résultats en fonction du diamètre lié au temps de croissance de l'agrégat (plus le temps de culture est long, plus le diamètre est important). Le diamètre des sphéroïdes a été mesuré à l'aide d'images de contraste de phase prises en vue de dessus à l'aide d'une caméra fixée au bâti du microscope. Afin de déterminer le diamètre on ajuste une ellipse. Le diamètre est alors pris comme étant la moyenne du grand axe et du petit axe de l'ellipse.

On trace sur la figure 3.16b la vitesse du son mesurée précédemment en fonction du diamètre initial du sphéroïde. On peut voir une plus grande dispersion des valeurs pour les faibles diamètres. Ceci étant probablement dû au fait que la compression de 100 μm impacte davantage les sphéroïdes de faible diamètre. On peut également supposer que les sphéroïdes n'ayant grandi que deux jours ont une structure plus variable en terme de quantité de matrice et de liaisons cellules-cellules et cellules-matrice, ce qui donne lieu à une plus grande hétérogénéité des valeurs de vitesse du son mesurées. Cependant la vitesse moyenne ne semble pas influencée par le diamètre initial dans les deux lignées. Nous pouvons donc comparer les données issues des différents sphéroïdes ayant différentes tailles initiales, au prix d'une augmentation de l'écart type dû à la contribution des petits diamètres.

3.2.6 Conclusions sur les mesures de vitesse du son dans les sphéroïdes

Dans la partie précédente nous avons présenté les résultats de vitesses du son mesurées sur les sphéroïdes HCT116 et HT29 à l'aide de la décomposition en ondelettes de Morlet. Nous avons pu mesurer la vitesse du son d'un ensemble d'échantillons sur une bande de fréquences entre 20 et 120 MHz. On a montré que la vitesse du son mesurée ne dépend pas significativement du diamètre initial des agrégats ou de leur niveau de compression. Cependant, une réponse éventuelle des agrégats à la compression comme une expulsion de fluide, qui traduirait une perte de volume, reste à vérifier. C'est cette étude qui va être l'objet de la partie suivante.

3.3 Mesures de diamètres et estimation de volume pendant la compression

On va maintenant étudier l'évolution du diamètre équatorial du sphéroïde en fonction du niveau de compression appliqué au sphéroïde. On comparera les résultats à des cas simples de solides déformables sous compression et on s'intéressera à la réponse des sphéroïdes lors de cycles compression/décompression.

3.3.1 Évolution du diamètre en fonction de la compression

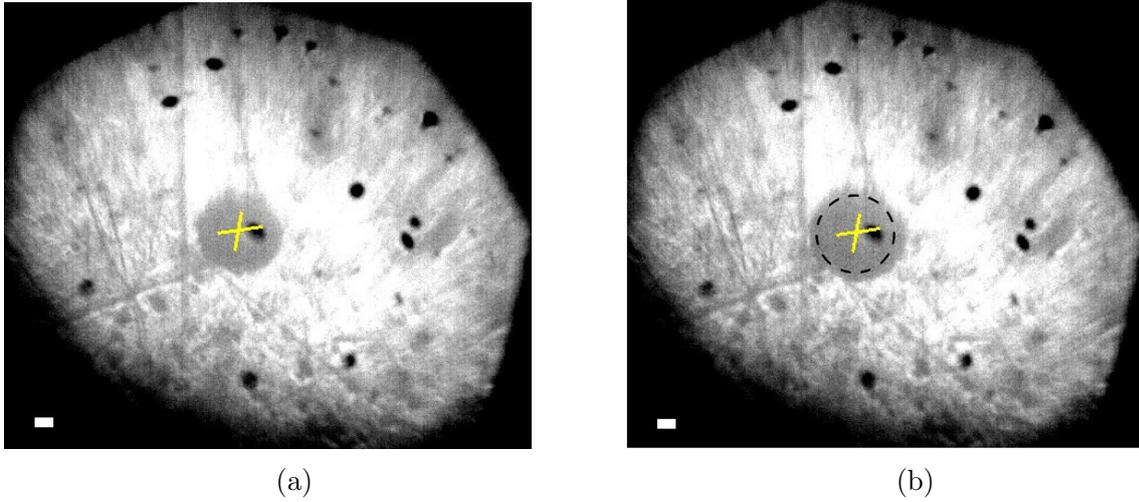


FIGURE 3.17 – Images en transmission d'un sphéroïde a) avant compression et b) après 150 μm de compression. Les pointillés indiquent le périmètre initial.

En figure 3.17, on peut voir deux images capturées en vue de dessus d'un sphéroïde à deux étapes de compression. On peut observer le changement de diamètre sur ces images au fur et à mesure de la compression. On va donc utiliser ces images pour étudier l'évolution du diamètre en fonction de la compression. Le diamètre des sphéroïdes a été mesuré en ajustant une ellipse dans les images enregistrées avec la caméra. Puisqu'on ne connaît pas l'épaisseur absolue, l'estimation de la hauteur du sphéroïde s'effectue en analysant les signaux acoustiques. En effet, dans les signaux on peut repérer le pic L et le pic $3L_{spheroid}$. On peut donc remonter directement à l'épaisseur absolue en extrayant dans un signal la différence de temps de vol entre le pic L et le pic $3L$ et la vitesse.

Pour faciliter l'analyse des résultats nous allons normaliser la hauteur et le diamètre des sphéroïdes de la façon suivante. Soit h_i l'épaisseur correspondant à une mesure de diamètre équatorial d_i à la position i , et h_0 et d_0 la première position et le premier diamètre mesuré. On définit pour chaque position de chaque échantillon sa hauteur normalisée \bar{h} et le diamètre normalisé \bar{d} de la façon suivante :

$$\bar{h} = \frac{h_i}{h_0} \quad \bar{d} = \frac{d_i}{d_0} \quad (3.1)$$

On va alors tracer \bar{d} en fonction de \bar{h} ce qui permettra de superposer les courbes d'évolution du diamètre pour des sphéroïdes de différents diamètres. En figures 3.18a et 3.18b on trace

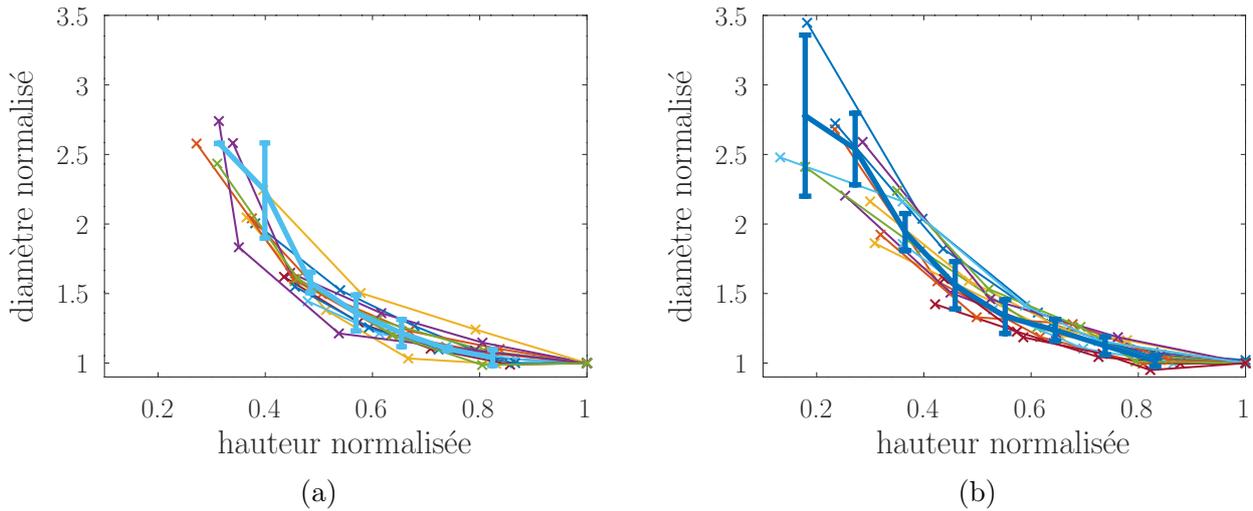


FIGURE 3.18 – Evolution du diamètre équatorial normalisé en fonction de la hauteur normalisée de la couche.

pour les deux lignées étudiées le diamètre normalisé en fonction de la hauteur normalisée pour l'ensemble des échantillons. On observe une croissance du diamètre normalisé avec la compression. Afin d'extraire un comportement statistique, on a tracé des courbes moyennes de la relation hauteur-diamètre des deux lignées en gras. Pour obtenir cette courbe moyenne, on échantillonne les données de hauteur normalisée par intervalle d'une largeur de 0.1.

Puisqu'on ne connaît pas l'angle de contact du sphéroïde avec les plaques, on va considérer 2 profils extrêmes dans le plan perpendiculaire à la lamelle : un cylindre et un ellipsoïde. Le cas de l'ellipsoïde est illustré en figure 3.19a ; on part d'une sphère de diamètre équatorial d_0 et de hauteur h_0 . On peut démontrer que pour un ellipsoïde de volume constant V_0 on a :

$$\bar{d}_{sphere} = \sqrt{\frac{1}{\bar{h}_{sphere}}} \quad (3.2)$$

où \bar{d}_{sphere} est le diamètre normalisé de la sphère et \bar{h}_{sphere} sa hauteur normalisée. On sait cependant que les cellules et les tissus peuvent adhérer aux surfaces avec lesquelles ils sont en contact. Pour cette raison le modèle d'ellipsoïde peut ne pas être une bonne description. On propose un cas extrême de ce changement de forme dû à l'adhésion. Ainsi la deuxième loi diamètre-hauteur à laquelle on va comparer nos mesures sera celle d'une sphère de volume V_0 qui, lorsqu'on la comprime, se transforme en cylindre de même volume. Ce cas de figure est

illustré en figure 3.19b. La relation hauteur-diamètre pour un tel solide sera alors :

$$\bar{d}_{cylindre} = \sqrt{\frac{4}{3\bar{h}_{cylindre}}} \quad (3.3)$$

On trace les deux lois diamètre-hauteur, illustrées en figure 3.19a et 3.19b, sur la figure 3.20.

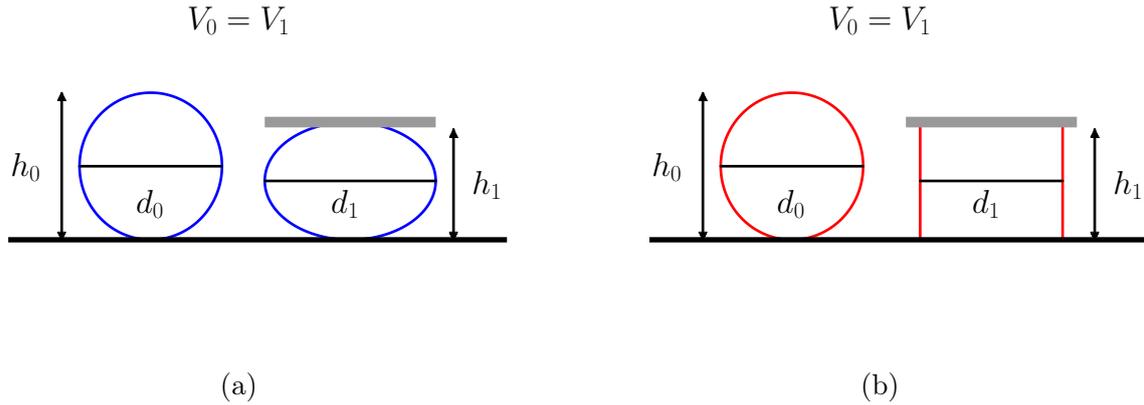


FIGURE 3.19 – illustration des deux sphères déformables qui, lorsqu'on les comprime, deviennent a) un ellipsoïde b) un cylindre.

On y reproduit les courbes expérimentales obtenues pour les deux lignées.

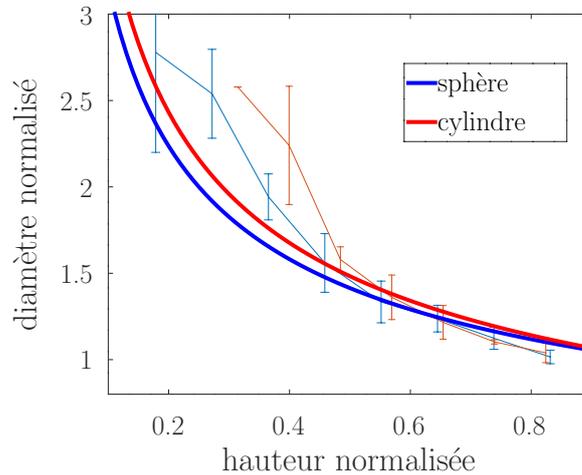


FIGURE 3.20 – courbe moyenne pour les sphéroïdes HCT116 (rouge) et HT29 (bleu) comparées aux lois hauteur-diamètre pour un ellipsoïde à volume constant (bleu) et un cylindre à volume constant (rouge).

Les courbes "cylindre" et "ellipsoïde" sont très proches suggérant que l'angle de contact ne peut avoir qu'une influence faible sur nos mesures. Aux faibles compressions les courbes moyennes suivent les courbes théoriques. Au delà de 50 % ($\bar{h} > 0.5$), le diamètre augmente

plus rapidement que sur la courbe du solide à volume constant, ce qui veut dire que le volume des agrégats augmente aux fortes compressions. Aux faibles compressions, on ne voit aucune différence entre le comportement moyen des deux lignées.

Cette apparente augmentation du volume est surprenante car aucune expérience de compression sur des sphéroïdes n'a à ce jour donné de résultats similaires.[40] [41] On se pose alors la question de l'erreur de mesure potentielle. L'hypothèse privilégiée est celle d'une perte de focus qui induit une imprécision sur le diamètre. Une solution pour palier à ce problème serait d'avoir accès à une vue de côté comme dans l'expérience de Marmottant et al. [?] On conclut donc qu'on observe pas de pertes ou de gain de volume pour les faibles compressions et qu'aux fortes compressions le système n'est pas adapté à la mesure de diamètre.

3.3.2 Conclusions sur les mesures de diamètre

En mesurant le diamètre des sphéroïdes à différents stades de compression et comparant les résultats à des cas simples de solides déformables à volumes constants, on a constaté qu'aux faibles compressions les sphéroïdes ne perdaient pas de volume. Aux fortes compressions on a observé un comportement qui traduirait un gain de volume. Or nous n'avons pas vu précédemment d'influence de la compression sur la vitesse, notre conclusion est donc que le déplacement vertical important a eu un impact sur la mesure optique du diamètre aux fortes compressions et que la mesure devient trop imprécise pour qu'on puisse extraire des informations fiables. Ces résultats, en confirmant qu'il n'y pas de pertes de volumes des sphéroïdes lors de la compression, nous permettent de valider une nouvelle fois notre approche. Dans la partie suivante, afin de compléter l'étude, nous allons présenter l'application de notre algorithme d'extraction des amplitudes et de mesures de l'atténuation acoustique aux deux lignées de sphéroïdes tumoraux.

3.4 Résultats en amplitude obtenus sur les sphéroïdes tumoraux

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté une méthode d'analyse de l'amplitude des pics L et $3L$ permettant d'extraire une atténuation acoustique à partir des signaux acoustiques. Dans cette sous-section, nous allons présenter l'application de cette méthode aux sphéroïdes fabriqués à partir des cellules des lignées HCT116 et HT29. On rappelle que sur l'eau, le rapport entre la largeur à mi-hauteur temporelle de l'ondelette et celle des pics dans les signaux avait limité la gamme de fréquence où on pouvait extraire une atténuation à 40-80 MHz. Pour les sphéroïdes, on va reproduire cette analyse.

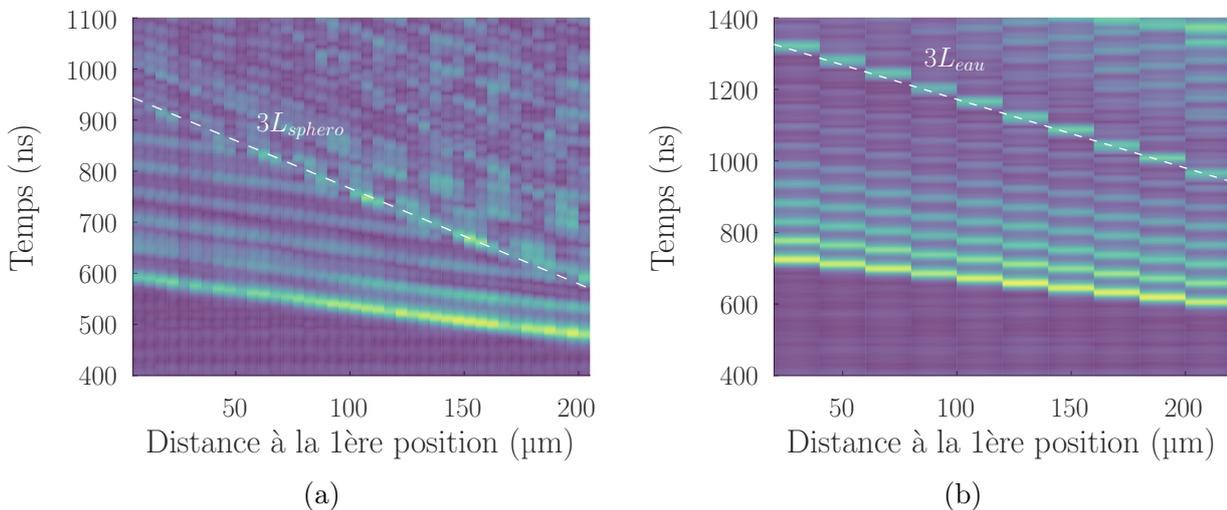


FIGURE 3.21 – Carte des spectres de répartition d'énergie temporelle à 40 MHz pour a) un sphéroïde HCT116 et b) une couche d'eau

En figures 3.21a et 3.21b, on représente les cartes des spectres de répartition d'énergie temporelle à différentes positions à 40 MHz pour des signaux enregistrés dans un sphéroïde et le même type de carte pour une couche d'eau. On constate que si dans l'eau, les pics $3L_{eau}$ sont nets et forment une ligne droite bien définie, on voit que dans le cas des sphéroïdes, il y a plus de bruit. À certaines positions, on ne distingue pas clairement de pic sur la ligne des pics $3L_{sphero}$. On va donc analyser plus précisément le spectre obtenu à une position où le pic $3L_{sphero}$ est visible et une position où il ne l'est pas.

On peut voir en figures 3.22a et 3.22b les spectres pour une position où le pic $3L_{sphero}$ apparaît clairement et une où son amplitude est comparable à celle du bruit. On voit que dans

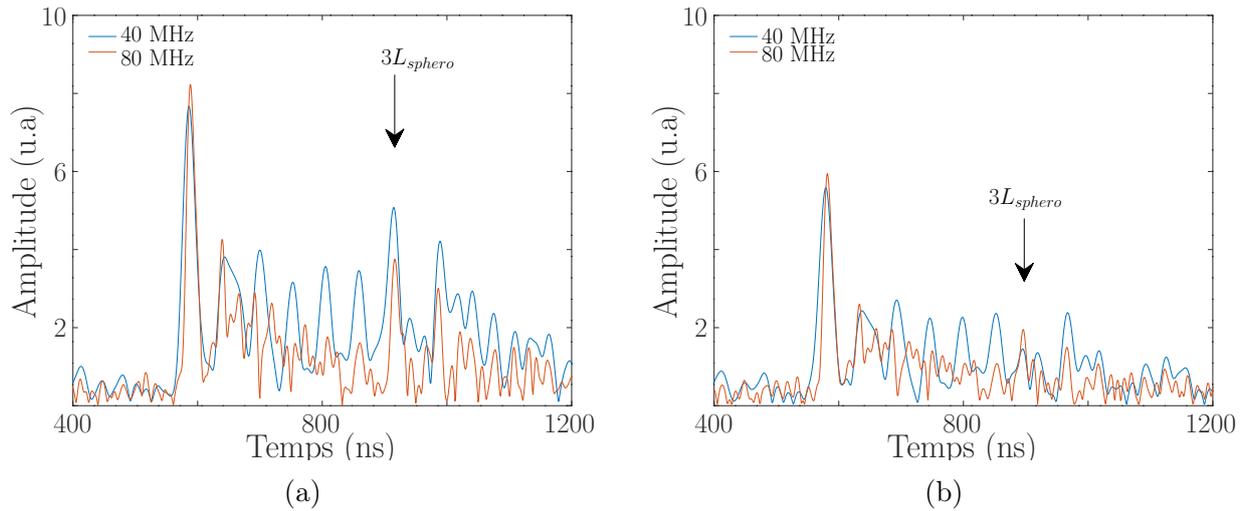


FIGURE 3.22 – Spectres de répartition d'énergie temporelle à 40 (bleu) et 80 MHz (orange) pour les positions 3 et 5 dans la carte en figure 3.21a. Les flèches indiquent les pics $3L_{sphero}$

la figure 3.22b l'amplitude du pic semble augmenter avec la fréquence alors que pour l'autre position c'est l'inverse qui se produit.

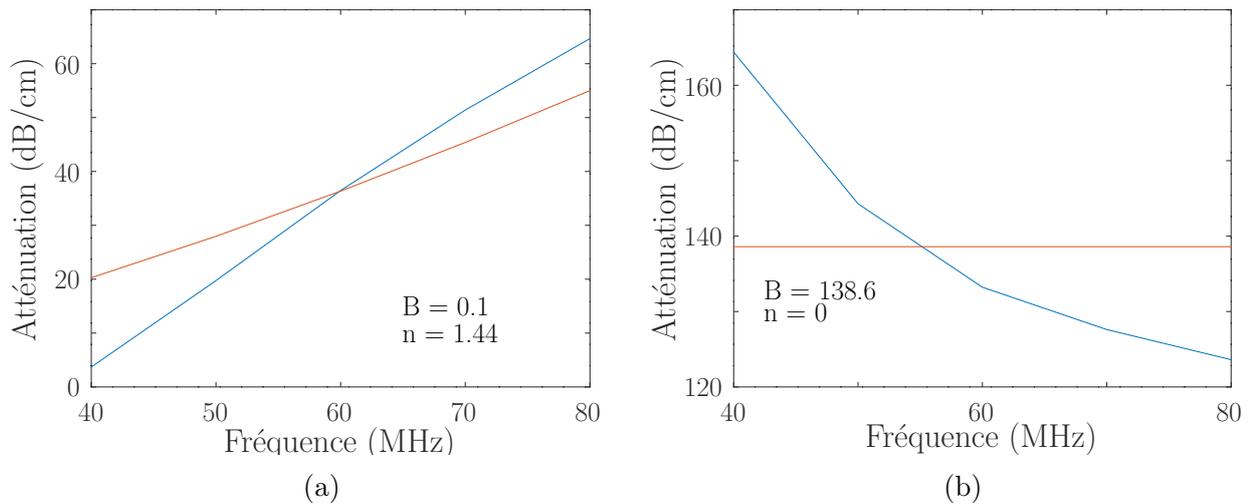


FIGURE 3.23 – Courbe d'atténuation mesurée (bleu) et ajustement obtenu par la méthode des moindres carrés (orange) pour les deux positions représentées en figures 3.22a et 3.22b.

En figure 3.23a on trace l'atténuation acoustique en fonction de la fréquence correspondant à l'échantillon et à la position du le spectre de la figure 3.22a, ainsi que l'ajustement obtenu par la méthode des moindres carrés avec une loi de type $\alpha = Bf^n$. On affiche sur les courbes les paramètres d'ajustement obtenus à ces deux postions. On voit qu'en figure 3.23a l'atténuation croît avec la fréquence, alors que c'est l'inverse qui se produit en figure 3.23b. Contrairement à l'eau, on ne dispose pas d'une loi théorique vérifiée expérimentalement à laquelle on pourrait

comparer ces mesures. Le consensus dans la littérature est que l'atténuation suit une loi de puissance Bf^n observée par exemple Han et al. sur des cellules ovariennes d'hamster à 40 et à 80 MHz.[118] C'est pour cette raison qu'on a choisi d'ajuster les courbes d'atténuation obtenues sur les sphéroïdes sur des courbes de type Bf^n par la méthode des moindres carrés. On voit que dans la figure 3.23b on obtient pas un ajustement satisfaisant ce qui se traduit par une valeur de 0 pour n et une valeur de B élevée. À l'inverse, en figure 3.23a l'ajustement est meilleur et on obtient une valeur de n supérieur à 1 et une valeur B faible.

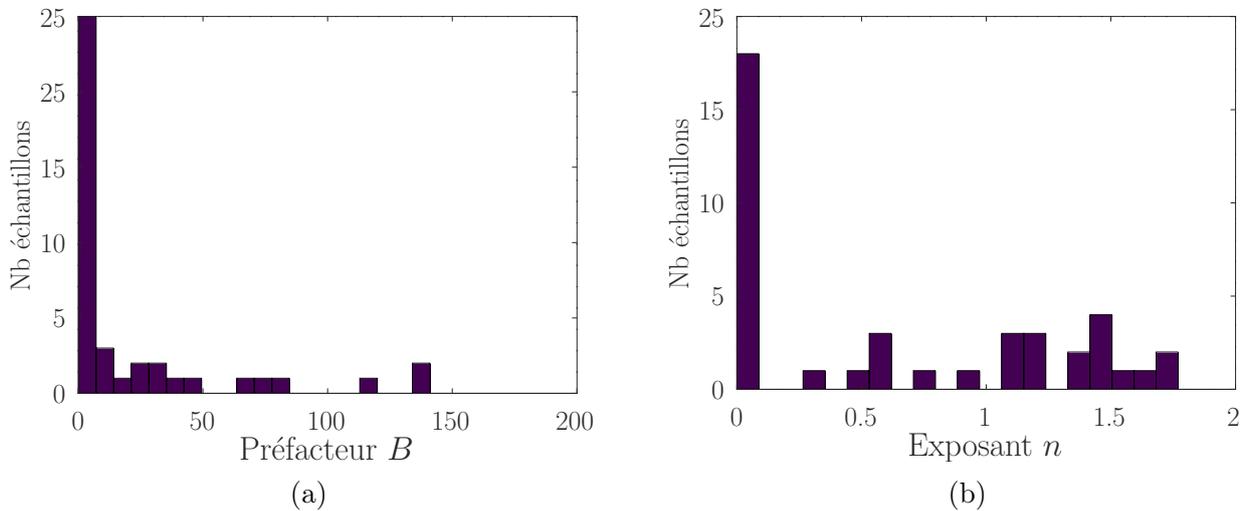


FIGURE 3.24 – Distribution des valeurs a) de B et b) de n obtenues par la méthode des moindres carrés sur toutes les positions pour un échantillon.

En figures 3.24a 3.24b, on représente les valeurs de n et de B pour chaque position de l'échantillon étudié. En comparant ces valeurs aux spectres à chaque position. On constate que $n < 0.5$ correspond à des positions où le pic $3L_{sphero}$ n'est pas distinguable du bruit de fond. On ne va donc conserver que les échantillons où la valeur n est supérieure à 0.5, les valeurs inférieures à 0.5 donnant généralement des courbes d'atténuation décroissantes ou aberrantes. Dans la sous-section suivante, on va présenter les résultats d'atténuation pour chaque lignée en suivant le critère proposé ici ($n > 0.5$). On mettra ensuite ces résultats en commun afin de comparer les deux lignées

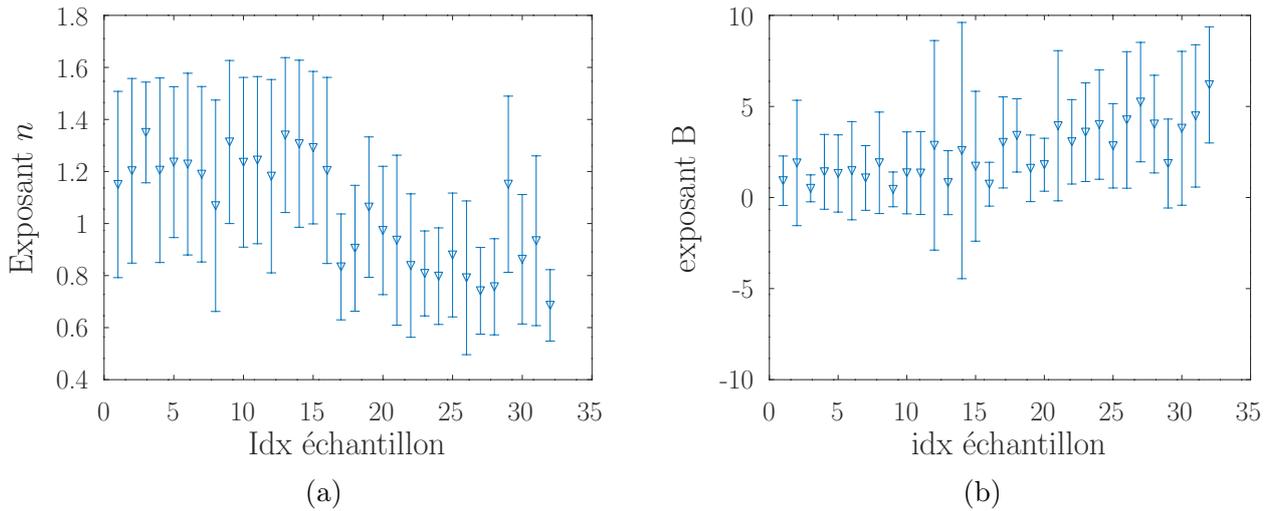


FIGURE 3.25 – Moyenne et écart type pour chaque échantillon de a) l'exposant n et b) le préfacteur B sur les sphéroïdes issues de la lignée HCT116

3.4.1 Résultats d'atténuation sur les sphéroïdes issus de la lignée HCT116

En figures 3.25a et 3.25b, on représente pour chaque échantillon l'exposant n et le préfacteur B . On voit que les valeurs de B sont généralement comprises entre 0 et 5. Pour n , on note la présence de deux sous-populations. Dans le premier sous-groupe (1 à 16) l'exposant moyen se trouve autour de 1.3 tandis que dans le second sous-groupe l'exposant est plus proche de 0.8.

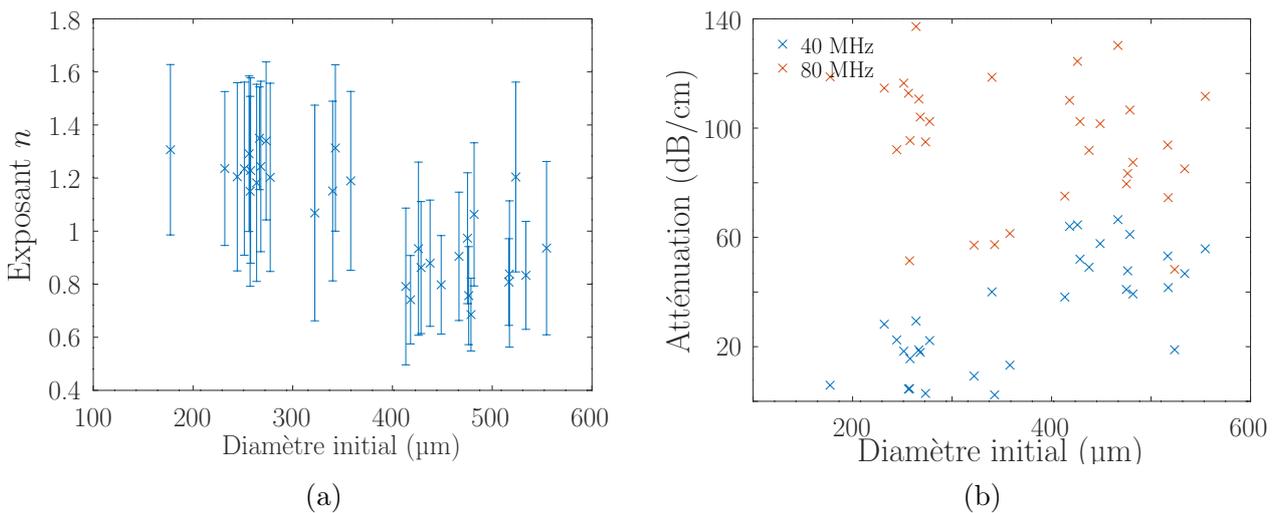


FIGURE 3.26 – a) Diamètre initial de chaque sphéroïde issu de la lignée HCT116 b) Atténuation à 40 MHz (bleu) et à 80 MHz (orange) pour les sphéroïdes fabriqués à partir de cellules de la lignée HCT116.

À notre connaissance, le seul paramètre variant entre les deux groupes d'échantillons est le

diamètre initial des agrégats. En figure 3.26a on trace donc l'exposant n pour chaque échantillon en fonction du diamètre initial pour chaque sphéroïde issus de la lignée HCT116. En figure 3.26b on représente l'atténuation acoustique à 40 et à 80 MHz en fonction du diamètre initial du sphéroïde. On constate qu'il existe deux sous-groupes de diamètres différents. Les sphéroïdes de faible diamètre ($d < 400 \mu\text{m}$) ont une atténuation comprise entre 20 et 100 dB/cm et un exposant moyen autour de 1.3. Les sphéroïdes plus gros ($d > 400 \mu\text{m}$) dont les valeurs ont une atténuation comprise entre 40 et 100 dB/cm et un exposant autour de 0.9, comme on peut le voir en figure 3.26a. En résumé, on peut séparer les sphéroïdes HCT116 en deux sous-groupes déterminés par le diamètre initial des agrégats. La différence de diamètre entre les deux sous-groupes vient du fait que les expériences ont été réalisées à deux jours d'écart durant lesquels les sphéroïdes ont continué à croître. On va maintenant procéder à la même analyse sur les sphéroïdes issus de la lignée HT29.

3.4.2 Résultats d'atténuation sur les sphéroïdes issus de la lignée HT29

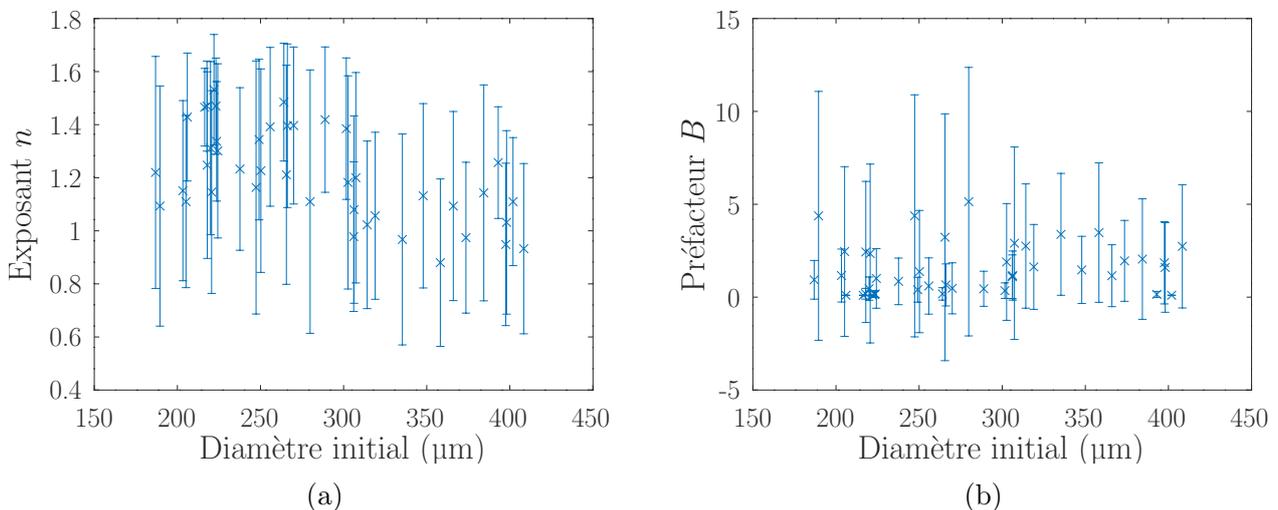


FIGURE 3.27 – Moyenne et écart type pour chaque échantillon de a) l'exposant n et b) le préfacteur B en fonction du diamètre initial pour les sphéroïdes issues de la lignée HT29.

Tout comme les sphéroïdes issus de la lignée HCT116, le diamètre des sphéroïdes issus de la lignée HT29 varie au cours des expériences. Cela vient du fait qu'on a du réaliser les mesures sur plusieurs jours durant lesquels les sphéroïdes ont continué à croître dans l'incubateur. En figures 3.27a et 3.27b, on représente donc pour chaque échantillon l'exposant n et le préfacteur

B en fonction du diamètre initial des sphéroïdes. On voit que les valeurs de B sont généralement comprises entre 0 et 10. Pour n , on note cette fois ci que si la valeur d'exposant n varie moins nettement avec le diamètre, la différence entre les petits ($d < 300 \mu\text{m}$) et les grands sphéroïdes ($d > 300 \mu\text{m}$) est moins marquée pour les sphéroïdes issus de la lignée HCT116. Cette différence moins marquée peut s'expliquer par le fait que la gamme de diamètre étudiée pour les sphéroïdes issus de la lignée HT29 est moins étendue que pour les sphéroïdes issus de la lignée HCT116.

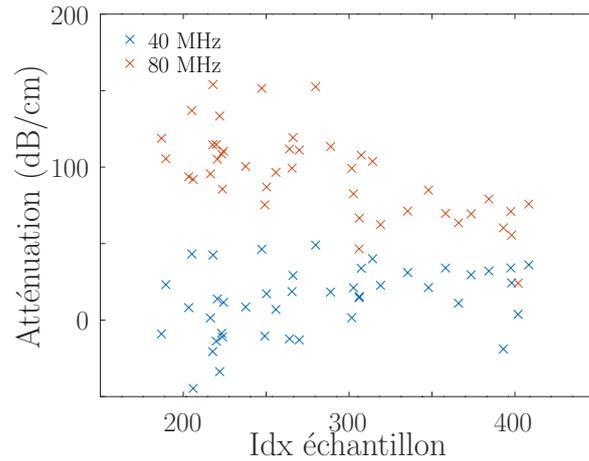


FIGURE 3.28 – Atténuation à 40 MHz (bleu) et à 80 MHz (orange) pour les sphéroïdes fabriqués à partir de cellules de la lignée HT29

On peut voir en figure 3.28 que les gammes de valeurs obtenues sont globalement les mêmes pour l'ensemble des échantillons, même si on observe, comme dans l'eau ; une diminution de la dispersion des valeurs pour les diamètres initiaux importants.

En résumé, si on a pu séparer les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 en deux sous-groupes de diamètres, il est moins évident de faire de même pour les sphéroïdes de la lignée HT29 au vu des valeurs obtenues. L'exposant semble bien diminuer lorsque le diamètre augmente. Mais comme la gamme de diamètres étudiés pour les sphéroïdes issus de la lignée HT29 est moins importante, la différence est moins marquée que celle observée pour les sphéroïdes issus de la lignée HCT116.

3.4.3 Comparaison des deux lignées et bilan

Dans la partie précédente, on a montré qu'on pouvait séparer les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 en sous-groupe de diamètres. Pour les sphéroïdes on constate une tendance similaire mais moins marquée. On va donc maintenant présenter les résultats d'atténuation sur

l'ensemble des échantillons et des positions retenues avec notre critère ($n > 0.5$).

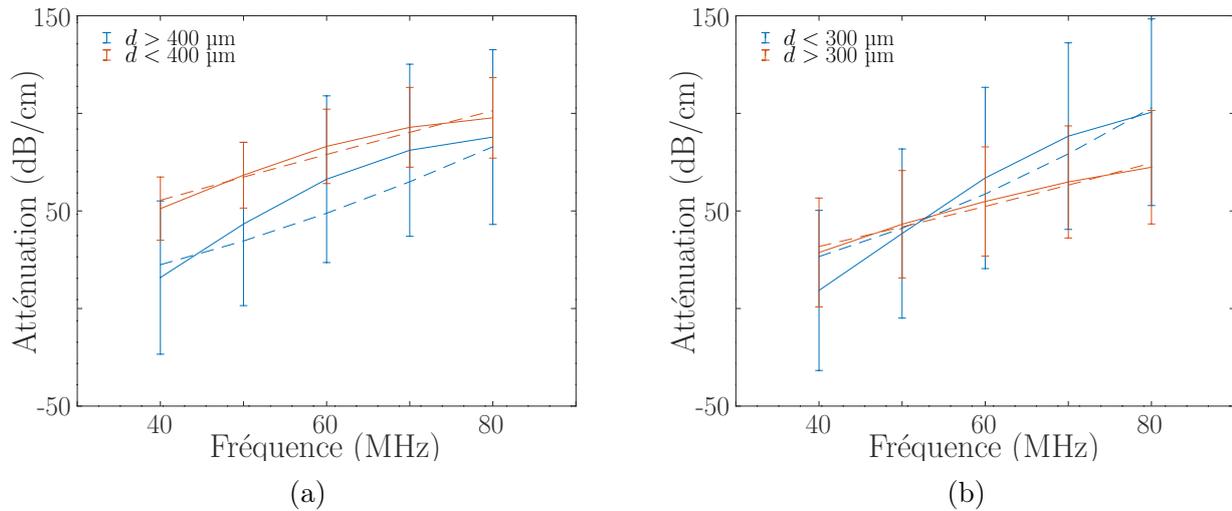


FIGURE 3.29 – Moyenne et écart type sur toutes les positions retenues et pour tous les échantillons de l'atténuation acoustique mesurée sur a) les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 de faible diamètre (bleu) et de diamètre important (rouge) et b) les sphéroïdes issus de la lignée HT29 de faible diamètre (bleu) et de diamètre important (rouge)

On représente en figures 3.29a et 3.29b l'atténuation à chaque fréquence entre 40 et 80 MHz pour les positions retenues. La courbe bleue correspond aux sphéroïdes ayant un diamètre inférieur à 300 μm pour les HT29 et à 400 μm pour les HCT116 et la courbe rouge correspond aux sphéroïdes dont le diamètre est supérieur à 300 μm pour les HT29 et à 400 μm pour les HCT116. On peut voir que l'atténuation croît plus rapidement avec la fréquence dans les petits sphéroïdes ce qui va se traduire par un exposant n plus important. Dans les sphéroïdes de diamètre plus important, la valeur à 40 MHz est plus importante que dans les petits sphéroïdes alors que la valeur à 80 MHz est à peu près la même ce qui se traduit par un exposant plus faible dans la loi de puissance. Les exposants n obtenus en ajustant la loi Bf^n sur les courbes d'atténuation des sphéroïdes issus de la lignée HCT116 sont de 1.68 ($d < 400 \mu\text{m}$) et 0.87 ($d > 400 \mu\text{m}$). Pour les sphéroïdes issus de la lignée HT29 on obtient des valeurs de n de 1.92 ($d < 300 \mu\text{m}$) et de 1.23 ($d > 300 \mu\text{m}$).

En terme de valeur absolue, on va pouvoir comparer nos courbes moyennes aux mesures de Muleki-Seya *et al.* et Wirtzfeld *et al.*. Dans la première étude, une mesure d'atténuation a été effectuée sur des tumeurs formées de cellules HT29 et ont donné une pente d'atténuation de 0.69 dB/cm/MHz ce qui correspond à une valeur de 20.7 dB/cm à 30 MHz ce qui est proche de la valeur moyenne obtenues pour les sphéroïdes HT29 de diamètre important ($d > 400 \mu\text{m}$)

à 40 MHz.[117] Dans la seconde étude la pente de l'atténuation mesurée sur la gamme 25-50 MHz est de 0.53 dB/cm/MHz sur le culot de cellules après 1h sans nutriments. Cela correspond à une valeur de 21.2 dB/cm à 40 MHz ce qui est également proche des valeurs obtenues sur les sphéroïdes HT29.[63] La compatibilité entre nos valeurs et la littérature rassure sur le fait qu'en dépit d'un écart type important dû au système de mesure, nos résultats sont cohérents avec la littérature disponible pour les HT29. En ce qui concerne les sphéroïdes HCT116, on ne dispose pas à ce jour de résultats avec lesquels on pourrait comparer nos mesures.

En résumé, on a pu estimer l'atténuation acoustique des sphéroïdes issus des lignées HCT116 et HT29. Contrairement à la vitesse, qui ne dépend pas significativement du diamètre de l'agrégat, on a pu observer ici que, à 40 MHz, les agrégats de diamètre important avaient une atténuation plus importante que ceux de diamètre plus faible et que cet écart disparaissait à 80 MHz. Cette différence est plus marquée chez les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 que ceux issus de la lignée HT29 car la gamme de diamètres étudiés est plus importante chez les sphéroïdes issus de la lignée HCT116. Globalement, les sphéroïdes HT29 et HCT116 ne présentent pas de différence marquée en terme d'atténuation pour $d < 300 \mu\text{m}$. En revanche, si on compare les valeurs d'atténuations obtenues pour les sphéroïdes ayant un diamètre de 400 μm (taille maximale disponibles sur les deux lignées), les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 semblent avoir une atténuation plus importante que les sphéroïdes issus de la lignée HT29 sur la gamme de fréquences étudiées.

3.5 Conclusions générales

Dans ce chapitre, nous avons mesuré la vitesse du son dans des sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29. Ces mesures de vitesses ont été obtenues pour des fréquences acoustiques allant de 20 à 120 MHz. Ces mesures montrent que les deux lignées, malgré leurs différences sur le plan biologique, ont la même vitesse du son lorsqu'elles sont étudiées à des fréquences de l'ordre du MHz. Cette vitesse est de l'ordre de 1600 m/s.

Les résultats ont également montré que pour des compressions inférieures ou égales à 100 μm , la compression n'a pas d'effet significatif sur la vitesse du son mesurée. Des expériences de compression suivi d'une décompression ont été réalisées et ont montré que pour les sphéroïdes HCT116 qu'il n'y avait pas de variation significative de la vitesse du son entre les deux phases

du cycle. Ces deux expériences, nous ont donc permis de valider notre approche de la mesure de vitesse par le biais d'une compression.

Nous avons également mesuré le diamètre équatorial des sphéroïdes au fur et à mesure de la compression. Ces mesures de diamètre en fonction du niveau de la compression ont été comparées à des cas simples de solides déformables à volumes constants et ont montré une réponse à volume constant aux faibles compressions et une dilatation à l'équateur pour les fortes compressions que nous avons identifié comme un problème optique. Cependant le fait qu'il n'y ait pas de pertes de volume pour les faibles compressions confirment de nouveau que la compression ne change pas les propriétés physiques des agrégats.

Nous avons également analysé l'amplitude des signaux acoustiques dans les deux lignées cellulaires et on en a conclu qu'on pouvait observer une influence du diamètre sur l'exposant n obtenu. Cette influence est très nette dans le cas des sphéroïdes issus de la lignée HCT116 alors qu'elle est moins marquée dans le cas des sphéroïdes issus de la lignée HT29. On attribue cette différence au fait que la gamme de diamètre étudiée pour les sphéroïdes issus de la lignée HT29 est moins importante que celle des sphéroïdes issus de la lignée HCT116. À diamètres comparables ($d < 300 \mu\text{m}$), l'exposant pour les sphéroïdes issus de la lignée HT29 est plus élevé que pour ceux issus de la lignée HCT116.

Dans le chapitre suivant, nous allons analyser ces résultats et les mettre en commun avec d'autres expériences de caractérisation mécaniques réalisées sur des sphéroïdes tumoraux afin de mieux comprendre le comportement des agrégats et expliquer le comportement observé.

CHAPITRE 4

Discussion et perspectives

Dans les chapitres précédents nous avons présenté le montage expérimental ultrason laser et sa calibration. Nous avons ensuite présenté son utilisation sur des sphéroïdes fabriqués à partir des lignées HCT116 et HT29. On a notamment mesuré la vitesse du son sur les deux lignées sur une gamme de fréquence de 20 à 120 MHz et l'atténuation acoustique sur une gamme de 40 à 80 MHz.

Dans ce chapitre nous allons analyser l'ensemble de ces résultats et les comparer avec des résultats obtenus par diffusion Brillouin sur le même type d'échantillon. On rappellera d'abord l'ensemble de nos résultats. On présentera ensuite le principe des mesures mécaniques par diffusion Brillouin. Une fois ces résultats mis en commun et analysés, on discutera qualitativement des hypothèses de modélisations possibles afin d'expliquer nos observations. On fera notamment appel aux familles de modèles viscoélastiques et poroélastiques.

On présentera ensuite les conclusions générales de l'étude ainsi que des pistes de poursuite qui permettront et de compléter ce travail. Parmi ces pistes, on proposera notamment un approfondissement expérimental et théorique de l'étude sur l'atténuation acoustique dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux. On présentera ensuite des éléments de conception pour un nouveau dispositif de mesure optoacoustique basé sur un interféromètre de Fabry-Pérot. On conclura ce chapitre en présentant une configuration de mesure permettant de coupler la mesure ultrason laser à la mesure de diffusion Brillouin sur un même échantillon.

4.1 Rappel des principaux résultats de propagation acoustique sur les sphéroïdes, analyse et comparaison avec les mesures de diffusion Brillouin

Dans cette section on va rappeler les résultats obtenus par ultrasons laser sur les sphéroïdes HT29 et HCT116. Puis nous allons présenter brièvement la diffusion Brillouin et les résultats obtenus par cette technique sur les sphéroïdes HCT116 et HT29 sur une gamme fréquentielle plus haute que celle accessible par les ultrasons lasers. On comparera ensuite les valeurs de vitesse du son et d'atténuation acoustique des sphéroïdes.

4.1.1 Rappel des résultats à l'aides des ultrasons lasers

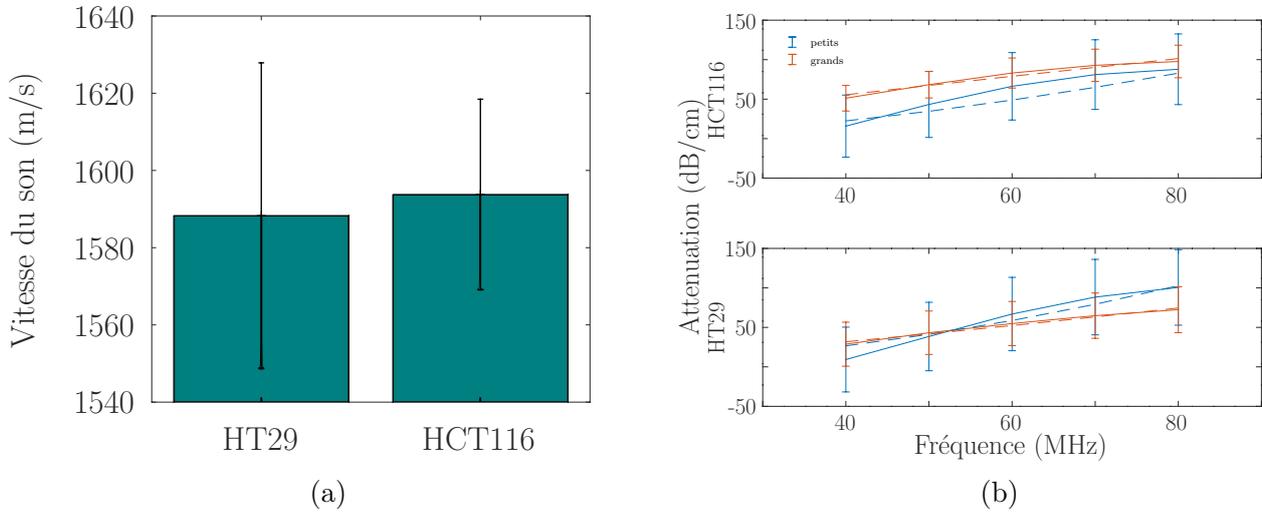


FIGURE 4.1 – Résultats de (a) vitesse du son et (b) d'atténuation acoustique sur les sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29

En figure 4.1a et 4.1b, on trace respectivement la vitesse du son et l'atténuation acoustique mesurées sur les sphéroïdes HCT116 et HT29 à l'aide du montage ultrason laser. On rappelle qu'on a montré dans les chapitres précédents que les valeurs de vitesse du son ne dépendaient pas significativement de la fréquence entre 20 et 120 MHz. On observe pas de différence de vitesse du son significative entre les lignées HT29 et HCT116. En ce qui concerne l'atténuation, on a montré que le comportement observé dépendait du diamètre des agrégats. Cette dépendance est très nette chez les sphéroïdes issus de la lignée HCT116 et un peu moins marquée chez les sphéroïdes HT29. Cette différence a été attribuée au fait que la gamme de diamètres étudiés pour la lignée HT29 était moins étendue. Aux faibles diamètres, on observe pas de différence très nette entre les deux lignées étudiées. Aux diamètres importants, l'exposant est plus faible et on observe une différence entre les deux lignées. La lignée HCT116 a une atténuation plus importante sur la gamme de fréquence 40-80 MHz, mais un exposant pour la loi en fréquence plus faible que la lignée HT29.

D'autres mesures proches de celles que nous avons effectuées ont été réalisées sur les sphéroïdes HCT116 et HT29. Il s'agit de mesures par diffusion Brillouin sur les sphéroïdes que nous allons présenter dans la sous-section suivante. Ces mesures sont enrichissantes car elles vont permettre la comparaison de données obtenues à des fréquences espacées d'une décade.

4.1.2 Mesures de diffusion Brillouin sur les sphéroïdes tumoraux

Dans cette section, nous allons commencer par présenter la diffusion Brillouin. On présentera ensuite rapidement le spectromètre utilisé pour les mesures ainsi que son principe de fonctionnement. On présentera finalement les résultats obtenus sur les sphéroïdes tumoraux avec cette technique de mesure.

Principe de la diffusion Brillouin

La diffusion Brillouin est un processus de diffusion inélastique de la lumière provoqué par l'interaction entre les phonons acoustiques naturellement présents dans un matériau et les photons incidents. Ces phonons correspondent à la propagation des ondes acoustiques dues à l'agitation thermique.[76] Dans cette mesure, on envoie un faisceau laser de longueur d'onde λ sur le matériau. Le spectre de la lumière diffusée sera constitué d'un pic intense à la même fréquence que le faisceau incident, mais aussi de deux pics décalés par rapport à la fréquence du faisceau incident. Ces deux pics, qu'on appelle les pics Stokes et anti-Stokes, vont être caractérisés par leur fréquence f_B et leur largeur à mi-hauteur Γ_B .

Le lien entre les paramètres physiques de la lumière diffusée (f_B , Γ_B) et les paramètres mécaniques du matériau étudié permettent d'utiliser la diffusion Brillouin comme outil de caractérisation non-invasive de matériau. Cela a notamment permis son utilisation dans l'étude de cellules individuelles[79] et de tissus biologiques[119], incluant les sphéroïdes tumoraux[52]. Cette technique a aussi été utilisée pour caractériser mécaniquement des objets aux dimensions nanométriques comme des nanoparticules[120] ou des biopolymères.[121]

Typiquement, dans les matériaux biologiques, les décalages de fréquences sont de l'ordre du GHz. Dans le cadre de notre étude, la diffusion Brillouin présente donc l'intérêt de nous renseigner sur les propriétés mécaniques des sphéroïdes dans une gamme de fréquences supérieures à celle accessible sur le montage ultrason laser. Les résultats de ces expériences, si on les met en commun avec les résultats obtenus sur le montage ultrason laser, permettront d'avoir des mesures de propriétés mécaniques à des fréquences séparées par plus d'une décade. Dans la sous-section suivante nous allons présenter le spectromètre utilisé pour l'expérience et les résultats obtenus sur des sphéroïdes fabriqués à partir de cellules des lignées HCT116 et HT29.

Structure du spectromètre Brillouin

Pour pouvoir tirer parti de la diffusion Brillouin, il faut utiliser un spectromètre afin de séparer les différentes composantes du spectre de la lumière diffusée. Deux types d'interféromètres sont principalement utilisés, les dispositifs de type tandem Fabry-Pérot[122] et les dispositifs basés sur un Virtually Imaged Phase Array (VIPA)[123]. Le spectromètre utilisé par G. Yan au sein de l'équipe biophysique pour effectuer les mesures sur les sphéroïdes est un spectromètre commercial basé sur un VIPA (Light Machinery, Hyperfine HF-8999-532).

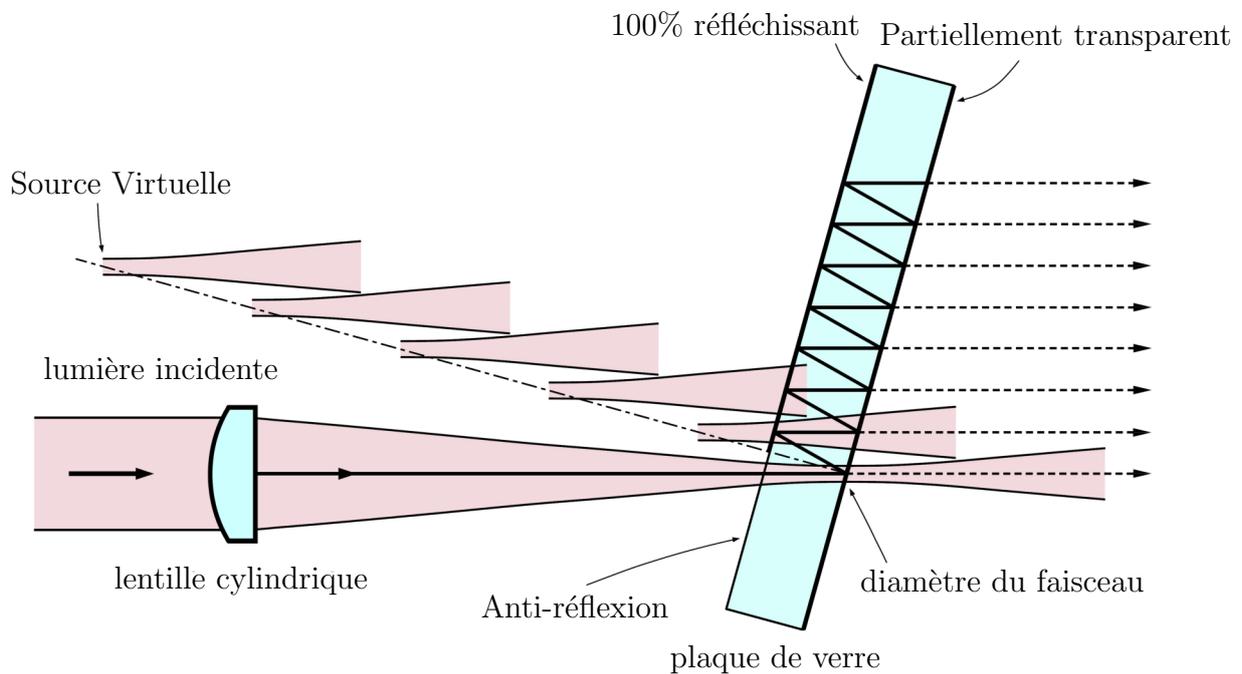


FIGURE 4.2 – Schéma de principe du VIPA. (adapté de Shirasaki [123])

Le principe physique du VIPA repose sur les interférences optiques et est décrit en figure 4.2. Le VIPA est une couche de verre dont la face avant est recouverte d'une couche 100 % réfléchissante, à l'exception d'une petite zone qui sert de point d'entrée de la lumière dans le dispositif. La face arrière est recouverte d'une couche très réfléchissante, mais pas totalement ce qui permet à la lumière de sortir du dispositif. Si un faisceau entre dans le dispositif avec un léger angle par rapport à la normale de la face avant, il y subit des réflexions multiples et à chaque réflexion sur la face arrière partiellement réfléchissante une partie de la lumière est transmise. On a donc en sortie une superposition de faisceaux déphasés les uns par rapport aux autres du fait du nombre d'allers-retours différents qu'ils ont effectué dans le VIPA. Cette somme

de faisceaux lumineux déphasés les uns par rapport aux autres produit des interférences qui séparent spatialement les composantes de différentes fréquences. Ici, en l'occurrence, on sépare la lumière diffusée élastiquement (Rayleigh) et celle diffusée inélastiquement (Brillouin). Il faut alors projeter la figure d'interférence sur une caméra CCD pour pouvoir enregistrer le spectre.

On ne détaillera pas ici la structure précise du spectromètre. Les aspects techniques de la mesure Brillouin peuvent être trouvés dans les travaux de Shirasaki[123]. Les informations propres à la structure du spectromètre Light Machinery sont disponibles sur la page internet du fabricant.

Résultats obtenus sur les sphéroïdes tumoraux et comparaison avec les ultrason laser

Dans cette section, nous allons présenter les résultats des mesures de diffusion Brillouin réalisées par G. Yan sur les sphéroïdes des lignées HCT116 et HT29.

Dans ces mesures, le spectromètre VIPA est couplé à un microscope confocal et le faisceau laser à 532 nm est focalisé sur l'échantillon avec un objectif 20X (N.A 0.35). La plaque 96 puits contenant les sphéroïdes est montée sur une platine et le microscope est placé dans une chambre où l'environnement de mesure est contrôlé. La température est fixée à 37°C et la concentration en CO₂ est fixée à 5%. Les mesures ont été réalisées sur 45 sphéroïdes HT29 et 48 sphéroïdes HCT116.

En figure 4.3 on présente les résultats des mesures Brillouin effectuées sur le spectromètre VIPA, c'est-à-dire la moyenne et l'écart type pour f_B et Γ_B sur l'ensemble des échantillons mesurés pour les lignées HCT116 et HT29. On constate que sur les deux lignées étudiées, le décalage en fréquence est le même. La largeur à mi-hauteur des pics Brillouin donne des résultats différents en fonction de la lignée étudiée. La lignée HT29 a largeur à mi-hauteur la plus élevée et la lignée HCT116 a la plus faible. Si on veut pouvoir relier la largeur à mi-hauteur mesurée en Brillouin à une atténuation acoustique, il faut faire une hypothèse sur le comportement du matériau. Ici on se place dans le cadre du modèle d'oscillateur harmonique amorti. Dans le cadre de ce modèle, on peut relier le module d'onde longitudinale complexe M du matériau aux paramètres des pics correspondant à la diffusion Brillouin dans le spectre de

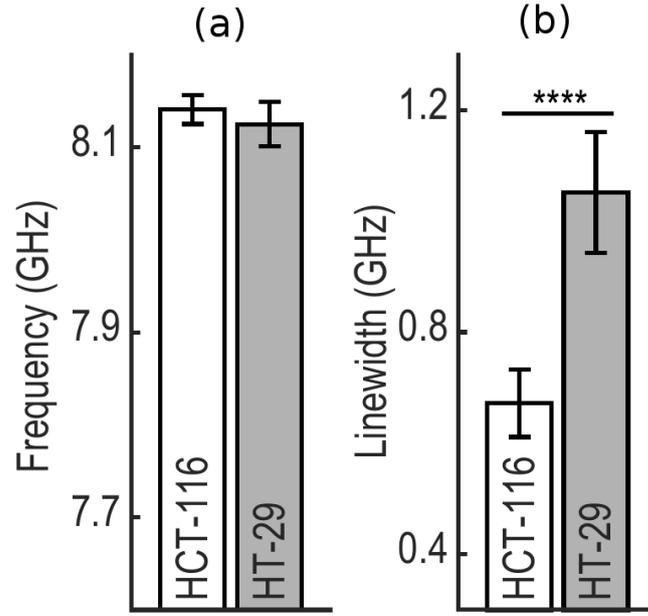


FIGURE 4.3 – (a) Fréquences Brillouin et (b) largeur à mi-hauteur des pics Brillouin mesurés sur des sphéroïdes tumoraux fabriquées à partir de lignées HCT116 et HT29.

la lumière diffusée par l'échantillon[121] :

$$f_B = \frac{1}{2\pi} q M'(f_B) = \frac{1}{2\pi} q V \quad (4.1)$$

$$\Gamma_B = \frac{M''(f_B) q^2}{2\pi \rho f_B} \quad (4.2)$$

où $q = \frac{4\pi n_{opt}}{\lambda}$ est le vecteur d'onde optique et $M'(f_B)$ et $M''(f_B)$ sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire du module d'onde longitudinale. Si on suppose qu'on est en régime de faible amortissement, on peut également écrire[124] :

$$\alpha = \frac{2\pi f M''(f)}{2\rho V^3} \quad (4.3)$$

ce qui nous permet de relier l'atténuation à la partie imaginaire du module d'onde longitudinale.

Donc si on injecte l'équation 4.3 dans l'équation 4.2 on obtient :

$$V = \frac{2\pi f_B}{q} \quad (4.4)$$

$$\alpha = \frac{4\pi^2 f_B^2 \Gamma_B}{2q^2 V^3} = \frac{\Gamma_B}{2V} \quad (4.5)$$

ce qui nous permet de relier le décalage en fréquence et la largeur à mi-hauteur des pics Brillouin

à la vitesse du son et à l'atténuation et de comparer les mesures ultrasons laser aux mesures Brillouin.

Pour extraire une vitesse du son à partir de la fréquence Brillouin mesurée sur les sphéroïdes, il faut donc connaître l'indice optique de l'échantillon étudié. Des mesures d'indice optique ont été réalisées par tomographie en cohérence optique sur des sphéroïdes HCT116. La gamme mesurée est comprise entre 1.35 et 1.39.[125] La variabilité observée sur ces mesures provient principalement de la taille des sphéroïdes, les sphéroïdes les plus petits ayant un indice plus élevé. Si on injecte cette gamme de valeurs dans l'équation 4.1 et qu'on utilise les fréquences obtenues par diffusion Brillouin, on obtient une vitesse du son entre 1555 m/s et 1590 m/s pour les HCT116. Cette gamme de valeurs est compatible avec celle obtenue sur les mesures ultrasons laser où les valeurs sont de 1590 m/s avec un écart type de 30 m/s sur l'ensemble des échantillons pour les deux lignées. Il n'y a pas de mesures d'indice optique disponibles pour les sphéroïdes HT29, mais le fait que la valeur de fréquence Brillouin soit presque identique et que la vitesse du son mesurée par ultrason laser soit la même pour les deux lignées peut laisser penser que la vitesse du son est aussi la même entre les deux lignées en diffusion Brillouin. Donc, en ce qui concerne la vitesse du son, on peut considérer que les deux expériences donnent des résultats similaires.

En ce qui concerne l'atténuation acoustique, si on utilise la formule 4.5, on obtient une valeur d'atténuation comprise entre $1.27 \cdot 10^5$ dB/cm et $1.30 \cdot 10^5$ dB/cm pour les sphéroïdes HCT116 et entre $1.80 \cdot 10^5$ dB/cm et $1.85 \cdot 10^5$ dB/cm pour les sphéroïdes HT29. On va donc pouvoir comparer ces résultats aux résultats obtenus sur le montage ultrasons laser.

Comparaison avec les données Ultrason Laser

Pour des fréquences d'excitation acoustique de l'ordre du GHz, la fréquence mesurée par diffusion Brillouin est identique pour les lignées HT29 et HCT116 et on a pu voir que les valeurs de vitesse du son étaient compatibles avec celles obtenues sur le montage ultrasons laser. En revanche, les résultats d'atténuation acoustique obtenus lors des deux expériences sont différents. Les mesures par diffusion Brillouin étant beaucoup plus rapides à effectuer que les mesures sur le montage ultrason laser, les résultats obtenus par cette méthode correspondent uniquement à des sphéroïdes ayant grandi pendant 3 jours, c'est-à-dire aux sphéroïdes de faibles

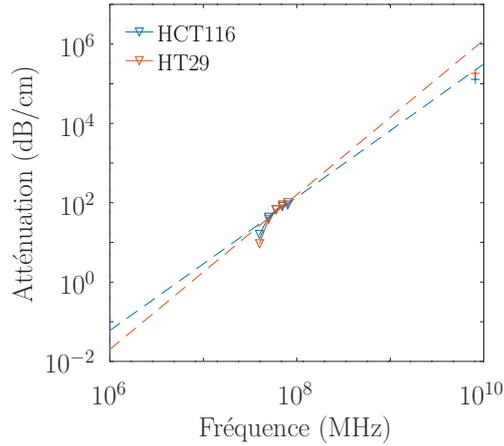


FIGURE 4.4 – Résultats d’atténuation pour les sphéroïdes issus des lignées HCT116 (bleu) et HT29 (orange) obtenus sur le montage ultrason laser (triangles) et par diffusion Brillouin (croix). Les pointillés représentent l’extrapolation des lois Bf^n obtenues par la méthode des moindres carrés sur les mesures ultrasons lasers.

diamètres sur le montage ultrason laser. Il semble donc logique de comparer les résultats obtenus par diffusion Brillouin à ceux obtenus sur les sphéroïdes de petites tailles dans les mesures réalisées sur le montage ultrasons laser. Sur le montage ultrasons laser, on a obtenu des résultats sur lesquels on a ajusté une loi de la forme Bf^n .

En figure 4.4, on trace sur le même graphe les résultats obtenus sur les sphéroïdes de faibles diamètres avec le montage ultrason laser et par diffusion Brillouin. On peut voir que si on extrapole la tendance suivie par les résultats ultrasons laser jusqu’à la fréquence acoustique sondée par le spectromètre Brillouin (pointillés), on obtient des valeurs d’atténuation supérieures à celles effectivement mesurées sur les sphéroïdes issus de la lignée HT29. On constate donc un décalage entre la tendance en fréquence observée dans les mesures effectuées sur le montage ultrason laser et les valeurs obtenues à partir des résultats des mesures par diffusion Brillouin dans certains cas. Cependant, il faut nuancer l’importance de cet écart en considérant la précision du montage ultrason laser et la fiabilité de l’extrapolation.

On ne connaît pas l’origine physique de la loi de puissance. On ne sait pas non plus la raison pour laquelle l’atténuation acoustique se comporte différemment pour les sphéroïdes de diamètres plus importants alors que la vitesse n’est pas impactée. Pour cette raison, dans la section suivante nous allons présenter des outils de modélisation et tenter d’explorer des pistes d’explications pour nos observations.

4.2 Modèles théoriques pour la description des sphéroïdes tumoraux et conclusions de l'étude

Dans cette section, nous allons présenter brièvement plusieurs familles de modèles récemment utilisés dans la littérature pour interpréter les résultats de mesures mécaniques réalisées sur des cellules, des tissus ou des sphéroïdes. Deux familles de modèles sont souvent utilisées pour décrire le comportement mécanique des tissus biologiques dans différentes expériences : les modèles viscoélastiques[49][53][126] et les modèles poroélastiques[54][127][128]. Les modèles viscoélastiques sont souvent utilisés pour décrire des expériences de microaspirations de cellules ou d'agrégats de cellules, tandis que les modèles poroélastiques sont généralement utilisés dans les modèles de croissance et permettent de bien décrire l'émergence de contraintes résiduelles dans les agrégats de cellules tumoraux et les tumeurs. Certaines expériences incluant des phénomènes de croissance utilisent également des modèles hyperélastiques[39], mais les ondes acoustiques ne génèrent pas de déformations importantes et on peut donc se contenter d'une théorie linéaire en première approche. Dans la suite, nous allons donc discuter qualitativement des modèles viscoélastiques et poroélastiques dans le cadre de l'étude des sphéroïdes et de l'analyse de nos résultats.

4.2.1 Modèles Viscoélastiques

Les modèles viscoélastiques sont des modèles utilisés pour décrire les matériaux ayant une réponse qui n'est ni purement élastique, ni purement visqueuse. Ces modèles ont été développés dès le milieu du XIXe siècle, notamment par Maxwell, Boltzmann et Kelvin, pour décrire la réponse mécanique des polymères.[129] Dans le cadre biologique, ces modèles ont été utilisés pour décrire les propriétés des ligaments,[130][131] et depuis quelques années pour décrire la réponse mécanique des cellules et des tissus.[49][53]

Ces modèles sont conçus pour décrire des systèmes physiques dont le comportement n'est ni complètement élastique ni complètement visqueux. Pour cela on utilise des lois de comportement faisant intervenir un ou plusieurs termes élastiques par exemple sous forme d'une loi de Hooke, ou visqueux, par exemple sous forme de loi de Newton. De cette façon, on obtient une loi déformation-contrainte pour le système qui peut faire intervenir des dérivées temporelles de

ces deux quantités ce qui, lorsqu'on passe en régime fréquentiel, va correspondre à un module mécanique complexe et dépendant de la fréquence d'excitation.

Pour donner une représentation visuelle de ces modèles, on représente souvent les systèmes sous forme de "circuits mécaniques" où sont connectés en série ou en parallèle des ressorts qui représentent les composantes élastiques, et des pistons qui représentent les composantes visqueuses. Les deux modèles viscoélastiques les plus simples sont les modèles de Maxwell et Kelvin-Voigt qui correspondent respectivement à un système composé d'un ressort et d'un piston en parallèle, et à un système composé d'un ressort et d'un piston en série (voir fig. 4.5)



FIGURE 4.5 – Schéma des modèles viscoélastiques de (a) Maxwell et (b) Kelvin-Voigt

On va détailler ici dans le cas du modèle de Kelvin-Voigt comment on peut obtenir la vitesse du son et l'atténuation acoustique. La loi de comportement déformation-contrainte s'écrit :

$$\sigma = K_{ve}\epsilon + \eta_{ve}\frac{d}{dt}\epsilon \quad (4.6)$$

où σ et ϵ sont respectivement la déformation et la contrainte imposées à l'élément de volume du système et où K_{ve} et η_{ve} correspondent respectivement au module élastique et à la viscosité du système viscoélastique. On passe ensuite dans le domaine fréquentiel en prenant la transformée de Fourier de cette équation, on obtient

$$\tilde{\sigma} = \frac{jK_{ve}\omega\eta_{ve}}{K_{ve} - j\omega\eta_{ve}}\tilde{\epsilon} = M_{ve}\tilde{\epsilon} \quad (4.7)$$

où $\tilde{\sigma}$ et $\tilde{\epsilon}$ sont les transformées de Fourier de σ et ϵ . Dans ce cas, $M_{ve} = M'_{ve} + iM''_{ve}$ va correspondre au module d'onde longitudinale complexe du matériau et il caractérise son comportement mécanique en fonction de la fréquence d'excitation. C'est à partir de ce module

mécanique qu'on va pouvoir extraire une atténuation et une vitesse du son [132] :

$$V(\omega) = [\Re(\sqrt{\frac{\rho}{M_{ve}(\omega)}})]^{-1} \quad (4.8)$$

$$\alpha(\omega) = -\omega \Im(\sqrt{\frac{\rho}{M_{ve}(\omega)}}) \quad (4.9)$$

où ρ est la densité du matériau considéré. On peut alors définir un temps caractéristique τ_{ve} pour le système qui va s'écrire :

$$\tau_{ve} = \frac{\eta_{ve}}{K_{ve}} \quad (4.10)$$

Pour les temps d'excitation grands devant τ_{ve} , le système va avoir une réponse purement élastique. Alors qu'aux temps courts, le système va devenir de plus en plus rigide (M_{ve} augmente) et dissiper de plus en plus d'énergie lorsqu'on vient le solliciter mécaniquement. C'est généralement ce modèle qui est considéré en ultrasons, et qui conduit à une atténuation α proportionnelle à ω^2 , comme dans l'équation 4.1.

On utilise bien souvent des modèles plus complexes que les modèles de Maxwell ou de Kelvin-Voigt pour décrire des systèmes biologiques et ces modèles permettent d'obtenir un bon accord avec les données expérimentales. En revanche, l'aspect très synthétique du modèle rend souvent l'interprétation physique des résultats compliquée puisqu'on ne connaît que rarement le lien précis entre les paramètres viscoélastiques mesurées et la structure et/ou les processus physiques à l'oeuvre dans l'objet étudié. De plus, si les modèles simples que sont le modèle de Maxwell, le modèle de Kelvin-Voigt et le modèle de Zener permettent de décrire de nombreux systèmes de manière satisfaisante, ils ne prédisent pas d'évolution de l'atténuation en loi de puissance. Une autre famille de modèles régulièrement utilisée est la famille des modèles poroélastiques.

4.2.2 Modèles Poroélastiques

Le premier modèle poroélastique a été proposé par Biot dans les années 50 et était utilisé pour décrire le comportement mécanique des roches poreuses saturées de fluide.[133] Le modèle a depuis été repris et adapté pour décrire la réponse mécanique des gels[134][135][136] et des

tissus biologiques[54][127]. Dans ce modèle, on décrit le matériau en représentant une phase solide et une phase fluide. Ces phases peuvent interagir par le biais de différents mécanismes comme par exemple la friction.

Cette famille de modèles se décline en plusieurs possibilités qui découlent de différentes modélisations pour la phase solide et la phase fluide. En effet, la phase solide peut être un solide élastique non-linéaire ou linéaire, isotrope ou non. De la même manière, le fluide peut être un fluide simple ou un fluide non-newtonien, viscoélastique ou même viscoplastique. On s'intéressera uniquement au modèle où le solide est considéré comme élastique linéaire et où le fluide est considéré comme un fluide simple newtonien. Cette approche est basée sur les travaux de Johnson qui effectue une synthèse de travaux précédents sur l'élastodynamique des milieux poreux, notamment ceux de Tanaka et Bacri.[135]

On écrit les équations du mouvement pour les deux phases. Pour la phase solide, l'équation de mouvement s'écrit[135] :

$$\rho_{11} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{u} + \rho_{12} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{U} = P \nabla(\nabla \cdot \mathbf{u}) + Q \nabla(\nabla \cdot \mathbf{U}) + N \nabla \times \nabla \times \mathbf{u} + bF(\omega) \left(\frac{\partial}{\partial t} \mathbf{U} - \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{u} \right) \quad (4.11)$$

et pour la phase fluide[135] :

$$\rho_{22} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{U} + \rho_{12} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{u} = R \nabla(\nabla \cdot \mathbf{U}) + Q \nabla(\nabla \cdot \mathbf{u}) - bF(\omega) \left(\frac{\partial}{\partial t} \mathbf{U} - \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{u} \right) \quad (4.12)$$

\mathbf{u} et \mathbf{U} sont respectivement les vecteurs de déplacement du solide et du fluide. P et N décrivent la dynamique de la phase solide en compression et en cisaillement. Q décrit le couplage élastique entre le fluide et le solide. R décrit la dynamique du fluide en compression et $bF(\omega)$ décrit l'ensemble des processus de friction entre les phases fluide et solide avec :

$$bF(\omega) = \frac{\eta \phi^2}{\zeta} F(\omega) \quad (4.13)$$

où ϕ la concentration de fluide dans le système biphasique, η la viscosité dynamique du fluide, ζ la perméabilité du fluide et $F(\omega)$ une fonction décrivant une correction à apporter à la friction en fonction de la fréquence.[137] Les déplacements des deux phases sont décrits par le même type d'équation à l'exception du terme $N \nabla \times \nabla \times \mathbf{u}$ qui est absent de l'équation fluide car on néglige

les efforts de cisaillement dans le fluide. Dans les deux équations on retrouve dans le membre de gauche des termes inertiels avec des densités effectives ρ_{11} , ρ_{12} et ρ_{22} , qui décrivent le couplage inertiel du fluide et du solide. On note que ce n'est pas équivalent au couplage visqueux décrit par le terme $bF(\omega)(\frac{\partial}{\partial t}\mathbf{U} - \frac{\partial}{\partial t}\mathbf{u})$ et peut s'y superposer. Dans ce modèle les densités effectives ρ_{11} , ρ_{12} et ρ_{22} peuvent prendre des valeurs complexes qui permettent de décrire les processus dissipatifs.[135]. Pour obtenir l'équation de propagation, puis les vecteurs d'onde complexes, et en déduire la vitesse du son et l'atténuation, il faut donc résoudre le système de deux équations différentielles constitué par les équations 4.11 et 4.12. La présentation détaillée des expressions des différentes solutions de l'équation de propagation ne présenterait que peu d'intérêt dans le cas de notre étude car les solutions ont des expressions comprenant de nombreux paramètres. On se contentera ici d'une présentation qualitative de différentes solutions asymptotiques et de leur comportement. Le système comportant deux équations différentielles d'ordre 2, il existe 4 solutions à l'équation de propagation qu'on obtient en prenant le déterminant du système d'équations. Ces quatre solutions représentent chacune un type d'onde :

- une onde de compression rapide correspondant au mouvement en phase du solide et du fluide
- une onde de compression lente correspondant au mouvement en opposition de phase des deux phases
- une onde de cisaillement qui correspond à la transmission des ondes cisaillement par le squelette élastique
- une onde de fréquence nulle (solution triviale)

Dans notre cas, on va se concentrer sur l'onde de compression rapide car nous n'observons pas d'onde de cisaillement avec le montage ultrason laser et que l'onde de diffusion lente est souvent fortement atténuée, ce qui va rendre sa détection difficile sur les deux montages expérimentaux.[133][135] Pour étudier le comportement de l'onde de compression rapide, on étudie des cas limites dans les régimes dits "haute fréquence" et "basse fréquence" tels que décrits par Johnson et Biot dans leur travaux. Ces deux régimes sont déterminés par le rapport entre la taille de pore dans le réseau élastique, a , et l'épaisseur de peau visqueuse, δ , qui s'écrit

de la façon suivante[133][135] :

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho_f \omega}} \quad (4.14)$$

avec ρ_f la masse volumique du fluide et ω la fréquence d'excitation acoustique. Pour des valeurs de ω élevées, l'épaisseur de peau visqueuse devient petite devant la taille de pore a , ce qui signifie que la viscosité ne va pas générer beaucoup de friction lors de l'écoulement du fluide dans les pores et que la dissipation qui en résulte sera négligeable. À l'inverse pour des valeurs de ω faibles, la dissipation par friction va être importante lors l'écoulement du fluide dans les pores. La fréquence limite entre les régimes haute fréquence et basse fréquence va s'écrire :

$$\omega_c = \frac{2\eta}{\rho_f a^2} \quad (4.15)$$

Comportement en fréquence de la vitesse du son de l'onde de compression rapide dans le modèle poroélastique

En ce qui concerne la vitesse du son de l'onde de compression rapide (premier type onde de dilatation dans les travaux de Biot), il est utile de définir une valeur de référence qu'on appellera V_0 et qui est la vitesse de l'onde qu'on mesurerait si tout mouvement relatif du solide et du fluide était empêché.[133] Dans son étude, Johnson considère que pour un squelette élastique peu rigide par rapport au fluide, cette vitesse du son peut s'écrire comme celle d'une suspension, en suivant la formule de Wood[138][139][140] :

$$V_0 = \sqrt{\frac{K^*}{\rho_T}} \quad (4.16)$$

avec :

$$\frac{1}{K^*} = \frac{\phi}{K_f} + \frac{1-\phi}{K_s} \quad (4.17)$$

et

$$\rho_T = \phi\rho_f + (1-\phi)\rho_s \quad (4.18)$$

où ρ_f et ρ_s sont respectivement les densités de solide et de fluide. K_f est le module de compression isostatique du fluide et K_s celui du solide. On précise ici que lorsqu'on parle de rigidité du squelette K_b , on considère l'ensemble des fibres et de leur liaisons, il ne s'agit pas de K_s qui est généralement plus élevé que K_f et K_b .

Dans sa discussion numérique du modèle, Biot montre qu'à l'exception du cas où le solide est bien plus dense que le fluide (solide 4 fois plus dense), la valeur V_0 est la valeur minimale de vitesse du son à basse fréquence. Lorsque la fréquence augmente en restant dans la limite du régime basse fréquence, la vitesse de l'onde de compression va croître mais seulement de quelques centièmes de pourcents d'après les applications numériques de Biot.[133] Johnson écrit également la vitesse du son de l'onde rapide à basse fréquence comme V_0 multipliée par un coefficient proche de 1 et dépendant des caractéristiques du squelette élastique.[135] Dans leurs travaux sur les propriétés mécaniques des hydrogels, Wu et al. choisissent ce type de modélisation, ce qui implique qu'ils considèrent que ces systèmes répondent en régime basse fréquence lors de leur expérience de diffusion Brillouin.[80]

À haute fréquence ($\omega \gg \omega_c$), la forme du coefficient de friction change, ce qui modifie les racines de l'équation de propagation et en conséquence la vitesse du son de l'onde de compression rapide. Biot montre qu'à haute fréquence la vitesse du son va croître de façon plus ou moins significative en fonction des propriétés mécaniques des deux phases, avec des écarts à la valeur de référence V_0 pouvant aller jusqu'à 15% si les deux composantes présentent de fortes différences de compressibilité et de densité.[137]

Les comportements en fréquence observés lors de nos mesures sur les sphéroïdes peuvent être expliqués dans le cadre du modèle poroélastique. En effet il existe des cas où la vitesse ne varie même pas de 1% sur plus d'une décade à basse fréquence.[137] Dans le cadre du modèle de Biot une faible variation de la vitesse du son à haute fréquence peut aussi suggérer un faible contraste acoustique entre les composantes solides et fluides du système en terme de densité et de rigidité.

Comportement en fréquence de l'atténuation de l'onde de compression rapide dans le modèle poroélastique

L'atténuation de l'onde de compression rapide croît généralement de manière significative avec la fréquence dans le régime basse fréquence.[133] Dans son étude Johnson donne la formule suivante pour l'atténuation α (γ dans l'article de Johnson) de l'onde rapide, toujours dans le cas d'un squelette moins rigide que le fluide et dans le régime basse fréquence [135] :

$$\alpha(\omega) = \frac{1}{2} \frac{\zeta(1-\phi)^2(\rho_f - \rho_s)^2}{\eta V_0 \rho_T} \omega^2 \quad (4.19)$$

où ζ est la perméabilité du fluide selon la loi de Darcy. Le fait que la viscosité η se retrouve au dénominateur peut sembler contre-intuitif si on se rappelle de l'équation 4.3 pour l'atténuation dans un fluide. En régime basse fréquence, la fonction $F(\omega)$ est proche de 1.[133][135] Donc la friction se résume au terme b . Ce terme b se retrouve au dénominateur des solutions de l'équation d'onde et c'est pour cette raison que l'atténuation générée par la friction fait intervenir η au dénominateur.[135][136] Physiquement, l'atténuation va être reliée aux turbulences de l'écoulement de fluide dans les pores. Un flux très laminaire dans les pores sera très peu turbulent et donc dissipera très peu d'énergie par turbulence. Un des moyens de quantifier la turbulence d'un écoulement est le nombre de Reynolds[141] :

$$\text{Re} = \frac{\rho_f v_f a}{\eta} \quad (4.20)$$

avec v_f la vitesse d'écoulement du fluide. Un nombre de Reynolds faible signifie que le flux sera très laminaire, or on peut voir en équation 4.20 qu'un nombre de Reynolds faible correspond à une viscosité de fluide élevée. Donc une viscosité importante signifie que l'écoulement sera laminaire et que l'atténuation sera faible car on dissipera peu d'énergie par turbulence lors de l'écoulement dans les pores.[133] Si on met de côté le rôle de la viscosité du fluide, la tendance en fréquence reste cependant la même que dans l'équation 4.5. Donc à basse fréquence, la friction croît comme le carré de la fréquence.[135]

À haute fréquence, on ne peut plus approximer l'écoulement dans les pores par un écoulement de Poiseuille. En conséquence, l'atténuation acoustique ne suit plus une loi en ω^2 mais une loi en $\sqrt{\omega}$. [137] Physiquement, cette transition s'opère car une fréquence acoustique ω plus élevée

signifie que la vitesse augmente dans l'équation 4.20 ce qui va rendre l'écoulement turbulent. Dans ce cas, le terme $F(\omega)$ ne vaut plus 1 et induit une dépendance en fréquence supplémentaire pour le terme de friction.

Donc dans le modèle poroélastique proposé par Johnson et inspiré du modèle de Biot, l'atténuation acoustique va croître comme le carré de la fréquence en régime basse fréquence et comme la racine carré de la fréquence à haute fréquence. Cette atténuation acoustique a pour source les turbulences qui peuvent se produire au sein du fluide lors de l'écoulement dans les pores. On peut raffiner le modèle en décrivant le fluide par un modèle Kelvin-Voigt. On tient compte de ce phénomène en ajoutant un terme d'atténuation analogue à celui décrit en équation 4.5. Ce point est abordée en détail par Johnson dans son article.[135]

Comme on vient de le voir la famille de modèles poroélastiques offre une description plus détaillée du système que les modèles viscoélastiques, mais avec le désavantage d'être plus complexe mathématiquement ce qui oblige à introduire davantage d'hypothèses de modélisations ainsi que des constantes pas nécessairement mesurables expérimentalement notamment dans les systèmes biologiques. On note également que dans le cas du modèle présenté ici on n'obtient pas non plus de loi de puissance pour le comportement en fréquence de l'atténuation. Dans la sous-partie suivante nous allons présenter des modèles permettant d'obtenir un comportement en loi de puissance pour l'atténuation acoustique

4.2.3 Modèles en loi de puissance

Si les modèles viscoélastiques et poroélastiques standards ne permettent pas d'obtenir une loi de puissance pour l'atténuation, il est possible de modifier ces modèles pour obtenir une atténuation et/ou une vitesse du son qui varie avec la fréquence en suivant une loi de puissance.

Physiquement, les temps caractéristiques observés dans les modèles poroélastiques et viscoélastiques constituent une limite assez nette entre deux régimes différents. Cependant, dans les systèmes où de nombreuses tailles caractéristiques et processus physiques aux temps de relaxations différents peuvent influencer la réponse physique du système, cette description avec un seul temps de relaxation ne fonctionne pas. C'est généralement dans cette catégorie, qui inclue les systèmes biologiques, mais aussi les verres et certains gels qu'on observe des lois de puissances qu'on peut expliquer notamment en considérant un continuum de temps de

relaxation.[46][142].

Un modèle simple permettant d'obtenir un comportement en loi de puissance est le modèle de Rhéologie en loi de puissance ou Power Law Rheology (PLR). [143][144] Le module d'onde longitudinale dans ce modèle va s'écrire de la façon suivante :

$$M = K_{ve} + \eta_{ve}(j\omega)^x \quad (4.21)$$

avec x un paramètre compris 0 (solide élastique) et 1 (fluide visqueux). Ce type de modèle a déjà été utilisé pour décrire la réponse mécanique de tissus rénaux porcins dans des expériences de rhéologie. Un autre modèle un peu plus complexe permettant d'obtenir des exposants entre 0 et 1 pour l'atténuation est le modèle de Cole-Davidson, qui a notamment été utilisé pour décrire les verres [124] et dans lequel le module d'onde longitudinale s'écrit :

$$M = M_\infty - \frac{\rho\Delta_M}{(1 + i\omega\tau_{CD})^x} \quad (4.22)$$

où τ_{CD} et n sont deux paramètres représentant la dynamique de relaxation du système, $\Delta = c_\infty^2 - c_0^2$ où c_∞ (et $M_\infty = \rho c_\infty$) est la vitesse du son du système non relaxé (i.e si on le sollicite à une échelle de temps bien plus courte que tous les temps de relaxation) et c_0 la vitesse du son du système relaxé. Dans ce modèle, pour des temps caractéristiques grands devant τ_{CD} , qui représente le centre de la distribution de temps de relaxation, le système va voir son atténuation varier comme ω^2 et au delà, l'atténuation va varier en suivant une loi en ω^{1-x} avec $x < 1$, ce qui peut correspondre au comportement observé dans les sphéroïdes au MHz.

On notera que de nombreux modèles, poroélastiques et viscoélastiques, peuvent donner lieu à des comportements en loi de puissance. [145][146] Cette analyse nous permet donc d'avoir une première idée de l'origine physique du comportement en loi de puissance. En ce qui concerne la diminution de l'exposant liée à l'augmentation du diamètre, elle montre bien que l'organisation de l'agrégat évolue lors de la croissance de ce dernier. Une perspective intéressante pourrait être d'évaluer précisément la relation entre le diamètre de l'agrégat et l'exposant de la loi d'atténuation. Cela nous permet tout de même de conclure que l'atténuation est sensible à l'organisation interne de l'agrégat et peut permettre de son suivre son évolution.

4.2.4 Conclusions des discussions sur les modèles théoriques

Dans cette sous-partie nous avons mis en commun les résultats des mesures Brillouin et ultrasons laser. La comparaison a permis de mettre en évidence que si on extrapolait la tendance suivie par les mesures ultrasons laser on trouvait des valeurs d'atténuation globalement compatible avec celles obtenues en diffusion Brillouin si on tient compte de l'imprécision des mesures. Cela nous a donc permis de conclure que l'atténuation des sphéroïdes semble suivre une loi de puissance sur deux décades. On a également discuté brièvement des implications de l'influence du diamètre sur le comportement en fréquence de l'atténuation dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux.

4.2.5 Conclusions générales de l'étude

L'objectif de notre étude était d'apporter de nouvelles données expérimentales sur les propriétés mécaniques des sphéroïdes multicellulaires tumoraux. Il est intéressant de mesurer les propriétés mécaniques de ces sphéroïdes cellulaires car leur organisation les rend physiologiquement proches des tumeurs *in vivo* et leurs propriétés mécaniques peuvent être de potentiels marqueurs de l'état de la tumeur et peuvent permettre de suivre son évolution. La structure complexe des sphéroïdes tumoraux rend leurs propriétés mécaniques difficiles à prédire puisqu'on ne dispose pas encore de modèles satisfaisants pour les décrire. Ce projet avait donc pour but d'utiliser les ondes acoustiques afin d'étudier ces propriétés mécaniques complexes sur une gamme de fréquences étendue afin de mieux comprendre le comportement mécanique de ces objets.

Afin d'étudier les propriétés mécaniques des sphéroïdes, nous avons mis en place un montage ultrason laser permettant de générer des ondes acoustiques avec une bande passante de 0 à 120 MHz, et nous les avons détectées à l'aide d'un interféromètre de Michelson stabilisé. Nous avons ensuite calibré ce montage pour des mesures sur de l'eau avant de l'utiliser pour réaliser des expériences de propagation acoustique dans des sphéroïdes tumoraux fabriqués à partir de cellules des lignées HCT116 et HT29. Nous avons analysé les signaux enregistrés et nous avons réalisé une première étude en temps de vol qui nous a permis d'extraire la vitesse du son dans les sphéroïdes des deux lignées. Nous avons pu vérifier qu'elle ne dépend pas non plus du taux de compression pour des compressions de l'ordre de 100 μm sur des sphéroïdes ayant des diamètres compris entre 250 et 500 μm et que le volume des sphéroïdes ne changeait pas, ce qui nous a permis de valider notre approche de mesure de vitesse. Nous avons également réalisé une étude en amplitude qui nous a permis d'extraire une atténuation acoustique dans les deux lignées. La vitesse du son mesurée dans les deux lignées ne dépend pas de la fréquence acoustique entre 20 et 120 MHz. Pour les deux lignées, on a obtenu une valeur moyenne d'environ 1590 m/s. L'atténuation acoustique que nous avons pu extraire entre 40 et 80 MHz suit pour les deux lignées une loi de puissance. Les valeurs obtenues sont proches de celles obtenues sur des tumeurs constituées du même type de cellule dans le cas des cellules HT29.

Afin d'approfondir notre étude nous avons souhaité comparer ces données à des résultats obtenus par diffusion Brillouin sur des sphéroïdes issus des mêmes lignées HCT116 et HT29.

La fréquence Brillouin moyenne obtenue sur les deux lignées est de 8.12 GHz. Grâce à une valeur d'indice optique trouvée dans la littérature pour des sphéroïdes HCT116, nous avons pu convertir ces valeurs de fréquences Brillouin en vitesse du son et nous avons obtenu pour les deux lignées une valeur de vitesse du son très proche de 1590 m/s ce qui correspond à la valeur moyenne obtenue sur le montage ultrason laser. La largeur à mi-hauteur obtenue sur les sphéroïdes HCT116 est de 1.0 GHz tandis que celle obtenues sur les sphéroïdes HT29 est de 0.7 GHz. Nous avons étudié des hypothèses de modélisations permettant d'expliquer qualitativement nos observations.

Le fait que les deux lignées aient des vitesses du son proches peut s'expliquer par le fait que ces dernières sont biologiquement très proches ce qui se traduit par des structures internes assez similaires et donc une réponse mécanique proche en ce qui concerne la vitesse du son. Ces résultats mettent en évidence qu'il est a priori plus simple de distinguer deux lignées de sphéroïdes de constitutions proches en étudiant leur atténuation acoustique qu'en étudiant leur vitesse du son. Cela suggère la vitesse du son n'est pas un marqueur très sensible pour analyser le grade d'une tumeur. L'atténuation semble également pouvoir rendre compte de l'évolution de la structure de l'agrégat au cours de sa croissance.

Les résultats suggèrent que l'atténuation pourrait croître plus rapidement avec la fréquence dans les lignées à grade métastatique plus faible. Quelques études similaires ont été menées à ce jour. Un premier exemple d'étude similaire est l'étude sur les propriétés viscoélastiques des cellules de deux lignées de cancer colorectal de grade métastatiques différentes (HT29 et SW480) par Pachenari *et al.* Dans leur étude ils ont démontré que leur résultats sur des expériences de microaspirations pouvaient être décrit par un modèle de Zener et que les cellules au grade métastatique le plus faible étaient globalement moins déformables.[2] Un autre exemple est l'étude menée par Rebelo *et al.* où ils ont extrait des constantes viscoélastiques sur des lignées de cellules cancéreuses proches en utilisant de la microscopie à force atomique. [147] Le consensus dans ce type d'études étant que les cellules provenant de lignées plus invasives sont généralement les moins visqueuses et les plus déformables.[148][149][150]

L'ensemble des résultats présentés ici ont permis de répondre à certaines questions mais en ont soulevé de nouvelles. Quel est le potentiel de l'atténuation acoustique en tant que marqueur dans l'étude du cancer ? Quel modèle mécanique est adéquat pour la description des propriétés

des tissus biologiques en terme de propagation d'ondes acoustiques ? Dans la section suivante, nous allons présenter les perspectives ouvertes par notre étude sur les propriétés mécaniques des sphéroïdes à l'aide des ondes acoustiques.

4.3 Perspectives et Expériences futures

Dans cette partie nous allons présenter les mesures qu'on souhaiterait réaliser dans la continuité de ce projet ainsi que le travail préliminaire déjà effectué dans ce sens. Dans un premier temps, nous allons aborder la suite à donner aux mesures d'atténuation acoustique sur les sphéroïdes tumoraux, les pistes de réalisations techniques de telles mesures ainsi que leur potentielles applications. Dans un second temps, nous présenterons un second dispositif de mesure optoacoustique basé sur un étalon Fabry-Pérot qui a pour objectif de coupler sur un même dispositif la mesure de signaux acoustique et la mesure de force lors de compression quasi-statique sur des sphéroïdes tumoraux. On va ensuite décrire un projet d'expérience où on couple les mesures Brillouin et les mesures ultrason laser sur le même échantillon afin de pouvoir réaliser ces deux mesures simultanément sur un même échantillon, également dans le but d'approfondir la dépendance en fréquence de l'atténuation.

4.3.1 Atténuation acoustique dans les sphéroïdes multicellulaires tumoraux

Dans cette sous-section nous allons présenter des expériences pouvant potentiellement apporter des éclairages sur cette question ainsi que des pistes d'applications pour la mesure d'atténuation acoustique sur des tissus cancéreux. Nous présenterons ensuite des pistes de poursuite de cette étude expérimentale.

Une piste évidente de la poursuite d'étude de l'atténuation dans les sphéroïdes HCT116 et HT29 serait d'utiliser un transducteur piézoélectrique à une fréquence entre 1 et 10 GHz. Cela permettrait, qui plus est, de s'affranchir de l'influence potentiel de l'indice optique ou de la diffusion optique dans la mesure de l'atténuation par diffusion Brillouin. Cependant, si de tels dispositifs existent, ils sont généralement difficiles à fabriquer et donc coûteux.[151][152] Une fois que des mesures d'atténuation acoustique fiables pourront être obtenues sur les deux

systèmes, on pourra envisager de poursuivre avec des mesures à différentes stades de croissance et dans différentes régions des agrégats. On pourrait éventuellement s'inspirer de l'étude de Guillaume *et al.* et étudier l'effet de la concentration initiale de cellules sur l'atténuation mesurée dans les différentes gammes de fréquences.[39]

Une étude applicative que nous pourrions mener porterait sur la corrélation entre le grade métastatique des différentes lignées cellulaires et l'atténuation acoustique mesurée sur les sphéroïdes tumoraux. On pourrait par exemple mesurer les propriétés acoustiques de la lignée SW480, qui est plus invasive que les HT29, mais moins invasive que les HCT116.[32] On pourrait également envisager de tester d'autres types de lignées comme des lignées issues de cellules mammaires (MCF-7, par exemple). On pourrait également envisager de faire des mesures sur des mutants dont on aurait modifié les propriétés en altérant, par exemple, les jonctions cellules-cellules ou la structure de la matrice extracellulaire. On pourrait également tenter de coupler nos mesures d'atténuation au marquage de protéines pertinentes afin de tenter d'évaluer le lien potentiel entre l'organisation de ces protéines et l'atténuation mesurée dans l'agrégat.

Une expérience pertinente dans la suite de ce cheminement serait d'arriver à évaluer l'atténuation acoustique à une échelle de temps inférieure à la minute sur des sphéroïdes lorsque ces derniers sont soumis à des changements d'environnements, tels que des chocs osmotiques ou l'exposition à des traitements anti-cancéreux. Cependant une telle étude sera un peu plus compliquée à réaliser car les sphéroïdes exposés à la drogue sont plus difficile à manipuler car ils se désagrègent aux temps longs.[32] Une telle étude est envisageable en l'état sur le spectromètre VIPA. En revanche, sur le montage ultrason laser, elle demandera une amélioration du rapport signal sur bruit afin de pouvoir réduire la durée d'acquisition. Il est également envisageable de réaliser cette étude avec un seul transducteur acoustique plan ayant une fréquence de l'ordre du MHz.

Une piste pour améliorer le rapport signal sur bruit serait de développer un dispositif de mesure optoacoustique basé sur un interféromètre de Fabry-Pérot. En outre un tel système permettrait d'obtenir le module d'Young des sphéroïdes. C'est ce que nous allons décrire dans la sous partie suivante.

4.3.2 Mesure optoacoustique par le biais d'un étalon Fabry-Pérot

Dans les chapitres précédents, nous avons présenté des mesures de déplacements à l'aide d'un interféromètre de Michelson. Bien que nous ayons pu réaliser notre étude sur les sphéroïdes et extraire des vitesses du son et des atténuations acoustiques, l'interféromètre de Michelson reste sensible aux fluctuations et doit donc être stabilisé à l'aide d'un correcteur PID. Cela ralentit considérablement le système d'acquisition et oblige à travailler proche du régime d'ablation. Une manière de s'affranchir de cette contrainte et potentiellement de gagner en sensibilité serait d'utiliser un interféromètre de Fabry-Pérot.[153] De plus nous projetons également d'utiliser ce dispositif pour mesurer des forces et obtenir de façon innovante le module d'Young des sphéroïdes en régime quasi-statique. C'est ce que nous allons détailler ici.

Le principe de base d'un interféromètre de Fabry-Pérot est de créer une cavité optique à l'aide de deux surfaces réfléchissantes parallèles. Lorsque de la lumière entre dans cette cavité, la superposition des réflexions dans la cavité crée des interférences optiques qui vont moduler l'intensité en sortie du dispositif. Si on utilise une couche de polymère ou d'un matériau déformable transparent comme cavité, on peut obtenir un interféromètre très peu sensible aux fluctuations et qui permet la détection d'ultrasons[154] et la mesure d'autres grandeurs physiques, comme la température, de façon simultanée selon les caractéristiques du dispositif.[155] Nous avons donc décidé de concevoir un interféromètre de Fabry-Pérot qui nous permettra de mesurer des ondes ultrasonores générées par ultrason laser sans utiliser de stabilisation. Par ailleurs, on espère aussi mesurer des efforts quasi-statiques de compression en utilisant un matériau de rigidité connue dans la cavité optique pour connaître la force exercée lors des compressions. On pourra ainsi mesurer le module d'Young des sphéroïdes lors de compressions quasi-statiques et étendre la gamme de fréquences accessibles. Dans cette section nous allons nous inspirer des modèles théoriques et de dispositifs déjà réalisés pour proposer une méthode de réalisation d'un interféromètre de Fabry-Pérot. Un point important à respecter est le compromis entre sensibilité et gamme dynamique, ce qui dépend des paramètres optiques et mécaniques de l'interféromètre. On commencera par détailler les aspects optiques du dispositif, puis on présentera les aspects mécaniques. On terminera sur les premiers tests réalisés et les résultats obtenus.

Partie Optique

Dans cette sous-partie, on va s'inspirer des travaux de P. Beard *et al.*[154] sur ce type de dispositif pour proposer des éléments de dimensionnement optique de notre dispositif. On va dans un premier temps rappeler les équations optiques qui déterminent le fonctionnement d'un interféromètre de Fabry-Pérot, puis on s'en servira pour discuter les paramètres importants et obtenir une sensibilité optique théorique pour un tel dispositif.

On rappelle brièvement le principe de l'interféromètre de Fabry-Pérot : Le rayon incident entre dans la cavité formée par deux surfaces parallèles et subit des réflexions partielles. Ces ondes réfléchies interfèrent constructivement ou destructivement selon leur longueur d'onde, entraînant une modulation de l'intensité lumineuse.

Dans notre cas, on va utiliser l'interféromètre de Fabry-Pérot en réflexion donc on va écrire son coefficient de réflexion en intensité R_{FP} [156] :

$$R_{FP} = \frac{F \sin^2\left(\frac{4\pi n l}{\lambda}\right)}{1 + F \sin^2\left(\frac{4\pi n l}{\lambda}\right)} \quad (4.23)$$

$$(4.24)$$

avec :

$$F = \frac{4R}{(1 - R)^2} \quad (4.25)$$

où R est le coefficient de réflexion en intensité des miroirs délimitant la cavité, n est l'indice optique dans la cavité, l est la longueur de la cavité, θ est l'angle entre le faisceau incident et la normale au miroir d'entrée et λ la longueur d'onde du faisceau incident. Dans cette formule, on peut déjà se rendre compte que si on change la longueur de la cavité, on fait varier le coefficient de réflexion et donc l'intensité du rayon réfléchi. De ce fait, si on connaît le module d'Young de matériau dans la cavité, on peut remonter à une mesure de force à partir du déplacement mesuré.

Le paramètre F est ce qu'on va appeler la finesse de l'interféromètre. Afin d'illustrer le sens physique de F , on a tracé en figure 4.6 le coefficient de réflexion en fonction d'une longueur de

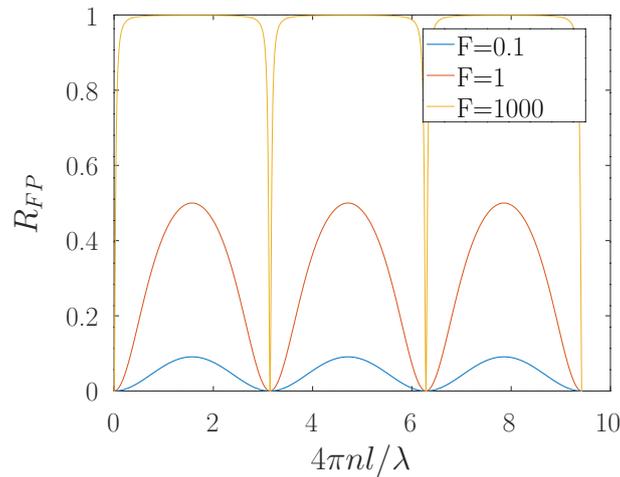


FIGURE 4.6 – Coefficient de réflexion en intensité R_{FP} en fonction de $\frac{4\pi nl}{\lambda}$ pour différentes valeurs de la finesse F

cavité normalisée par la longueur d'onde pour un interféromètre utilisé en incidence normale, et ce pour différentes finesesses. On peut voir que pour une finesse F élevée les minima apparaissent pour des longueurs très précises et que le contraste est élevé, alors que pour une finesse F faible les pics sont très larges et l'amplitude de variation du coefficient R_{FP} est plus faible. Pour obtenir une finesse importante, il faut prendre des miroirs très réfléchissants et à l'inverse des miroirs peu réfléchissants conduiront à une finesse faible.

La question de la finesse va être notre premier sujet de réflexion pour le choix des paramètres de l'interféromètre. Tout comme l'interféromètre de Michelson, si on souhaite utiliser l'interféromètre pour la mesure de déplacement il faut utiliser la zone "linéaire" de la courbe de fonctionnement. On peut voir en figure 4.6 que pour des finesesses importantes, une faible variation de la longueur de cavité l génèrera une variation significative du coefficient de réflexion. En revanche, la gamme de déplacement mesurable sans sortir de la zone linéaire sera faible. Si on diminue la finesse, on va augmenter la gamme de déplacement mesurable au prix d'une diminution de sensibilité. Dans notre cas, étant donné qu'on souhaiterait pouvoir mesurer à la fois les compressions quasi-statiques et les ondes acoustiques sur un même dispositif il est nécessaire de privilégier une large gamme dynamique si on y perd pas trop en sensibilité. De plus tout comme dans le cas du Michelson on doit pouvoir voir à travers le dispositif pour repérer le sphéroïde lors des mesures. Si à terme on espère pouvoir réaliser un dispositif utilisant des miroirs dichroïques on doit pour l'instant également garantir une visibilité suffisante pour distinguer le sphéroïde avec des miroirs "large bande" qui serviront de prototype. Pour cette

raison on utilisera des couches peu réfléchissantes aux extrémités de notre cavité. Contrairement à l'interféromètre de Michelson, l'interféromètre de Fabry-Pérot tel qu'on souhaite le fabriquer ne devrait pas être sujet aux fluctuations dues à l'environnement, ce qui devrait déjà améliorer le rapport signal sur bruit des signaux acoustiques, et ce malgré une finesse peu élevée.

Maintenant qu'on a présenté la partie optique, on va présenter la partie acoustique la sous-section suivante.

Aspect mécanique

Dans cette sous-section, on va utiliser le modèle proposé par Beard [154] pour obtenir les caractéristiques acoustiques de l'interféromètre. Dans son étude, Beard définit la sensibilité acoustique du dispositif comme la variation d'intensité lumineuse réfléchie par unité de pression appliquée. Si on se place près du centre de la zone linéaire telle que définie dans la sous-section précédente, cette quantité s'écrit [154] :

$$\frac{dI_0}{P_0} = \frac{8\pi n I (1 - R) R T_{ac} \psi}{E k \lambda} \quad (4.26)$$

$$(4.27)$$

où T_{ac} est le coefficient de transmission acoustique entre le dispositif et le milieu de provenance de l'onde acoustique mesurée, n l'indice optique de la cavité optique, E le module d'Young du matériau utilisé dans la cavité optique, I l'intensité lumineuse incidente, R est le coefficient de réflexion en amplitude des miroirs de la cavité et k est le vecteur d'onde acoustique. ψ est une somme de termes sinusoïdaux qui donnent une estimation l'amplitude de l'onde acoustique dans la cavité en tenant compte des réflexions multiples. Dans notre cas, l'interféromètre de Fabry-Pérot est pris entre une couche de verre et une couche d'eau (ou de sphéroïde) d'où provient l'onde acoustique. Dans ce cas, $T_{ac} = 1$ et ψ s'écrit [154] :

$$\psi = 2 \sin(kl) \quad (4.28)$$

On peut alors réécrire la sensibilité acoustique :

$$\frac{dI_0}{P_0} = \frac{8\pi n I (1 - R) R \lambda_{ac}}{\lambda} \frac{\lambda_{ac}}{E} \sin\left(\frac{\pi l}{\lambda_{ac}}\right) \quad (4.29)$$

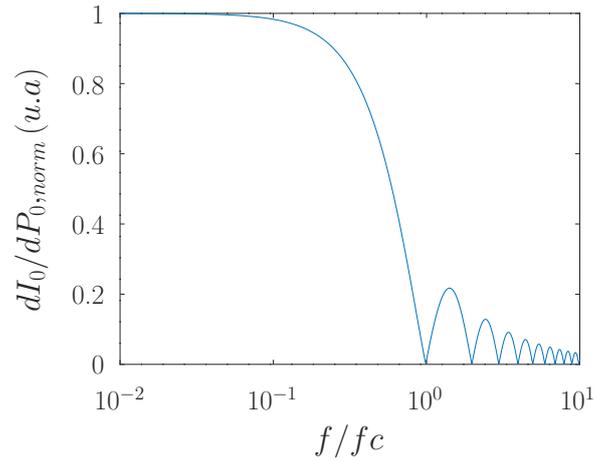


FIGURE 4.7 – Sensibilité acoustique en fonction de la fréquence pour un interféromètre de Fabry-Pérot monté sur un substrat rigide

La sensibilité dépend donc de la fréquence acoustique, et va nous permettre de déterminer la bande passante du système. On trace en figure 4.7 la sensibilité acoustique en fonction de la fréquence d’excitation acoustique pour un système monté sur un substrat rigide. On peut définir une fréquence critique $f_c = V/2l$, où V est la vitesse du son du matériau dans la cavité optique. En dessous de cette fréquence, la sensibilité est constante, ce qui correspond au cas où $\frac{\pi l}{\lambda_{ac}}$ est proche de zéro. Dans cette gamme de fréquence, la sensibilité est donc donnée par :

$$\frac{dI_0}{P_0}_{f \rightarrow 0} = \frac{16\pi n I (1-R) R l}{\lambda E} = \frac{dI_0}{P_0_{max}} \quad (4.30)$$

On peut voir dans l’équation 4.30 que, à paramètre optiques fixés, la sensibilité va dépendre principalement de l’épaisseur de la cavité et de la rigidité du matériau qui la compose. Si on veut une large bande passante il faut augmenter f_c en augmentant la vitesse du son du matériau ou en diminuant son épaisseur. Mais l’augmentation de la vitesse s’accompagne généralement d’une augmentation du module d’Young ce qui va faire globalement chuter la sensibilité. Il en va de même pour la longueur de cavité l . Si on la diminue, on va augmenter la bande passante mais la sensibilité va diminuer. Il faut donc trouver un couple rigidité/longueur de couche qui permettent d’avoir une bande passante suffisante tout en maintenant une bonne sensibilité. De plus l’épaisseur de la couche et sa rigidité pose la question de sa fabrication. Il ne sera pas forcément simple d’obtenir l’épaisseur ou la rigidité souhaitée sur un matériau donné. Nous allons aborder ces questions dans la sous-section suivante où nous allons présenter les étapes du protocoles que nous avons mis en place pour réaliser les premiers interféromètres.

Réalisation technique

Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de réaliser la cavité de l'interféromètre de Fabry-Pérot en utilisant du PolyDiMethylSiloxane (PDMS). De nombreuses techniques ayant déjà été développées pour ce matériau dans l'équipe où nous travaillons, choisir le PDMS nous a permis de tirer parti d'un nombre d'équipements facilitant la fabrication des couches. Un autre avantage du PDMS est qu'on peut changer sa rigidité en modifiant le rapport base/réticulant dans le mélange initial. En ce qui concerne les miroirs du Fabry-Pérot, nous avons choisi de déposer des couches de Chrome 15 nm avec un évaporateur sous vide. Cette épaisseur nous permet à la fois d'avoir suffisamment du signal réfléchi tout en conservant suffisamment de transparence pour pouvoir repérer un sphéroïde sous le dispositif avec la caméra. Pour faciliter la fabrication et la manipulation nous avons décidé de réaliser l'interféromètre de Fabry-Pérot sur un substrat de verre. Nous avons donc utilisé une lamelle couvre-objet similaire à celles utilisées sur l'interféromètre de Michelson.

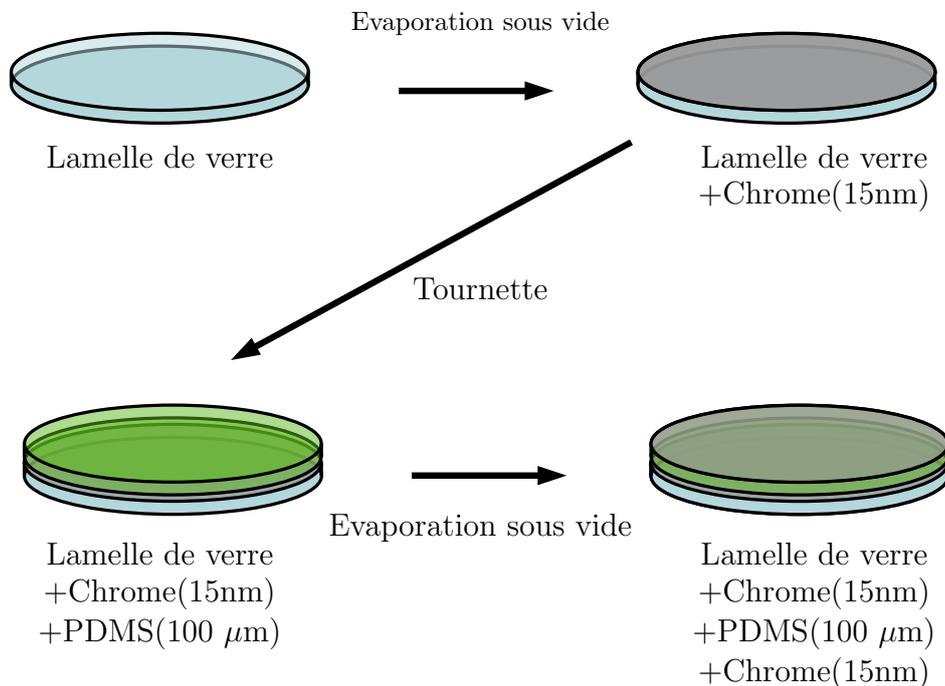


FIGURE 4.8 – Schéma des différentes étapes de fabrication de l'interféromètre de Fabry-Pérot.

On illustre en figure 4.8 les différentes étapes de fabrication de l'interféromètre de Fabry-Pérot. La première étape de fabrication consiste à déposer la première couche de Chrome de

15 nm d'épaisseur sur la lamelle de verre.

La seconde étape de fabrication est le dépôt de la couche de PDMS. La méthode que nous avons privilégié est le dépôt de couche sur tournette (spin-coating). On dépose le substrat en verre recouvert de Chrome sur la tournette et on y place une petite quantité de PDMS. On met l'ensemble en rotation en fixant l'accélération et la vitesse angulaire de la tournette ainsi que la durée de rotation en fonction de l'épaisseur de couche souhaitée. Cette technique permet d'obtenir un bon état de surface. Cependant des effets de bords provoquent l'apparition d'un bourrelet de PDMS qui s'étale ensuite lors de la réticulation. Ce phénomène complique grandement l'obtention de surfaces planes et parallèles qui sont nécessaires au bon fonctionnement de l'interféromètre. Une solution consiste à faire tourner l'ensemble sur la tournette pendant plusieurs heures afin que la réticulation se fasse sans interruption de la force centrifuge qui maintient le bourrelet au bord du dispositif. Mais la réticulation complète du PDMS à température ambiante durant plus de 8h cette méthode est contraignante. D'autres solutions de dépôt de couches sont donc à l'étude.

La dernière étape consiste à déposer la seconde couche de Chrome sur l'ensemble verre/Chrome/ PDMS. Certaines précautions doivent être prises. Par exemple pour éviter que la couche de PDMS ne perturbe le dépôt en dégazant dans la chambre, il est nécessaire de le laisser dans l'évaporateur au moins une nuit avant le dépôt de la couche de Chrome. Une autre observation est que si le rapport base/réticulant est trop faible (5:1 par exemple), l'état de surface du dépôt de métal sera mauvais et le dispositif sera inutilisable car la deuxième couche de Chrome aura un aspect totalement dépoli.

La difficulté à obtenir des couches de PDMS planes avec nos méthodes de dépôt actuelles fait que nous n'avons pas encore pu produire de signaux acoustiques comparables à ceux obtenus sur le Michelson et que les arguments de dimensionnement présentés dans la partie précédentes n'ont pas pu être mis en œuvre. Mais des figures d'interférences ont pu être observées sur certains dispositifs ce qui laisse penser qu'une fois le problème de la planéité des couches de PDMS résolu, on pourra acquérir des signaux et optimiser le dispositif. Dans la sous-section suivante nous allons aborder la mise en place d'une expérience couplant le montage ultrason laser et le spectromètre VIPA.

4.3.3 Expériences de mesure Brillouin en compression

Dans cette sous-section nous allons présenter un montage où sont couplées la mesure ultrason laser et la mesure par diffusion Brillouin. Cela va nous permettre à terme d'étudier la corrélation entre la vitesse du son et l'atténuation mesurées par le biais des deux méthodes sur un seul échantillon.

Spectromètre Brillouin couplé à la compression du montage ultrason laser

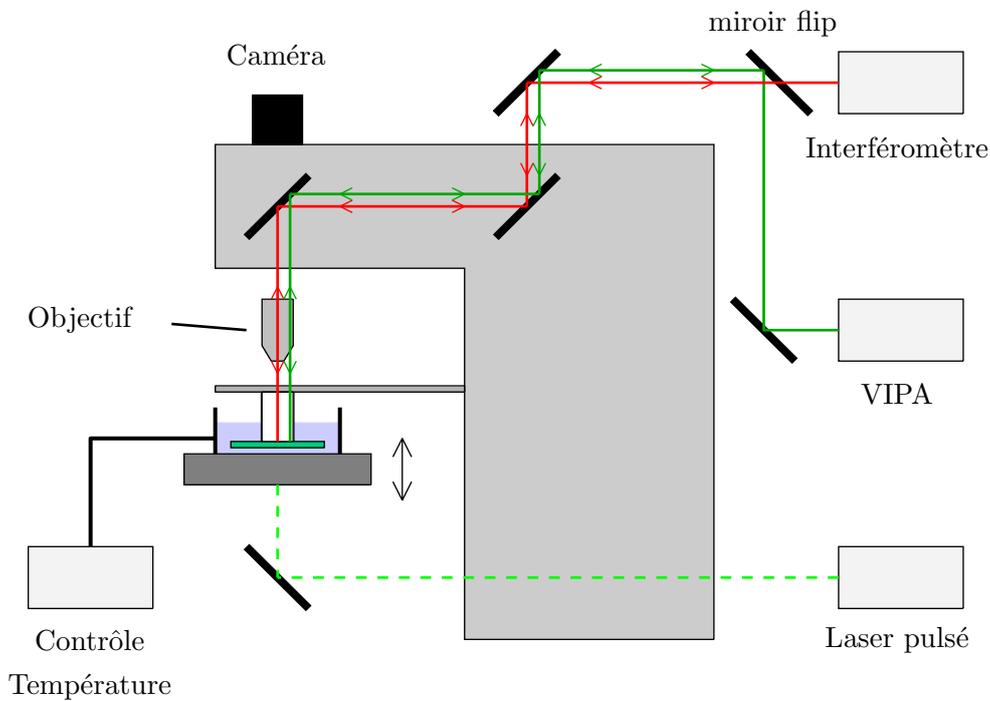


FIGURE 4.9 – Montage expérimental rassemblant l'expérience ultrason laser et le spectromètre basé sur le VIPA.

On présente en figure 4.9 le montage expérimental rassemblant la mesure ultrason laser et la mesure Brillouin pour un même échantillon. On reprend le schéma présenté précédemment pour les mesures dans l'eau. Le spectromètre VIPA est positionné sur une table optique dédiée adjacente à celle utilisée pour le montage ultrason laser. Le laser du spectromètre est ensuite dirigé sur le chemin optique de l'interféromètre et on utilise un miroir basculant pour envoyer

soit le faisceau du spectromètre Brillouin, soit le faisceau de l'interféromètre de Michelson vers l'échantillon. Une fois les deux faisceaux alignés de manière coaxiale on peut commencer les mesures "couplées".

Une fois l'échantillon mis en place dans la cuve régulée en température, on utilise le moteur pour commencer à comprimer le sphéroïde. Une fois le niveau de compression souhaité atteint on peut réaliser au choix la mesure ultrason laser ou la mesure Brillouin. La mesure ultrason laser ayant déjà été présentée on va ici discuter de la mesure Brillouin.

Pour pouvoir effectuer la mesure Brillouin, on doit focaliser le faisceau laser du spectromètre au centre du sphéroïde, contrairement au faisceau du Michelson qui doit lui être focalisé sur la surface de la lamelle dichroïque. La difficulté étant que les deux faisceaux passent par le même objectif. Afin de focaliser la faisceau Brillouin dans l'échantillon, on le décollimate légèrement afin de le rendre divergent avant son passage dans l'objectif pour que son point focal soit légèrement plus bas que celui du faisceau Michelson qui lui est collimaté. Les caractéristiques de la lamelle dichroïque sont également importantes puisque la lamelle doit réfléchir le faisceau de l'interféromètre de Michelson, mais pas du spectromètre Brillouin si on veut pouvoir réaliser la mesure Brillouin. C'est pour cette raison que le laser du spectromètre que nous avons choisi a une longueur de 532 nm.

Dans cette expérience l'objectif utilisé est l'objectif 4X/0.10 utilisé pour le montage ultrason laser. Ce choix est imposé par la présence du bras et du tube de fixation de la lamelle. Les objectifs à plus fort grossissement ont des distances de travail trop courtes (<1 cm) pour être utilisés avec l'ensemble lamelle-bras-tube. L'objectif va donc fixer la taille des spots laser de l'interféromètre et du spectromètre. Pour l'interféromètre cette taille de spot a été mesurée et vaut environ 70 μm pour le laser rouge (633 nm). Nous n'avons pas mesuré précisément le diamètre du spot vert du spectromètre mais les dimensions doivent être similaires. Il faut également tenir compte de la profondeur de la zone d'éclairement pour le Brillouin qui dans cette expérience sera d'environ 200 μm . De ce fait lorsqu'on va extraire les pics Brillouin, leurs caractéristiques seront une moyenne sur l'ensemble de la zone centrale de l'échantillon comme illustré en figure 4.10

Le temps d'acquisition pour chaque position est d'environ une minute afin d'obtenir des spectres ayant un rapport signal sur bruit suffisant. On a enregistré des spectres à 10 positions

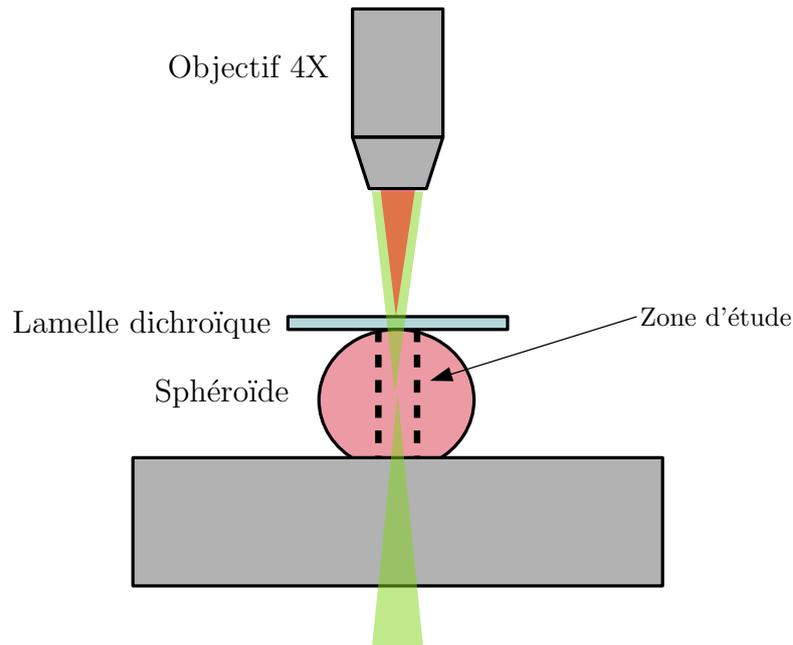


FIGURE 4.10 – Illustration de la focalisation des différents faisceaux sur le montage couplé Brillouin-Ultrason laser

pour chaque échantillon étudié. La distance verticale entre deux positions sera de $10\ \mu\text{m}$.

Des mesures préliminaires ont été réalisées mais la sensibilité des alignements optiques rend la réalisation de mesures simultanées difficiles. On observe notamment une forte diminution du rapport signal sur bruit pour la mesure Brillouin et les jeux de données ne sont pas exploitables en l'état. Mais de nouveaux essais seront effectués dans l'avenir.

4.3.4 Résumé des perspectives

Notre étude des propriétés mécaniques des sphéroïdes tumoraux à l'aide d'ondes acoustiques a fourni des résultats intéressants et intrigants, notamment en terme d'atténuation acoustique sur les lignées de cellules HCT116 et HT29. On propose donc d'approfondir cette étude en améliorant nos mesures sur les deux lignées déjà étudiées et en l'étendant à d'autres lignées, colorectales ou non, afin de mieux comprendre le comportement de l'atténuation acoustique dans les agrégats de cellules cancéreux et d'évaluer son intérêt en tant que marqueur pour la biophysique du cancer.

Un nouveau dispositif de mesure optoacoustique a été mis à l'étude et nous avons démarré sa conception. Si des signaux acoustiques n'ont pas encore pu être mesurés avec ce dispositif,

des tests sont en cours pour résoudre les problèmes techniques et pourront potentiellement mener à l'enregistrement de signaux acoustiques et à des mesures de forces sur les sphéroïdes cellulaires tumoraux, ce qui viendrait compléter notre étude sur les propriétés mécaniques des sphéroïdes tumoraux.

Des mesures de diffusion Brillouin et les mesures ultrasons laser sur les sphéroïdes tumoraux ont été comparées sur l'ensemble des échantillons des deux lignées. Mais on souhaiterait pouvoir pousser l'étude en comparant les mesures de propriétés mécaniques échantillons par échantillons. Pour cette raison nous avons souhaité coupler le montage ultrason laser et le spectromètre VIPA pour qu'ils puissent mesurer un échantillon de façon quasi-simultanée. Mais nous avons rencontré des difficultés lors des premières mesures. Cette étude devra donc également être poursuivie plus tard.

Bibliographie

- [1] E.C Klatt. *Robbins and Cotran Atlas of Pathology*. 2014.
- [2] M Pachenari, SM Seyedpour, M Janmaleki, S Babazadeh Shayan, S Taranejoo, and H Hosseinkhani. Mechanical properties of cancer cytoskeleton depend on actin filaments to microtubules content : investigating different grades of colon cancer cell lines. *J Bio-mech.*, 47(2) :373–379, 2014.
- [3] Sangwoo Kwon and Kyung Kim. Qualitative analysis of contribution of intracellular skeletal changes to cellular elasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 10 2019.
- [4] Sui Huang and Donald E. Ingber. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*, 8(3) :175 – 176, 2005.
- [5] Giuliano Scarcelli and Seok Yun. *Brillouin Scanning Microscopy in Keratoconus*, pages 167–173. 12 2017.
- [6] Joshua Webb, Hongyuan Zhang, Abhijit Sinha Roy, James Randleman, and Giuliano Scarcelli. Detecting mechanical anisotropy of the cornea using brillouin microscopy. *Translational Vision Science and Technology*, 9 :26, 06 2020.
- [7] Tijana Lainović, Jérémie Margueritat, Quentin Martinet, Xavier Dagany, Larisa Blažić, Dejan Pantelić, Mihailo Rabasović, Aleksandar Krmpot, and Thomas Dehoux. Micro-mechanical imaging of dentin with brillouin microscopy. *Acta Biomaterialia*, 105, 01 2020.
- [8] Georg Osterhoff, Elise Morgan, Sandra Shefelbine, Lamya Karim, Laoise Mcnamara, and Peter Augat. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury*, 47 :S11–S20, 06 2016.
- [9] Christopher S. Chen. Mechanotransduction – a field pulling together? *Journal of Cell Science*, 121(20) :3285–3292, 2008.
- [10] Guillermo García-Cardena, Jason Comander, Keith Anderson, Brett Blackman, and M.A. Gimbrone. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 :4478–85, 05 2001.
- [11] Mano J. Thubrikar and Francis Robicsek. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *The Annals of Thoracic Surgery*, 59(6) :1594 – 1603, 1995.

- [12] Peter Friedl and Katarina Wolf. Plasticity of cell migration : A multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*, 188 :11–9, 01 2010.
- [13] Jan Brábek, Claudia Mierke, Daniel Rösel, Pavel Vesely, and Ben Fabry. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell communication and signaling : CCS*, 8 :22, 09 2010.
- [14] Julien Aureille. *Mécanotransduction au cours du cycle cellulaire : Rôle de la déformation de l'enveloppe nucléaire*. PhD thesis, 12 2018.
- [15] Thomas Burkholder. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12 :174–91, 02 2007.
- [16] John Haycock. 3d cell culture : A review of current approaches and techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 695 :1–15, 01 2011.
- [17] Tomasz Kolenda, Marta Kapałczyńska, Weronika Przybyła, Maria Zajączkowska, Anna Teresiak, Violetta Filas, Matthew Ibbs, Renata Bliźniak, Łukasz Łuczewski, and Katarzyna Lamperska. 2d and 3d cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14, 11 2016.
- [18] Brendon Baker and Christopher Chen. Deconstructing the third dimension : How 3d culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science*, 125 :3015–24, 07 2012.
- [19] Franziska Hirschhaeuser, Heike Menne, Claudia Dittfeld, Jonathan West, Wolfgang Mueller-Klieser, and Leoni Kunz-Schughart. Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*, 148 :3–15, 07 2010.
- [20] Susan Breslin and Lorraine Driscoll. Three-dimensional cell culture : the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*, 18, 10 2012.
- [21] Bashar Emon, Jessica Bauer, Yasna Jain, Barbara Jung, and Taher Saif. Biophysics of tumor microenvironment and cancer metastasis - a mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16 :279 – 287, 2018.
- [22] Abbas Samani, Judit Zubovits, and Donald Plewes. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues : An inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Physics in medicine and biology*, 52 :1565–76, 04 2007.

- [23] Andrew Handorf, Yaxian Zhou, Matthew Halanski, and Wan-Ju Li. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*, 11 :1–15, 01 2015.
- [24] Maria Kalli and Triantafyllos Stylianopoulos. Defining the role of solid stress and matrix stiffness in cancer cell proliferation and metastasis. *Frontiers in Oncology*, 8, 03 2018.
- [25] Charlotte Alibert, Bruno Goud, and Jean-Baptiste Manneville. Are cancer cells really softer than normal cells? *Biology of the Cell*, 109, 02 2017.
- [26] Tyler Jacks, Alexander Oudenaarden, Kevin Kung, Anna Lyubimova, David Agus, Nathan Choi, Daniel Hillis, Ahyoung Joo, Jonathan Katz, Parag Mallick, Shannon Mumenthaler, Jenny Wan, Jenolyn Francisca Alexander, Paolo Decuzzi, Mauro Ferrari, Biana Godin, Srimeenakshi Srinivasan, Wadih Arap, Renata Pasqualini, and Shashaanka Ashili. A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells. *Scientific Reports*, 02 2014.
- [27] Xiaolin Cui, Yusak Hartanto, and Hu Zhang. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of The Royal Society Interface*, 14, 02 2017.
- [28] A. Moscona and H MOSCONA. Dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of anatomy*, 86 :287–301, 08 1952.
- [29] R Sutherland, J McCredie, and W Inch. Sutherland rm, mccredie ja, inch wrgrowth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *j natl cancer inst* 46 : 113-120. *Journal of the National Cancer Institute*, 46 :113–20, 02 1971.
- [30] Gianpiero Lazzari, Patrick Couvreur, and Simona Mura. Multicellular tumor spheroids : a relevant 3d model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polym. Chem.*, 8 :4947–4969, 2017.
- [31] Maria Wartenberg, F Dönmez, F Ling, Helmut Acker, Jürgen Hescheler, and Heinrich Sauer. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15 :995–1005, 05 2001.
- [32] Angélique Virgone-Carlotta, Manon Lemasson, Hichem C. Mertani, Jean-Jacques Diaz, Sylvain Monnier, Thomas Dehoux, Hélène Delanoë-Ayari, Charlotte Rivière, and Jean-

- Paul Rieu. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids : Effects of 5-fluorouracil. *PLOS ONE*, 12(11) :1–18, 11 2017.
- [33] Karina Kwapiszewska, Agnieszka Zuchowska, M Rybka, Radoslaw Kwapiszewski, and Zbigniew Brzózka. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab on a chip*, 14 :2096, 05 2014.
- [34] Hon Fai Chan, Ying Zhang, Yi-Ping Ho, Y.-L Chiu, Youngmee Jung, and K.W. Leong. Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *sci rep 3. Sci. Rep.*, 01 2013.
- [35] Karl Olofsson, Valentina Carannante, Mathias Ohlin, Thomas Frisk, Keiichiro Kushiro, Madoka Takai, Andreas Lundqvist, Björn Önfelt, and Martin Wiklund. Acoustic formation of multicellular tumor spheroids enabling on-chip functional and structural imaging. *Lab on a Chip*, 18, 07 2018.
- [36] Nicholas Timmins, Stefanie Dietmair, and Lars Nielsen. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumor angiogenesis. *Angiogenesis*, 7 :97–103, 02 2004.
- [37] Molly Boutin, Ty Voss, Steven Titus, Kennie Cruz-Gutierrez, Sam Michael, and Marc Ferrer. A high-throughput imaging and nuclear segmentation analysis protocol for cleared 3d culture models. *Scientific Reports*, 8, 12 2018.
- [38] Marguerite Vantangoli, Pranita Kabadi, April Rodd, Elizabeth Leary, Samantha Madnick, Jeffrey Morgan, Agnes Kane, and Kim Boekelheide. Into the depths : Techniques for in vitro three-dimensional microtissue visualization. *BioTechniques*, 59 :279–286, 01 2015.
- [39] L. Guillaume, L. Rigal, J. Fehrenbach, C. Severac, B. Ducommun, and V. Lobjois. Characterization of the physical properties of tumor-derived spheroids reveals critical insights for pre-clinical studies. *Sci Rep*, 9(1) :6597, Apr 2019.
- [40] Philippe Marmottant, Abbas Mgharbel, Jos Kafer, Benjamin Audren, Jean-Paul Rieu, Jean-Claude Vial, Boudewijn van der Sanden, Athanasius F M Maree, François Graner, and Helene Delanoë-Ayari. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 :17271–5, 09 2009.

- [41] Morgan Delarue, Jean-François Joanny, Frank Jülicher, and Jacques Prost. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface focus*, 4 :20140033, 12 2014.
- [42] Devina Jaiswal, Norah Cowley, Zichao Bian, Guoan Zheng, Kevin Claffey, and Kazunori Hoshino. Stiffness analysis of 3d spheroids using microtweezers. *PLOS ONE*, 12 :e0188346, 11 2017.
- [43] Marita L. Rodriguez, Patrick J. McGarry, and Nathan J. Sniadecki. Review on cell mechanics : Experimental and modeling approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65(6), 10 2013. 060801.
- [44] Addie Embry, Hamid Mohammadi, Xinying Niu, Liping Liu, Borren Moe, William Miller-Little, Christopher Lu, Leslie Bruggeman, Christopher McCulloch, Paul Janmey, and R. Miller. Biochemical and cellular determinants of renal glomerular elasticity. *PLOS ONE*, 11 :e0167924, 12 2016.
- [45] Yareni Ayala, Bruno Pontes, Diney Ether, Luis Pires, Glauber Araújo, Susana Frases, Luciana Romão, Marcos Farina, Vivaldo Moura-Neto, Nathan Viana, and Herch Nussenzveig. Rheological properties of cells measured by optical tweezers. *BMC Biophysics*, 9, 06 2016.
- [46] James Butler, Ben Fabry, Michael Glogauer, Geoffrey Maksym, and Daniel Navajas. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 87, 11 2001.
- [47] Yue Ding, Guangkui Xu, and Gangfeng Wang. On the determination of elastic moduli of cells by afm based indentation. *Scientific Reports*, 2017 :45575, 05 2017.
- [48] Qing Luo, Dongdong Kuang, Bingyu Zhang, and Guanbin Song. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica et biophysica acta*, 1860, 06 2016.
- [49] Karine Guevorkian, Marie-Josée Colbert, Mélanie Durth, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Aspiration of biological viscoelastic drops. *Physical review letters*, 104 :218101, 05 2010.
- [50] Thomas Brown. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro : A review. *Journal of biomechanics*, 33 :3–14, 01 2000.

- [51] Monika Dolega, Morgan Delarue, F. Ingremeau, Jacques Prost, A. Delon, and G. Cappello. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nature Communications*, 8 :14056, 01 2017.
- [52] Jeremie Margueritat, Angelique Virgone-Carlotta, Sylvain Monnier, Helene Delanoe-Ayari, Hichem Mertani, Alice Berthelot, Quentin Martinet, Xavier Dagany, Charlotte Riviere, Jean-Paul Rieu, and Thomas Dehoux. High-frequency mechanical properties of tumors measured by brillouin light scattering. *Physical Review Letters*, 122, 01 2019.
- [53] David Gonzalez-Rodriguez, Karine Guevorkian, Stéphane Douezan, and Francoise Brochard-Wyart. Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 338 :910–7, 11 2012.
- [54] D Ambrosi, Simone Pezzuto, Davide Riccobelli, Triantafyllos Stylianopoulos, and P Ciarletta. *Solid Tumors Are Poroelastic Solids with a Chemo-mechanical Feedback on Growth*, pages 107–124. 01 2018.
- [55] Paul G. Newman and Grace S. Rozycki. The history of ultrasound. *Surgical Clinics of North America*, 78(2) :179 – 195, 1998.
- [56] Martin Greenspan and C.E. Tschiegg. Speed of sound in water by a direct method. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 59 :249, 10 1957.
- [57] Benjamin Johnson, Mark Holland, James Miller, and J. Katz. Ultrasonic attenuation and speed of sound of cornstarch suspensions. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133 :1399–403, 03 2013.
- [58] Jens Becker, Laurence Jacobs, and Jianmin Qu. Characterization of cement-based materials using diffuse ultrasound. *Journal of Engineering Mechanics*, 129 :1478–1484, 12 2003.
- [59] Eric M. Strohm, Michael J. Moore, and Michael C. Kolios. High resolution ultrasound and photoacoustic imaging of single cells. *Photoacoustics*, 4(1) :36 – 42, 2016.
- [60] Kwang Song and Lihong Wang. Deep reflection-mode photoacoustic imaging of biological tissue. *Journal of biomedical optics*, 12 :060503, 11 2007.
- [61] Michael Moore, Joseph Sebastian, and Michael Kolios. Determination of cell nucleus-to-cytoplasmic ratio using imaging flow cytometry and a combined ultrasound and photoacoustic technique : a comparison study. *Journal of Biomedical Optics*, 24 :1, 10 2019.

- [62] Eno Hysi, Lauren Wirtzfeld, Jonathan May, Elijus Undzys, Shyh-Dar Li, and Michael Kolios. Photoacoustic signal characterization of cancer treatment response : Correlation with changes in tumor oxygenation. *Photoacoustics*, 5, 03 2017.
- [63] Lauren Wirtzfeld, Elizabeth Berndl, Gregory Czarnota, and Michael Kolios. Monitoring quantitative ultrasound parameter changes in a cell pellet model of cell starvation. *Biophysical Journal*, 112, 06 2017.
- [64] C. Thomsen, J. Strait, Z. Vardeny, H. J. Maris, J. Tauc, and J. J. Hauser. Coherent phonon generation and detection by picosecond light pulses. *Phys. Rev. Lett.*, 53 :989–992, Sep 1984.
- [65] C. Rossignol, N. Chigarev, M. Ducouso, B. Audoin, G. Forget, F. Guillemot, and M. C. Durrieu. In vitro picosecond ultrasonics in a single cell. *Applied Physics Letters*, 93(12) :123901, 2008.
- [66] Mathieu Ducouso, Omar Zouani, Christel Chanseau, Celine Chollet, Clement Rossignol, Bertrand Audoin, and Marie-Christine Durrieu. Evaluation of mechanical properties of fixed bone cells with sub-micrometer thickness by picosecond ultrasonics. *European Physical Journal Applied Physics*, 61 :11201–, 01 2013.
- [67] Thomas Dehoux, Maroun Abi Ghanem, Omar Zouani, J-M Rampnoux, Yannick Guillet, Stefan Dilhaire, Marie-Christine Durrieu, and Bertrand Audoin. All-optical broadband ultrasonography of single cells. *Scientific reports*, 5 :8650, 03 2015.
- [68] Thomas Dehoux, Maroun Abi Ghanem, Mathieu Ducouso, Nikolay Chigarev, Clement Rossignol, Bertrand Audoin, Omar Zouani, Marie-Christine Durrieu, and Nicolas Tsapis. Probing single-cell mechanics with picosecond ultrasonics. *Ultrasonics*, 56, 12 2014.
- [69] Sorasak Danworaphong, Motonobu Tomoda, Yuki Matsumoto, Osamu Matsuda, Toshiro Ohashi, Hiromu Watanabe, Masafumi Nagayama, Kazutoshi Gohara, Paul Otsuka, and Oliver Wright. Three-dimensional imaging of biological cells with picosecond ultrasonics. *Applied Physics Letters*, 106 :163701, 04 2015.
- [70] Armen Sarvazyan, A. Skovaroda, S.Y. Emelianov, Jeffrey Fowlkes, J. Pipe, Ronald Adler, Richard Buxton, and Paul Carson. Biophysical bases of elasticity imaging. *Acoust. Imaging*, 21, 01 1995.

- [71] Jean-Luc Gennisson, Thomas Deffieux, Mathias Fink, and Mickaël Tanter. Ultrasound elastography : Principles and techniques. *Diagnostic and interventional imaging*, 94, 04 2013.
- [72] Rosa Sigrist, Joy Liao, Ahmed El Kaffas, Maria Chammas, and Jürgen Willmann. Ultrasound elastography : Review of techniques and clinical applications. *Theranostics*, 7 :1303–1329, 03 2017.
- [73] Victor Barrere, David Melodelima, Stefan Catheline, and Bruno Giammarinaro. Imaging of thermal effects during high-intensity ultrasound treatment in liver by passive elastography : A preliminary feasibility in vitro study. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 46, 06 2020.
- [74] Stefan Catheline, Bruno Giammarinaro, Ali Zorgani, Chadi Zemzemi, Rémi Souchon, and Olivier Rouvière. Passive elastography : Extracting mechanical properties of soft tissues from natural elastic waves. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 146 :2862–2862, 10 2019.
- [75] Pol Grasland-Mongrain, Ali Zorgani, Shoma Nakagawa, Simon Bernard, Lia Paim, Greg Fitzharris, Stefan Catheline, and Guy Cloutier. Ultrafast imaging of cell elasticity with optical microelastography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 :201713395, 01 2018.
- [76] L. Brillouin. Diffusion de la lumière et des rayons x par un corps transparent homogène. influence de l'agitation thermique. *Ann. Phys.*, 9(88), 1922.
- [77] Robert Prevedel, Alba Diz-Muñoz, Giancarlo Ruocco, and Giuseppe Antonacci. Brillouin microscopy : an emerging tool for mechanobiology. *Nature Methods*, 16, 09 2019.
- [78] Giuliano Scarcelli and Seok Yun. Confocal brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging. *Nature photonics*, 2 :39–43, 12 2007.
- [79] Giuliano Scarcelli, William Polacheck, Hadi Nia, Kripa Patel, Alan Grodzinsky, Roger Kamm, and Seok Yun. Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by brillouin microscopy. *Nature methods*, 12, 10 2015.
- [80] Pei-Jung Wu, Irina Kabakova, Jeffrey Ruberti, Joseph Sherwood, Iain Dunlop, Carl Patterson, Peter Török, and Darryl Overby. Water content, not stiffness, dominates brillouin spectroscopy measurements in hydrated materials. *Nature Methods*, 15, 07 2018.

- [81] M Sherar, Mark Noss, and F Foster. Ultrasound backscatter microscopy images the internal structure of living tumour spheroids. *Nature*, 330 :493–5, 12 1987.
- [82] Floyd Dunn and William J. Fry. Ultrasonic absorption microscope. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 31(5) :632–633, 1959.
- [83] A.G. Bell. On the production and reproduction of sound by light. *American Journal of Science*, 20 :305–324, 10 1880.
- [84] R. M. White. Generation of elastic waves by transient surface heating. *Journal of Applied Physics*, 34(12) :3559–3567, 1963.
- [85] Srirang Manohar and Daniel Razansky. Photoacoustics : A historical review. *Advances in Optics and Photonics*, 8 :586–617, 12 2016.
- [86] Vitalyi Gusev, Zhonghua Shen, and Todd Murray. Special issue on laser ultrasonics. *Applied Sciences*, 9 :5561, 12 2019.
- [87] Ivan Shibaev, E.B. Cherepetskaya, Anton Bychkov, Vasily Zarubin, and P.N. Ivanov. Evaluation of the internal structure of dolerite specimens using x-ray and laser ultrasonic tomography. *International Journal of Civil Engineering and Technology*, 9 :84–92, 08 2018.
- [88] Evgeny Glushkov, Natalia Glushkova, Bernard Bonello, Lu Lu, Eric Charron, Noëlle Gogneau, François Julien, Maria Tchernycheva, and Olga Boyko. Evaluation of effective elastic properties of nitride nws/polymer composite materials using laser-generated surface acoustic waves. *Applied Sciences*, 8(11) :2319, Nov 2018.
- [89] S. D. Sharples, M. Clark, R. J. Smith, R. J. Ellwood, W. Li, and M. G. Somekh. Laser ultrasonic microscopy. *Nondestructive Testing and Evaluation*, 26(3-4) :367–384, 2011.
- [90] D Royer and E Dieulesaint. *Elastic Waves in Solids*, volume I and II. 01 1996.
- [91] Samuel Raetz. *Development of numerical methods for the imaging of optoacoustic sources in solid media*. PhD thesis, 11 2012.
- [92] Todd W. Murray and James W. Wagner. Laser generation of acoustic waves in the ablative regime. *Journal of Applied Physics*, 85(4) :2031–2040, 1999.
- [93] Andrew Tam. Pulsed-laser generation of ultrashort acoustic pulses : Application for thin-film ultrasonic measurements. *Applied Physics Letters*, 45 :510 – 512, 10 1984.

- [94] R.J. Dewhurst, C.E. Edwards, A.D.W. McKie, and S.B. Palmer. Comparative study of wide-band ultrasonic transducers. *Ultrasonics*, 25(6) :315 – 321, 1987.
- [95] Gustav Gaultschi. *Piezoelectric Sensorics : Force, Strain, Pressure, Acceleration and Acoustic Emission Sensors, Materials and Amplifiers / G. Gaultschi*. 01 2002.
- [96] Georg Wissmeyer, Miguel Angel Pleitez, Amir Rosenthal, and Vasilis Ntziachristos. Looking at sound : optoacoustics with all-optical ultrasound detection. *Light : Science and Applications*, 7, 12 2018.
- [97] Jennifer Watchi, Sam Cooper, Binlei Ding, Conor M. Mow-Lowry, and Christophe Collette. Contributed review : A review of compact interferometers. *Review of Scientific Instruments*, 89(12) :121501, 2018.
- [98] Pavel Fomitchov, S. Krishnaswamy, and J.D. Achenbach. Compact phase-shifted sagnac interferometer for ultrasound detection. *Optics and Laser Technology - OPT LASER TECHNOL*, 29 :333–338, 09 1997.
- [99] Chen Chao, Zhihong Wang, Weiguang Zhu, and Ooikiang Tan. Scanning homodyne interferometer for characterization of piezoelectric films and microelectromechanical systems devices. *Review of Scientific Instruments*, 76(6) :063906, 2005.
- [100] Malcolm Gray, David McClelland, M. Barton, and Seiji Kawamura. Simple high-sensitivity interferometric position sensor for test mass control on an advanced ligo interferometer. *Optical and Quantum Electronics*, 31 :571–582, 07 1999.
- [101] Patrick Prouvost. *Automatique contrôle et régulation : cours et exercices corrigés*. 2010.
- [102] Thomas Rossing. *Springer Handbook of Acoustics*. 01 2014.
- [103] J. Morlet, G. Arens, Eliane Fourgeau, and D. Giard. Wave propagation and sampling theory–part i : Complex signal and scattering in multilayered media. *Geophysics*, 47 :203–221, 02 1982.
- [104] J. Morlet, G. Arens, Eliane Fourgeau, and D. Giard. Wave propagation and sampling theory–part ii : Sampling theory and complex waves. *Geophysics*, 47 :222–236, 02 1982.
- [105] Maroun Abi Ghanem. *Microscope opto-acoustique utilisant la technique d’acoustique picoseconde pour l’échographie cellulaire*. PhD thesis, 10 2014.
- [106] Engineering Toolbox. Velocity of sound in solids and metals. [online], 2004.

- [107] Michael X Cohen. A better way to define and describe morlet wavelets for time-frequency analysis. *NeuroImage*, 199 :81 – 86, 2019.
- [108] Andrei Dukhin and Philip Goetz. Bulk viscosity and compressibility measurement using acoustic spectroscopy. *The Journal of chemical physics*, 130 :124519, 04 2009.
- [109] Mel Holmes, Nicholas Parker, and Megan Povey. Temperature dependence of bulk viscosity in water using acousticspectroscopy. *Journal of Physics Conference Series*, 269 :012011, 01 2011.
- [110] Ashwani Rajput, Ivan Martin, Rebecca Rose, Alexander Beko, Charles Levea, Elizabeth Sharratt, Richard Mazurchuk, Robert Hoffman, Michael Brattain, and Jing Wang. Characterization of hct116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *The Journal of surgical research*, 147 :276–81, 07 2008.
- [111] M Fogue-Lafitte, A Coudray, Bernadette Bréant, and J Mester. Proliferation of the human colon carcinoma cell line ht29 : Autocrine growth and deregulated expression of the c-myc oncogene. *Cancer research*, 49 :6566–71, 01 1990.
- [112] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. *Molecular Biology of the Cell*, 01 2002.
- [113] Gerhard Hamilton. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer letters*, 131 1 :29–34, 1998.
- [114] Mona El-Bahrawy, S. Richard Poulson, Andrew J. Rowan, Ian T. Tomlinson, and Malcolm R. Alison. Characterization of the e-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *Intern. Journ. of Experimental Pathology*, 85, 05 2004.
- [115] Shane K. Green, Giulio Francia, Ciro Isidoro, and Robert S. Kerbel. Antiadhesive antibodies targeting e-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2) :149–159, 2004.
- [116] A. Taylor. Responses of cells to ph changes. *The Journal of cell biology*, 15 :201–9, 12 1962.
- [117] Pauline Muleki Seya, Regine Guillermin, Julien Guglielmi, Jiangang Chen, Thierry Pouchier, Elisa Konofagou, and Emilie Franceschini. High-frequency quantitative ultrasound

- spectroscopy of excised canine livers and mouse tumors using the structure factor model. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 63 :1–1, 05 2016.
- [118] Aiguo Han, Rami Abuhabsah, James Blue, Sandhya Sarwate, and William O’Brien. Ultrasonic backscatter coefficient quantitative estimates from chinese hamster ovary cell pellet biophantoms. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 128 :3175–80, 11 2011.
- [119] Raimund Schlüßler, Stephanie Möllmert, Shada Abuhattum, Gheorghe Cojoc, Paul Müller, Kyoohyun Kim, Conrad Möckel, Conrad Zimmermann, Jürgen Czarske, and Jochen Guck. Mechanical mapping of spinal cord development and repair in living zebrafish larvae using brillouin microscopy. *Biophysical Journal*, 115, 08 2018.
- [120] Adrien Girard, Julien Ramade, Jérémie Margueritat, Denis Machon, Lucien Saviot, Frédéric Demoisson, and Alain Mermet. Contact laws between nanoparticles : the elasticity of a nanopowder. *Nanoscale*, 10 :2154–2161, 2018.
- [121] Francesca Palombo, Charles Winlove, Ryan Edginton, Ellen Green, Nicholas Stone, Silvia Caponi, Marco Madami, and Daniele Fioretto. Biomechanics of fibrous proteins of the extracellular matrix studied by brillouin scattering. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 11, 12 2014.
- [122] S. M. Lindsay, M. W. Anderson, and J. R. Sandercock. Construction and alignment of a high performance multipass vernier tandem fabry–perot interferometer. *Review of Scientific Instruments*, 52(10):1478–1486, 1981.
- [123] M. Shirasaki. Large angular dispersion by a virtually imaged phased array and its application to a wavelength demultiplexer. *Opt. Lett.*, 21(5) :366–368, Mar 1996.
- [124] L. Comez, L. Lupi, M. Paolantoni, F. Picchiò, and D. Fioretto. Hydration properties of small hydrophobic molecules by brillouin light scattering. *The Journal of Chemical Physics*, 137(11) :114509, 2012.
- [125] Neelam Hari, Priyanka Patel, Jacqueline Ross, Kevin Hicks, and F. Vanholsbeeck. Optical coherence tomography complements confocal microscopy for investigation of multicellular tumour spheroids. *Scientific Reports*, 9 :10601, 07 2019.

- [126] Nicolas Schierbaum, Johannes Rheinlaender, and Tilman Schäffer. Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contact to adjacent cells. *Acta Biomaterialia*, 55, 04 2017.
- [127] Tiina Roose, Paolo Netti, Lance Munn, Yves Boucher, and Rakesh Jain. Solid stress generated by spheroid growth estimated using a linear poroelasticity model. *Microvascular research*, 66 :204–12, 12 2003.
- [128] Emad Moeendarbary, Léo Valon, Marco Fritzsche, Andrew Harris, Dale Moulding, Adrian Thrasher, Eleanor Stride, Lakshminarayanan Mahadevan, and Guillaume Charras. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nature materials*, 12, 01 2013.
- [129] K. Chawla. *Mechanical Behavior of Materials*, volume 81. 01 2008.
- [130] Michael K. Kwan, Timothy H-C. Lin, and Savio L-Y. Woo. On the viscoelastic properties of the anteromedial bundle of the anterior cruciate ligament. *Journal of Biomechanics*, 26(4) :447 – 452, 1993.
- [131] S. L.-Y. Woo, M. A. Gomez, and W. H. Akeson. The Time and History-Dependent Viscoelastic Properties of the Canine Medial Collateral Ligament. *Journal of Biomechanical Engineering*, 103(4) :293–298, 11 1981.
- [132] Chapter 2 - viscoelasticity and wave propagation. In José M. Carcione, editor, *Wave Fields in Real Media (Third Edition)*, pages 63 – 122. Elsevier, Oxford, third edition edition, 2015.
- [133] Maurice Biot. Theory of propagation of elastic waves in a fluid-saturated porous solid. i. low-frequency range. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 28 :168–178, 03 1956.
- [134] Toyochi Tanaka, Lon O. Hocker, and George B. Benedek. Spectrum of light scattered from a viscoelastic gel. *The Journal of Chemical Physics*, 59(9) :5151–5159, 1973.
- [135] David Johnson. Elastodynamics of gels. *The Journal of Chemical Physics*, 77 :1531–1539, 08 1982.
- [136] Jeffrey Marqusee and John Deutch. Brillouin light scattering from polymer gels. *The Journal of Chemical Physics*, 75 :5239–5245, 12 1981.

- [137] M. A. Biot. Theory of propagation of elastic waves in a fluid-saturated porous solid. ii. higher frequency range. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 28(2) :179–191, 1956.
- [138] A. B. Wood. *A textbook of sound*. 1930.
- [139] Gwang Hoon Lee. Technical note—wood’s equation revisited. *Marine Georesources and Geotechnology*, 13(3) :235–242, 1995.
- [140] P. Chambré. Speed of a plane wave in a gross mixture. *Journal of The Acoustical Society of America - J ACOUST SOC AMER*, 26, 05 1954.
- [141] Osborne Reynolds. Xxix. an experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 174 :935–982, 1883.
- [142] Peter Sollich. Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Physical Review E*, 58, 12 1997.
- [143] Stéphane Nicolle, Philippe Vezin, and J-F Paliarne. A strain-hardening bi-power law for the nonlinear behaviour of biological soft tissues. *Journal of biomechanics*, 43 :927–32, 11 2009.
- [144] Tianxiao Niu and Guoxin Cao. Power-law rheology characterization of biological cell properties under afm indentation measurement. *RSC Advances*, 4 :29291, 07 2014.
- [145] David Johnson, Joel Koplik, and Roger Dashen. Theory of dynamic permeability and tortuosity in fluid-saturated porous media. *Journal of Fluid Mechanics*, 176 :379–402, 03 1987.
- [146] Piero Chiarelli, Antonio Iannatà, Marina Carbone, and Claudio Domenici. High frequency poroelastic waves in hydrogels. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 127 :1197–207, 03 2010.
- [147] Luciana Rebelo, Jeanlex de Sousa, Jose Filho, and Manfred Radmacher. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 24 :055102, 01 2013.

- [148] Eric Darling, Stefan Zauscher, Joel Block, and Farshid Guilak. A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy : Do cell properties reflect metastatic potential? *Biophysical journal*, 92 :1784–91, 04 2007.
- [149] Anatol Fritsch, Michael Höckel, Tobias Kießling, Kenekwukwu Nnetu, Franziska Wetzel, Mareike Zink, and Josef Käs. Are biomechanical changes necessary for tumor progression? *Nature Physics*, 6, 10 2010.
- [150] Alperen Ketene, Eva Schmelz, Paul Roberts, and Masoud Agah. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 8 :93–102, 06 2011.
- [151] Qifa Zhou, Sienting Lau, Dawei Wu, and K Shung. Piezoelectric films for high frequency ultrasonic transducers in biomedical applications. *Progress in materials science*, 56 :139–174, 02 2011.
- [152] Anette Jakob, M. Bender, Thorsten Knoll, Robert Lemor, Q. Zhou, Benpeng Zhu, J.X. Han, K.K. Shung, T. Lehnert, M. Koch, and M. Veith. Comparison of different piezoelectric materials for ghz acoustic microscopy transducers. pages 1722 – 1725, 10 2009.
- [153] Md. Rajibul Islam, Muhammad Mahmood Ali, Man Hong Lai, Kok-Sing Lim, and Harith Ahmad. Chronology of fabry-perot interferometer fiber-optic sensors and their applications : A review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14 :7451–88, 04 2014.
- [154] P Beard and Tim Mills. Extrinsic optical-fiber ultrasound sensor using a thin polymer film as a low-finesse fabry-perot interferometer. *Applied optics*, 35 :663–75, 02 1996.
- [155] Paul Morris, Andrew Hurrell, Adam Shaw, Edward Zhang, and Paul Beard. A fabry-pérot fiber-optic ultrasonic hydrophone for the simultaneous measurement of temperature and acoustic pressure. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 125(6) :3611–3622, 2009.
- [156] G Hernandez. *Fabry-pérot Interferometers*. 1986.