

Manipulation, caractérisation et reconcentration de cellules par force de radiation acoustique

Ludovic Bellebon

▶ To cite this version:

Ludovic Bellebon. Manipulation, caractérisation et reconcentration de cellules par force de radiation acoustique. Acoustique [physics.class-ph]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT: 2021SORUS569. tel-04112074

HAL Id: tel-04112074 https://theses.hal.science/tel-04112074

Submitted on 31 May 2023

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.

SORBONNE UNIVERSITÉ

Thèse de Doctorat

Manipulation, Caractérisation et Reconcentration de Cellules par Force de Radiation Acoustique

Auteur : Ludovic BELLEBON Superviseurs : Dr. Jean-Luc AIDER & Dr. Mauricio HOYOS

Une thèse soumise pour satisfaire aux exigences pour le grade de Docteur en Physique

Soutenue le 22 décembre 2021

JURY

- Mme. Chantal Pichon, Directeur de Recherche au CNRS, Rapporteur
- M. Philippe Brunet, Directeur de Recherche au CNRS, Rapporteur
- M. Chaouqi Misbah, Directeur de Recherche au CNRS, Examinateur
- M. Diego Baresch, Chargé de Recherche au CNRS, Examinateur
- M. Régis Wunenburger, Professeur à Sorbonne Université, Président
- M. Jean-Luc Aider, Directeur de Recherche au CNRS, Directeur de Thèse

Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes Sciences Mécaniques, Acoustique, Electronique et Robotique (SMAER) de Paris

Déclaration de l'auteur

Je, Ludovic BELLEBON, déclare que cette thèse intitulée, « Manipulation, Caractérisation et Reconcentration de Cellules par Force de Radiation Acoustique » et les travaux qui y sont présentés sont les miens. Je confirme que :

- Ce travail a été effectué entièrement ou principalement dans le cadre d'une candidature à un diplôme de recherche de cette Université.
- Si une partie de cette thèse a déjà été soumise pour l'obtention d'un diplôme ou de toute autre qualification dans cette université ou dans une autre institution, cela a été clairement indiqué.
- Lorsque j'ai consulté les travaux publiés d'autres personnes, celles-ci sont toujours clairement mentionnées.
- Lorsque je cite des travaux d'autres personnes, la source est toujours indiquée. À l'exception de ces citations, cette thèse est entièrement mon œuvre.
- J'ai reconnu toutes les principales sources d'aide.
- Lorsque la thèse est basée sur un travail effectué par moi-même conjointement avec d'autres personnes, j'ai indiqué clairement ce qui a été fait par les autres et ce que j'ai apporté moi-même.

Signature :	Ballos
Date :	18/01/22

SORBONNE UNIVERSITÉ

Résumé

Sorbonne Université Sciences Mécaniques, Acoustique, Electronique et Robotique (SMAER) de Paris

Docteur en Physique

Manipulation, Caractérisation et Reconcentration de Cellules par Force de Radiation Acoustique

par Ludovic BELLEBON

La médecine réparatrice est un des enjeux majeurs du domaine médical. Elle fait appel aux thérapies cellulaires qui mettent en culture les cellules d'intérêt pour développer ces tissus biologiques. Cependant elles sont très coûteuses du fait de la difficulté à isoler de manière efficace à grande échelle ces cellules d'intérêt.

L'acoustophorèse fait partie des processus de reconcentration/séparation qui permettraient de répondre aux attentes des thérapies cellulaires par la manipulation de micro-objets grâce à des ondes acoustiques.

Une onde stationnaire dans une cavité crée la force de radiation acoustique qui permet aux objets de migrer vers le nœud pression.

Dans cette étude nous souhaitons améliorer les processus de reconcentration par acoustophorèse en augmentant leur rendement.

Il nous faut déterminer les paramètres optimaux de reconcentration de notre système en mesurant les hauteurs et vitesses de focalisation de particules dans un canal microfluidique 1 entrée - 3 sorties en fonction de la fréquence utilisée. Suivant la fréquence appliquée nous sommes capable de choisir dans quelle sortie les particules vont être collectées.

Nous nous intéressons ensuite à la détermination des propriétés acoustiques des cellules grâce à l'aberration optique de la tâche d'Airy. La vitesse de focalisation des cellules est mesurée dans une cavité acoustique permettant d'en déduire leur facteur de contraste acoustique. En parallèle des mesures de densité de ces cellules sont effectuées. Le facteur de contraste acoustique et la densité nous permettent d'en déduire la compressibilité des cellules. Nous avons ainsi pu mesurer les propriétés mécaniques de 4 types cellulaires.

Les effets collectifs ont un impact important sur les dynamiques de focalisation. Nous cherchons à les quantifier et montrons que la taille d'un agrégat de particules modifie grandement sa vitesse de focalisation. De plus nous mettons en évidence 3 régimes de focalisation et introduisons un paramètre afin de quantifier le passage d'un régime à un autre.

Le milieu, tout comme les cellules, possède une réponse acoustique. Nous nous intéressons au cas particulier du plasma sanguin et son effet sur les dynamiques d'agrégation de plaquettes.

Enfin, grâce aux résultats obtenus durant ces travaux, nous proposons deux nouvelles configurations de canaux microfluidiques et comparons leur efficacité de reconcentration face à une configuration dite "classique". La première configuration se base sur un système multinœuds tandis que la seconde allie préfocalisation géométrique, paramètres de reconcentration optimaux et concentration locale importante.

Remerciements

A mes directeurs de thèse,

Messieurs Jean-Luc Aider et Mauricio Hoyos, Directeur de Recherche et Chargé de Recherche au Laboratoire PMMH,

Qui m'ont guidé, soutenu et encouragé durant ces 3 années. Ainsi que pour leur présence, pour m'avoir permis d'exprimer mes idées et d'avoir pu les mettre en œuvre.

A mon employeur,

Monsieur Emmanuel Vincent,

Directeur de Aenitis Technologies,

Pour m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse ainsi qu'à tous les employés pour leurs connaissances et amabilité.

A Hugo,

Pour tous les échanges que nous avons eus aussi bien sur les plans professionnel que personnel.

A mes collègues,

Chloé, Nathan, Xavier, Lucile, Gabriel, Salomé et Angelica avec qui j'ai pu échanger et apprendre au sein de l'équipe.

Mes remerciements vont également,

A ma famille,

Qui m'a toujours soutenu et avec qui j'ai pu me détendre en rentrant à la maison.

A mes colocataires,

Qui ont écouté le récit des succès et déboires de mes expériences. Mention particulière à Pierre pour ses conseils et son aide.

Table des matières

D	éclara	tion d	e l'auteur	iii
Re	ésumo	é		v
Re	Remerciements			vii
1	Intr	oductio	on	1
	1.1	Enjeu	x médicaux et industriels du tri cellulaire	1
	1.2	Les di	fférentes méthodes de tri	1
		1.2.1	Centrifugation	1
		1.2.2	Tri par immuno-magnétisme	2
			Lévitation magnétique et magnétophorèse	2
		1.2.3	Séparation hydrodynamique	4
			Field Flow Fractionation	4
			SPlit-flow Lateral Transport Thin	7
			Pinched Flow Fractionation	8
			Filtration hydrodynamique	10
				10
			Separation induite par obstacles	11
		1 2 4	Les transformentions et la céneration per optical fractionation	14
		1.2.4	Séparation biochimique	14
	13	1.2.J Sépar	ation par acoustophorèse	16
	1.0	131	Aenitis Technologies	16
		1.3.2	Objectifs de la thèse	16
2	Forc	e de R	adiation Acoustique : principes et applications.	19
	2.1	Acous	stophorèse	19
	2.2	Stand	ing Surface Acoustic Waves (SSAW)	20
	2.3	Bulk A	Acoustic Waves (BAW)	22
	2.4	Modé	lisation de la Force de Radiation Acoustique	22
			Modèle de King	23
		2.4.1	Modèle de Yosioka	23
		2.4.2	Modèle de Doinikov	24
		2.4.3	Modèle de Gor'kov	25
		2.4.4	Modèle 3D	25
		2.4.5	Hypothèses et modèle utilisés dans le manuscrit	26
	2.5	Forces	Secondaires	27
		2.5.1	Force Transverse	27
		2.5.2	Force de Bjerknes	27
	0.4	2.5.3	Streaming acoustique	28
	2.6	Appli	cation au processus de reconcentration et de tri cellulaire	29
	2.7	Les au	itres champs d'application de l'acoustofluidique	30

		2.7.1 Tissue Engineering	31
		Culture cellulaire 3D	31
		Structuration du collagène par acoustique	32
		2.7.2 Mélanges	33
		Streaming acoustique dans des bulles	33
		Génération de streaming acoustique par des arêtes	34
		2.7.3 Tweezers acoustiques	35
		vortex acoustique	36
		2.7.4 Manipulation de gouttes	38
		Division de gouttes par Surface Acoustic Waves et Encapsulation	38
		Rebond d'une goutte sur une surface piézoelectrique	39
		2.7.5 Microbulles	40
		Force de Radiation Acoustique s'exerçant sur une bulle	40
		Sonoporation	41
	2.8	Conclusion	42
3	Dis	positif et méthodes expérimentales	45
	3.1		45
	3.2	Génération de l'onde ultrasonore	45
	3.3	Canaux en PMMA	47
	3.4		49
	3.5	Métrologie optique par microscopie en fluorescence	50
	3.6	Mesure de l'énergie acoustique	51
		3.6.1 Vitesse de focalisation acoustique et énergie acoustique	51
		3.6.2 Vitesse axiale et défocalisation	52
		3.6.3 Code Matlab	54
	3.7	Conclusion	57
4	Cor	ntrôle de la lévitation acoustique à l'aide de la fréquence de l'onde ul-	
-	tras	onore. Application aux processus de reconcentration.	61
	4.1	Introduction	61
	4.2	Modification de la position axiale du plan de lévitation	62
	4.3	Mesure de la position du plan de lévitation en fonction de la fréquence	62
	4.4	Mesures de la vitesse de focalisation	64
		4.4.1 Corrélation avec la puissance réfléchie	66
	4.5	Influence de la fréquence acoustique sur le processus de reconcentration	67
		4.5.1 Reconcentration de particules	67
		4.5.2 Décalage en fréquence induit par la suspension	71
		4.5.3 Reconcentration des cellules souches non parenchymateuses	72
		4.5.4 Processus de reconcentration des cellules HepaRG.	74
	4.6	Conclusion	75
5	Mes	sures des propriétés acoustiques des cellules	77
	5.1		77
	5.2	Mesures du facteur de contraste acoustique et de la densité	77
	5.3	Mesures de l'énergie acoustique du système	78
	5.4	Mesures du facteur de contraste acoustique et de la compressibilité	79
		5.4.1 Methodologie	79
		5.4.2 Validation : mesure du facteur de contraste acoustique des par-	00
		ticules	80

x

	5.5	Mesure du facteur de contraste acoustique et de la compressibilité des
		5.5.1 Application aux cellules
		5.5.2 Cellules AM-MSCs et BM-MSCs
		Cellules souches
		Cellules stromales mésenchymateuses
		Cellules iPS
		Cellules N2a
		Culture cellulaire et passages
		5.5.3 Mesures des propriétés des cellules AD-MSCs et BM-MSCs 84
		Mesures du facteur de contraste acoustique des cellules AD-
		MSCs
		Mesures du facteur de contraste acoustique des cellules BM-
		MSCs
		Facteur de contraste acoustique et diamètre des cellules 88
		5.5.4 Pression osmotique
	5.6	Caractérisation des propriétés mécaniques des cellules
		5.6.1 Mesure de la densité des cellules
		5.6.2 Mesure de la compressibilité des cellules
		5.6.3 Synthèse
	5.7	Ouverture : le cas des globules rouges
	5.8	Conclusion 101
	EC.	
0	EIIe	Introduction 100
	6.2	Effete collectife - analogie avec le sé dimentation
	6.2	Effets collectifs : analogie avec la sedimentation.
	6.3	
	6.4	Particules individuelles
	6.5	
	6.6	Influence de la taille de l'agrégat 108
		6.6.1 Agrégats de particules de 10 μm
		6.6.2 Agrégats de particules de $25 \ \mu m$
		6.6.3 Agrégats de particules de 40 μm
	6.7	Caractérisation des différents régimes de focalisation acoustique 110
		6.7.1 Porosité des agrégats
	6.8	Conclusion
7	Infl	uence du plasma sanguin 115
	7.1	Introduction
	7.2	Méthodes expérimentales
	7.3	Premières observations
	7.4	Influence du plasma sur la vitesse d'agrégation des plaquettes dans le
		plan de lévitation
		7.4.1 Principe
		742 Influence de l'albumine
		7.4.3 Influence de la concentration en plaquettes 110
		7.1.0 minuence de la concentration en plaquettes
	75	Processus de fabrication des protéines
	1.3	r rocessus de labrication des proteines
	7.6	Mesures de densite et vitesse du son du plasma
	7.7	Conclusion 12^{4}

8	Rec	oncent	ration des cellules	125
	8.1	Introc	luction	125
	8.2	Canal	Multinœuds en cascade	127
		8.2.1	Configuration Multinœuds	127
			Configuration à deux nœuds	127
			Configuration à quatre nœuds	128
		8.2.2	Effet de l'augmentation de la concentration locale sur la vitesse	
			de focalisation	130
	8.3	Canal	Multi-steps	134
		8.3.1	Principes	134
		8.3.2	Utilisation des effets hydrodynamiques	136
		8.3.3	Utilisation des effets hémodynamiques	139
		8.3.4	Canal acoustofluidique Multisteps	140
		8.3.5	Montage Multisteps	142
		8.3.6	Caractérisation du montage Multisteps	144
		8.3.7	Caractérisation de la configuration "classique" (canal droit équip	é
			de trois transducteurs)	145
		8.3.8	Comparaison des différentes configurations	146
	8.4	Discu	ssion	147
	8.5	Concl	usion	149
9	Con	clusio	n	151
	9.1	Ouve	rture	153
		9.1.1	Perspectives	154
Bi	bliog	raphie		155

Table des figures

1.1	Principe de centrifugation : les cellules réparties de façon homogène dans la suspension vont sédimenter rapidement suite à leur passage dans une centrifugeuse. Issu de Fisher Scientific.	2
1.2	Principe de tri par immuno-magnétisme. Issu de STEMCELL Techno- logies.	2
1.3	Principe de lévitation magnétique de cellules. Issu de (DURMUS et al., 2015).	3
1.4	Schéma d'un processus de tri de particules par électromagnétisme. Un canal possédant de multiples entrées ainsi que de multiples sor- ties est placé sous champ magnétique. Une entrée contient la sus- pension à séparer tandis que les autres entrées possèdent un milieu tampon. Les particules, réagissant au champ magnétique, vont se dé- placer perpendiculairement au sens de l'écoulement. Les plus grosses particules, plus sensibles à la force magnétique, vont migrer vers les sorties les plus éloignées de l'entrée de la suspension tandis que les petites seront collectées dans des sorties plus proches. Issu de (PAMME et MANZ, 2004).	4
1.5	Principe de séparation cellulaire par Field Flow Fractionation. Un écou- lement extérieur perpendiculaire est appliqué à l'écoulement de Poi- seuille principal contenant 2 types de particules. Les particules vont être plaquées sur la paroi opposée à celle d'où arrive l'écoulement ex- térieur. Les petites particules vont suivre les lignes de courant plus proches de la paroi (et donc plus lentes) que les grosses particules, in- capables d'approcher autant la paroi et donc soumises à des lignes de courant plus rapides. On obtient un délai temporel en sortie entre les grosses et les petites particules. Issu de (JIANG et al., 1999).	5

xiii

- Les 3 différents modes de Field Flow Fractionation. Le "normal mode" 1.6 comprend les particules sub-micromètre (jaune) et les macromolécules (noir). Celles-ci s'accumulent sur la paroi opposée augmentant la concentration locale. Cette augmentation est contre-balancée par la mouvement Brownien qui les redirige loin de la paroi. Les macromoélcules, plus affectées par le mouvement Brownien vont s'éloigner davantage de la paroi puis emportées plus rapidement dans l'écoulement grâce à des lignes de courant plus rapides que celles proches de la paroi où sont restées les particules sub-micromètre. Le "steric mode" s'applique pour des particules comprises entre 0,5 μm et 10 μm . Les particules ne sont plus affectées par le mouvement Brownien. Les particules vont former une couche le long de la paroi. Les petites particules (vert) vont rester dans cette couche tandis que les grosses (rose) vont dépasser de cette couche et être emportées plus rapidement par des lignes de courant plus éloignées de la paroi. Enfin on se considère en "hyperlayer" mode lorsque la taille des particules est supérieure à 10 μm . Celles-ci s'approchent difficilement de la paroi, étant repoussées par les forces hydrodynamiques de lift. Plus leur diamètre est important plus leur position sera éloignée de la paroi et donc plus elles seront affectées par des lignes de courant rapides. Ainsi les grosses particules (rouge) auront un temps de rétention inférieur aux petites (violet). Issu de
- 1.7 Principe de séparation cellulaire par la technologie du SPLITT. Un écoulement est imposé dans un canal microfluidique possédant 2 entrées et 2 sorties. La première entrée contient une suspension de billes bi-disperses tandis que la seconde contient un milieu tampon. Un écoulement perpendiculaire au premier est appliqué au niveau de la paroi proche de l'entrée contenant la suspension. Sous l'effet de ce se-cond écoulement les particules vont migrer vers la paroi opposée à une vitesse plus ou moins importante en fonction de leur taille, les grosses particules migrant latéralement plus rapidement que les petites. Les 2 sorties séparées par une membrane collectent chaque type cellullaire devenu indépendant. Issu de (JIANG et al., 1999).

6

7

8

1.8 Principe de séparation cellulaire par Pinched Flow Fractionation. Un écoulement est imposé dans un canal possédant 2 petites entrées, un tronçon étroit et une portion élargie qui donne sur une sortie. Une entrée contient une suspension de particules de 2 tailles. La seconde entrée permet l'injection d'un milieu tampon à débit plus élevé que dans la première entrée. En arrivant dans le tronçon étroit, les particules sont plaquées contre une paroi du fait du débit important de la seconde entrée. En arrivant dans la section élargie du canal, les lignes de courant du fluide vont se propager sur toute la largeur. Les petites particules, davantage soumises à ces lignes de courant vont se déplacer latéralement sur une distance bien plus importante que les grosses particules moins soumises aux lignes de courant. Issu de (VIG et KRISTENSEN, 2008).

xiv

Schéma illustrant le principe de filtration hydrodynamique. a) Un ca-1.9 nal composé de multiples branches orthogonales aligne les particules injectées dans celui-ci le long des parois grâce à une partie du fluide s'échappant par ces branches. a) A faible débit imposé dans ces branches, aucune particule n'est évacuée de l'écoulement principal b) A débit moyen seules les petites particules sont évacuées. c) A haut débit toutes les particules sont évacuées, même les plus grosses. d) Un mélange de petites et grosses particules introduit dans l'écoulement principal peut-être séparé en récupérant les petites particules dans les premières branches puis les grosses dans les dernières en appliquant 9 1.10 Schémas d'un processus de reconcentration via des expansions-restrictions multiples. a) Les forces de lift s'exerçant sur des particules rigides dans un écoulement de Poiseuille. La force du gradient de cisaillement déplace les particules vers les parois latérales tandis que les effets de bord contrent cela, les particules atteignant leur position d'équilibre. b) Vortex hydrodynamiques générés suite à une expansion soudaine du canal en fonction du nombre de Reynolds critique Re_c . c) Représentation des différentes étapes du processus de séparation. Issu de (PARK, SONG et JUNG, 2009). 10 1.11 Schéma d'un processus de séparation induite par obstacles. A) Le réseau est composé de micro-poteaux espacés d'une distance λ dans le sens de l'écoulement et d'une distance G dans le sens perpendiculaire à l'écoulement. Le réseau est asymétrique de décalage δ et permet aux particules de tailles différentes de suivre différentes lignes de courant du fluide. B) Cela se traduit par un déplacement latéral des particules plus ou moins important selon leur taille et donc de les isoler. Issu de 1.12 Principe de diélectrophorèse. La pDEP déplace la particule vers le champ électrique le plus fort tandis que la nDEP la déplace vers le champ électrique le plus faible. Issu de (LENSHOF et LAURELL, 2010). 12 1.13 Exemple d'un montage utilisant la technologie de la diélectrophorèse. A) 3 types cellulaires sont marqués par des marqueurs de DEP "A" et "B", le 3ème type cellulaire n'étant pas marqué. Celles-ci sont injectées dans un canal 2 entrées - 3 sorties, un milieu tampon étant injecté dans la seconde entrée. Un ensemble d'électrodes inclinées est placé à deux endroits différents le long du canal. Celles-ci agissent sur les cellules marquées qui sont ensuite collectées suivant leurs caractéristiques dans les différentes sorties. B) Les cellules "A" sont dirigées vers la paroi opposée aux électrodes lorsqu'elles passent devant le jeu d'électrodes "A" avec un angle θ_1 . Les cellules "B" marquées ne sont pas déviées par l'électrode A mais par la B avec un angle θ_2 . Les cellules non marquées ne sont pas affectées par les électrodes. Issu de 13 1.14 Schéma d'une pince optique. a) Un rayon optique est concentré grâce à une lentille optique concave sur une particule immergée dans de l'eau. Ce rayon crée un piège par gradient de force. b) Image prise par fluorescence d'une particule de 10 μm immergée dans de l'eau et piégée par les rayons optiques. On voit clairement les rayons optiques incidents et diffusés. Issu de (ASHKIN et al., 1986).

1.15	Schéma du principe de séparation optique. Un canal microfluidique comportant 2 entrées - 2 sorties ainsi qu'une fractionation chamber (FC) est soumis à un réseau optique 3D (ici une configuration b.c.t. pour body-centered tetragonal). Une entrée "B" contient le mélange de particules tandis que l'entrée "A" injecte du milieu tampon. Les rayons optiques déplacent les particules vers le centre du faisceau laser, leur vitesse de migration étant dépendante de leur taille et de leurs propriétés optiques. Les petites particules sont largement déviées de leur trajectoire initiale et migrent vers la sortie "C" tandis que les grosses, moins soumises à la force optique, maintiennent leur position dans l'écoulement et sont collectées dans la sortie "D". Issu de (MACDONALD, SPALDING et DHOLAKIA, 2003).	15 15
2.1	Intéraction onde-particule. a) Schéma en champ lointain d'une onde acoustique ϕ_{in} (lignes bleues) de longueur d'onde λ se propageant sur une particule (point noir) de rayon $a << \lambda$ et créant une onde résultante ϕ_{sc} (flèches et cercles rouges). b) Schéma d'une particule (disque jaune) de rayon a et de densité ρ_p et compressibilité κ_p im- mergée dans un fluide (bleu clair) compressible et non visqueux de densité ρ_0 et compressibilité κ_0 . Le fluide est divisé en 2 parties : le champ proche $r << \lambda$ où on a un champ acoustique instantané ϕ_{sc} (t) et le champ lointain avec un délai temporel du champ $\phi_{sc} \left(t - \frac{r}{c_0}\right)$. Enfin l'ARF (flèches rouges) s'exerçant sur une surface quelconque en champ lointain (cercle en pointillés) est égale à celle s'exerçant à la surface de la sphère (flèches vertes). Issu de (BRUUS, 2012). Principe de lévitation acoustique par Standing Surface Acoustic Waves. a) Système de tri par SAW. On impose un débit dans un canal composé de 3 entrées et 3 sorties. Un mélange de petites (en jaune) et grosses (en rouge) particules est injecté dans le canal par les entrées latérales (1). Les SAW générées par les IDT's déplacent les grosses particules au centre du canal tandis que les petites restent proches des parois latérales du fait de leur temps de passage dans la zone acoustique	19
2.3	centrale tandis que les petites sont récupérées dans les sorties laté- rales. b) Les particules subissent une Force de Radiation Acoustique supérieure à de petites particules ce qui explique leur migration plus rapide vers le nœud de pression généré par les SAW. Issu de (SHI et al., 2009b). Schéma d'un montage SSAW de lavage de cellules. Les globules blancs, initialement présents dans le "Lysed Blood" sont déviés de leur trajec- toire grâce à des SAW générées par des IDT's. L'orientation des IDT's permet le déplacement des globules blancs dans la partie PBS du ca- nal avant d'être récupérés dans la sortie haute, isolés de tout débris. Issu de (LI et al., 2015).	21

2.4	Schéma illustrant le montage permettant la séparation de gouttes grâce aux SAW dans une puce PDMS. (a) Lorsque le transducteur interdi- gité est "off", les gouttes sont collectées dans une sortie privilégiée (ici	
	la sortie du haut). (b) En activant les IDT's (configuration "on") les	
	SAW poussent les gouttes vers la partie sortie basse de la puce. Issu	
	de (FRANKE et al., 2009)	22
2.5	Schéma d'une suspension sous l'effet de la FRA dans un set-up de	
	BAW (a). La force de radiation acoustique déplace les particules vers	
	le plan de focalisation proche du plan nodal (b). Une fois qu'elles ont	
	atteint le plan de focalisation, les particules s'agrègent au centre de la $\frac{1}{2}$	22
26	Eavite grace à la composante radiale de la FKA (c).	23
2.0	un champ est établi de facon aléatoire b) Lorsque les particules sont	
	alignées perpendiculairement à la propagation de l'onde c) Lorsque	
	les particules sont alignées parallèlement à la direction de propaga-	
	tion de l'onde. Issu de (HAAKE, 2004).	27
2.7	Streaming acoustique. Issu de (WIKLUND, GREEN et OHLIN, 2012).	28
2.8	Schéma des différentes forces acoustiques agissant sur une particule :	
	$\vec{F_{ac}}$ la Force de Radiation acoustique, $\vec{F_T}$ la Force de Radiation Trans-	
	verse et F_{B-rad} la Force d'attraction particule-particule aussi appelée	
•	Force de Bjerknes.	29
2.9	Schema d'un processus de reconcentration des cellules. Les cellules	
	sous AKF se deplacent vers le centre du canal tandis que le fiulde	30
2 10	Schéma d'un procédé de séparation cellulaire. Un mélange de 2 types	50
2.10	de cellules est injecté dans l'entrée. Les cellules blanches, qui sont plus	
	grosses, se déplacent vers le centre du canal tandis que les cellules	
	rouges, plus petites, sont collectés dans les 3 sorties.	30
2.11	Schéma d'un processus de séparation de cellules avec milieu de col-	
	lecte. Le mélange de cellules est injecté sur les côtés tandis que le mi-	
	lieu de collecte est injecté au centre du canal. Sous l'effet de l'acous-	
	tique, les cellules vont migrer plus ou moins rapidement pour être ré-	
	cupèrèes dans une des sorties choisies. Issu de (LENSHOF, MAGNUSSON	01
2 12	Culture collulaire 3D de collulas souches méconchumatouses sur dif	31
2.12	férents plans de focalisation a) Schéma du montage expérimental Un	
	transducteur piloté par ordinateur génère une onde acoustique dans	
	une puce PDMS de plusieurs mm de hauteur. La suspension de cel-	
	lules est injectée via un pousse-seringue. b) Auto-structuration des	
	cellules soumises à l'acoustique dans la puce PDMS sur 24 h. Au début	
	les cellules s'organisent en feuillets qui peu à peu s'épaississent tout	
	en réduisant leur diamètre jusqu'à prendre la forme de sphéroïdes.	
0.10	Issu de (JEGER-MADIOT et al., 2021).	32
2.13	Repartition spatiale de cellules endothéliales dans de l'hydrogel col-	
	tillons ont été exposés à des amplitudes de pression différentes à des	
	fréquences de (A) 1 MH_7 (B) 2 MH_7 Issu de (CARVIN et al. 2013b)	32
		24

xvii

2.14	Schéma d'une goutte d'eau reposant sur une surface piézoélectrique. Des SAW sont générées et exercent une pression de radiation sur la goutte à un angle de Rayleigh Θ_R , développant un streaming acous- tique à l'intérieur de la goutte permettant un brassage du fluide. Issu	22
2.15	de (SRITHARAN et al., 2006). Bille d'acier de 2 mm de diamètre dans une goutte d'eau de 5 μm de diamètre. Les SAW génèrent une recirculation du fluide suffisamment importante pour créer une force de lift. La bille entre en lévitation audessus de la surface piézoélectrique et est transportée dans la direc-	33
2.16	tion de propagation des SAW. Issu de (SHILTON et al., 2008) a) Schéma d'un écoulement acoustique oscillant autour d'une arête. La vibration du fluide est distribuée de façon uniforme sauf dans la zone locale autour de l'arête ce qui génère le streaming acoustique. b) Lignes de courant de particules excitées par le champ acoustique et	34
2 17	et de l'arête. Issu de (ZHANG et al., 2019).	34
2.1/	le long d'un canal permettent l'établissement de nœuds de pression en longueur, piégeant les particules le long de ceux-ci. b) En plaçant les IDT's de façon perpendiculaire l'un l'autre il est possible de piéger localement en 2D des particules. En modifiant l'angle des IDT's on modifie la spatialisation du piège acoustique et donc les motifs qui en résultent. Issu de (SHI et al., 2009a).	35
2.18	Schéma d'une pince acoustique. Un transducteur ultrasonique est im- mergé dans une cuve. Le rayon est concentré grâce à une lentille acous- tique concave sur des particules reposant sur un film acoustique trans- parent de polyéthylène. Issu de (BARESCH, THOMAS et MARCHIANO,	
2.19	 2016). a) Schéma d'un montage expérimental utilisant un vortex acoustique. Le vortex acoustique est généré par un tweezer en spirale qui le dirige vers une chambre microfluidique. Les cellules présentes dans la chambre sont ensuite manipulées de façon individuelle en déplaçant la platine motorisée sur laquelle repose la chambre microfluidique. b) Il est possible d'utiliser des fréquences différentes en modifiant les dimensions du tweezer. Cela implique une miniaturisation et l'utilisation d'un nouveau tweezer pour chaque nouvelle fréquence désirée. 	36
2.20	Issu de (BAUDOIN et al., 2020). Succession d'images montrant le déplacement d'une cellule de can- cer du sein manipulée à l'aide d'un tweezer vortex acoustique. La ligne verte continue illustre le chemin effectué par la cellule tandis que la ligne en bleu pointillés montre son parcours à venir. Issu de	37
2.21	 (BAUDOIN et al., 2020). a) Schéma d'un microcanal PDMS traversé par des gouttes d'eau immergées dans de l'huile. Un transducteur interdigité permet la génération de SAW dirigées vers le microcanal. La goutte d'eau est divisée en 2 parties grâce à ces SAW. b) Les gouttes d'eau dans l'huile sont générées à l'intersection en "T" du microcanal puis transportées dans 	37
	la zone soumise à l'acoustique. Issu de (JUNG et al., 2016).	38

- pos b) soumise à une faible excitation acoustique. Les SAW concentrent les particules à l'interface eau-huile. Un pulse acoustique de haute intensité déforme l'interface eau-huile, la brisant d) et créant ainsi une gouttelette dans la phase huile. (e-f) Une utilisation de haut débit pour la phase huile ainsi qu'une grande amplitude acoustique permettent e) à une suspension semi-concentrée à l'interface eau-huile f) et grâce à l'utilisation de SAW par intermittence de générer une succession de gouttelettes encapsulant chacune 1 à 2 particules. Issu de (COLLINS et al., 2013).
- 2.23 Schéma de l'impact d'une goutte d'eau sur une surface inclinée soumise ou non à des SAW. L'utilisation de SAW va modifier le temps de contact de la goutte sur la surface et le sens de propagation des SAW va ouvrir ou fermer l'angle de rebond de la goutte. Issu de (H. BIROUN et al., 2020).
- 2.24 Intéraction de microbulles avec la membrane d'une cellule. A, B et C sont les conséquences d'une cavitation stable tandis que D et E illustrent une cavitation inertielle. A) La microbulle oscille de façon stable, ce qui pousse et tire sur la membrane endommageant l'intégrité de la membrane. B) L'ARF déplace la bulle vers la membrane puis la compresse dessus ce qui a pour conséquence une rupture de cette dernière. La bulle peut même entrer dans la cellule et traverser la bicouche lipidique. C) L'oscillation de la bulle crée du streaming à des échelles micrométriques dans le fluide environnant. La membrane subit donc une contrainte ce qui crée la formation de pores. D) Des ondes de choc sont créées par l'éclatement des bulles, générant d'importantes contraintes sur la membrane et entraînant la rupture de celle-ci. E) L'éclatement d'une bulle proche de la membrane est asymétrique, formant un jet vers la membrane. Ce jet perfore la membrane et crée donc un pore. Issu de (LENTACKER et al., 2014).
- 3.1 Mesure de l'énergie acoustique d'un transducteur *Signal Processing* (2 *MHz*) en fonction de la fréquence acoustique. Issu de (DRON, 2011).
 46
- 3.2 Photo du transducteur coudé utilisé lors de nos expériences (a). Dimensions du transducteur. La partie active fait 5 mm de diamètre (b). Le transducteur packagé envoie l'essentiel de l'énergie acoustique émise par le piézoélectrique (rouge) dans une direction, grâce au "backing" (en gris sur la schéma). Le piézo est couvert par une lame 1/4 d'onde (c).
 3.3 a) Schéma montrant les différentes couches composées de feuilles de PMMA découpées par laser et les principales dimensions intérieures et extérieures du canal. Trois couches sont nécessaires pour définir l'injection centrale et les trois sorties (sortie haute, côté transducteur,
 - et extérieures du canal. Trois couches sont nécessaires pour définir l'injection centrale et les trois sorties (sortie haute, côté transducteur, sortie basse, côté opposé au transducteur et sortie centrale). Les trois couches sont collées et prises en sandwich entre la paroi haute et la paroi basse du canal (plaques de PMMA de 1 *mm* d'épaisseur). Le transducteur est placé sur la paroi supérieure du canal, la transmission des ultrasons étant facilitée par une couche d'huile. b) Photo d'un canal en PMMA avec une entrée et trois sorties.

xix

39

40

42

48

3.4	Schéma du montage expérimental utilisé pour mesurer la position des plans de focalisation acoustique ainsi que les vitesses de focalisation acoustique par suivi de la tâche de défocalisation optique. Il est plus aisé de placer le transducteur sur la paroi supérieure du canal et donc d'observer par en-dessous à l'aide d'un microscope inversé (Axio Ob-	10
	server 7 de Zeiss ^{1M}).	49
3.5	Vue éclatée (a) et vue de côté (b) de la cavité utilisée pour suivre la dy- namique de focalisation acoustique de particules ou cellules isolées. La cavité cylindrique a un diamètre de 25 <i>mm</i> pour une épaisseur de 330 μ m, soit un volume total de 200 μ L. Photo de la cavité en alumi- nium (a) Les achémes no cont pas à l'échelle	50
3.6	Schéma du montage optique et acoustique adapté à l'observation dans une cavité acoustique fermée. La cavité acoustique couplée à un trans- ducteur est placée sur la platine d'un microscope à fluorescence. Un générateur de signal est branché au transducteur afin de générer une onde acoustique qui va passer à travers le fond en silicium de la cavité. L'observation et l'illumination (CoolLED [™] pe4000) se font à travers le couvercle en quartz de la cavité. Ceci permet d'observer le mouve- ment axial des particules ou cellules à l'aide d'une caméra très sen-	50
	sible (PCOIM Panda Bi) pilotée par ordinateur	51
07	Bible (1 CO T and a b) photee par ordinateur.	51
3.7	Profil de vitesse axiale d'une particule ou d'une cellule dans un canal	
	microfluidique soumis à l'acoustique	52
3.8	Schémas optiques avec les images résultantes correspondantes. <i>L</i> est	
	la lentille, <i>I</i> le plan imaginaire, <i>P</i> le plan où se situe la particule et <i>O</i> le	
	plan d'observation lié au plan imaginaire via la lentille. Dans le cas a)	
	le plan d'observation et la particule se superposent tandis que dans le	
	cas b) ce n'est pas le cas. En conséquence un anneau est observé. Issu	
	do (DRON 2011)	53
2.0	Traduction de la têche d'Airre d'une neutieule de E un de nelvetroire	55
3.9	Evolution de la tache d'Airy d'une particule de 5 μ m de polystyrene	
	lors de sa focalisation acoustique vers le nœud de pression	53
3.10	Calibration de la position d'une particule de 5 μm de polystyrène en	
	fonction de la taille de l'anneau	55
3.11	Intensité de gris des pixels partant du centre d'une tâche d'Airy jus-	
	qu'à la bordure de l'anneau. Les pixels "blancs" de l'anneau ont une	
	intensité de gris bien plus importante que les pixels "noirs" situés au	
	contro et à l'avtáriour de l'anneau	56
2 1 2	Interface du module Matlah dévelopmé pour la détection des têches	50
5.12	interface du module Matiab developpe pour la detection des taches	
	d'Airy.	57
3.13	Mesures effectuées lors de la focalisation d'une particule de polysty-	
	rène 10 μm vers le plan de focalisation dans une cavité acoustique a)	
	Rayon de la tâche d'Airy en fonction du temps b) Position de la parti-	
	cule par rapport au plan de focalisation au cours du temps c) Vitesse	
	de focalisation de la particule au cours du temps d) Vitesse de focali-	
	sation de la particule en fonction de sa position par rapport au plan	
	de focalisation	58
		50
4.1	Hauteur de focalisation de particules de 5 <i>um</i> de silice (Si) et de parti-	
	cules de polystyrène (Ps) de 10 um et 20 um	63
12	Vitassa da facelisation da particulas da polyetradas da 5 um 10 um et	00
4.4	vicesse de localisation de particules de polystyrene de 5 μ m, 10 μ m et	
	15 μm en fonction de la frequence.	65

4.3	Vitesse de focalisation maximale de particules de polystyrène en fonc- tion de leur diamètre au carré pour les fréquences de a) 2 <i>MHz</i> et b)	
	2.05 <i>MHz</i> . Des particules de 5 <i>um</i> . 10 <i>um</i> et 15 <i>um</i> ont été utilisées.	66
4.4	Comparaison entre la vitesse de focalisation des particules de poly-	
	styrène de 5 μm en fonction de la fréquence avec la puissance réflé-	
	chie mesurée par le wattmètre. La fréquence optimale mesurée par	
	les deux méthodes est la même : 1,95 <i>MHz</i>	67
4.5	Schéma du montage utilisé pour la reconcentration de particules ou	
	de cellules. Une pompe péristaltique prélève la suspension présente	
	dans l'échantillon initial pour l'envoyer dans le canal soumis à l'acous-	
	tique. Les 3 sorties en aval du canal collectent la suspension dans des	
	échantillons différents qui seront ensuite analysés.	68
4.6	Taux de reconcentration de particules de polystyrène de 5 μm dans les	
	3 sorties du canal sans acoustique à 3 débits différents : $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$,	(0)
4 🗖	$1,0 \ mL.min^{-1} \ et \ 1,5 \ mL.min^{-1}$	69
4.7	laux de reconcentration de particules de polystyrene de 5 μ m en fonc-	70
19	tion de la frequence à a) 0,5 mL.min ⁻ b) 1,0 mL.min ⁻ c) 1,5 mL.min ⁻	70
4.0	a) Repartition de la fréquence accustique, pour $19, 21$ et 25 MHz h)	
	Taux de reconcentration des cellules dans les 3 sorties pour ces 3 fré-	
	quences A 1.9 MHz les cellules se reconcentrent principalement dans	
	les sorties adjacente et centrale. A 2.1 MHz on a une nette reconcen-	
	tration en sortie centrale tandis qu'à 2,5 MHz la majorité des cellules	
	sont collectées en sortie opposée.	73
4.9	Reconcentration de cellules hepaRG sous acoustique à 1,7 MHz et	
	2,1 MHz. a) Des photos dans les 3 sorties du canal ont été prises : la	
	sortie adjacente, la sortie centrale et la sortie opposée au transducteur.	
	b) Taux de reconcentration dans les 3 sorties à ces 2 fréquences. On	
	observe une importante reconcentration en sortie centrale à 2,1 <i>MHz</i> .	75
5.1	Evolution de l'énergie acoustique en fonction du voltage au carré pour	
	un transducteur packagé 2 <i>MHz</i> et un piézoélectrique en céramique	
	2 <i>MHz</i> . Des mesures ont été faites à 5, 6, 7, 8 et 9 <i>V</i> .	79
5.2	Méthodologie pour déduire les propriétés acoustiques des cellules.	
	Etape a) En mesurant la vitesse de focalisation maximale de particules	
	dont les densité et compressibilité nous sont connues on en déduit	
	l'énergie acoustique dans notre système. Etape b) Grâce à la mesure	
	de la vitesse de focalisation des cellules et à l'énergie acoustique pré-	
	cédemment calculée, on en déduit le facteur de contraste acoustique	
	des cellules. En parallele des mesures de vitesse de sedimentation sont	
	enectuees pour trouver la densite. Les densite et lacteur de contraste	80
53	Eacteur de contraste acoustique des hilles de polystyrène de 5, 10 et	00
0.0	15 <i>µm</i> avec leur valeur théorique : $G = 0.573$	81
5.4	Différenciation de cellules souches. Une cellule souche peut se renou-	01
	veler ou se différencier. En se différenciant elle donne naissance à une	
	cellule progénitrice qui peut uniquement se différencier de manière	
	ciblée. On obtient la cellule en question voulue	82
5.5	Evolution de la tâche d'Airy d'une cellule AD-MSC lors de sa migra-	
	tion vers le plan de focalisation	84

xxii

5.6	Mesures effectuées lors de la focalisation d'une cellule AD-MSC vers	
	le plan de focalisation. a) Rayon de la tâche d'Airy en fonction du	
	temps, b) Position de la cellule par rapport au plan de focalisation	
	au cours du temps, c) Vitesse de focalisation de la cellule au cours du	
	temps d) Vitesse de focalisation de la cellule en fonction de sa position	
	par rapport au plan de focalisation	85
5.7	Facteur de contraste acoustique de cellules AD-MSCs en fonction de	
	5 donneurs (A, B, C, D, E) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c)	
	passage 3	86
5.8	Facteur de contraste acoustique de cellules AD-MSCs en fonction de	
	5 donneurs (A, B, C, D, E) au cours de 5 passages	87
5.9	Facteur de contraste acoustique de cellules BM-MSCs en fonction de	
	3 donneurs (α , β , γ) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3 .	88
5.10	Diamètre moyen de cellules AD-MSCs en fonction du nombre de pas-	
	sages effectués pour chaque donneur.	88
5.11	Diamètre moyen de cellules AD-MSCs en fonction du nombre de pas-	
	sages effectués. Pour chaque passage tous les donneurs ont été mélan-	
	gés	89
5.12	Facteur de contraste acoustique en fonction du diamètre des cellules	
	AD-MSCs pour les donneurs a) <i>A</i> , b) <i>B</i> , c) <i>C</i> , d) <i>D</i> , e) <i>E</i> . Dans chaque	
	cas, tous les passages ont été confondus	90
5.13	Phénomène de pression osmotique caractérisé par 3 cas : hyperto-	
	nique, isotonique et hypotonique. Issu de Biology for AP Courses	91
5.14	Mesures effectuées lors de la sédimentation d'une cellule AD-MSC	
	vers le fond de la cavité. a) Rayon de la tâche d'Airy en fonction du	
	temps, b) Position de la cellule par rapport au plan de focalisation	
	au cours du temps, c) Vitesse de sédimentation de la cellule au cours	
	du temps d) Vitesse de sédimentation de la cellule en fonction de sa	
	position par rapport au plan de focalisation	93
5.15	Densité de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (<i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i> ,	
	<i>E</i>) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3	94
5.16	Densité de cellules BM-MSCs en fonction de 3 donneurs (α , β , γ) sui-	
	vant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3.	95
5.17	Densité moyenne de cellules AD-MSCs pour les donneurs A, B, C, D	
	et E en fonction du nombre de passages. On observe une homogénéi-	~-
- 10	sation de la densité à mesure que les cellules subissent des passages.	95
5.18	Compressibilité de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (A ,	0.6
= 10	B, C, D, E) survant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3	96
5.19	Compressibilité moyenne de cellules AD-MSCs pour les donneurs A,	
	B, C, D et E en fonction du nombre de passages. De la meme maniere	
	qu'avec la densité, on observe une homogeneisation de la compressi-	07
- 0 0	bilite au fur et a mesure des passages effectues.	97
5.20	Compressibilité de cellules BM-MSCs en fonction de 3 donneurs (α , β ,	07
E 01	γ) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3	97
3.21	a) Facteur de contraste acoustique, b) Densité, c) Compressibilité des	
	particules de polystyrene de 5, 10 et 15 μ m, amsi que de certules AD-	00
5.00	Tableau réconitulatif des diamètres mouses (passages 1 et 3), 115 et 1N2a	70
5.22	tique densités et compressibilités obtenus pour chaque tune colludaire	
	aque, densnes et compressionnes obtenus pour chaque type centilaire	00
	ctudie	フフ

6.1 6.2	Déstabilisation d'un nuage de particules au cours de sa sédimentation. 104 Les différents régimes de sédimentation d'une particule en fonction du nombre de Galilée. Le premier régime correspond a une sédimen- tation verticale stable. Le second correspond a une sédimentation oblique stable. Le troisième régime est considéré comme oblique oscillatoire.
6.3	Enfin le quatrième est dit chaotique. Issu de (HUISMAN et al., 2016) 105 Position initiale de l'agrégat dans la cavité avant sa remontée vers le
6.4	plan de focalisation sous acoustique
6.5	e) $t = 150 \text{ ms}$, f) $t = 200 \text{ ms}$, g) $t = 300 \text{ ms}$ et h) $t = 2 \text{ s}$ respectivement . 106 Vitesse de focalisation pour des particules de 10, 25 et 40 μm en fonc- tion de l'énergie acoustique du système. Chaque remontée vers le plan de focalisation est individuelle sans effets collectifs. Chaque point
6.6	est la moyenne de 5 mesures
6.7	la focalisation d'une particule de polystyrène de 10 μm isolée 108 Vitesse de focalisation de 3 agrégats de tailles différentes en fonction de l'énergie acoustique injectée dans le système. Tous les agrégats sont composés de particules de 25 μm de polystyrène. Une particule de
6.8	polystyrène de 25 μm focalise seule pour référence
6.9	ticule de polystyrène de 40 μm isolée est ajoutée pour référence 110 Les différents régimes de focalisation acoustique d'un agrégat de par- ticules de 25 μm de diamètre. Chaque image a été prise lorsque l'agré- gat arrive dans le plan de focalisation. a) Le premier régime corres- pond à une focalisation acoustique où l'agrégat garde sa forme ini- tiale, celle d'un "discoïde". b) Dans le second régime l'agrégat remonte sous forme de colonne, les particules étant dans le sillage les unes des autres. c) Le troisième régime correspond à une focalisation acous- tique où l'agrégat se divise en plusieurs parties. Ces parties vont se réassembler entre elles une fois arrivées dans le plan de focalisation
6.10	Les différents régimes de focalisation acoustique d'agrégats en fonc- tion du nombre de Reynolds de focalisation acoustique. La structure des agrégats est présentée grâce à des vues de dessus et de côté. On observe trois régimes : une focalisation sous forme de disque pour $Re_{ac} \leq 0,015$, une focalisation en colonne pour $0,015 \leq Re_{ac} \leq 0,50$ et un split de l'agrégat pour $Re_{ac} \geq 0.050$.
6.11	Reynolds de focalisation acoustique en fonction de la porosité de l'agré- gat. Pour les faibles Reynolds on a des agrégats qui focalisent sous forme de disque. Cette région s'étend sur une grande gamme de po- rosités. Pour les hauts Reynolds on a une région plus concentrée cor- respondant à une division de l'agrégat lors de sa remontée. On se si- tue sur des porosités faibles en comparaison du dernier régime dans lequel l'agrégat focalise en colonne

xxiv

7.1	Création d'un agrégat de plaquettes au cours du temps. Les plaquettes	
	sont dans le plan de focalisation et se déplacent vers un point local	
	dans le plan (x,y). L'agregat croit entre a) 1 min, b) 2 min, c) 10 min, d)	11/
70	20 min.	. 116
1.2	Evolution de la surface d'un agregat de plaquettes en mm ⁻ au cours	117
72	Example d'agrégate plaquettaires en fonction de la concentration	. 117
7.5	d'albumine après 20 min d'attente. On a des échantillers contentration	
	a abumme apres 20 mm a attente. On a des echantinons contenant respectivement : a) 40 g L^{-1} b) 180 g L^{-1} c) 227 g L^{-1} d) 250 g L^{-1}	110
74	Formation d'agrégate de plaquettes en fonction de la concentration	. 110
7.4	collulaire dans l'échantillen après 20 min d'attente. La concentration	
	d'albumine est fixe : $40 g L = 1$ La concentration de plaquettes est res-	
	nectivement de : a) 365 10^3 nlaquettes μI^{-1} h) 182 5 10^3 nlaquettes μI^{-1}	
	c) 121 6 10^3 n laquettes μI^{-1} d) 91 25 10^3 n laquettes μI^{-1}	119
7.5	Evolution de la surface d'un agrégat de plaquettes en fonction de la	• • • • •
	concentration plaquettaire pour deux cas : avec et sans albumine.	. 120
7.6	structure 3D d'une protéine d'albumine humaine (SUGIO et al., 1999)	. 121
7.7	Technologie de mesure de densité et vitesse du son de Anton Paar. La	
	mesure de vitesse du son se fait par un capteur de mesure tandis que	
	la mesure de densité s'effectue via un tube de forme géométrique U	
	qui oscille. Issu de DirectIndustry	. 122
7.8	Densité de l'eau en fonction de de la concentration d'albumine pré-	
	sente dans l'échantillon.	. 123
7.9	Vitesse du son dans de l'eau en fonction de la concentration d'albu-	100
	mine présente dans l'échantillon.	. 123
8.1	Illustration du phénomène de margination des plaquettes pour dif-	
	férents diamètres de vaisseaux sanguins. On peut clairement voir les	
	plaquettes (jaunes) se concentrer vers la paroi du vaisseau au niveau	
	de la Free-Cell-Layer. Illustration obtenue par simulation Lattice-Boltzn	nann
	(KRÜGER, 2016).	. 126
8.2	Schéma multinœuds. Nous avons créé deux nœuds dans le canal en	
	appliquant une fréquence deux fois plus élevée que la fréquence de ré-	
	sonance correspondant à la hauteur du canal. Nous obtiendrons ainsi	
	4 nœuds si nous appliquons une fréquence de 4 <i>MHz</i> dans un canal	
	de hauteur 750 μ m.	. 127
8.3	Position de focalisation de particules de $20 \mu m$ de polystyrène en fonc-	
	tion de la fréquence. On observe 2 nœuds de focalisation pour une fré-	
	quence donnee. En se deplaçant vers les basses frequences les nœuds	
	se deplacent vers la paroi aujacente au transducteur. A i inverse vers	
	transductour. Lorsqu'un noul disparaît sur une des pareis un nou-	
	veau nœud apparaît sur la paroi opposée	128
84	Position de focalisation de particules de 20 <i>um</i> de polystyrène en fonc-	. 120
0.1	tion de la fréquence. On observe jusqu'à 4 nœuds de focalisation pour	
	une fréquence donnée. En se déplacant vers les basses fréquences les	
	nœuds se déplacent vers la paroi adiacente au transducteur. A l'in-	
	verse vers les hautes fréquences les nœuds se déplacent vers la paroi	
	opposée au transducteur. Lorsqu'un nœud disparaît sur une des pa-	
	rois, un nouveau nœud apparaît sur la paroi opposée.	. 129

8.5	Evolution du profil de concentration en particules en aval du trans- ducteur pour différents débits (DRON et al., 2009). On peut clairement voir le passage d'une concentration homogène sur la hauteur du ca-	
8.6	nal (sans acoustique) à une concentration inhomogène, avec un maxi- mum plus ou moins marqué à mi-hauteur du canal	. 130
	en rouge tandis que les particules qui n'y sont pas (non comptabili- sées) sont en jaune (DRON, 2011)	. 131
8.7	Influence de la concentration locale sur la vitesse de focalisation de particules (ici β_F). Nous n'observons pas de tendance significative avant 7 .10 ⁹ <i>particules</i> . <i>L</i> -1. La vitesse de focalisation est relativement constante. Puis, au-delà de 9 .10 ⁹ <i>particules</i> . <i>L</i> -1, on a la vitesse de fo-	
8.8	calisation qui augmente drastiquement (DRON, 2011) Canal multinœuds en cascade. Les cellules se concentrent sur cha- cun des 4 nœuds de pression le long de la hauteur du canal. Cela augmente la concentration locale permettant aux cellules de réagir plus rapidement à l'acoustique. Ensuite, nous réduisons le nombre de nœuds sur chaque partie du canal pour les amener à mi-hauteur et	. 131
8.9	les collecter dans la sortie centrale	. 132
8.10	droite Epaisseur de reconcentration de particules de polystyrène de 5 μm en aval d'une configuration multinœuds en cascade 4 <i>MHz-2 MHz-</i> 1 <i>MHz-1 MHz</i> . L'observation a été faite dans le canal en aval des	. 133
8.11	4 transducteurs pour 3 débits : $0.5 \ mL.min^{-1}$ (rouge), $1.0 \ mL.min^{-1}$ (bleu) et $1.5 \ mL.min^{-1}$ (vert)	. 134
8.12	centrale. Schéma du canal Multisteps, vue de côté. On a un profil de Poiseuille qui s'évase avec une vitesse maximum au centre du canal qui diminue	. 135
8.13	à chaque changement de section. a) Schéma d'une expansion avec un taux d'expansion $E = 3$, et la transition d'un écoulement symétrique à un écoulement asymétrique stable. b) Diagramme de bifurcation pour un écoulement à faible nombre de Reynolds dans un canal en expansion avec un taux d'expansion de	. 136 e
8 14	3, comme dans nos canaux. Le nombre de Reynolds critique $Re_c = 58$. Issu de HAWA et RUSAK, 2001. Evolution du Re_c en fonction du taux d'expansion. On peut voir que le	. 137
	Re_c augmente considérablement pour les taux d'expansion inférieurs à 3. Issu de QIAN et al., 2016.	. 138
8.15	Canal Multisteps. Vision hémodynamique. On a une free-cell-layer qui se crée au niveau des parois du canal	. 140
8.16	Dispositif de séparation des plaquettes du sang total à l'aide d'une succession de portions "restriction-extension" par LAXMI et al., 2020.	. 140

xxvi

8.17	Dispositif Multisteps composé de trois piézoélectriques. Chaque pié-	
	zoélectrique est alimenté par un générateur et refroidi par un système	
	de refroidissement piloté par ordinateur. La chaleur dégagée par les	
	piézoélectriques est transmise par la pâte thermique dans le radia-	
	teur où elle est dissipée. Deux pompes péristaltiques placées en entrée	
	et sortie permettent de faire circuler le fluide dans le canal. Ce mon-	
	tage n'a malheureusement pas fonctionné en raison de l'impossibilité	
	d'adapter la fréquence émise par les piézo aux épaisseurs variables	
	du canal	143
8.18	Position des nœuds de pression en fonction de la fréquence pour chaque	
	portion du canal Multisteps.	144
8.19	Hauteur de focalisation de particules de $5\mu m$ de silice et $20\mu m$ de po-	
	lystyrène en fonction de la fréquence. Les mesures sont effectuées au	
	niveau du transducteur central tandis que les transducteurs amont et	
	aval, situés sur la même paroi, sont également activés	145
8.20	Reconcentration de particules de 5 μm en fonction du canal utilisé	
	sans acoustique. Dans les 3 cas un débit de $0,5 mL.min^{-1}$ a été imposé.	146
8.21	Reconcentration de particules de 5 μm en fonction du canal utilisé.	
	Dans les 3 cas un débit de $0,5 mL.min^{-1}$ a été imposé	147
8.22	Processus de séparation cellulaire utilisant des SAW. L'originalité du	
	système réside dans une préfocalisation géométrique couplée à un	
	champ acoustique multinœuds. A) Les cellules injectées en entrée (1)	
	migrent vers les 2 nœuds présents dans la partie préfocalisation. Une	
	expansion légèrement abrupte a lieu juste avant la section "a" puis un	
	processus de séparation à l'aide d'un seul nœud de pression fait mi-	
	grer les grosses cellules vers la sortie centrale (2) tandis que les petites	
	cellules sont collectées en sortie latérale (3). B) Vue de côté du canal.	
	On a la même épaisseur tout le long de celui-ci. Issu de ANTFOLK et	
	al., 2015	148
8.23	Schéma d'un canal multisteps/multifréquence idéal pour de la recon-	
	centration. La condition $\frac{\lambda}{2}$ est respectée dans la portion fluide tandis	
	que les parois ont une épaisseur $\frac{\lambda}{4}$	148
	-	

Liste des Abréviations

AD-MSCs	Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ARF	Acoustic Radiation Force
BAW	Bulk Acoustic Wave
BM-MSCs	Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster Differenciation
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CTSA	Centre de Transfusion Sanguine des Armées
FFF	Field Flow Fractionation
fps	frame per second
FWD	ForWarD power
GDPT	General Defocusing Particle Tracking
GR	Globules Rouges
HSC	Hepatic Star Cells
IBPS	Institut de Biologie Paris-Seine
IDM	Infarctus Du Myocarde
iLite	innovation for Liver Tissue Engineering
iPS	induced Pluripotent Stromal cells
KC	Kupffer Cells
LEC	Liver Endothelial Cells
NaCl	chlorure de sodium
NPC	Non Parenchymal Cells
N2a	cellules Neuro-2a
PFF	Pinched Flow Fractionation
PHH	cellules Primaires Humaines Hépatocytes
PIA	Projet d'Investissement d'Avenir
PMMA	Poly Méthacrylate de Méthyle Acrylique
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
Ps	Polystyrène
PSL	Produits Sanguins Labiles
RE	Reticulum Endoplasmique
REF	REFlected power
RHU	projet de Recherches Hospitalo-Universitaire
SAW	Surface Acoustic Wave
SGPI	Secrétariat Général Pour l'Investissement
Si	Silice
SSAW	Standing Surface Acoustic Wave
SWR	Standing Wave Ratio

Constantes Physiques

Accélération de pesanteur $g = 9.80665 \,\mathrm{m/s^2}$

Liste des Symboles

а	rayon d'un disque rigide
<i>a_{GB}</i>	rayon d'un globule rouge
$A_{a\sigma}$	surface de l'agrégat projetée normalement a la direction de mouvement
$A_n^{u_{\mathcal{S}}}$	surface d'une particule projetée normalement à la direction de mouvement
Anores	surface de l'agrégat occupée par les pores
Anores_min	surface minimale de l'agrégat occupée par les pores
A_{sol}	surface de l'agrégat occupée par des particules
$A_{sol-max}$	surface maximale de l'agrégat occupée par des particules
B	densité de flux magnétique
Cf	vitesse du son dans le fluide
C_p	vitesse du son dans les particules/cellules
\dot{D}_a	diamètre d'ouverture de la lentille
$D_{a\sigma}$	diamètre d'un agrégat de particules
D_e^{n}	diamètre effectif des particules/cellules
D_h	diamètre horizontal de l'agrégat passant par le centre
D_n	diamètre d'un nuage de particules
d_p	diamètre des particules/cellules
\dot{D}_{th}	coefficient de diffusion thermique
D_v	diamètre vertical de l'agrégat passant par le centre
Ε	facteur d'expansion du canal microfluidique
$\langle E_{ac} \rangle$	densité d'énergie acoustique
E_{rms}	valeur moyenne quadratique du champ électrique
F	longueur focale
$\left\langle \vec{F_{ac_G}} \right\rangle$	potentiel de force modèle de Gor'kov
F _{ac}	force de radiation acoustique modèle de Yosioka
f_{ac}	fréquence acoustique
$\vec{F_{ac_K}}$	force de radiation acoustique modèle de King
$\vec{F_{B-rad}}$	force de Bjerknes
F _{comp}	terme de compressibilité force de radiation acoustique
f _{corr}	facteur de correction force radiation acoustique
fcm	facteur de Clausius-Mossoti
F_D	facteur de contraste acoustique thermovisqueux
f_{def}	paramètre de déformation d'un globule rouge
F_{DEP}	force de diélectrophorèse
F_{GB}	force de traînée d'un globule rouge
F_K	facteur de densité
F_{mag}	force magnétique
F_R	force de radiation acoustique modèle tridimensionnel
F_r	terme de sphère rigide radial force de Bjerknes
F_S	force de Stokes
$F_{S_{gb}}$	force de traînée appliquée à un globule rouge

		٠
XXX	1	1
	-	

$\vec{F_T}$	force de radiation acoustique transverse
F_{th}	facteur de contraste acoustique thermique
F_v	facteur de contraste acoustique visqueux
F_x	force de radiation acoustique sur un disque rigide selon l'axe x
F_Y	facteur contraste acoustique
F_{y}	force de radiation acoustique sur un disque rigide selon l'axe y
$\check{F}_{Y_{\chi}}$	facteur de compressiblité
F_z	force de radiation acoustique sur un disque rigide selon l'axe z
$F_{ heta}$	terme de sphère rigide orthoradial force de Bjerknes
f_{\sharp}	nombre focal de la lentille
G	facteur de contraste acoustique X3
Ga	nombre de Galilée
8	accélération de pesanteur
h	hauteur du canal/de la cavité
j	unité imaginaire
k	nombre d'onde acoustique
K_n	facteur de forme appliqué à un agrégat
<i>k</i> _{or}	facteur d'orientation d'un globule rouge lors de sa sédimentation
Μ	grossissement
m_d	masse d'un disque rigide
NA	ouverture numérique
N_p	nombre de particules dans un agrégat
P_A	force de flottabilité
р	pression acoustique
r	rayon d'une particule
Ke D	nombre de Keynolds
Re_{ac}	Reynolds de focalisation acoustique
Re _c D	nombre de Reynolds critique
κ_{eff}	distance entre l'objectif et le plan d'observation
S	custance entre i objecti el le plan d'observation
S_{ag}	surface d'un agrégat
5 _{sph}	ápaissour d'un disque rigide
\mathcal{L}_d	temps de focalisation d'un agrégat
foc-ag	énergie potentielle modèle de Cor'kov
\u/ 1/r	vitesse de focalisation d'une particule/cellule
u _F U _C D	vitesse de sédimentation d'un globule rouge
ugb Uc	vitesse de sédimentation d'une particule/cellule
v	vitesse d'écoulement du fluide
V _{foc} ag	vitesse de focalisation d'un agrégat
V_d	volume d'une particule
$V_{a}^{\mu_{p}}$	vitesse de gravitation d'une particule
W	épaisseur des particules regroupées à mi-hauteur du canal
X_n	fraction volumique de particules
r Z	position de la particule/cellule
Z_{c}	position à mi-hauteur du canal
ß-	nourcontage de particules focalisées par seconde
PF Bc	compressibilité du fluide
Pf B	compressibilité des particules / cellules
Pp δu	épaisseur de pénétration thermique
U th	epuisseur de peretrution merninque

ϵ constante diélectrique ϵ_m permittivité complexe du milieu ϵ_p permittivité complexe d'une particule κ perméabilité de l'agrégat λ_{ac} longueur onde acoustique λ_{fluo} longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes μ viscosité dynamique du fluide μ_0 perméabilité du vide v viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	$\delta_{ u}$	épaisseur de pénétration visqueuse
ϵ_m permittivité complexe du milieu ϵ_p permittivité complexe d'une particule κ perméabilité de l'agrégat λ_{ac} longueur onde acoustique λ_{ac} longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes μ viscosité dynamique du fluide μ_0 perméabilité du vide ν viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	ϵ	constante diélectrique
$\begin{array}{lll} \epsilon_p & \mbox{permittivité complexe d'une particule} \\ \kappa & \mbox{perméabilité de l'agrégat} \\ \lambda_{ac} & \mbox{longueur onde acoustique} \\ \lambda_{fluo} & \mbox{longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes} \\ \mu & \mbox{viscosité dynamique du fluide} \\ \mu_0 & \mbox{perméabilité du vide} \\ \nu & \mbox{viscosité cinématique} \\ \rho_d & \mbox{densité du disque} \\ \rho_f & \mbox{densité du fluide} \\ \sigma & \\ masse ajoutée d'un disque rigide \\ \sigma_e & \mbox{conductivité} \\ \tau & \mbox{période d'oscillation tube vibrant} \\ \nu & \mbox{vitesse acoustique} \\ \nu_0 & \\ amplitude de la vitesse acoustique \\ \varphi & \\ porosité des agrégats \\ \chi & \\ rapport d'aspect de l'agrégat \\ \omega & \\ \end{array}$	ϵ_m	permittivité complexe du milieu
κ perméabilité de l'agrégat λ_{ac} longueur onde acoustique λ_{fluo} longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes μ viscosité dynamique du fluide μ_0 perméabilité du vide ν viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique ρ_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	ϵ_p	permittivité complexe d'une particule
$\begin{array}{lll} \lambda_{ac} & \mbox{longueur onde acoustique} \\ \lambda_{fluo} & \mbox{longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes} \\ \mu & \mbox{viscosité dynamique du fluide} \\ \mu_0 & \mbox{perméabilité du vide} \\ \nu & \mbox{viscosité cinématique} \\ \rho_d & \mbox{densité du disque} \\ \rho_f & \mbox{densité du fluide} \\ \rho_p & \mbox{densité des particules/cellules} \\ \sigma & \mbox{masse ajoutée d'un disque rigide} \\ \sigma_e & \mbox{conductivité} \\ \tau & \mbox{période d'oscillation tube vibrant} \\ \nu & \mbox{vitesse acoustique} \\ \nu_0 & \mbox{amplitude de la vitesse acoustique} \\ \rho & \mbox{porosité des agrégats} \\ \chi & \mbox{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & \mbox{fréquence angulaire du champ électrique} \\ \end{array}$	κ	perméabilité de l'agrégat
$\begin{array}{lll} \lambda_{fluo} & \mbox{longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes} \\ \mu & \mbox{viscosité dynamique du fluide} \\ \mu_0 & \mbox{perméabilité du vide} \\ \nu & \mbox{viscosité cinématique} \\ \rho_d & \mbox{densité du disque} \\ \rho_f & \mbox{densité du fluide} \\ \rho_p & \mbox{densité des particules/cellules} \\ \sigma & \mbox{masse ajoutée d'un disque rigide} \\ \sigma_e & \mbox{conductivité} \\ \tau & \mbox{période d'oscillation tube vibrant} \\ \nu & \mbox{vitesse acoustique} \\ \nu_0 & \mbox{amplitude de la vitesse acoustique} \\ \rho & \mbox{porosité des agrégats} \\ \chi & \mbox{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & \mbox{fréquence angulaire du champ électrique} \\ \end{array}$	λ_{ac}	longueur onde acoustique
μ viscosité dynamique du fluide μ_0 perméabilité du vide μ_0 perméabilité du vide ν viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	λ_{fluo}	longueur d'onde d'émission des particules/cellules fluorescentes
μ_0 perméabilité du vide ν viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant ν vitesse acoustique ν_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	μ	viscosité dynamique du fluide
ν viscosité cinématique ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	μ_0	perméabilité du vide
ρ_d densité du disque ρ_f densité du fluide ρ_p densité des particules/cellules σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	ν	viscosité cinématique
$\begin{array}{lll} \rho_f & \mbox{densité du fluide} \\ \rho_p & \mbox{densité des particules/cellules} \\ \sigma & \mbox{masse ajoutée d'un disque rigide} \\ \sigma_e & \mbox{conductivité} \\ \tau & \mbox{période d'oscillation tube vibrant} \\ v & \mbox{vitesse acoustique} \\ v_0 & \mbox{amplitude de la vitesse acoustique} \\ \varphi & \mbox{porosité des agrégats} \\ \chi & \mbox{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & \mbox{fréquence angulaire du champ électrique} \end{array}$	$ ho_d$	densité du disque
$ \begin{array}{ll} \rho_p & \mbox{densité des particules/cellules} \\ \sigma & \mbox{masse ajoutée d'un disque rigide} \\ \sigma_e & \mbox{conductivité} \\ \tau & \mbox{période d'oscillation tube vibrant} \\ v & \mbox{vitesse acoustique} \\ v_0 & \mbox{amplitude de la vitesse acoustique} \\ \varphi & \mbox{porosité des agrégats} \\ \chi & \mbox{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & \mbox{fréquence angulaire du champ électrique} \end{array} $	$ ho_f$	densité du fluide
σ masse ajoutée d'un disque rigide σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	ρ_p	densité des particules/cellules
σ_e conductivité τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	σ	masse ajoutée d'un disque rigide
τ période d'oscillation tube vibrant v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	σ_e	conductivité
v vitesse acoustique v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	τ	période d'oscillation tube vibrant
v_0 amplitude de la vitesse acoustique φ porosité des agrégats χ rapport d'aspect de l'agrégat ω fréquence angulaire du champ électrique	υ	vitesse acoustique
$ \begin{array}{ll} \varphi & & \text{porosité des agrégats} \\ \chi & & \text{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & & \text{fréquence angulaire du champ électrique} \end{array} $	v_0	amplitude de la vitesse acoustique
$\begin{array}{ll} \chi & & \text{rapport d'aspect de l'agrégat} \\ \omega & & \text{fréquence angulaire du champ électrique} \end{array}$	φ	porosité des agrégats
ω fréquence angulaire du champ électrique	χ	rapport d'aspect de l'agrégat
	ω	fréquence angulaire du champ électrique

Chapitre 1

Introduction

1.1 Enjeux médicaux et industriels du tri cellulaire

La création de tissus et d'organes in-vitro à partir de cellules souches est un sujet de recherche majeur dans la perspective du développement d'une médecine réparatrice capable de réparer ou régénérer des organes endommagés, malades ou trop âgés. On peut citer par exemple l'infarctus du myocarde (IDM) qui est une nécrose ischémique du muscle cardiaque consécutive à l'obstruction thrombotique d'une ou de plusieurs artères coronaires. Cette obstruction entraîne la mort des cardiomyocytes et est responsable de lésions irréversibles de la paroi ventriculaire. La thérapie cellulaire a pour objectifs de remplacer le tissu cicatriciel engendré par l'IDM par du tissu vivant, de promouvoir l'angiogénèse afin d'assurer les apports en oxygène et en nutriments au niveau de la zone infarcie et d'assurer les fonctions contractiles nécessaires au coeur pour répondre aux besoins de l'organisme.

La thérapie cellulaire consiste alors à faire croître des cellules spécifiques qui pourront se différencier en différents types de tissus ou d'organes : cellules dérivées de la moelle osseuse (KUO et al., 2008) (cellules mononucléées, cellules souches hématopoïétiques, progéniteurs endothéliaux circulants, cellules stromales mésenchymateuses), cellules souches cardiaques (SEGERS et LEE, 2008), cellules souches pluripotentes comme les cellules souches embryonnaires et les induced-Pluripotent Stem Cells (TAKAHASHI, 2016). Parmi les difficultés rencontrées lors des différentes étapes menant à la fabrication de tissus biologiques, on peut citer la sélection des cellules d'intérêt extraites du milieu de culture, la manipulation des couches «mono-layer» de cellules développées sur un substrat solide ou encore la croissance d'organes nécessitant un support (scaffold).

Cependant, la thérapie cellulaire reste une pratique trop peu utilisée aujourd'hui du fait du coût trop élevé des traitements et du marché de niche. Plus de 3 millions de francais et 30 millions d'Européens sont concernés (PASCAL, 2019). Un important besoin d'industrialisation de ces techniques se fait sentir. Le fait d'accéder à des traitements de moindre coût passe par l'industrialisation des traitements et donc la capacité à isoler les cellules d'interêt avec succès et à de grandes échelles. Malheureusement les méthodes de tri cellulaire dites "classiques" ne le permettent pas.

1.2 Les différentes méthodes de tri

1.2.1 Centrifugation

Différentes méthodes de tri existent déjà. La plus connue et la plus ancienne est la centrifugation. Une suspension de cellules est placée dans une centrifugeuse, appareil permettant une vitesse de rotation importante des échantillons. Les cellules


FIGURE 1.1 – Principe de centrifugation : les cellules réparties de façon homogène dans la suspension vont sédimenter rapidement suite à leur passage dans une centrifugeuse. Issu de Fisher Scientific.

dans l'échantillon sont soumises à la force centrifuge et une séparation se crée du fait de la différence de densité entre les cellules et leur environnement (Fig. 1.1).

Cette méthode, bien que très répandue depuis de nombreuses années, surtout pour de l'enrichissement de cellules, possède une efficacité limitée et endommage les cellules du fait des centaines accélérations de pesanteur "g" qu'elles subissent.

1.2.2 Tri par immuno-magnétisme

Une seconde méthode est le tri par immuno-magnétisme. Des particules magnétiques sont injectées dans l'échantillon et viennent se fixer sur une population de cellules ciblées. On applique ensuite un champ magnétique qui attire les cellules marquées sur le bords du tube contenant l'échantillon. Le reste est ensuite évacué permettant la récupération du type cellulaire restant dans l'échantillon (Fig. 1.2).





Cette méthode est encore une fois assez peu efficace et a le gros inconvénient d'être intrusive du fait de la fixation de billes magnétiques sur les cellules.

Lévitation magnétique et magnétophorèse

D'autres méthodes, plus expérimentales sont à l'étude. On peut citer la lévitation magnétique de cellules (DURMUS et al., 2015). La force magnétique F_{mag} s'exerçant sur une particule de volume V_{d_p} s'exprime comme :



FIGURE 1.3 – Principe de lévitation magnétique de cellules. Issu de (DURMUS et al., 2015).

$$F_{mag} = \frac{\Delta \chi V_{d_p}}{\mu_0} \left(\nabla B\right) B \tag{1.1}$$

avec *B* la densité de flux magnétique, ∇B le gradient du champ magnétique extérieur, μ_0 la perméabilité du vide et $\Delta \chi$ la différence de susceptibilité entre la particule et le fluide.

Une plateforme de mesure de densité est composée de 2 aimants avec les pôles identiques se faisant face. Les cellules sont dans un milieu paramagnétique. Cellesci s'éloignent des zones d'induction les plus importantes pour migrer vers les plus petites. La cellule se stoppe lorsque la force magnétique et la force de flottaison sont à l'équilibre (Fig. 1.3). Ce système permet de mesurer en temps-réel la variation de densité d'une cellule individuelle.

Une application de la manipulation magnétique est la magnétophorèse. Celle-ci permet la séparation de particules paramagnétiques via l'utilisation d'aimants ou électro-aimants en se basant sur leur taille ainsi que le "coeur" magnétique de la particule entouré d'un revêtement. Ce revêtement est généralement composé d'une substance qui permet à la particule de s'accrocher à une cellule cible et permet des applications dans le domaine biomédical (PANKHURST et al., 2003; PANKHURST et al., 2009).

Un processus de séparation microfluidique basé sur la magnétophorèse est celui de Pamme et al. (Fig. 1.4).

Ils utilisent un canal microfluidique composé de multiples entrées et sorties séparées par une chambre soumise à un champ magnétique. Une entrée contient un mélange de particules, les autres ne contenant que du milieu tampon. Les particules, en entrant dans la chambre, sont soumises au champ magnétique qui va les déplacer latéralement. La force magnétique étant volumique, les grosses particules migreront plus loin que les petites. Ainsi on peut récupérer chaque taille de particules dans une sortie correspondante.

La force magnétique peut être utilisée également pour manipuler des objets nonmagnétiques (ou diamagnétiques). Ceux-ci, soumis à un champ magnétique vont subir une force de répulsion qui permet de les déplacer également (PAMME, 2006). Ainsi, via cette méthode, Furnali et al. ont pu séparer des globules blancs de globules rouges (FURLANI, 2007).



FIGURE 1.4 – Schéma d'un processus de tri de particules par électromagnétisme. Un canal possédant de multiples entrées ainsi que de multiples sorties est placé sous champ magnétique. Une entrée contient la suspension à séparer tandis que les autres entrées possèdent un milieu tampon. Les particules, réagissant au champ magnétique, vont se déplacer perpendiculairement au sens de l'écoulement. Les plus grosses particules, plus sensibles à la force magnétique, vont migrer vers les sorties les plus éloignées de l'entrée de la suspension tandis que les petites seront collectées dans des sorties plus proches. Issu de (PAMME et MANZ, 2004).

1.2.3 Séparation hydrodynamique

Field Flow Fractionation

La Field Flow Fractionation (FFF) est une technique de séparation analytique (GIDDINGS, 1993) qui permet de caractériser des particules et polymères. Leurs diamètre, densité, masse molaire et coefficients de diffusion sont déduits de leur "temps de rétention", c'est-à-dire le temps entre l'injection de l'échantillon et la collecte des particules ou cellules en sortie de canal (JIANG et al., 1999). En effet, si une suspension polydisperse est injectée dans un canal rectangulaire, elle est transportée par un écoulement de Poiseuille. Ceci implique que la vitesse est maximale au centre du canal et nulle aux parois. Pour effectuer la séparation entre deux populations de particules on applique un écoulement perpendiculaire au premier qui va entraîner les particules vers la paroi opposée à celle d'où arrive l'écoulement extérieur. C'est sur cette paroi opposée que vont s'accumuler les particules (Fig. 1.5).

Il existe 3 modes de FFF (Fig. 1.6). Pour des particules de taille inférieure au micromètre, nous sommes en "normal mode". Les forces de diffusion brownienne vont s'opposer à l'écoulement perpendiculaire ce qui va créer une épaisseur de concentration de particules plus ou moins importante selon leur taille, forme et capacité à se déformer (MYERS, 1997).

Les particules les plus soumises à la diffusion brownienne vont s'éloigner davantage de la paroi et auront donc un temps de rétention inférieur à celles proches de la paroi car soumises à des lignes de courant plus rapides du profil d'écoulement parabolique. Pour des particules ayant un diamètre compris entre 0,5 μm et 10 μm nous sommes en "steric mode" (ou "reversed" mode). Les particules, trop grosses pour être affectées par le mouvement brownien, vont se concentrer sur la paroi créant une nappe de particules. Les grosses particules "dépassant" de cette nappe



FIGURE 1.5 – Principe de séparation cellulaire par Field Flow Fractionation. Un écoulement extérieur perpendiculaire est appliqué à l'écoulement de Poiseuille principal contenant 2 types de particules. Les particules vont être plaquées sur la paroi opposée à celle d'où arrive l'écoulement extérieur. Les petites particules vont suivre les lignes de courant plus proches de la paroi (et donc plus lentes) que les grosses particules, incapables d'approcher autant la paroi et donc soumises à des lignes de courant plus rapides. On obtient un délai temporel en sortie entre les grosses et les petites particules. Issu de (JIANG et al., 1999).



FIGURE 1.6 – Les 3 différents modes de Field Flow Fractionation. Le "normal mode" comprend les particules sub-micromètre (jaune) et les macromolécules (noir). Celles-ci s'accumulent sur la paroi opposée augmentant la concentration locale. Cette augmentation est contre-balancée par la mouvement Brownien qui les redirige loin de la paroi. Les macromoélcules, plus affectées par le mouvement Brownien vont s'éloigner davantage de la paroi puis emportées plus rapidement dans l'écoulement grâce à des lignes de courant plus rapides que celles proches de la paroi où sont restées les particules sub-micromètre. Le "steric mode" s'applique pour des particules comprises entre 0,5 µm et 10 µm. Les particules ne sont plus affectées par le mouvement Brownien. Les particules vont former une couche le long de la paroi. Les petites particules (vert) vont rester dans cette couche tandis que les grosses (rose) vont dépasser de cette couche et être emportées plus rapidement par des lignes de courant plus éloignées de la paroi. Enfin on se considère en "hyperlayer" mode lorsque la taille des particules est supérieure à 10 µm. Celles-ci s'approchent difficilement de la paroi, étant repoussées par les forces hydrodynamiques de lift. Plus leur diamètre est important plus leur position sera éloignée de la paroi et donc plus elles seront affectées par des lignes de courant rapides. Ainsi les grosses particules (rouge) auront un temps de rétention inférieur aux petites (violet). Issu de (LENSHOF et LAURELL, 2010).

vont être entraînées par des lignes de courant plus rapides réduisant leur temps de rétention par rapport à celles restées dans la nappe. Le dernier cas est appelé "hyperlayer mode" et comprend des particules de diamètre supérieur à 10 μm . Plus le diamètre des particules sera important, plus les forces de lift vont s'opposer à l'écoulement perpendiculaire. Ainsi les grosses particules plus proches du centre du canal seront emportées par des lignes de courant plus rapides que les petites particules plus proches de la paroi et donc emportées par des lignes de courant moins rapides.

SPlit-flow Lateral Transport Thin

Une technologie se rapprochant de la FFF est celle du SPlit-flow Lateral Transport Thin ou SPLITT (JIANG et al., 1999; NARAYANAN, SALDANHA et GALE, 2006). Inaugurée par Giddings et al. (GIDDINGS, 1985), elle consiste en un canal composé de 2 entrées - 2 sorties. Une entrée contient la suspension tandis que la seconde ne contient que du fluide. Ces 2 entrées sont isolées l'une de l'autre jusqu'à arriver sous l'influence d'un écoulement extérieur orthogonal à l'écoulement principal. Les particules vont migrer vers la paroi opposée à celle où l'écoulement extérieur s'applique, les particules migrant plus ou moins rapidement vers cette paroi selon leurs tailles (Fig. 1.7).



FIGURE 1.7 – Principe de séparation cellulaire par la technologie du SPLITT. Un écoulement est imposé dans un canal microfluidique possédant 2 entrées et 2 sorties. La première entrée contient une suspension de billes bi-disperses tandis que la seconde contient un milieu tampon. Un écoulement perpendiculaire au premier est appliqué au niveau de la paroi proche de l'entrée contenant la suspension. Sous l'effet de ce second écoulement les particules vont migrer vers la paroi opposée à une vitesse plus ou moins importante en fonction de leur taille, les grosses particules migrant latéralement plus rapidement que les petites. Les 2 sorties séparées par une membrane collectent chaque type cellullaire devenu indépendant. Issu de (JIANG et al., 1999).

Là où la FFF ne se base que sur le temps de rétention des particules avec une sortie unique, le SPLITT possède 2 sorties séparées par une membrane qui permet d'isoler chaque type de particules et de les récupérer indépendemment l'un de l'autre. Suivant la taille des particules et la longueur du canal il faut donc adapter le débit de façon à séparer les 2 types de particules le plus efficacement possible. La technologie du SPLITT a permis l'élaboration d'un design microfluidique pertinent pour le tri cellulaire, design qui a été repris dans différents domaines tels que la diélectrophorèse (KIM et al., 2007b) ou encore l'application de forces magnétiques (LAI et al., 2009) et acoustiques (HAWKES et al., 2004).

Pinched Flow Fractionation

Une seconde méthode se basant également sur la taille des particules pour faire de la séparation en flux laminaire est la Pinched Flow Fractionation ou PFF (OAKEY, ALLELY et MARR, 2002). Le système contient 2 entrées, une portion étroite suivie directement par une large portion de canal donnant sur la sortie (Fig. 1.8).



FIGURE 1.8 – Principe de séparation cellulaire par Pinched Flow Fractionation. Un écoulement est imposé dans un canal possédant 2 petites entrées, un tronçon étroit et une portion élargie qui donne sur une sortie. Une entrée contient une suspension de particules de 2 tailles. La seconde entrée permet l'injection d'un milieu tampon à débit plus élevé que dans la première entrée. En arrivant dans le tronçon étroit, les particules sont plaquées contre une paroi du fait du débit important de la seconde entrée. En arrivant dans la section élargie du canal, les lignes de courant du fluide vont se propager sur toute la largeur. Les petites particules, davantage soumises à ces lignes de courant vont se déplacer latéralement sur une distance bien plus importante que les grosses particules moins soumises aux lignes de courant. Issu de (VIG et KRISTENSEN, 2008).

La première entrée contient la suspension tandis que la seconde contient le milieu tampon. Le débit imposé dans l'entrée contenant le milieu tampon est supérieur à celui contenant la suspension. Dans la portion étroite les particules vont se placer contre la paroi proche de la première entrée dû au débit supérieur imposé dans la seconde entrée. Les lignes de courant passant par le centre des petites particules sont plus proches que les lignes de courant passant par le centre des grosses. Or en arrivant dans la portion large du canal, les lignes de courant vont se propager sur toute la largeur. Ainsi les lignes de courant au centre de la portion étroite vont se retrouver au centre de la portion large tandis que les lignes de courant collées aux parois de la portion étroite vont se déplacer le long des parois de la portion large. Les petites particules sont donc emportées proches de la paroi dans la section large tandis que les grosses vont migrer davantage vers le centre du canal.

Filtration hydrodynamique

La filtration hydrodynamique se base sur l'évacuation du fluide environnant les particules par l'intermédiaire de multiples branches perpendiculaires à l'écoulement principal. Cette évacuation du fluide a pour effet de coller les particules proches des parois latérales (Fig. 1.9).



FIGURE 1.9 – Schéma illustrant le principe de filtration hydrodynamique. a) Un canal composé de multiples branches orthogonales aligne les particules injectées dans celui-ci le long des parois grâce à une partie du fluide s'échappant par ces branches. a) A faible débit imposé dans ces branches, aucune particule n'est évacuée de l'écoulement principal b) A débit moyen seules les petites particules sont évacuées. c) A haut débit toutes les particules sont évacuées, même les plus grosses. d) Un mélange de petites et grosses particules introduit dans l'écoulement principal peut-être séparé en récupérant les petites particules dans les premières branches puis les grosses dans les dernières en appliquant les débits adéquats. Issu de (YAMADA et SEKI, 2005).

Le débit dans les branches est contrôlé de façon précise afin d'effectuer les séparations souhaitées. Ainsi avec un faible débit imposé, seul le fluide s'échappe de l'écoulement principal. A mesure que l'on augmente le débit, nous sommes en mesure d'évacuer des particules de tailles de plus en plus grosses (YAMADA et SEKI, 2005). Cela est une conséquence de l'effet Zweifach-Fung : dans un canal possédant de multiples embranchements, les particules composant une suspension vont avoir tendance à suivre l'écoulement où le débit est le plus important tandis que le milieu s'évacue dans les branches perpendiculaires à des débits inférieurs. Yang et al. ont utilisé avec pertinence cet effet afin d'isoler le plasma sanguin du sang (YANG, ÜNDAR et ZAHN, 2006).

Forces de lift

Les forces de lift (ou effets de paroi) permettent de déplacer les particules à des positions latérales spécifiques de l'écoulement en s'équilibrant avec les forces de cisaillement liées au profil de l'écoulement. Park et al. utilisent une méthode séparative utilisant ces forces de lift (PARK, SONG et JUNG, 2009). Par un jeu successif d'expansion-restriction dans un canal microfluidique, ces derniers sont capables de déplacer et d'isoler des particules en des endroits spécifiques du canal (Fig. 1.10).



FIGURE 1.10 – Schémas d'un processus de reconcentration via des expansions-restrictions multiples. a) Les forces de lift s'exerçant sur des particules rigides dans un écoulement de Poiseuille. La force du gradient de cisaillement déplace les particules vers les parois latérales tandis que les effets de bord contrent cela, les particules atteignant leur position d'équilibre. b) Vortex hydrodynamiques générés suite à une expansion soudaine du canal en fonction du nombre de Reynolds critique Re_c . c) Représentation des différentes étapes du processus de séparation. Issu de (PARK, SONG et JUNG, 2009).

Les expansions-restrictions permettent la génération d'écoulements turbulents même à faible nombre de Reynolds. Le nombre de Reynolds *Re*, qui est le rapport des forces d'inerties sur les forces visqueuses s'exprime comme :

$$Re = \frac{vL_c}{v} \tag{1.2}$$

avec v la vitesse du fluide dans l'écoulement, L_c la longueur caractéristique et v la viscosité cinématique du fluide.

Ce design particulier permet donc la génération de vortex au niveau des parois latérales en début de portion d'expansion. Ces vortex sont plus ou moins importants. Ainsi à faible nombre de Reynolds les vortex se limitent à un coin de la chambre d'expansion tandis qu'à grand nombre de Reynolds ces derniers vont s'étaler sur toute la longueur de la portion. L'apparition d'un régime turbulent entraîne donc un écoulement secondaire. Une suspension de particules initialement répartie de façon aléatoire va ainsi se réorganiser. Puis l'écoulement secondaire va permettre de les isoler petit à petit grâce à ces vortex de chaque côté des parois. Enfin les particules vont focaliser sur les parois latérales d'une portion restriction, leur permettant de suivre les lignes de courant qui vont se rapprocher des parois de la portion d'expansion et donc d'être récupérées en 2 populations distinctes.

Séparation induite par obstacles

Une technique de séparation microfluidique se basant sur la taille des objets est la DLD (Deterministic Lateral Displacement). Un réseau de micro-poteaux est introduit de façon asymétrique dans un canal microfluidique (les poteaux sont légèrement décalés latéralement par rapport à ceux en amont du canal). Une particule, suivant sa taille, va se déplacer entre les poteaux et être emportée par des lignes de courant voisines. Cela entraîne petit à petit un mouvement latéral de la particule permettant de l'isoler d'une autre particule de taille différente (Fig. 1.11).



FIGURE 1.11 – Schéma d'un processus de séparation induite par obstacles. A) Le réseau est composé de micro-poteaux espacés d'une distance λ dans le sens de l'écoulement et d'une distance *G* dans le sens perpendiculaire à l'écoulement. Le réseau est asymétrique de décalage δ et permet aux particules de tailles différentes de suivre différentes lignes de courant du fluide. B) Cela se traduit par un déplacement latéral des particules plus ou moins important selon leur taille et donc de les isoler. Issu de (MORTON et al., 2008).

L'organisation des poteaux détermine le nombre de lignes de courant pouvant emporter les particules et donc le nombre de tailles différentes de ces dernières. Cela définit aussi la distance de séparation latérale des particules en bout de canal (caractérisée par l'angle α).

Diélectrophorèse

La diélectrophorèse (ou DEP) est la force s'exercant sur une particule diélectrique dans un champ électrique non uniforme. Etudiée pour la première fois par Pohl et al., cette force est dépendante de la taille et de la forme de la particule, de la fréquence du champ électrique et des propriétés électriques de la particule et du milieu (POHL, 1951). La force de diélectrophorèse F_{DEP} agissant sur une sphère homogène de rayon r s'exprime comme :

$$\vec{F_{DEP}} = 2\pi r^3 \varepsilon_m RE(f_{cm}) \vec{\nabla} E_{rms}^2$$
(1.3)

où E_{rms} est la valeur moyenne quadratique du champ électrique, $RE(f_{cm})$ la partie réelle du facteur de Clausius-Mossoti f_{cm} et ε la constante diélectrique.

Le facteur de Clausius-Mossotti s'écrit comme :

$$f_{cm} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \tag{1.4}$$

avec ε_p^* et ε_m^* les permittivités complexes de la particule et du milieu respectivement. La constante diélectrique complexe ε s'exprime comme :

$$\varepsilon^* = \varepsilon - \frac{j\sigma_e}{\omega} \tag{1.5}$$

avec ε la constante diélectrique, $j = \sqrt{-1}$, σ_e la conductivité et ω la fréquence angulaire du champ électrique.

Pour créer un moment dipolaire dans la particule, on varie la fréquence du champ appliqué. Ainsi la particule va pouvoir être déplacée suivant sa perméabilité f_{cm} par rapport à celle du fluide. Si $f_{cm} > 0$ alors la particule migrera vers une zone où le champ électrique est plus fort. A l'inverse si $f_{cm} < 0$ alors la particule se dirigera vers une zone où le champ électrique est plus faible. Ces cas sont appelés diélectrophorèse positive (pDEP) et diélectrophorèse négative (nDEP) respectivement (Fig. 1.12).



FIGURE 1.12 – Principe de diélectrophorèse. La pDEP déplace la particule vers le champ électrique le plus fort tandis que la nDEP la déplace vers le champ électrique le plus faible. Issu de (LENSHOF et LAURELL, 2010).

La force d'électrophorèse est une force volumique. Elle est donc pertinente dans le développement de systèmes de séparation se basant sur la taille des objets. Kim et al. ont utilisé un canal microfluidique 2 entrées - 3 sorties dont l'écoulement principal est soumis à un champ électrique grâce à des électrodes inclinées chacune d'un angle précis (KIM et al., 2008). Une entrée contient 3 types cellulaires dont 2 marqués par des marqueurs diélectrophorétiques ("A" et "B"). La seconde entrée contient un milieu tampon. Les cellules "A" sont déviées de leur trajectoire avec un angle θ_1 lorsqu'elles passent devant le set d'électrodes "A". La force de diélectrophorèse s'exerçant sur les cellules "B" n'est pas suffisamment importante pour contrer les forces hydrodynamiques de l'écoulement. Elles ne sont déviées qu'en passant devant le set d'électrodes "B" avec un angle θ_2 . Les dernier type cellulaire n'est aucunement dévié lors de son parcours le long du canal. Chaque type cellulaire est ensuite collecté dans la sortie correspondante (Fig. 1.13).



FIGURE 1.13 – Exemple d'un montage utilisant la technologie de la diélectrophorèse. A) 3 types cellulaires sont marqués par des marqueurs de DEP "A" et "B", le 3ème type cellulaire n'étant pas marqué. Celles-ci sont injectées dans un canal 2 entrées - 3 sorties, un milieu tampon étant injecté dans la seconde entrée. Un ensemble d'électrodes inclinées est placé à deux endroits différents le long du canal. Celles-ci agissent sur les cellules marquées qui sont ensuite collectées suivant leurs caractéristiques dans les différentes sorties. B) Les cellules "A" sont dirigées vers la paroi opposée aux électrodes lorsqu'elles passent devant le jeu d'électrodes "A" avec un angle θ_1 . Les cellules "B" marquées ne sont pas déviées par l'électrode A mais par la B avec un angle θ_2 . Les cellules non marquées ne sont pas affectées par les électrodes. Issu de (KIM et al., 2008).

Ce design a été utilisé pour séparer les plaquettes du sang total. Ces dernières étant plus petites, elles réagissaient moins à la force diélectrophorèse que des globules rouges ou blancs (POMMER et al., 2008).

1.2.4 Les tweezers optiques et la séparation par optical fractionation

L'optique a permis la manipulation d'objets à l'échelle individuelle. La première manipulation de micro-objets s'est faite grâce à des "optical tweezers" (ASHKIN et al., 1986) (Fig. 1.14).



FIGURE 1.14 – Schéma d'une pince optique. a) Un rayon optique est concentré grâce à une lentille optique concave sur une particule immergée dans de l'eau. Ce rayon crée un piège par gradient de force. b) Image prise par fluorescence d'une particule de 10 μm immergée dans de l'eau et piégée par les rayons optiques. On voit clairement les rayons optiques incidents et diffusés. Issu de (ASHKIN et al., 1986).

Cependant ces tweezers ont de nombreux inconvénients parmi lesquels une mise en place volumineuse et complexe, un équipement coûteux et une détérioration des cellules manipulées par ces pinces due à la chaleur émise par le laser (RASMUSSEN, ODDERSHEDE et SIEGUMFELDT, 2008). D'autres méthodes de manipulation ont vu le jour comme la diélectrophorèse (PARK et al., 2011), les tweezers magnétiques (SNEZHKO et ARANSON, 2011) ou encore les tweezers optoélectroniques (JAMSHIDI et al., 2008). La manipulation d'objets par tweezers acoustiques existe également et aura une partie qui lui sera concacrée dans le chapitre suivant.

Le système de séparation par optical fractionation utilise un canal 2 entrées - 2 sorties, une entrée contenant un mélange de particules, la seconde contenant un milieu tampon. Une chambre microfluidique entre les entrées et sorties est soumise à un réseau optique 3D (Fig. 1.15).

En entrant dans la chambre les particules ciblées vont être déviées de leur trajectoire initiale et subir un déplacement latéral. A l'inverse les particules non ciblées vont poursuivre leur chemin sans déplacement latéral. La capacité d'une particule à se déplacer sur une distance latérale plus ou moins importante dépend de son potentiel optique. En conséquence chaque type de particule est collecté dans une sortie indépendante.



FIGURE 1.15 – Schéma du principe de séparation optique. Un canal microfluidique comportant 2 entrées - 2 sorties ainsi qu'une fractionation chamber (FC) est soumis à un réseau optique 3D (ici une configuration b.c.t. pour body-centered tetragonal). Une entrée "B" contient le mélange de particules tandis que l'entrée "A" injecte du milieu tampon. Les rayons optiques déplacent les particules vers le centre du faisceau laser, leur vitesse de migration étant dépendante de leur taille et de leurs propriétés optiques. Les petites particules sont largement déviées de leur trajectoire initiale et migrent vers la sortie "C" tandis que les grosses, moins soumises à la force optique, maintiennent leur position dans l'écoulement et sont collectées dans la sortie "D". Issu de (MACDONALD, SPALDING et DHOLAKIA, 2003).

1.2.5 Séparation biochimique

La séparation biochimique se base sur 2 méthodes : l'immunoaffinité et l'adhésion cellulaire (SUN et al., 2020). L'immunoaffinité est assez répandue. Des anticorps et aptamères (anticorps chimiques artificiels (FANG et TAN, 2010)) sont utilisés pour capturer la cellule cible lors de son passage dans le canal. NAGRATH et al., 2007 utilisent ce procédé pour isoler des cellules tumorales du reste du sang en utilisant un anticorps spécifique : le EnCAM. Les aptamères ont également prouvé leur efficacité pour identifier et isoler des cellules cancéreuses (Fig. 1.16) (SHEN et al., 2013; WAN et al., 2011). Cependant cette technique requiert des marqueurs cellulaires spécifiques ce qui peut entraîner des coûts importants. Dans le cas de l'adhésion cellulaire, le canal possède un revêtement spécifique qui a pour but d'intéragir avec la cellule cible dont on connaît la capacité d'adhésion. En imposant un débit adéquat dans le canal, une population de cellules va adhérer à la surface du canal tandis qu'une seconde population va continuer son chemin le long de ce dernier. Kwon et al. (KWON et al., 2007) utilisent ce procédé pour séparer des cellules cancéreuses du sein de cellules épithéliales. C'est l'une des rares méthodes à être label-free et à ne pas dépendre de la taille de la cellule (DIDAR et TABRIZIAN, 2010).



FIGURE 1.16 – Principe de séparation cellulaire par immunoaffinité. Issu de (WAN et al., 2011).

1.3 Séparation par acoustophorèse

Enfin, il y a l'acoustophorèse, phénomène acoustique au cœur de notre étude et que nous développerons par la suite. L'acoustophorèse a l'avantage d'être nonintrusive et de ne pas nécessiter de marquage. D'une manière générale, la manipulation acoustique offre un large champ d'applications, depuis la manipulation cellulaire sans contact (JEGER-MADIOT et al., 2021) jusqu'à la détection de cellules tumorales circulantes pour prévenir des cancers en amont (KARTHICK et al., 2018). L'acoustophorèse pourrait permettre une industrialisation plus simple des protocoles de thérapie cellulaire.

1.3.1 Aenitis Technologies

Aenitis Technologies, une start-up française, spin-off du Laboratoire PMMH de l'ESPCI Paris-PSL et du CNRS, a été fondée en 2014 par Jean-Luc Aider, Mauricio Hoyos et Emmanuel Vincent. Aenitis valorise des brevets initialement déposés par Mauricio Hoyos et Jean-Luc Aider en développant des machines de tri cellulaire par acoustophorèse.

La première application visée par Aenitis est la production de Produits Sanguins Labiles (PSL) en partenariat avec l'Etablissement Français du Sang (EFS). L'objectif principal est de produire des concentrés de plaquettes (CP) en séparant les plaquettes des GR, ou bien de séparer les GR du plasma sanguin pour produire un plasma riche en facteur de coagulation. Ceux-ci travaillent également sur l'isolation des îlots de Langherans afin de traiter des patients atteints de diabète de type 1 instable. Les îlots de Langherans sont responsables de la sécrétion de l'insuline , hormone permettant la régulation de la glycémie chez une personne. Un autre axe de développement est celui de l'isolement et la préparation de cellules stromales mésenchymateuses dans le but de répondre aux attentes des thérapies cellulaires et de la médecine régénérative comme cité précédemment. Enfin leurs activités se développent actuellement sur les phénomènes de transduction et transfection accentuées par acoustique.

1.3.2 Objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est de rechercher des solutions pour améliorer les processus de séparation ou reconcentration par Force de Radiation Acoustique et donc permettre d'améliorer les rendements des futures machines développées par Aenitis Technologies.

Cet objectif appliqué se traduit par de nombreux objectifs fondamentaux. En effet, l'application de l'acoustophorèse au sang représente un vrai défi. Le sang est un fluide complexe avec des propriétés spécifiques. La très grande fraction volumique occupée par les GR, également appelée Hématocrite, rend la modélisation quasi impossible et sa manipulation délicate. Nous évoquerons son cas particulier plus loin dans cette étude. L'idée de cette thèse est donc de décomposer ce problème complexe en plusieurs problèmes simples dont nous étudions la cause et l'impact que cela a sur la reconcentration / séparation de fluides à haute fraction volumique.

Ces différentes études se caractérisent par la compréhension et la maîtrise de nos systèmes de manipulation/reconcentration. La fréquence est un paramètre nous permettant une grande liberté de manipulation afin d'observer le comportement de suspensions soumises à l'acoustique et d'en déduire des paramètres de reconcentration optimaux.

La caractérisation des cellules est essentielle pour manipuler/reconcentrer/séparer au mieux des populations. Leur réaction à l'acoustique étant dépendante de leurs propriétés mécaniques, il nous est nécessaire de quantifier ces dernières afin d'anticiper leur comportement dans des systèmes de reconcentration/séparation.

Une étude sur les comportements collectifs est également faite, les suspensions étant généralement à haute fraction volumique, il nous est nécessaire d'observer et d'analyser leur comportement sous acoustique.

Le milieu est une autre composante pouvant affecter un processus de reconcentration. De par sa nature, il réagit à l'acoustique modifiant l'efficacité de reconcentrer des cellules. Nous nous intéressons au cas particulier du plasma sanguin, fluide dont les propriétés ne peuvent être négligées.

Enfin nous étudions le potentiel de reconcentration de deux designs de canaux "originaux" en se basant sur les résultats obtenus dans les parties précédentes et comparons leur efficacité par rapport à un canal dit "classique".

Chapitre 2

Force de Radiation Acoustique : principes et applications.

2.1 Acoustophorèse

L'acoustofluidique est un nouveau domaine de recherche qui prend de plus en plus d'ampleur avec l'essor de la microfluidique et l'amélioration des performances des sources piezo-électriques. Le principe de base est de manipuler des objets de taille micrométrique en suspension dans un fluide à l'aide d'une force acoustique appelée *Force de Radiation Acoustique* (FRA), ce qui ouvre de nouvelles perspectives dans de multiples domaines, notamment dans le domaine de la biologie cellulaire.



FIGURE 2.1 – Intéraction onde-particule. a) Schéma en champ lointain d'une onde acoustique ϕ_{in} (lignes bleues) de longueur d'onde λ se propageant sur une particule (point noir) de rayon $a << \lambda$ et créant une onde résultante ϕ_{sc} (flèches et cercles rouges). b) Schéma d'une particule (disque jaune) de rayon a et de densité ρ_p et compressibilité κ_p immergée dans un fluide (bleu clair) compressible et non visqueux de densité ρ_0 et compressibilité κ_0 . Le fluide est divisé en 2 parties : le champ proche $r << \lambda$ où on a un champ acoustique instantané ϕ_{sc} (t) et le champ lointain avec un délai temporel du champ ϕ_{sc} ($t - \frac{r}{c_0}$). Enfin l'ARF (flèches rouges) s'exerçant sur une surface quelconque en champ lointain (cercle en pointillés) est égale à celle s'exerçant à la surface de la sphère (flèches vertes). Issu de (BRUUS, 2012).

Le principe est relativement simple, même si, on va le voir, sa mise en oeuvre se révèle parfois difficile, et même si les mécanismes à l'origine de la force de radiation acoustique sont également complexes : il consiste à générer une onde stationnaire dans une micro-cavité (ou un micro-canal) afin de créer un nœud de pression acoustique au centre de celle-ci (zone locale où la pression est nulle) ainsi qu'un gradient de pression acoustique. Sous l'effet du gradient de pression acoustique ainsi créé, les objets de taille micrométrique en suspension dans le fluide, qui peuvent être aussi bien des particules, des cellules ou des micro-organismes, sont forcés à migrer vers le nœud de pression. Comme nous allons le voir par la suite, ce phénomène se révèle plus subtil qu'il n'y parait puisqu'il va dépendre fortement des conditions géométriques, acoustiques et variera en fonction de la nature des objets manipulés, de leur concentration, mais aussi et surtout de leurs propriétés physiques intrinsèques.

Il existe deux approches technologiques différentes pour générer un champ de force de radiation acoustique dans un micro-canal : utiliser des ondes de surface ou bien des ondes de volume.

2.2 Standing Surface Acoustic Waves (SSAW)

La première est le Standing Surface Acoustic Waves (SSAW). Le principe consiste à faire se propager une onde acoustique le long d'un matériau élastique jusque dans la cavité où l'on souhaite faire apparaître l'onde stationnaire (SHI et al., 2009a). La première grande différence réside dans la nature de la source ultrasonore. En effet, on utilise des transducteurs interdigités (ou IDT's pour Inter Digital Transducers) fabriqués par photolithographie sur un substrat piézoélectrique (LIN, MAO et HUANG, 2012). Un transducteur interdigité est composé de 2 électrodes métalliques en forme de peignes qui s'entrecroisent. En appliquant une tension entre les 2 électrodes on crée un champ électrique entre chaque paire de doigts. L'association du champ établi et du substrat piézoélectrique entraîne des compressions et dilatations dans le matériau créant des déplacements. Ce sont ces déplacements qui sont à l'origine des ondes de surface (DUQUENNOY et al., 2012). Les fréquences utilisées sont ici nettement plus élevées que dans les systèmes en volume et sont de l'ordre de 30 à 40 *MHz*.

En dimensionnant correctement le réseau d'IDT et les micro-canaux, il est alors possible de créer une onde stationnaire à l'intérieur des micro-canaux, sur le même principe de résonance (ajustement de l'onde ultrasonore à la largeur du micro-canal). Si la condition de résonance est respectée, un nœud de pression apparaît ce qui permet la manipulation de particules et cellules par ARF (Fig. 2.2).

Les cellules manipulées vont se déplacer vers le nœud de pression. Des cellules de tailles différentes migreront à différentes vitesses. Ainsi des grosses cellules atteindront le nœud de pression rapidement tandis que des cellules plus petites prendront plus de temps. En imposant un débit adéquat dans le micro-canal, nous sommes donc en mesure de procéder à un système de tri cellulaire où les cellules ayant atteint le nœud de pression sont séparées de celles restant proches des parois latérales grâce à la mise en place de plusieurs sorties.

Les SSAW sont déjà été utilisées pour de la séparation de particules (SHI et al., 2009b) ou nanoparticules (WU et al., 2017), de lipides dans le sang (PETERSSON et al., 2004).

En plus de leur pertinence pour du tri cellulaire, les SSAW peuvent être utilisées pour du "washing" de cellules (Fig. 2.3).

En inclinant les IDT's d'un certain angle par rapport au canal microfluidique, les SAW ne se propagent plus perpendiculairement à la longueur du canal. Par conséquent il est possible de déplacer des cellules initialement proches d'une paroi latérale du canal vers la paroi opposée en modifiant l'axe du nœud de pression. Li et al. ont utilisé cette technique pour déplacer des globules blancs initialement dans du "lysed blood" vers du PBS et ainsi être collectés sans les débris alentours présents dans le fluide initial (LI et al., 2015).



FIGURE 2.2 – Principe de lévitation acoustique par Standing Surface Acoustic Waves. a) Système de tri par SAW. On impose un débit dans un canal composé de 3 entrées et 3 sorties. Un mélange de petites (en jaune) et grosses (en rouge) particules est injecté dans le canal par les entrées latérales (1). Les SAW générées par les IDT's déplacent les grosses particules au centre du canal tandis que les petites restent proches des parois latérales du fait de leur temps de passage dans la zone acoustique trop faible (2). Les grosses particules sont ensuite collectées en sortie centrale tandis que les petites sont récupérées dans les sorties latérales. b) Les particules subissent une Force de Radiation Acoustique supérieure à de petites particules ce qui explique leur migration plus rapide vers le nœud de pression généré par les SAW. Issu de (SHI et al., 2009b).



FIGURE 2.3 – Schéma d'un montage SSAW de lavage de cellules.
Les globules blancs, initialement présents dans le "Lysed Blood" sont déviés de leur trajectoire grâce à des SAW générées par des IDT's.
L'orientation des IDT's permet le déplacement des globules blancs dans la partie PBS du canal avant d'être récupérés dans la sortie haute, isolés de tout débris. Issu de (LI et al., 2015).



FIGURE 2.4 – Schéma illustrant le montage permettant la séparation de gouttes grâce aux SAW dans une puce PDMS. (a) Lorsque le transducteur interdigité est "off", les gouttes sont collectées dans une sortie privilégiée (ici la sortie du haut). (b) En activant les IDT's (configuration "on") les SAW poussent les gouttes vers la partie sortie basse de la puce. Issu de (FRANKE et al., 2009).

Au-delà de la manipulation de particules et cellules, les SAW peuvent manipuler des objets moins évidents tels que des gouttes. Franke et al. ont appliqué ce processus à une puce PDMS (FRANKE et al., 2009). La puce comprend 2 sorties (Fig. 2.4).

Les IDT's placés à la perpendiculaire de la longueur de la puce envoient des SAW dans cette dernière. Sans SAW les gouttes qui parcourent la puce migrent naturellement vers la sortie "haute" de la puce. Et lorsque les IDT's sont activés, les SAW exercent une force qui déplace les gouttes dans une région de la puce qui leur permet d'être collectées dans la partie "basse". Grâce à cet ingénieux système, les SAW sont ainsi capables de faire de la séparation de gouttes.

2.3 Bulk Acoustic Waves (BAW)

La seconde est appelée Bulk Acoustic Waves (BAW). Un fluide circule entre 2 parois parallèles opposées et une onde acoustique incidente est envoyée dans le fluide. Les 2 parois permettent de restreindre les limites du fluide mais également de réfléchir l'onde acoustique afin de créer une onde stationnaire, résultat d'une superposition des ondes incidente et réfléchie (Fig. 2.5) (LEIBACHER, SCHATZER et DUAL, 2014; GARBIN et al., 2015).

Nous utilisons dans notre étude des systèmes BAW qui s'apparentent à une cavité cylindrique fermée ou un canal rectangulaire. L'onde ultrasonore est émise à l'aide d'un piézoélectrique au fond d'une cavité de hauteur *h*. Cette onde, de longueur d'onde λ_{ac} , traverse la cavité, est réfléchie au sommet par un réflecteur pour finalement former une onde stationnaire si la condition de résonance $h = \frac{\lambda_{ac}}{2}$ est respectée.

2.4 Modélisation de la Force de Radiation Acoustique

Du point de vue académique, la première observation connue d'un effet d'acoustophorèse a été établie par Kundt et Lehmann (KUNDT, 1866; KUNDT et LEHMANN,



FIGURE 2.5 – Schéma d'une suspension sous l'effet de la FRA dans un set-up de BAW (a). La force de radiation acoustique déplace les particules vers le plan de focalisation proche du plan nodal (b). Une fois qu'elles ont atteint le plan de focalisation, les particules s'agrègent au centre de la cavité grâce à la composante radiale de la FRA (c).

1874) qui ont fait des expériences dans un tuyau générant une onde ultrasonore stationnaire. C'est Rayleigh, en 1884, qui a été le premier à proposer une hypothèse pour expliquer ce phénomène (RAYLEIGH, 1894).

Modèle de King

Puis King, en 1934, a proposé une expression analytique pour décrire le rayonnement acoustique d'une onde plane sur des sphères. Dans son modèle, les sphères sont rigides tandis que le fluide est incompressible, et non visqueux (KING, 1934). On obtient ainsi l'expression :

$$\vec{F_{ac_K}} = \frac{\pi}{8} \rho_f v_0^2 k d_p^3 F_K sin(2kz) \vec{e_z}$$
(2.1)

avec F_K le facteur de densité :

$$F_K = \frac{1 + \frac{2}{3}(1 - \frac{\rho_f}{\rho_p})}{2 + \frac{\rho_f}{\rho_p}}$$
(2.2)

 v_0 est l'amplitude de la vitesse acoustique, k est le nombre d'onde et ρ_f la densité du fluide. d_p est le diamètre de la particule ou de la cellule en suspension et z est la position sur l'axe axial qui sera la hauteur de notre cavité ou canal.

On pourra citer également Brillouin (BRILLOUIN, 1925) qui a étudié les forces issues de la pression de radiation sur des écrans absorbants et réfléchissants ainsi que Westervelt (WESTERVELT, 1951) qui s'est intéressé à celles agissant sur un objet de forme quelconque.

2.4.1 Modèle de Yosioka

Le modèle de King a été complété par Yosioka-Kawasima qui ont proposé des particules sphériques et compressibles, un fluide compressible et une onde toujours plane (YOSIOKA et KAWASIMA, 1955).

Cette nouvelle Force de Radiation Acoustique (ARF) s'écrit :

$$\vec{F_{ac}} = \frac{\pi}{4} \langle E_{ac} \rangle \, k d_p^3 F_Y sin(2kz) \vec{e_z} \tag{2.3}$$

Cette équation est composée de

$$k = \frac{2\pi}{\lambda_{ac}} \tag{2.4}$$

qui est toujours le nombre d'onde avec λ_{ac} la longueur d'onde acoustique. λ_{ac} s'écrit $\lambda_{ac} = \frac{c_f}{f_{ac}}$ avec f_{ac} la fréquence de résonance et c_f la vitesse du son dans le fluide.

$$c_f = \frac{1}{\sqrt{\rho_f \beta_f}} \tag{2.5}$$

avec ρ_f la densité du fluide et β_f la compressibilité du fluide. Nous établissons la vitesse du son dans les particules :

$$c_p = \frac{1}{\sqrt{\rho_p \beta_p}} \tag{2.6}$$

avec ρ_p et β_p les densité et compressibilité des particules. La compressibilité du polystyrène est de $\beta_p = 2,20 \cdot 10^{-10} P a^{-1}$ (HAY et BURLING, 1982). Cette équation n'est normalement valide que pour des fluides et non pour des solides, la vitesse du son dans un solide étant dépendante de sa densité, son coefficient de Poisson et de son module de Young. On aura des valeurs de compressibilité légèrement différentes de la réalité. Cependant on garde cette forme du fait que nous étudions la compressibilité des cellules, celles-ci étant composées d'un fluide intracellulaire encerclé par une membrane.

 $\langle E_{ac} \rangle$ est la densité d'énergie acoustique injectée dans notre système. Elle dépend de la fréquence et de la puissance appliquée. Celle-ci était déjà présente dans le modèle de King mais exprimée via ρ_f et ν_0 . En effet $\langle E_{ac} \rangle$ peut s'exprimer comme :

$$\langle E_{ac} \rangle = \frac{\rho_f \nu_0^2}{2} \tag{2.7}$$

Enfin, F_Y est le facteur de contraste acoustique. Il quantifie la réaction de l'objet à l'acoustique en fonction du milieu. Dans ce terme, on retrouve les propriétés des particules et du fluide (densité, compressibilité). Ces propriétés mécaniques, liées à la taille des objets, vont permettre de quantifier les effets des objets sous l'effet de l'acoustique. Elles permettent de construire un système de tri.

 F_Y s'écrit comme suit :

$$F_Y = \frac{1 + \frac{2}{3}(1 - \frac{\rho_f}{\rho_p})}{2 + \frac{\rho_f}{\rho_p}} - \frac{\rho_f c_f^2}{3\rho_p c_p^2} = F_K + F_{Y_\chi}$$
(2.8)

2.4.2 Modèle de Doinikov

Le modèle de Yosioka-Kawasima est lui-même complété par celui basé sur la théorie de Doinikov. Ce dernier a calculé la Force de Radiation Acoustique exercée sur une sphère compressible dans un fluide visqueux (DOINIKOV, 1994) et conducteur de chaleur (DOINIKOV, 1996; DOINIKOV, 1997).

Il en déduit 2 termes additionnels qui viennent s'ajouter au facteur de contraste acoustique :

$$F_D = F_Y + 6\left(\frac{\lambda_{ac} - 1}{2\lambda_{ac} + 1}\right)^2 \frac{\delta_v}{d_p} + 6\left(\frac{\lambda_{ac} - 1}{2\lambda_{ac} + 1}\right)^2 \frac{\delta_{th}}{d_p} = F_Y + F_v + F_{th}$$
(2.9)

Le premier terme additionnel prend en compte les effets visqueux avec $\delta_{\nu} = \sqrt{\frac{\nu}{\pi f_{ac}}}$ l'épaisseur de pénétration visqueuse tandis que le second terme est du aux effets thermiques avec $\delta_{th} = \sqrt{\frac{D_{th}}{\pi f_{ac}}}$ l'épaisseur de pénétration thermique. ν est la viscosité cinématique du fluide et D_{th} le coefficient de diffusion thermique. Si on travaille à 2 *MHz* avec une température de 20 °C soit à température ambiante, on a $\nu = 1.10^{-6}m^2.s^{-1}$ et $D_{th} = 1,5.10^{-7}m^2.s^{-1}$ pour de l'eau. Cela donne $\delta_{\nu} \approx 4.10^{-7}m$ et si on compare avec $d_p = 5 \ \mu m, \frac{\delta_{\nu}}{d_p} = 0,08$. On a donc $\delta_{\nu} << d_p$. En appliquant le même raisonnement, $\delta_{th} \approx 1,5.10^{-7}m$ et en reprenant $d_p = 5 \ \mu m$ on obtient $\frac{\delta_{th}}{d_p} = 0,03 << 1$ donc $\delta_{th} << d_p$. Les épaisseurs de pénétration visqueuse et thermique sont très petites devant les tailles de particules utilisées. Si on travaille à des fréquences de l'ordre du *kHz* ou avec des particules de quelques *nm* de diamètre alors les effets thermovisqueux deviennent significatifs et il nous faudrait les prendre en compte. Or dans notre cas nous avons des particules de la dizaine de μm de diamètre et des fréquences de l'ordre du *MHz*, rendant F_{ν} et F_{th} négligeables et par conséquent également les effets thermovisqueux.

2.4.3 Modèle de Gor'kov

Le modèle suivant est celui de Gor'kov (GOR'KOV, 1962). L'avantage de cette théorie est qu'elle peut être utilisée pour calculer la Force de Radiation Acoustique provenant d'un champ acoustique généré de façon aléatoire en utilisant le potentiel de force $\langle \vec{F_{ac_G}} \rangle = -\vec{\nabla} \langle U \rangle$ avec l'expression de l'énergie potentielle :

$$\langle U \rangle = \frac{\pi}{4} d_p^3 \rho_f \left(\frac{1}{3} \frac{\langle p^2 \rangle}{\rho_f^2 c_f^2} A_1 - \frac{1}{2} \langle v^2 \rangle A_2 \right)$$
(2.10)

avec p^2 et v^2 les fluctuations quadratiques moyennes de la pression et vitesse acoustique respectivement. Enfin on a les termes A_1 et A_2 égaux à :

$$A_{1} = 1 - \frac{c_{f}^{2}\rho_{f}}{c_{p}^{2}\rho_{p}} \quad et \quad A_{2} = \frac{2\Delta\rho}{2\rho_{p} + \rho_{f}}$$
(2.11)

Embleton a utilisé ce modèle pour déterminer la force de radiation acoustique s'exercant sur une sphère dans des champs acoustiques sphérique et cylindrique (EMBLETON, 1954; EMBLETON, 1956). Il est à noter qu'en reprenant l'hypothèse d'un champ acoustique établi par onde plane alors on retombe sur le modèle de King.

2.4.4 Modèle 3D

Enfin un modèle de Force de Radiation Acoustique tridimensionnelle F_R pour un champ acoustique aléatoire a été proposé par Vargas-Jiménez et al. (VARGAS-JIMÉNEZ et al., 2021). Ce modèle a été développé dans une cavité de géométrie carrée et rectangulaire avec ou sans parois rigides. Dans ce système les particules sont bien plus petites que la longueur d'onde acoustique et le fluide est considéré comme non visqueux. La force $\vec{F_R}$ est dérivée du potentiel acoustique établi par Gor'kov (2.10) et s'exprime comme :

$$\vec{F_R} = 2k_x GU_0 sin(2k_x x) \left[\frac{1}{4} + \frac{1}{4} cos(2k_y y) cos(2k_z z) + A_1 cos(2k_y y) + A_2 cos(2k_z z) - B_1 \right] \vec{i} + 2k_y GU_0 sin(2k_y y) \left[\frac{1}{4} + \frac{1}{4} cos(2k_x x) cos(2k_z z) + A_1 cos(2k_x x) + A_3 cos(2k_z z) - B_2 \right] \vec{j} + 2k_z GU_0 sin(2k_z z) \left[\frac{1}{4} + \frac{1}{4} cos(2k_x x) cos(2k_y y) + A_2 cos(2k_x x) + A_3 cos(2k_y y) - B_3 \right] \vec{k}$$

dans le cas de parois rigides dans une chambre carrée.

Si on se place dans une chambre rectangulaire sans parois le long de l'axe *x* alors la Force de Radiation Acoustique devient :

$$\vec{F_R} = -2k_x G U_0 sin(2k_x x) \left[\frac{1}{4} + \frac{1}{4} cos(2k_y y) cos(2k_z z) + A_1 cos(2k_y y) + A_2 cos(2k_z z) - B_1 \right] \vec{i} + 2k_y G U_0 sin(2k_y y) \left[\frac{1}{4} - \frac{1}{4} cos(2k_x x) cos(2k_z z) - A_1 cos(2k_x x) + A_3 cos(2k_z z) - B_2 \right] \vec{j} + 2k_z G U_0 sin(2k_z z) \left[\frac{1}{4} - \frac{1}{4} cos(2k_x x) cos(2k_y y) - A_2 cos(2k_x x) + A_3 cos(2k_y y) - B_3 \right] \vec{k}$$

avec respectivement $A_1 = \frac{1}{4} - \frac{G'k_z^2}{2k^2}$, $A_2 = \frac{1}{4} - \frac{G'k_y^2}{2k^2}$, $A_3 = \frac{1}{4} - \frac{G'k_x^2}{2k^2}$, $B_1 = \frac{G'}{2k^2}k_y^2 + k_z^2$, $B_2 = \frac{G'}{2k^2}k_x^2 + k_z^2$ et $B_3 = \frac{G'}{2k^2}k_x^2 + k_y^2$.

 U_0 est le maximum de potentiel acoustique. *G* et *G*' sont 2 facteurs sans dimensions. Ceux-ci se révèlent être le facteur de contraste acoustique F_Y multiplié par 3. *G* sera présenté plus en détail plus loin dans le manuscrit.

2.4.5 Hypothèses et modèle utilisés dans le manuscrit

Nous faisons le choix d'utiliser le modèle de Yosioka. Le modèle de King ne prend en effet pas en compte la compressibilité des sphères, partie importante de notre étude et le modèle de Doinikov est inutilement complexe, les effets thermovisqueux étant négligeables dans notre système. Notre champ est clairement défini avec une propagation des ondes suivant la direction axiale *z*. Les modèles de Gor'kov et 3D ne sont pas pertinents dans notre étude puisque nous avons un champ acoustique établi par une onde plane.

Le facteur de contraste acoustique est essentiel pour le processus de tri, il sera différent pour chaque type de particules ou cellules. Selon les valeurs de F_Y , les objets se déplaceront plus ou moins vite. Si $F_Y > 0$ les objets atteindront le nœud de pression alors que si $F_Y < 0$ les objets se déplaceront vers l'antinœud. En général, les particules ou cellules possèdent un $F_Y > 0$ alors que les bulles ont un $F_Y < 0$. Le facteur de contraste acoustique est un critère quantifié permettant de séparer les populations de cellules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur compressibilité.

De nombreux facteurs doivent être pris en compte pour optimiser le système de tri. Pour ce faire, nous avons exploré plusieurs domaines qui étaient pertinents. C'est ce que nous allons aborder ici avec la caractérisation de notre installation, l'étude de la vitesse de focalisation des cellules individuelles, la suspension à haute concentration avec des cellules proches les unes des autres et les effets collectifs avec les agrégats.

2.5 Forces Secondaires

2.5.1 Force Transverse

Nous mentionnons ici les autres forces appliquées lorsque le champ acoustique est activé. La première est la composante transversale de l'ARF (WHITWORTH, GRUNDY et COAKLEY, 1991) :

$$\vec{F}_T = d_p^3 \frac{3(\rho_p - \rho_f)}{\rho_f + 2\rho_p} \vec{\nabla} \langle E_{ac} \rangle$$
(2.12)

Cette force existe du fait de la source ultrasonore qui est inhomogène et également aux effets de bords liés aux parois de la cavité. Elle crée un champ acoustique qui déplace les objets dans le plan latéral vers un point local et crée un agrégat. Elle est inférieure de deux ordres de grandeur par rapport à l'ARF primaire (TUZIUTI, KOZUKA et MITOME, 1999; WOODSIDE, BOWEN et PIRET, 1997) et devient non négligeable au nœud de pression où l'ARF primaire devient nulle (Fig. 2.5).

2.5.2 Force de Bjerknes

La seconde force est la force de Bjerknes (BJERKNES, 1906) qui permet aux agrégats de rester compacts. C'est une force d'attraction particule-particule qui s'applique à courte distance : Crum (CRUM, 1975) trouva qu'elle est composée de 2 termes : un terme de sphère rigide ayant 2 composantes (F_r , F_θ) et un terme de compressibilité (Fig. 2.6).



FIGURE 2.6 – Force de Bjerknes s'exercant sur 2 particules. a) Dans le cas général ou un champ est établi de façon aléatoire b) Lorsque les particules sont alignées perpendiculairement à la propagation de l'onde c) Lorsque les particules sont alignées parallèlement à la direction de propagation de l'onde. Issu de (HAAKE, 2004).

Le terme de sphère rigide est (NYBORG, 1978) :

$$F_r = F_{r0}(3\cos^2(\theta_r) - 1)$$
(2.13)

et

$$F_{\theta} = F_{r0} sin\left(2\theta_r\right) \tag{2.14}$$

avec

$$F_{r_0} = \frac{(\pi)d_p^6(\rho_p - \rho_f)^2}{96\rho_f d_{p-p}^4}$$
(2.15)

tandis que le terme de compressibilité s'exprime comme (APFEL, 1990) :

$$F_{comp} = -\frac{\pi^3}{72} \frac{\rho_f f^2 p^2 d_p^6 \left(\beta_p - \beta_f\right)^2}{d_{p-p}^2}$$
(2.16)

où *p* est la pression acoustique.

La force de Bjerknes est particulièrement effective dans les cas de forte concentration locale de cellules ou lors de la formation d'agrégats.

2.5.3 Streaming acoustique

En plus des force de radiation acoustique et force de Bjerknes, un troisième phénomène peut apparaître : le streaming acoustique. Le streaming acoustique est un flux généré dans le fluide par l'atténuation de l'onde acoustique (SPENGLER et JECKEL, 2001). Il a été observé la première fois par Lord Rayleigh (RAYLEIGH, 1883) et peut être catégorisé en 3 types de streaming différents (NOMURA, MURAKAMI et SASAKI, 2000; ZAREMBO, 1971) :

- Le streaming d'Eckart qui est l'atténuation de l'onde acoustique dans le volume du fluide (ECKART, 1948). Ce dernier est présent lorsque $\lambda_{ac} \ll h$ et donc peut être minimisé en réduisant les dimensions de la cavité ou du canal utilisé (SPENGLER et JECKEL, 2000).
- Le streaming de Rayleigh est présent dans le volume du fluide et se définit principalement par $\lambda_{ac} \approx h$. Il entraîne l'apparition de larges vortex au loin des parois (Fig 2.7). Sundin et al. ont montré que le streaming de Rayleigh n'impactait vraiment que les particules d'un diamètre inférieur à 1 μm pour une fréquence de 2 *MHz* (SUNDIN et al., 2007).
- Le streaming de Schlichting se traduit par un mouvement de flux contre rotatif se répartissant sur une épaisseur égale à la couche limite du fluide au niveau des parois (Fig. 2.7). Il a un effet prononcé que lorsque $\lambda_{ac} >> h$ (WIKLUND, GREEN et OHLIN, 2012). Dans notre cas, celui-ci n'a pas d'impact, l'épaisseur du streaming de Schlichting étant inférieure au diamètre d'une particule.



FIGURE 2.7 – Streaming acoustique. Issu de (WIKLUND, GREEN et OHLIN, 2012).

Le streaming de Rayleigh, bien que perturbateur dans notre cas, peut être utilisé pour favoriser l'agrégation de particules ou cellules (HAWKES et CASTRO, 2008) ou encore pour mélanger efficacement 2 fluides dans un microcanal (BENGTSSON et LAURELL, 2004).



FIGURE 2.8 – Schéma des différentes forces acoustiques agissant sur une particule : $\vec{F_{ac}}$ la Force de Radiation acoustique, $\vec{F_T}$ la Force de Radiation Transverse et $\vec{F_{B-rad}}$ la Force d'attraction particule-particule aussi appelée Force de Bjerknes.

Pour résumer, les forces acoustiques qui s'exercent sur une particule immergée dans un fluide sont l'ARF qui l'entraîne vers le nœud de pression, la Force Transverse qui la déplace dans le plan (x,y) et enfin la Force de Bjerknes qui attire les particules entre elles à faible distance (Fig. 2.8).

Enfin, si streaming acoustique il y a, de larges vortex entraînent les particules ou cellules de petites tailles dans la majorité du volume de la cavité.

2.6 Application au processus de reconcentration et de tri cellulaire

Pour effectuer un processus de reconcentration ou séparation cellulaire via acoustophorèse, nous utilisons un canal microfluidique. La hauteur du canal correspond à une demi-longueur d'onde acoustique $h = \frac{\lambda_{ac}}{2}$ ce qui permet d'établir une onde stationnaire dans le canal grâce à un piézoélectrique fixé sur une des parois de celuici. Le canal est composé d'une entrée et de 3 sorties. L'échantillon est injecté en entrée puis sous l'influence de l'acoustique et en fonction du débit, les particules vont migrer vers le nœud de pression. Ainsi pour effectuer une reconcentration, les particules sont récupérées dans la sortie correspondant à la position du nœud de pression tandis que le fluide dépeuplé de particules est récupéré dans les 2 autres sorties (Fig. 2.9). Pour un système de séparation, les cellules qui réagissent le mieux à l'acoustique migrent vers le nœud de pression tandis que les cellules moins réactives à l'acoustique n'ont pas le temps de l'atteindre et sont collectées en majeure partie dans les 2 autres sorties (Fig. 2.10).

On précisera que pour effectuer une séparation propre et efficace de cellules, il faudrait injecter également dans le canal un milieu de collecte. Ainsi cela évite qu'une faible fraction de cellules non désirées se retrouve dans la sortie de collecte principale. Lenshoff et al. utilisent ce système de séparation cellulaire par l'intermédiaire de SAW (LENSHOF, MAGNUSSON et LAURELL, 2012). Cela implique d'avoir au minimum 2 entrées dans le canal : une entrée pour la suspension à trier et une entrée pour le milieu de collecte (Fig. 2.11).

Cependant 2 milieux sous acoustique qui n'ont pas les mêmes propriétés mécaniques entraîne des mélanges, phénomènes non souhaitables pour une séparation efficace. Le fluide le plus dense va migrer vers le nœud de pression tandis que le fluide moins dense va être déplacé vers l'antinœud. Il faut donc faire correspondre



FIGURE 2.9 – Schéma d'un processus de reconcentration des cellules. Les cellules sous ARF se déplacent vers le centre du canal tandis que le fluide s'accumule dans les 3 sorties.



FIGURE 2.10 – Schéma d'un procédé de séparation cellulaire. Un mélange de 2 types de cellules est injecté dans l'entrée. Les cellules blanches, qui sont plus grosses, se déplacent vers le centre du canal tandis que les cellules rouges, plus petites, sont collectés dans les 3 sorties.

les impédances des 2 fluides afin d'éviter cette situation. Le dextrose est souvent utilisé pour augmenter la densité d'un fluide cependant cela a aussi pour effet d'augmenter la viscosité de ce dernier. On lui préférera donc l'OptiPrep[™] Density Gradient Medium qui permet une augmentation de la densité du milieu souhaité sans pour autant changer sa viscosité.

Dans le cadre de notre étude nous ne serons pas amenés à faire de séparation, uniquement de la manipulation et de la reconcentration. Nous n'utiliserons donc que des canaux 1 entrée - 3 sorties et il n'y aura pas d'altération du milieu via l'ajout de dextrose ou d'OptiPrepTM.

2.7 Les autres champs d'application de l'acoustofluidique

En introduction, nous avons présenté l'acoustofluidique comme étant un phénomène permettant la manipulation d'objets de taille micrométrique dans un fluide à l'aide d'ultrasons. L'acoustofluidique permet également la manipulation d'objets non sphériques et de dimensions nanométriques. Dumy et al. ont étudié le comportement de nanocylindres d'or et de platine en microgravité (DUMY et al., 2020). Ces nanocylindres ont une hauteur de l'ordre du μm et un diamètre de la centaine



FIGURE 2.11 – Schéma d'un processus de séparation de cellules avec milieu de collecte. Le mélange de cellules est injecté sur les côtés tandis que le milieu de collecte est injecté au centre du canal. Sous l'effet de l'acoustique, les cellules vont migrer plus ou moins rapidement pour être récupérées dans une des sorties choisies. Issu de (LENSHOF, MAGNUSSON et LAURELL, 2012).

de *nm*. Ceux-ci ont la particularité de se propulser sous acoustique lorsque ceux-ci sont composés de 2 matériaux de densités différentes (AHMED et al., 2016). Mais au-delà de la simple manipulation de particules, nanocylindres ou cellules, d'autres domaines exploitent avec pertinence les propriétés uniques de l'acoustofluidique.

2.7.1 Tissue Engineering

Dans notre introduction nous avons également évoqué le domaine des thérapies cellulaires qui fabriquent des tissus biologiques à partir de cellules ciblées dans le but remplacer via la médecine régénératrice des tissus qui auraient été endommagés ou nécrosés. La fabrication de ces tissus ou organes passe par la culture cellulaire 3D.

Culture cellulaire 3D

L'utilisation de l'acoustique est un moyen pertinent de manipuler des objets biologiques de par sa manipulation sans contact et non intrusive. Différentes géométries telles que des couches (TAIT et al., 2019), multi-couches (BOUYER et al., 2016) et sphéroïdes (KUZNETSOVA et al., 2009) peuvent être obtenus grâce à l'acoustophorèse. Jeger et al. ont ainsi mis en culture sous acoustique des cellules stromales mésenchymateuses dans des puces PDMS de plusieurs *mm* de hauteur (JEGER-MADIOT et al., 2021). Les dimensions de cette puce permettent l'établissement de plusieurs nœuds de pression et donc de plusieurs zones d'agrégation des cellules. Ces dernières vont créer des feuillets dès leurs premiers instants sous acoustique puis s'auto-organiser au cours du temps jusqu'à prendre la forme d'un sphéroïde après 15 *h* d'exposition à l'acoustique (Fig. 2.12).



FIGURE 2.12 – Culture cellulaire 3D de cellules souches mésenchymateuses sur différents plans de focalisation. a) Schéma du montage expérimental. Un transducteur piloté par ordinateur génère une onde acoustique dans une puce PDMS de plusieurs mm de hauteur. La suspension de cellules est injectée via un pousse-seringue. b) Autostructuration des cellules soumises à l'acoustique dans la puce PDMS sur 24 *h*. Au début les cellules s'organisent en feuillets qui peu à peu s'épaississent tout en réduisant leur diamètre jusqu'à prendre la forme de sphéroïdes. Issu de (JEGER-MADIOT et al., 2021).

Structuration du collagène par acoustique

De leur côté Garvin et al. utilisent les ondes acoustiques pour structurer le collagène, principal composant fibreux de la matrice extracellulaire, dans de l'hydrogel (GARVIN et al., 2013a). Les fibres de collagène soumises à l'acoustique ont révélé être plus fines et plus courtes que celles non soumise à l'acoustique. Ces observations vont dans le même sens que celles faites par Braaten et al. : l'exposition de gels de fibrine à des ultrasons réduit le diamètre des fibres de fibrine (BRAATEN, GOSS et FRANCIS, 1997). Garvin et al. ont également contrôlé la répartition spatiale de cellules endothéliales dans de l'hydrogel collagène et soumises à l'acoustique (GARVIN et al., 2013b). La fréquence définit la répartition des agrégats de cellules tandis que l'intensité permet de gérer la densité de cellules présentes dans ces agrégats (Fig. 2.13).



FIGURE 2.13 – Répartition spatiale de cellules endothéliales dans de l'hydrogel collagéné soumis à des ondes acoustiques pendant 15 *min*. Les échantillons ont été exposés à des amplitudes de pression différentes à des fréquences de (A) 1 *MHz* (B) 2 *MHz*. Issu de (GARVIN et al., 2013b).

2.7.2 Mélanges

Le mélange de quantités infimes de fluides est délicat. Les systèmes microfluidiques imposent un régime laminaire empêchant toute turbulence de se développer et ainsi de mélanger 2 fluides miscibles.

Streaming acoustique dans des bulles



FIGURE 2.14 – Schéma d'une goutte d'eau reposant sur une surface piézoélectrique. Des SAW sont générées et exercent une pression de radiation sur la goutte à un angle de Rayleigh Θ_R , développant un streaming acoustique à l'intérieur de la goutte permettant un brassage du fluide. Issu de (SRITHARAN et al., 2006).

Malgré tout le mélange de volumes de l'ordre du microlitre sont particulièrement intéressant notamment dans le domaine des biopuces. Ces dernières permettent de déterminer quels gènes sont exprimés dans une cellule donnée à un moment donné et sous quelles conditions (GERSHON, 2002). L'utilisation de mélangeurs permet ainsi l'accélération du processus d'hybridation de microréseaux d'ADN (LIU et al., 2003). Sritharan et al. ont montré que des SAW pouvaient être utilisées pour mélanger le contenu de gouttelettes présentes à la surface d'un substrat piézoélectrique (SRITHARAN et al., 2006). En entrant en contact avec la gouttelette, les SAW créent un streaming acoustique à l'intérieur du fluide (Fig. 2.14).

Pour de faibles amplitudes acoustiques, le streaming acoustique créé permet le mélange à des échelles micrométriques avec des vitesses allant jusqu'à 1 $cm.s^{-1}$. Pour des amplitudes plus importantes les SAW peuvent mouvoir la goutte et les couches de fluides en contact avec le substrat permettant du transport. Ce transport a également été observé par Shilton et al. qui ont pu déplacer une bille d'acier de 2 mm de diamètre placée dans une goutte de 5 μL de volume et reposant sur une surface piézoélectrique soumise à des SAW (SHILTON et al., 2008). Le streaming acoustique généré dans la goutte fait léviter la bille d'acier qui est transportée dans le direction de propagation des SAW (Fig. 2.15).



FIGURE 2.15 – Bille d'acier de 2 mm de diamètre dans une goutte d'eau de 5 μm de diamètre. Les SAW génèrent une recirculation du fluide suffisamment importante pour créer une force de lift. La bille entre en lévitation au-dessus de la surface piézoélectrique et est transportée dans la direction de propagation des SAW. Issu de (SHILTON et al., 2008).

Génération de streaming acoustique par des arêtes

Un autre moyen de mélanger des fluides via acoustique est l'utilisation de géométries spécifiques telles que des arêtes dans les systèmes microfluidiques (DOINIKOV et al., 2020). Lorsque soumise à une excitation acoustique, une arête va générer un streaming acoustique autour de sa structure (Fig. 2.16) permettant le mélange du fluide ou même un effet de pompage (HUANG et al., 2014).



FIGURE 2.16 – a) Schéma d'un écoulement acoustique oscillant autour d'une arête. La vibration du fluide est distribuée de façon uniforme sauf dans la zone locale autour de l'arête ce qui génère le streaming acoustique. b) Lignes de courant de particules excitées par le champ acoustique et soumises au streaming généré par l'intéraction des ondes acoustiques et de l'arête. Issu de (ZHANG et al., 2019).

Zhang et al. ont étudié le potentiel de mélange de cette configuration en faisant varier l'amplitude acoustique, le débit ainsi que l'angle d'arête utilisé (ZHANG et al.,

2019, ZHANG et al., 2020, ZHANG, HORESH et FRIEND, 2021). Ils montrent clairement qu'une haute amplitude acoustique couplée à un angle d'arête aigu permet un mélange optimal du fluide.

2.7.3 Tweezers acoustiques

Précédemment nous avons évoqué l'utilisation de tweezers (ou pinces) optiques, technologie idéale pour la manipulation individuelle de particules (manipulation d'une particule unique indépendemment de ses voisines). Leur utilisation est cependant limitée dans le domaine biologique du fait que les lasers endommagent l'intégrité des cellules et bactéries (RASMUSSEN, ODDERSHEDE et SIEGUMFELDT, 2008). De la même facon, les tweezers magnétiques obligent le marquage de billes sur les cellules ciblées afin de les rendre sensibles au champ magnétique rendant la méthode très intrusive (BAUDOIN et al., 2020). Une alternative prometteuse est l'utilisation de tweezers acoustiques permettant une manipulation non intrusive des cellules sans pour autant les endommager. Cependant, dans un premier temps, le potentiel d'utilisation des tweezers acoustique était limité de par leur impossiblité à manipuler des objets de façon individuelle (TRAN, MARMOTTANT et THIBAULT, 2012, DING et al., 2012) ainsi que par la plage de fréquences utilisée (BARESCH, THOMAS et MARCHIANO, 2016).

Les SSAW peuvent être utilisées en tant que tweezers acoustiques en positionnant de façon spécifique les IDT's pour la génération de SAW (SHI et al., 2009a).



FIGURE 2.17 – Motifs obtenus suivant la disposition de IDT's. a)
2 IDT's parallèles le long d'un canal permettent l'établissement de nœuds de pression en longueur, piégeant les particules le long de ceux-ci. b) En plaçant les IDT's de façon perpendiculaire l'un l'autre il est possible de piéger localement en 2D des particules. En modifiant l'angle des IDT's on modifie la spatialisation du piège acoustique et donc les motifs qui en résultent. Issu de (SHI et al., 2009a).

Nous avons vu précédemment qu'en plaçant 2 IDT's le long d'un canal, les SAW permettent l'établissement de nœuds de pression adéquats pour la manipulation et le tri de particules ou celules. En changeant la disposition des IDT's il est possible de piéger localement des particules (Fig. 2.17). 2 IDT's placés perpendiculairement l'un

l'autre permettent la création de motifs 2D dont chaque motif est un piège acoustique composé de plusieurs particules. En inclinant de façon plus ou moins importante ces IDT's il est possible de modifier la répartition de ces motifs.

Une autre façon de créer un piège acoustique local est l'utilisation d'un transducteur immergé dans une cuve d'eau. Une lentille acoustique concave concentre le rayon sur des particules reposant sur un film acoustique (Fig. 2.18).



FIGURE 2.18 – Schéma d'une pince acoustique. Un transducteur ultrasonique est immergé dans une cuve. Le rayon est concentré grâce à une lentille acoustique concave sur des particules reposant sur un film acoustique transparent de polyéthylène. Issu de (BARESCH, THOMAS et MARCHIANO, 2016).

vortex acoustique

Afin de manipuler de façon sélective des particules ou cellules, une alternative utilisant des vortex acoustiques a été suggérée (HEFNER et MARSTON, 1999). Des ondes progressives hélicoïdales se concentrent autour d'un axe central, lieu où la pression est nulle. En contrepartie, un anneau à haute amplitude de pression entourant le faisceau pousse les particules vers le centre du faisceau (BAUDOIN et THOMAS, 2020). De par cette méthode, il est possible de piéger des objets possédant un facteur de contraste acoustique positif en 3D (Fig. 2.19).



FIGURE 2.19 – a) Schéma d'un montage expérimental utilisant un vortex acoustique. Le vortex acoustique est généré par un tweezer en spirale qui le dirige vers une chambre microfluidique. Les cellules présentes dans la chambre sont ensuite manipulées de façon individuelle en déplaçant la platine motorisée sur laquelle repose la chambre microfluidique. b) Il est possible d'utiliser des fréquences différentes en modifiant les dimensions du tweezer. Cela implique une miniaturisation et l'utilisation d'un nouveau tweezer pour chaque nouvelle fréquence désirée. Issu de (BAUDOIN et al., 2020).

L'utilisation d'un vortex acoustique permet ainsi la manipulation sélective de particules et cellules (Fig. 2.20).



FIGURE 2.20 – Succession d'images montrant le déplacement d'une cellule de cancer du sein manipulée à l'aide d'un tweezer vortex acoustique. La ligne verte continue illustre le chemin effectué par la cellule tandis que la ligne en bleu pointillés montre son parcours à venir. Issu de (BAUDOIN et al., 2020).

Les particules et cellules sont déplacées dans la chambre microfluidique et suivent une trajectoire définie par le vortex acoustique, trajectoire qui peut être modifiée à tout moment. On précisera que la taille du tweezer définit la fréquence d'utilisation du vortex acoustique et par conséquent la Force de Radiation Acoustique s'exercant sur la cellule manipulée. Il est donc nécessaire d'utiliser des technologies de miniaturisation afin de miniaturiser les tweezers et avoir différentes tailles de ces derniers afin de manipuler des objets biologiques ou non sur plusieurs échelles de taille.
2.7.4 Manipulation de gouttes

Un autre domaine qui a bénéficié de la miniaturisation des systèmes microfluidiques est la formation et l'exploitation de gouttes. On peut générer des volumes définis de gouttes à partir de fluides non-miscibles (TEH et al., 2008). Ces gouttes peuvent être ensuite utilisées comme des bioréacteurs liquides pour encapsuler des cellules par exemple (WEIBEL et WHITESIDES, 2006). L'utilisation de pièges optiques permet l'encapsulation à des volumes variant ente le picolitre et le femtolitre (HE et al., 2005). Dittrich et al. ont résumé les différentes méthodes et applications possibles dans le domaine des gouttes (DITTRICH, TACHIKAWA et MANZ, 2006) qui passent aussi bien par l'électromouillage pour le transport de peptides ou protéines (WHEELER et al., 2004) que par la cristallisation de protéines dans des gouttes de volumes de l'ordre du nanolitre, idéale pour évaluer la qualité des cristaux par diffraction des rayons X (ZHENG et al., 2004).



Division de gouttes par Surface Acoustic Waves et Encapsulation

FIGURE 2.21 – a) Schéma d'un microcanal PDMS traversé par des gouttes d'eau immergées dans de l'huile. Un transducteur interdigité permet la génération de SAW dirigées vers le microcanal. La goutte d'eau est divisée en 2 parties grâce à ces SAW. b) Les gouttes d'eau dans l'huile sont générées à l'intersection en "T" du microcanal puis transportées dans la zone soumise à l'acoustique. Issu de (JUNG et al., 2016).

L'acoustofluidique est également un moyen pertinent pour générer et manipuler ces gouttes. En injectant dans un canal microfluidique soumis à l'acoustique des gouttes d'eau immergées dans de l'huile, Jung et al. sont capables de diviser ces gouttes en 2 plus petites grâce à l'utilisation de SAW (Fig. 2.21). Les SAW déforment progressivement l'interface eau-huile jusqu'à "couper" la goutte en 2 (JUNG et al., 2016). On peut faire varier le ratio entre les 2 gouttes obtenues en modifiant le débit ainsi que l'amplitude acoustique du système.



Ce procédé se retrouve également chez Collins et al. (COLLINS et al., 2013). De plus, 2 méthodes d'encapsulation de particules de $10 \mu m$ nous sont présentées (Fig. 2.22).

FIGURE 2.22 – 2 méthodes d'encapsulation de particules de 10 μm . (a-d) On génère des gouttes de façon discrète a) à partir d'une suspension diluée au repos b) soumise à une faible excitation acoustique. Les SAW concentrent les particules à l'interface eau-huile. Un pulse acoustique de haute intensité déforme l'interface eau-huile, la brisant d) et créant ainsi une gouttelette dans la phase huile. (e-f) Une utilisation de haut débit pour la phase huile ainsi qu'une grande amplitude acoustique permettent e) à une suspension semi-concentrée à l'interface eau-huile f) et grâce à l'utilisation de SAW par intermittence de générer une succession de gouttelettes encapsulant chacune 1 à 2 particules. Issu de (COLLINS et al., 2013).

Rebond d'une goutte sur une surface piézoelectrique

Enfin on peut citer le comportement de gouttes tombant sur une surface inclinée soumise à des SAW (H. BIROUN et al., 2020). L'impact de gouttes sur des surface inclinées est principalement étudié pour des applications anti-gel, auto-nettoyant ou encore anti-infection. L'idée est de modifier la surface afin de modifier le temps de contact de la goutte avec la surface ainsi que l'angle de rebond de la goutte. Biroun et al. ont repris ces études en rendant la surface piézoélectrique et permettant ainsi la propagation de SAW.

Hosseini et al. ont montré que l'utilisation de SAW permet de réduire le temps de contact d'une goutte tombant sur une surface plane (HOSSEINI BIROUN et al., 2020). Cette réduction du temps de contact est due à un transfert d'énergie des SAW vers le milieu liquide pendant le contact entre cette dernière et la surface ce qui modifie le champ de recirculation du fluide et entraîne un détachement plus rapide de la goutte. Pour une surface inclinée le sens de propagation des SAW fait également varier ce temps de contact. Ainsi par exemple des SAW "descendant" la surface vont drastiquement réduire le temps de contact entre la goutte et la surface. Le sens de propagation des ondes permet également de modifier le signe de l'angle du rebond de la goutte. Des SAW "descendants" donneront à la goutte un angle de rebond positif (donc dans le sens "descendant") tandis que des SAW "remontant" lui donneront un angle de rebond négatif (dans le sens "remontant") (Fig. 2.23).



FIGURE 2.23 – Schéma de l'impact d'une goutte d'eau sur une surface inclinée soumise ou non à des SAW. L'utilisation de SAW va modifier le temps de contact de la goutte sur la surface et le sens de propagation des SAW va ouvrir ou fermer l'angle de rebond de la goutte. Issu de (H. BIROUN et al., 2020).

2.7.5 Microbulles

De la même manière que les gouttes, un intérêt grandissant se développe autour des microbulles. Celles-ci sont des moyens de transporter des molécules dans des endroits spécifiques.

Il a été prouvé depuis longtemps qu'il était possible de piéger une bulle dans un liquide grâce à des ondes acoustiques. Ainsi des bulles piégées dans une colonne liquide vibrant à des fréquences de l'ordre de la dizaine de *Hz* ont été étudiées (BUCHANAN, JAMESON et OEDJOE, 1962). Plus récemment Baresch et al. ont piégé avec succès des microbulles à l'aide de vortex acoustiques (BARESCH et GARBIN, 2020).

Force de Radiation Acoustique s'exerçant sur une bulle

Eller et al. se sont intéressé à la Force de Radiation Acoustique s'exercant sur une bulle. Pour une bulle de faible dimension devant la longueur d'onde acoustique, ils en déduisent l'expression (ELLER, 1968) :

$$F_A = \frac{2\pi^2 R_n^3 P_A^2}{3P_0 \lambda_z \left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)} sin\left(\frac{4\pi z}{\lambda_z}\right)$$
(2.17)

pour une Force de Radiation Acoustique F_A dans la direction z moyennée temporellement avec λ_z la longueur d'onde acoustique dans la direction z, ω la fréquence acoustique, ω_0 la fréquence de résonance de la bulle, P_0 la pression hydrostatique, P_A la pression acoustique et R_n le rayon de la bulle à l'équilibre.

Cette expression exprime une singularité lorsque $\omega = \omega_0$. Lee et al. ont donc proposé une seconde version de cette expression (LEE et WANG, 1993) :

$$F_{A} = \frac{\pi A^{2} k R^{3}}{\rho_{0} c_{0}^{2}} \left(\frac{\frac{1}{\sigma^{2}} \left[3\lambda - \left(\frac{kR}{\sigma}\right)^{2} \right]}{\sigma^{2} \left(\frac{kR}{\sigma}\right)^{6} + \left[3\lambda - \left(\frac{kR}{\sigma}\right)^{2} \right]^{2}} \right) \sin\left(2kZ\right)$$
(2.18)

avec *k* le nombre d'onde acoustique, *R* le rayon d'équilibre de la bulle, $\sigma = \frac{c_1}{c_0}$ le rapport entre la célérité du son dans le gaz c_1 et la célérité du son dans le liquide c_0 , $\lambda = \frac{\rho_1}{\rho_0}$ le rapport entre la densité du gaz ρ_1 et la densité du liquide ρ_0 , *Z* une position de la bulle différente du noeud de pression et enfin *A* la constante présente dans l'expression de la pression acoustique *p* dont la partie indépendante du temps s'exprime comme : p = Asin(kz).

Cette nouvelle expression a l'avantage de ne pas contenir de singularité.

Sonoporation

Le gros atout des microbulles est également la possibilité de faire de la sonoporation. La sonoporation est le fait de rendre temporairement poreuse la membrane d'une cellule. Il existe 3 méthodes de sonoporation (LENTACKER et al., 2014) :

- l'utilisation d'ultrasons sans microbulles
- l'utilisation d'ultrasons de faible intensité afin de créer des cavitations de microbulles stables
- l'utilisation d'ultrasons de forte intensité afin de créer des cavitations de microbulles inertielles et donc l'éclatement de ces dernières

Lors de l'oscillation d'une bulle, on a une phase d'expansion où on observe un afflux de gaz, et une compression assimilée à un efflux de gaz. Pour des intensités acoustiques faibles les bulles oscillent de façon symétrique, leur expansion et compression est inversement proportionnelle à la pression acoustique locale (QUAIA, 2005). Cela se traduit par un afflux de gaz nul au cours d'un cycle expansion/compression. Pour des intensités acoustiques supérieures les microbulles ont un comportement non linéaire. En effet, on observe un allongement de la phase d'expansion de cellesci, ces dernières étant plus résistantes à la compression qu'à l'expansion (FERRARA, POLLARD et BORDEN, 2007, SBOROS, 2008). On parle ici de cavitation. Dans ces conditions on a un afflux de gaz au cours du cycle expansion/compression puisque la phase d'expansion a été allongée. La bulle va donc croître jusqu'à sa taille de résonance. Il y a 2 types de cavitation. La première est une cavitation dite stable où la bulle subit un cycle expansion/compression non nul qui l'amène à occuper un volume plus important de façon périodique. Le second type est la cavitation inertielle. L'afflux de gaz lors des cycles expansion/compression est tel que cela conduit à l'éclatement de la bulle. Ces 2 méthodes peuvent être donc utilisées pour effectuer de la sonoporation et ainsi ouvrir la membrane des cellules de façon plus ou moins violente (Fig. 2.24).



FIGURE 2.24 – Intéraction de microbulles avec la membrane d'une cellule. A, B et C sont les conséquences d'une cavitation stable tandis que D et E illustrent une cavitation inertielle. A) La microbulle oscille de façon stable, ce qui pousse et tire sur la membrane endommageant l'intégrité de la membrane. B) L'ARF déplace la bulle vers la membrane puis la compresse dessus ce qui a pour conséquence une rupture de cette dernière. La bulle peut même entrer dans la cellule et traverser la bicouche lipidique. C) L'oscillation de la bulle crée du streaming à des échelles micrométriques dans le fluide environnant. La membrane subit donc une contrainte ce qui crée la formation de pores. D) Des ondes de choc sont créées par l'éclatement des bulles, générant d'importantes contraintes sur la membrane et entraînant la rupture de celle-ci. E) L'éclatement d'une bulle proche de la membrane est asymétrique, formant un jet vers la membrane. Ce jet perfore la membrane et crée donc un pore. Issu de (LENTACKER et al.,

2014).

En créant une rupture dans la membrane, les bulles permettent ainsi le dépôt de molécules ou protéines dans la cellule. Ce transport est particulièrement prometteur et permet de cibler de manière efficace et précise la ou les cellules souhaitées.

2.8 Conclusion

L'acoustophorèse permet la manipulation d'objets de taille micrométrique tels que des particules et cellules grâce à des ondes acoustiques. Il existe de multiples configurations utilisant l'acoustophorèse, les 2 principales étant les Surface Acoustic Waves et les Bulk Acoustic Waves. Le gradient de pression formé par les ondes acoustiques crée la Force de Radiation Acoustique qui dirige les particules vers le nœud de pression. Cette force a été modélisée dans un premier temps par King pour des sphères rigides dans un milieu non compressible. Yosioka enrichit ce modèle en prenant en compte la compressibilité des particules et du fluide. Enfin le modèle de Doinikov apporte les effets thermovisqueux. Dans notre étude nous utilisons le modèle de Yosioka. Les termes thermovisqueux sont négligeables et la compressibilité est une donnée essentielle que nous cherchons à quantifier ici. La Force de Radiation Acoustique Transverse prend le dessus sur l'ARF au niveau du nœud de pression permettant aux particules de se regrouper dans le plan (x,y). L'ARF Transverse permet donc la formation d'agrégats en agrégeant les particules entre elles. Enfin la force de Bjerknes, une force d'attraction particules-particule, permet aux particules de rester proches les unes des autres. En plus des forces citées précédemment, le phénomène de streaming acoustique crée de larges vortex dans le volume

de la chambre microfluidique. L'acoustophorèse est un domaine prometteur pour de la reconcentration et du tri cellulaire. L'utilisation d'un canal microfluidique et d'un transducteur générant un profil de pression dans le canal permettent d'orienter des cellules ciblées vers une sortie définie grâce à la Force de Radiation Acoustique agissant sur la cellule couplée au débit imposé dans le canal. Enfin l'acoustofluidique se développe dans d'autres domaines d'application tels que le tissue engineering, les mélanges à échelle micrométrique, la manipulation individuelle de particules grâce aux tweezers acoustiques, l'encapsulation et le transport de gouttes ainsi que la manipulation de microbulles et leur application dans la sonoporation.

Chapitre 3

Dispositif et méthodes expérimentales

3.1 Introduction

Nous présentons dans cette partie les principaux dispositifs expérimentaux que nous allons utiliser au cours de cette thèse pour nos analyses. Comme nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, l'objectif est de trouver des moyens d'améliorer les processus de reconcentration, voire de séparation de particules ou de cellules à l'aide de la FRA. À cette fin, nous allons devoir utiliser deux principaux dispositifs expérimentaux.

En effet, lors d'un processus de reconcentration, nous allons manipuler des suspensions de particules ou cellules en écoulement dans un canal microfluidique. Il s'agit du dispositif expérimental de base utilisé en acoustophorèse. Il implique la conjonction de plusieurs phénomènes complexes que nous devons étudier, si possible, indépendamment les uns des autres afin de mieux les maîtriser dans l'application finale : le transport d'une suspension plus ou moins concentrée de particules ou cellules soumise à une force acoustique afin de les concentrer et les collecter dans une des sorties du canal. Cela suppose de bien caractériser les propriétés des canaux, tant d'un point de vue fluidique qu'acoustique.

En plus de tous les phénomènes complexes associés à la manipulation de suspensions plus ou moins concentrées en écoulement, il nous faut également connaître les propriétés acoustiques des objets manipulés. Si nous connaissons en général les propriétés des particules, ce n'est pas le cas des cellules. Il nous faut donc disposer d'un moyen de mesurer les propriétés physiques des cellules afin de pouvoir optimiser les paramètres acoustiques et fluidiques à utiliser lors d'expériences de reconcentration ou de séparation. Ces expériences seront réalisées dans une cavité acoustique en aluminium fermée, afin de caractériser le mouvement des cellules sous l'effet de la seule FRA dans un fluide au repos.

3.2 Génération de l'onde ultrasonore

Nous utilisons pour nos expériences un transducteur de la marque *Signal Processing*. Il s'agit d'un transducteur packagé développé pour la vélocimétrie Doppler ultrasonore (VDU). Il est conçu pour émettre et recevoir des signaux Doppler et fonctionne donc sur une large gamme de fréquence. Ce fonctionnement avait été caractérisé dans la thèse d'Olivier Dron (DRON, 2011) à l'aide d'un montage dédié (mesure du déplacement d'une membrane par l'onde acoustique à l'aide d'un vibromètre laser) et avec un transducteur similaire (même constructeur, même fréquence). La



FIGURE 3.1 – Mesure de l'énergie acoustique d'un transducteur *Signal Processing* (2 *MHz*) en fonction de la fréquence acoustique. Issu de (DRON, 2011).

mesure de la vitesse acoustique avait permis de tracer l'évolution de l'énergie acoustique émise par le transducteur en fonction de la fréquence. Le résultat est illustré sur la Fig. 3.1. L'énergie mesurée est maximum à la fréquence de fonctionnement du transducteur, comme attendu, et décroît de part et d'autre de cette fréquence. L'énergie acoustique émise reste cependant supérieure ou égale à la moitié du maximum d'émission entre 1,75 et 2,15 *MHz*.

Il y a de nombreux avantages à utiliser ce type de transducteur par rapport à un piézoélectrique nu, collé sur la paroi de la cavité, en dépit d'un prix très nettement supérieur. En effet, le champ acoustique est mieux maîtrisé, avec le maximum d'énergie acoustique émise vers la cavité grâce un "backing" qui empêche les ondes ultrasonores d'être émises vers l'intérieur du transducteur (Fig. 3.2 c)). De plus, par construction, le transducteur fonctionne sur une large bande de fréquence, ce qui facilite grandement l'optimisation du montage acoustofluidique et va se révéler déterminant pour certaines manipulations. Enfin, le transducteur est robuste, réutilisable.



FIGURE 3.2 – Photo du transducteur coudé utilisé lors de nos expériences (a). Dimensions du transducteur. La partie active fait 5 mm de diamètre (b). Le transducteur packagé envoie l'essentiel de l'énergie acoustique émise par le piézoélectrique (rouge) dans une direction, grâce au "backing" (en gris sur la schéma). Le piézo est couvert par une lame 1/4 d'onde (c).

Le transducteur que nous avons utilisé est de forme cylindrique, avec une hauteur de 20 *mm* et un diamètre de extérieur de 8 *mm* pour un diamètre de piézo de 5 *mm* (Fig. 3.2 a) et b)). La connectique est coudée (câble d'alimentation perpendiculaire au casing du transducteur) ce qui facilite l'intégration sur la platine du microscope. L'adaptation d'impédance est déportée. Un élément de "backing" est ajouté au dos du piézoélectrique pour forcer l'émission de l'onde ultrasonore dans une direction. La transmission de l'onde ultrasonore vers la cavité ou le canal est assurée par un film d'huile qui se révèle un très bon conducteur acoustique.

La plupart du temps nous avons utilisé un transducteur 2 *MHz* alimenté par un Arbitrary Wave Form Generator USB (TiePieTM) contrôlé par le logiciel "Multi Channel" installé sur un ordinateur. L'amplitude du signal en sortie du générateur peut atteindre 12 V_{pp} et la fréquence du signal sinusoïdal peut être contrôlée sur une bande de fréquence allant jusqu'à 40 *MHz*.

3.3 Canaux en PMMA

Dans la première partie du manuscrit nous allons utiliser des micro-canaux conçus et fabriqués par Aenitis pour les applications de tri et/ou de reconcentration cellulaire. Ceci servira de base pour la caractérisation d'un certain nombre de phénomènes physiques avant de proposer une nouvelle version de canaux dans la dernière partie.

Les micro-canaux sont fabriqués en poly méthacrylate de méthyle acrylique (PMMA) car c'est un matériau biocompatible de grade médical, ce qui est essentiel pour nos applications, et bon marché. De plus ils sont transparents, avantage dans notre cas pour observer sous microscope le comportement de particules / cellules soumises à l'acoustique. Les canaux sont constitués de feuillets de PMMA assemblés et collés par un technicien de l'entreprise. Les designs de ces canaux ont été brevetés par Aenitis.

Les canaux mesurent 240 mm de long, 23 mm de large et ont une hauteur de 5 mm (dimensions extérieures). Ce design est utilisé pour faire de la reconcentration ou du tri cellulaire grâce à des entrées et des sorties placées le long de la hauteur du canal. Le fluide circule à l'intérieur du canal de 180 mm de long et 10 mm de large. Plusieurs hauteurs sont disponibles, en fonction du débit et des fréquences que l'on souhaite utiliser. On utilise principalement des hauteurs de 187 μ m, 250 μ m, 375 μ m et 750 μ m qui correspondent respectivement à des fréquences de résonance de 4 *MHz*, 3 *MHz*, 2 *MHz* et 1 *MHz*.

Chaque canal est composé de 1 entrée et de 3 sorties comme le montrent les schémas Fig. 2.10 et Fig. 2.9. Afin de fabriquer un tel canal nous avons procédé par collage de couches successives de feuilles de PMMA découpées par laser afin de structurer les entrées / sorties couche par couche. Chaque feuille a une épaisseur égale : $125 \ \mu m$ pour un canal de $375 \ \mu m$.

Comme nous le montrons sur la Fig. 3.3 a), les canaux sont constitués d'une superposition de feuilles de PMMA découpées avec un dessin spécifique correspondant à chaque géométrie d'entrée et de sortie. Les trois couches ont la même épaisseur. Ainsi trois couches de 125 μm superposées permettent d'obtenir un canal d'épaisseur 375 μm . La couche du haut, côté transducteur, ne comporte pas d'entrée et a une sortie latérale qui va collecter les particules situées dans la partie supérieure du canal. La couche du milieu comporte une injection axiale et une sortie axiale et collectera toutes les particules / cellules situées à mi-hauteur du canal. Enfin la couche du bas ne comporte pas d'entrée et collectera les particules / cellules situées dans la partie basse du canal.



Des tubes coudés en acier assurent la jonction entre la tubulure microfluidique et les entrées / sorties du micro-canal (Fig. 3.3 b)).

FIGURE 3.3 – a) Schéma montrant les différentes couches composées de feuilles de PMMA découpées par laser et les principales dimensions intérieures et extérieures du canal. Trois couches sont nécessaires pour définir l'injection centrale et les trois sorties (sortie haute, côté transducteur, sortie basse, côté opposé au transducteur et sortie centrale). Les trois couches sont collées et prises en sandwich entre la paroi haute et la paroi basse du canal (plaques de PMMA de 1 *mm* d'épaisseur). Le transducteur est placé sur la paroi supérieure du canal, la transmission des ultrasons étant facilitée par une couche d'huile. b) Photo d'un canal en PMMA avec une entrée et trois sorties.

Le canal une fois assemblé, il nous faut déterminer la fréquence acoustique optimale suivant les paramètres géométriques du système. Cela a pour but de maximiser l'énergie acoustique dans le canal en respectant les conditions de résonance. Bien que théoriquement il est assez simple de déterminer ces conditions de résonance, dans la pratique cela se révèle bien plus ardu du fait des différents couches constituées de différents matériaux constituant le système et des imperfections de ceux-ci qui entraînent des conditions aux limites imparfaites et peuvent atténuer l'efficacité du



FIGURE 3.4 – Schéma du montage expérimental utilisé pour mesurer la position des plans de focalisation acoustique ainsi que les vitesses de focalisation acoustique par suivi de la tâche de défocalisation optique. Il est plus aisé de placer le transducteur sur la paroi supérieure du canal et donc d'observer par en-dessous à l'aide d'un microscope inversé (Axio Observer 7 de ZeissTM).

système. Nous devons prendre en compte le résonateur complet, depuis le transducteur, la paroi en contact avec le transducteur, le fluide et le réflecteur.

Comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre, afin de caractériser les performances du résonateur acoustique nous devons avoir un accès optique à l'intérieur du canal pour pouvoir suivre le mouvement axial des objets sous l'effet de la FRA. Le fait que les parois extérieures du canal soient en PMMA nous offre un bon accès optique. Il faut alors pouvoir observer à l'intérieur du canal à l'aide d'un microscope.

Dans le cas des canaux il est difficile de placer le transducteur sous le canal. Nous avons donc placé le transducteur sur la paroi supérieure du canal afin de pouvoir observer les particules à l'intérieur du canal à l'aide d'un microscope inversé (Fig. 3.4). Nous avons utiliser un microscope Axio Observer 7 de ZeissTM. Le micro-canal est alors placé sur la platine motorisée du microscope ce qui permet de positionner l'objectif du microscope sous le transducteur dans la zone de focalisation acoustique.

Enfin, le transducteur est connecté à un générateur TiePie[™]lui-même piloté par un ordinateur avec le logiciel "Multi Channel".

3.4 Cavité aluminium

La caractérisation des propriétés acoustiques des cellules demande des conditions de manipulation différentes. En effet, il est nécessaire d'avoir un très bon accès optique et d'assurer le meilleur contraste avec le milieu en utilisant un marqueur fluorescent. Cela implique l'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé de filtres optiques et d'une source optique permettant de générer la longueur d'onde adaptée au fluorophore. Enfin, comme on cherche à suivre le mouvement des particules ou cellules sous le seul effet de la force acoustique, il nous faut travailler dans une cavité fermée, sans flux.



FIGURE 3.5 – Vue éclatée (a) et vue de côté (b) de la cavité utilisée pour suivre la dynamique de focalisation acoustique de particules ou cellules isolées. La cavité cylindrique a un diamètre de 25 *mm* pour une épaisseur de 330 μ m, soit un volume total de 200 μ L. Photo de la cavité en aluminium (c). Les schémas ne sont pas à l'échelle.

Dans cette perspective, un montage dédié à été conçu et fabriqué. Il s'agit d'une cavité cylindrique en aluminium (Fig. 3.5 c)) d'un diamètre de 25 *mm* et d'une épaisseur de 330 μm , fixée à l'aide d'une feuille de mylar entre les deux pièces d'aluminium (Fig. 3.5 a)). Un disque de silicium de 25 *mm* de diamètre et 500 μm d'épaisseur est placé au fond de la cavité tandis qu'un disque de quartz de 30 *mm* de diamètre et 1 *mm* d'épaisseur est utilisé pour sceller la cavité (Fig. 3.5 a, b)) et créer une réflexion de l'onde acoustique conduisant à la création d'une onde stationnaire. La volume de la cavité est de 200 μL .

Le couvercle en quartz, en plus d'être un très bon réflecteur acoustique, permet d'avoir également un très bon accès optique par le dessus de la cavité, donc parfaitement adapté à la microscopie par fluorescence.

Le fond en silicium est parfaitement plan, sans défaut de surface, transmet très bien les ondes acoustiques en plus d'offrir un très bon contraste optique et améliore ainsi la qualité des observations par microscopie par réflexion, en particulier lorsque l'on observe des cellules.

C'est cette cavité que l'on utilisera pour caractériser les propriétés acoustiques des cellules.

3.5 Métrologie optique par microscopie en fluorescence

L'observation à l'intérieur du canal est réalisée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence OlympusTM BX 51 et d'une caméra PCOTM Panda Bi (Back Illuminated)



FIGURE 3.6 – Schéma du montage optique et acoustique adapté à l'observation dans une cavité acoustique fermée. La cavité acoustique couplée à un transducteur est placée sur la platine d'un microscope à fluorescence. Un générateur de signal est branché au transducteur afin de générer une onde acoustique qui va passer à travers le fond en silicium de la cavité. L'observation et l'illumination (CoolLED[™] pe4000) se font à travers le couvercle en quartz de la cavité. Ceci permet d'observer le mouvement axial des particules ou cellules à l'aide d'une caméra très sensible (PCO[™] Panda Bi) pilotée par ordinateur.

montée sur celui-ci (Fig. 3.6. Cette caméra est extrêmement sensible (efficacité quantique de 95%), ce qui permet de détecter de très faibles variations de luminosité, ce qui est crucial, comme nous le verrons par la suite, pour visualiser des tâches de défocalisation.

La caméra est pilotée avec le logiciel Camware 64. Des objectifs Olympus[™] 5 X, 10 X, 20 X et 50 X, sont utilisés pour faire des observations avec différents grossissements. La source de lumière est une CoolLed[™] pE-4000-F-SYS-ZZ qui nous permet d'utiliser 16 longueurs d'onde monochromatiques différentes. Comme précédemment, la cavité est fixée sur la platine du microscope qui permet de déplacer la cavité sous l'objectif du microscope. L'illumination et l'observation passent par l'objectif du microscope.

3.6 Mesure de l'énergie acoustique

3.6.1 Vitesse de focalisation acoustique et énergie acoustique

Une façon de mesurer l'énergie acoustique consiste à mesurer la vitesse de focalisation axiale des particules à chaque instant. En effet, si on considère que les particules se déplacent sous l'effet de la FRA, elles subissent également la force de Stokes F_s . Pour le cas d'une particule sphérique, la force de Stokes s'écrit :

$$F_s = 3\pi\mu d_p v_p \tag{3.1}$$

avec v_p la vitesse de la particule de diamètre d_p dans un fluide de viscosité μ .

Le principe fondamental de la dynamique permet alors d'obtenir l'expression suivante pour la vitesse de focalisation acoustique $u_F(z)$:

$$u_F(z) = \frac{\langle E_{ac} \rangle k d_p^2 F_Y}{12\mu} sin(2k_0 z)$$
(3.2)

Le profil de vitesse axiale dans le canal a l'allure d'une sinusoïde. Il est maximal à $\frac{h}{4}$ et $\frac{3h}{4}$ tandis qu'il est nul au nœud de pression $(\frac{h}{2})$ ainsi qu'aux parois du canal (0 et *h*) (Fig. 3.7). Si on mesure le profil de vitesse axiale d'une particule de taille et de densité connues, il est alors possible d'en déduire l'énergie acoustique.



FIGURE 3.7 – Profil de vitesse axiale d'une particule ou d'une cellule dans un canal microfluidique soumis à l'acoustique

La difficulté réside maintenant dans cette mesure de vitesse axiale selon l'axe d'observation.

3.6.2 Vitesse axiale et défocalisation

BARNKOB et al., 2011 utilisent un montage leur permettant d'observer le déplacement des particules au cours du temps. Cependant, dans notre cas, l'épaisseur du canal est si faible que nous ne pouvons pas l'observer.

La principale difficulté réside dans le fait que l'observation se fait selon la direction axiale également. Il n'est donc pas possible de mesurer la position des particules de façon simple. Une possibilité serait de développer un logiciel de tracking en temps réel qui permettrait de connaître à chaque instant la position de la particule donnée par l'asservissement de la platine motorisée. Nous n'avons pas pu mettre en œuvre une telle approche. Nous avons donc utilisé une technique basée sur les propriétés optiques de particules fluorescentes lorsque ces particules s'éloignent du plan focal. Cette technique avait déjà été mise en œuvre par DRON et AIDER, 2012a pour mesurer l'énergie acoustique.

Lorsqu'une particule est observée au microscope et que sa position est sur le même plan que le plan d'observation du microscope, la particule est nette. Si cette particule se trouve sur un autre plan que le plan d'observation, elle devient floue. Si on utilise une particule fluorescente, alors un anneau apparaît autour d'elle (Fig. 3.8) lorsqu'elle s'éloigne du plan focal. Cette anneau est appelé "tâche d'Airy" (ou anneau d'Airy). Le diamètre de l'anneau dépend directement de la distance au plan focal : plus la particule est éloignée du plan d'observation, plus le diamètre de l'anneau s'agrandit (Fig. 3.9).

Cette observation a donné naissance à une technique dite de défocalisation pour mesurer la position de la particule. Le principe est d'utiliser les propriétés optiques



FIGURE 3.8 – Schémas optiques avec les images résultantes correspondantes. *L* est la lentille, *I* le plan imaginaire, *P* le plan où se situe la particule et *O* le plan d'observation lié au plan imaginaire via la lentille. Dans le cas a) le plan d'observation et la particule se superposent tandis que dans le cas b) ce n'est pas le cas. En conséquence un anneau est observé. Issu de (DRON, 2011).

des particules fluorescentes ou de cellules marquées grâce à un fluorophore (ADRIAN, 1986).

OLSEN et ADRIAN, 2000 ont ainsi proposé une relation entre le diamètre effectif de l'anneau D_e , la position axiale de la particule z et les propriétés optiques du montage :

$$D_e(z) = \sqrt{M^2 d_p^2 + 5,95(M+1)^2 \lambda_{fluo} f_{\sharp}^2 + \frac{M^2 z^2 D_a^2}{(s+z)^2}}$$
(3.3)

avec λ_{fluo} la longueur d'onde optique d'émission des particules fluorescentes et D_a le diamètre d'ouverture de la lentille. f_{\sharp} est le nombre focal de la lentille et s'écrit :



FIGURE 3.9 – Evolution de la tâche d'Airy d'une particule de 5 μm de polystyrène lors de sa focalisation acoustique vers le nœud de pression

$$f_{\sharp} = \frac{F}{D_a} \tag{3.4}$$

avec *F* la longueur focale. On définit également l'ouverture numérique (NA) comme :

$$NA = \frac{1}{2f_{\sharp}} \tag{3.5}$$

Enfin, *s* est la distance entre l'objectif et le plan d'observation et s'écrit comme suit :

$$s = (\frac{1}{M} + 1)F.$$
 (3.6)

Le premier terme de l'équation 3.3 correspond à la taille de l'image dans le plan focal selon l'optique géométrique. Le deuxième terme applique une correction due à la diffraction de l'objectif. Le troisième terme correspond aux objets qui sont hors du plan d'observation.

Pour utiliser l'équation Eq. 3.3, nous devons respecter plusieurs hypothèses :

- Toutes les particules ont le même diamètre.
- L'éclairement du champ de vision est homogène.
- La lumière émise par les particules fluorescentes est isotrope.
- Les trois termes ont une distribution gaussienne dans le plan d'onde.

La distance entre l'objectif et le plan d'observation *s* est grandement supérieure à la distance *z* entre la position de la particule et le plan de focalisation. On peut donc considérer s >> z et en reprenant l'équation 3.3, on en déduit :

$$z = \frac{(\frac{1}{M} + 1)f_{\sharp}}{M} \sqrt{D_e^2 - M^2 d^2 - 5,95(M+1)^2 \lambda_{fluo}^2 f_{\sharp}^2}$$
(3.7)

Cette relation nous permet donc de connaître la position axiale de la particule à partir de la mesure du diamètre de l'anneau d'Airy. Si cette mesure est faite pendant la focalisation acoustique d'une particule, on disposera donc de la trajectoire de la particule z(t) et donc, par dérivation, de sa vitesse. Afin de réaliser ces mesures de façon systématique sur un grand nombre d'images, il faut maintenant disposer d'une méthode efficace pour mesurer automatiquement le diamètre de la tâche d'Airy dans une image.

3.6.3 Code Matlab

Pour mesurer la vitesse de focalisation d'une particule migrant vers le nœud de pression, il nous faut détecter à chaque instant sa position et donc le diamètre de l'anneau. Pour cela, nous confondons notre plan d'observation du microscope avec le plan de focalisation. Ainsi une particule située loin du plan de focalisation apparaîtra avec un anneau de taille importante. Puis, en activant l'acoustique, la particule va migrer vers le plan de focalisation, se traduisant par une diminution du diamètre de l'anneau jusqu'à ce que cet anneau prenne la forme d'un cercle plein de diamètre minimal, correspondant à l'image de la particule nette ayant atteint le nœud de pression.

Il existe un logiciel de tracking créé par Barnkob et al. permettant de suivre des particules non focus sur le plan d'observation du microscope (BARNKOB, KÄHLER et ROSSI, 2015; BARNKOB et ROSSI, 2020; ROSSI et BARNKOB, 2020). Ce logiciel en libre accès appelé General Defocusing Particle Tracking (GDPT) a l'avantage de tracker

des particules en 3 dimensions et est assez intuitif à utiliser. Son utilisation se base sur une suite d'images prises à différentes positions dans la cavité avec une bille d'un diamètre donné reposant au fond de celle-ci. A mesure que l'on s'éloigne de la particule, on a l'anneau d'Airy qui s'agrandit. On a donc une succession d'images correspondant à une succession de positions du plan d'observation par rapport à la particule (Fig. 3.10).



FIGURE 3.10 – Calibration de la position d'une particule de 5 μm de polystyrène en fonction de la taille de l'anneau.

Avec cette calibration effectuée, il est aisé de mesurer le déplacement des particules au cours du temps et de remonter à leur vitesse de focalisation.

Cependant nous avons décidé de ne pas utiliser ce logiciel pour nos analyses. En effet, la position des particules au cours du temps est déduite de la calibration faite avec cette taille de particules uniquement. Ainsi, si on veut étudier la dynamique de focalisation de particules ayant un diamètre différent, il nous faut refaire une nouvelle calibration. En pratique, cela est faisable tant que l'on utilise des particules qui ont des diamètres très proches les unes des autres. Cependant des micro-objets comme des cellules ont des diamètres beaucoup trop variables d'une cellule à l'autre. Ces diamètres peuvent varier parfois de façon assez conséquente. Il n'est donc pas possible pour nous d'effectuer des centaines de calibrations et de les adapter aux cellules étudiées.

C'est pour cette raison que nous avons décidé de ne pas utiliser GDPT mais d'écrire notre propre code Matlab permettant la détection des anneaux en se basant sur l'équation 3.3.

Nous disposons de séquences d'images à chaque instant *t* lors de la remontée d'une particule. Chaque image est composée de millions de pixels ayant des intensités de gris différentes. Ces intensités de gris sont définies par la lumière émise par les objets filmés par la caméra. Un objet peu lumineux aura un niveau de gris faible tandis qu'un objet très lumineux aura un niveau de gris important. Visuellement les pixels avec une faible intensité sont noirs tandis que ceux avec une grande intensité apparaissent blancs. C'est sur ce principe que nous nous basons pour développer le code Matlab permettant de détecter automatiquement les tâches d'Airy d'une particule (apparaissant comme blancs) en contraste avec le fond de l'image (apparaissant



FIGURE 3.11 – Intensité de gris des pixels partant du centre d'une tâche d'Airy jusqu'à la bordure de l'anneau. Les pixels "blancs" de l'anneau ont une intensité de gris bien plus importante que les pixels "noirs" situés au centre et à l'extérieur de l'anneau.

comme noir).

Matlab possède des fonctions déjà définies et implémentables facilement. Nous avons tout d'abord testé une de ces fonctions : "DetectCircles". Cette fonction permet de détecter des cercles de pixels sur une image. Pour des particules qui apparaissent comme des sphères cette fonction est tout à fait fonctionnelle. Cependant si à un endroit du cercle on a des pixels moins lumineux que le reste ou que le cercle n'est pas parfait alors "DetectCircle" est incapable de s'adapter et ne va rien détecter du tout. Cela sera d'autant plus problématique lorsque nous utiliserons des cellules qui peuvent ne pas fluorescer de façon homogène et occasionnellement avoir des formes se rapprochant assez peu à celles de sphères.

Pour palier à ce problème nous avons utilisé une autre fonction : "Regionprops". "Regionprops" détecte des lignes de pixels "blancs" successifs. Lorsque "Regionprops" détecte un pixel "noir", la fonction considère que nous avons atteint une des limites de l'anneau. Le gros avantage d'utiliser "Regionprops" par rapport à "DetectCircles" est donc la détection d'objets de formes moins régulières ainsi que sa faculté à extrapoler le contour d'un cercle même si une partie de ce dernier est moins lumineuse que le reste qui le compose.

Malgré tout, parfois, même "Regionprops" seule ne suffit pas. Afin de faciliter la détection des anneaux nous ajoutons une étape de post-processing sur les images brutes afin d'accentuer le contraste entre l'anneau et le background. Ce postprocessing est effectué avec le logiciel ImageJ.

Pour connaître le véritable diamètre de l'anneau nous utilisons une mire qui nous permet de convertir la taille de nos pixels en une longueur équivalente.

Enfin, une interface au code a été créée (Fig. 3.12) afin de permettre la saisie de tous les paramètres et faciliter son utilisation pour nos différentes applications. On peut ainsi renseigner les différents paramètres nécessaires au calcul de l'équation 3.3 :

 les paramètres optiques (grossissement, diamètre d'ouverture de la lentille, longueur focale, nombre focal)

Light Utility Detection Operator v2.3			
Analysis Results Image Sequence Selection	Algorithm parameters		
Repertory FXPost Confinement/Focalisation axiale7X20\10µm Find File Extension 11f Image Scrolling 170 Beginning 165 End 227	Global Light Pollution Adjust global lighting Gamma -1.5 -1 -0.5 0 0.5 1 1.5 Image sequence parameters 1005 parallel 330 Show scale on screen Calibrate scale 296 336 2803 2 814 Crop image Reset Time Between Pictures (s) 0.0125 Framerate (fps) 80	Microscope Particle Fluid Piezo System Save/Import Save/Import Detection Display circle fo Conjusting Acoustic Energy	Acoustic energy (Pa) 0.000000e+00 Acoustic contrast factor 1.910000e-01 und on screen M Acoustic Contrast Factor Start Detection

FIGURE 3.12 – Interface du module Matlab développé pour la détection des tâches d'Airy.

- le paramètre acoustique (fréquence)
- les propriétés du milieu (densité, compressibilité, viscosité)
- les propriétés des objets étudiés (diamètre, densité, compressibilité, longueur d'onde d'émission)
- les paramètres du système (énergie acoustique)
- les paramètres de la caméra (dimensions de l'image, calibration *pixels* > μm , temps d'exposition, nombre de *f ps*)

Une fois tous les paramètres rentrés et les images traitées par le code Matlab via "Regionprops", on obtient le rayon de l'anneau d'Airy en fonction du temps. Ceci permet le calcul de la position et la vitesse de la particule en fonction du temps et enfin la vitesse de focalisation de la particule en fonction de sa position par rapport au plan de focalisation (Fig. 3.13).

On peut voir sur la Fig. 3.13 un exemple de courbes obtenues pour la focalisation acoustique d'une particule de 10 μm . Lorsque la particule se déplace vers le plan de focalisation on observe bien une diminution progressive de la taille de la tâche d'Airy (Fig. 3.13 a)). On vérifie également que l'on obtient une vitesse de focalisation maximale à mi-chemin de la remontée (Fig. 3.13 d)), le profil de vitesse étant en accord avec le profil théorique (Fig. 3.7).

Ce code Matlab va nous être très utile pour mesurer l'énergie acoustique d'un système mais aussi pour mesurer les propriétés acoustiques de cellules.

3.7 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les différents moyens que nous allons utiliser pour étudier les différents mécanismes jouant un rôle dans le processus de reconcentration en flux.



FIGURE 3.13 – Mesures effectuées lors de la focalisation d'une particule de polystyrène 10 μm vers le plan de focalisation dans une cavité acoustique a) Rayon de la tâche d'Airy en fonction du temps b) Position de la particule par rapport au plan de focalisation au cours du temps c) Vitesse de focalisation de la particule au cours du temps d) Vitesse de focalisation de la particule en fonction de sa position par rapport au plan de focalisation

Pour caractériser les propriétés acoustiques des cellules nous allons utiliser une cavité fermée en aluminium adaptée à l'observation de cellules en microscopie par fluorescence.

Pour les processus de reconcentration nous allons utiliser des canaux à une entrée centrale et trois sorties, conçus et fabriqués pour cela. Une étape essentielle consiste à caractériser les propriétés acoustiques de ces canaux, c'est pourquoi nous allons également mettre en oeuvre un montage de microscopie adaptée, à savoir un microscope inversé permettant l'observation de la focalisation acoustique sous le transducteur.

Enfin, une part importante de ce travail consistera à enregistrer des time-lapse de particules ou cellules en mouvement pour ensuite mesurer les vitesses de focalisation. Cette étape essentielle permet, dans un premier temps, de mesurer l'énergie acoustique du système avant de pouvoir, dans un second temps, quantifier les propriétés acoustiques de cellules. Il était donc important de rendre ces étapes de mesures les plus simples et rapides possibles. C'est pour cette raison que nous avons développé un code Matlab doté d'une IHM (Interface Homme Machine) conviviale qui sera utilisée dans la plupart des expériences présentées dans la suite de ce manuscrit.

Chapitre 4

Contrôle de la lévitation acoustique à l'aide de la fréquence de l'onde ultrasonore. Application aux processus de reconcentration.

4.1 Introduction

Dans notre optique d'exploiter au mieux le processus d'acoustophorèse pour la reconcentration et/ou séparation de cellules, il nous faut dans un premier temps être capable de comprendre les phénomènes qui ont lieu dans notre système. Nous nous intéressons ici à l'influence de la fréquence de l'onde ultrasonore sur la migration des particules vers le plan de focalisation, en particulier sur la hauteur du plan de lévitation et sur la dynamique de focalisation.

Dans les cas classiques rencontrés en acoustofluidique, on cherche à déterminer la fréquence optimale qui permettra d'obtenir l'énergie maximum dans le résonateur acoustique. Cela suppose de respecter la condition théorique de résonance entre la hauteur de la cavité et la demi-longueur d'onde ultrasonore. Hors de la résonance, l'énergie chute très rapidement et l'on perd la possibilité de manipuler efficacement les suspensions. De nombreuses études ont été consacrées à ce problème et proposent différentes approches pour déterminer simplement la fréquence optimale du système. Cela sera possible grâce à des mesures électriques, d'admittance ou encore des mesures du spectre d'impédance (DUAL et al., 2012; HAMMARSTRÖM et al., 2014; VITALI et al., 2019).

Dans cette thèse, nous utilisons une autre approche basée sur les travaux réalisés par Dron et al. (DRON et AIDER, 2013). En effet, il a été montré qu'un résonateur multi-couches peut fonctionner sur une large bande de fréquence, si la source ultrasonore est adaptée, ce qui est le cas des transducteurs que nous utilisons. Sous ces conditions, il est possible de déplacer axialement le plan de lévitation sur toute la hauteur d'un micro-canal en variant la fréquence acoustique sur une large gamme de fréquences centrées autour de la fréquence de résonance du transducteur. C'est ce phénomène que nous allons caractériser à nouveau, en mesurant cette fois la vitesse de focalisation acoustique, en plus de la hauteur du plan de lévitation, en fonction de la fréquence ultrasonore. Nous chercherons alors à exploiter le contrôle de la focalisation acoustique par la fréquence pour reconcentrer des particules ou des cellules en ciblant une sortie du micro-canal.

4.2 Modification de la position axiale du plan de lévitation

Pour établir un processus de reconcentration ou de tri efficace, nous devons savoir comment déplacer les objets à l'intérieur de la cavité et du canal. Nous avons vu précédemment que les objets se déplacent vers le nœud de pression grâce la Force de Radiation Acoustique. Idéalement ce nœud de pression se situe à mi-hauteur du canal si la hauteur de ce dernier correspond à la fréquence de résonance. Cependant il est possible de déplacer ce nœud de pression sur la hauteur du canal ce qui peut permettre ainsi de déplacer les particules ou cellules vers une des parois du canal à une distance plus ou moins proche. Ce nœud de pression peut être déplacé suivant la composition des matériaux utilisés pour fabriquer les parois réflectrices du canal (HILL, SHEN et HAWKES, 2002; GONZALEZ et al., 2009) ainsi que suivant leur épaisseur (HILL, 2003; NOWOTNY, BENES et SCHMID, 1991). D'autres comme Haake (HAAKE, 2004) utilisent 2 transducteurs de chaque côté du canal et peuvent ainsi modifier la position du nœud de pression en faisant varier la phase et l'amplitude des ondes planes progressives. Enfin Glynne et al. (GLYNNE-JONES et al., 2010) utilisent 2 fréquences, l'une correspondant à une demi-longueur d'onde et l'autre à un quart d'onde afin de déplacer les particules entre la mi-hauteur du canal et une de ses parois respectivement. En jouant sur l'amplitude et sur la fréquence d'alternance entre les 2 fréquences respectives, il est possible de déplacer les particules sur une portion égale à une demi-hauteur de canal, la seconde n'étant pas accessible avec ce système.

Dans notre cas nous nous appuyons sur les travaux réalisés par DRON et AIDER, 2013. Il a été montré qu'il est possible de déplacer axialement le plan de lévitation de billes ou cellules le long de la hauteur d'un micro-canal en appliquant simplement un décalage sur une large gamme de fréquences centrées autour de la fréquence de résonance du transducteur.

Tout d'abord, nous devons connaître la hauteur de focalisation des particules en fonction de la fréquence. Dans chaque processus, nous essayons d'amener les particules à mi-hauteur du canal pour les collecter dans la sortie centrale tandis que le fluide est collecté dans les sorties latérales.

4.3 Mesure de la position du plan de lévitation en fonction de la fréquence

Pour mener à bien cette étude nous avons utilisé un canal PMMA à une entrée et trois sorties et le montage optique basé sur un microscope inversé présentés dans le Ch. 3. L'observation se fait donc sous le transducteur placé sur la paroi supérieure du canal posé sur la platine du microscope inversé (Fig. 3.4). La position du plan de lévitation acoustique est repérée en faisant la mise au point à l'aide de l'axe vertical motorisé de la platine. Le contrôleur de la platine nous permet d'avoir une lecture directe de la position du plan avec une précision de l'ordre du μm . Lorsque nous allons varier la fréquence acoustique, la position du plan de lévitation va changer. Une nouvelle mise au point sera nécessaire et la nouvelle position de la platine sera enregistrée qui correspondra à la nouvelle position stable du plan de lévitation axiale du plan de lévitation en fonction de la fréquence acoustique.

Nous avons mesuré la hauteur du canal $h = 400 \ \mu m$. La fréquence de résonance théorique est donc 1,91 *MHz*. Nous utilisons pour ces expériences un transducteur de 2 *MHz* et une tension constante de 7 *V*.

Nous avons réalisé ces mesures avec des particules, et non des cellules, afin d'améliorer la répétabilité des mesures. Nous avons utilisé différents types de particules : des particules de silice (Si) de 5 μm et des particules de polystyrène (Ps) de 10 μm et 20 μm .

Sur la Fig. 4.1 nous avons tracé l'évolution de la position du plan de lévitation en fonction de la fréquence pour les trois types de particules. Pour les trois particules nous retrouvons la même évolution que celle observée par DRON et AIDER, 2013. Autour de la fréquence de résonance, entre 1,91 et 2 *MHz*, les particules migrent vers une position située à 200 μm à mi-hauteur du canal.



FIGURE 4.1 – Hauteur de focalisation de particules de 5 μm de silice (Si) et de particules de polystyrène (Ps) de 10 μm et 20 μm

Pour des fréquences plus basses que la fréquence de résonance, la position du plan de lévitation se déplace progressivement vers la paroi supérieure, du côté du transducteur. Au contraire, en appliquant des fréquences plus élevées, la position axiale du plan de lévitation se déplace vers la paroi basse, opposée au transducteur. D'une manière générale, pour les trois types de particules, la position axiale du plan de lévitation décroît linéairement d'une position autour de 300 μm , près de la paroi supérieure , jusqu'à une position proche de 80 μm , près de la paroi inférieure.

On constate cependant une évolution un peu différente pour les particules de Ps de 10 μm . L'évolution globale est la même, mais la décroissance est moins régulière et surtout s'étend sur une plus large bande de fréquence. Il est en effet possible de rapprocher ces particules des parois supérieure ($z = 370 \ \mu m$ pour 1,45 *MHz*) et inférieure ($z = 30 \ \mu m$ pour 2,85 *MHz*).

Le transducteur que nous utilisons a une large gamme de fréquences exploitables : de 1,5 *MHz* à 2,7 *MHz* environ. Au-delà de ces fréquences, l'énergie acoustique est trop faible pour contrer la gravité et les particules sédimentent au fond du canal.

Les plus grandes variations apparaissent pour les fréquences extrêmes. Les particules de silice sédimentent à 1,6 *MHz* alors que les particules de polystyrène de 20 μ m tombent à 1,55 *MHz* et celles de 10 μ m à 1,45 *MHz*. La même observation est faite pour les hautes fréquences : les particules de silice, les particules de polystyrène de 10 μ m et de 20 μ m sédimentent à 2,6 *MHz*, 2,7 *MHz* et 2,85 *MHz* respectivement. Les particules de silice, de densité plus élevée, sont plus affectées par la gravité et sédimentent à des fréquences plus proches de celle de la résonance que les particules de polystyrène. De même, les particules de 20 μ m, plus grosses sont affectées et sédimentent plus rapidement que celles de 10 μ m.

4.4 Mesures de la vitesse de focalisation

Maintenant que nous connaissons la hauteur de focalisation des particules en fonction de la fréquence, nous voulons également connaître leur dynamique de focalisation. Les particules se déplacent vers le plan de focalisation en fonction de la fréquence et du facteur de contraste acoustique. Nous supposons que la vitesse est maximale à la fréquence de résonance puisque l'énergie acoustique est maximale (Fig. 3.1).

Nous allons ici utiliser la méthode de défocalisation présentée au Ch. 3 pour mesurer les vitesses de focalisation en fonction de la fréquence de l'onde ultrasonore.

Nous travaillons à M = 20 pour toute cette étude donc le deuxième terme de l'équation. 3.3 est plus faible que le premier et le troisième.

L'utilisation du grossissement M = 20 est le résultat d'un compromis qui a du être fait. L'idéal aurait été de prendre un grossissement plus important pour être plus précis sur la détection de l'anneau cependant l'intensité lumineuse captée par la caméra n'est pas suffisante pour détecter cet anneau et traiter les images. De plus, suivant le fournisseur et la qualité des particules utilisées, l'intensité lumineuse émise par ces dernières n'est pas toujours la même. Certains types de particules émettent une forte luminosité tandis que d'autres en émettent très peu.

Enfin, on précisera également que la vitesse radiale évolue également en fonction de la position axiale, ce qui implique un déplacement radial des particules au cours de la focalisation acoustique. Il nous faut donc un champ d'observation suffisamment large pour que la particule ne sorte pas de l'image. L'utilisation du grossissement 20 X nous permet de détecter la particule puis d'observer toute sa remontée même si elle se déplace un peu dans le plan (x,y). Avec un grossissement plus important, comme un 50 X, il devient très difficile de piéger une particule dans le champ d'observation de la caméra. En plus de la composante radiale de la FRA, il est également possible qu'une particule, lors de sa focalisation acoustique, sorte de la zone d'observation en raison du streaming acoustique, rendant les données non exploitables.

Enfin, pour s'assurer que le champ acoustique est le même pour les différentes mesures nous avons effectué toutes nos focalisations acoustiques dans une même région de la cavité bien définie.

Pour toutes ces raisons nous avons décidé d'utiliser le grossissement 20 X qui nous offre le meilleur compromis.

Les valeurs de vitesse maximale obtenues sont dépendantes de l'énergie injectée dans le système et de la fréquence utilisée. Afin de déterminer la fréquence optimale pour une énergie donnée, nous avons effectué ces mesures pour différents diamètres de particules et plusieurs fréquences.

Nous avons fait l'étude avec des particules de polystyrène de 5 μm , 10 μm et 15 μm le tout sur une plage de fréquences allant de 1,8 *MHz* à 2,2 *MHz* avec un incrément de 0,05 *MHz*. Nous obtenons ainsi des courbes d'évolution de la vitesse



FIGURE 4.2 – Vitesse de focalisation de particules de polystyrène de $5 \mu m$, 10 μm et 15 μm en fonction de la fréquence.

de focalisation acoustique en fonction de la fréquence pour les trois diamètres de particules, comme illustré sur la Fig. 4.2.

La première chose que l'on observe est que la vitesse de focalisation dépend fortement de la taille des particules. Comme attendu, plus la taille des particules est importante plus leur vitesse de focalisation augmente. Les 3 courbes possèdent un maximum à 2,05 *MHz*. Cette dépendance est quantifiée en traçant l'évolution du maximum de vitesse de focalisation des particules (maxima de chaque courbe représenté sur la Fig. 4.2) en fonction de leur diamètre au carré (Fig. 4.3). On obtient bien une évolution linéaire de la vitesse de focalisation en d_p^2 comme attendu (équation 3.2) pour la fréquence de résonance des transducteurs soit 2 *MHz*. Pour la fréquence correspondant à la vitesse de focalisation maximale, 2,05 *MHz* dans notre cas, nous ne trouvons pas cette évolution en d_p^2 .

Pour les trois diamètres de particules la vitesse diminue à mesure que l'on s'éloigne de la fréquence de résonance. On observe un seul maximum pour les particules de 10 μm , tandis que deux maxima sont observés pour les particules de 5 μm et 15 μm . Ces maxima se situent autour de la fréquence de résonance (2 *MHz*). Ce "split" de fréquence est la résultante d'une correspondance parfaite entre la fréquence de résonance du transducteur et la fréquence de résonance du canal (HILL, SHEN et HAWKES, 2002). Lorsque cette condition est respectée, on observe un "split" de la fréquence de résonance. C'est clairement le cas ici.

Pour chaque type de particules étudié, un canal différent a été utilisé. Le fait que l'on observe un "split" de la fréquence de résonance seulement pour deux diamètres de particules s'explique par le fait que tous les canaux ne sont pas parfaitement identiques. Ces différences sont dues au processus de micro-fabrication qui entraîne de petites variations d'un canal à l'autre. Malgré tout la vitesse de focalisation maximale se situe à la même fréquence pour les trois courbes ce qui montre que la reproductibilité de fabrication des canaux reste tout à fait satisfaisante. Ce sont également ces différences entre les canaux utilisés qui sont la raison pour laquelle nous ne retrouvons pas un comportement en d_p^2 de la vitesse de focalisation des particules en fonction de leur diamètre au carré pour la fréquence de 2,05 *MHz*.



FIGURE 4.3 – Vitesse de focalisation maximale de particules de polystyrène en fonction de leur diamètre au carré pour les fréquences de a) 2 *MHz* et b) 2,05 *MHz*. Des particules de 5 μ m, 10 μ m et 15 μ m ont été utilisées.

4.4.1 Corrélation avec la puissance réfléchie

Une alternative pour identifier la fréquence optimale pour le canal est de mesurer la puissance réfléchie et la puissance transmise dans le résonateur.

Pour réaliser ces mesures nous utilisons un wattmètre (KPO - DG - 503 - Digital SWR & Watt Meter). Le wattmètre est branché entre le générateur et le transducteur. Trois grandeurs sont mesurées : la puissance incidente (FWD), la puissance réfléchie (REF) et le Standing Wave Ratio (SWR).

La puissance incidente correspond à la puissance envoyée au transducteur tandis que la puissance réfléchie indique la puissance non transmise au transducteur mais réfléchie vers le wattmètre et donc perdue. Le SWR mesure le rapport entre l'énergie transmise au système et l'énergie réfléchie en pourcentage.

Pour trouver notre fréquence de résonance, nous cherchons la fréquence qui correspond à REF = 0 et SWR = 1,0. La puissance incidente ne varie pas quelle que soit la fréquence que nous utilisons.

Nous comparons nos résultats obtenus par la mesure de vitesse de focalisation maximale des billes avec les valeurs obtenues par le wattmètre (Fig. 4.4).

On observe que REF = 0 et que la vitesse de focalisation est maximale pour 1,95 *MHz*. Cependant, pour l'autre vitesse maximale (2,05 *MHz*), nous obtenons un $REF \neq 0$. De même, pour des fréquences où la vitesse de focalisation est faible, on mesure parfois une puissance réfléchie nulle. Ceci est une conséquence de la faible puissance que nous utilisons et des transducteurs qui sont optimisés pour envoyer l'onde dans une direction privilégiée. Le wattmètre n'est pas assez précis pour détecter les petites variations de puissance réfléchie entre deux "fréquences optimales". Les puissances utilisées ici sont de l'ordre de 1,5 *W*. Il nous faudrait au minimum atteindre 3 *W* en puissance incidente pour détecter ces variations de puissance réfléchie.

Le wattmètre est donc un outil pertinent pour des systèmes dans lesquels on injecte des puissances acoustiques importantes. Dans le cas de systèmes possédant de faibles puissances acoustiques, il est préférable d'effectuer une analyse de la dynamique de focalisation et d'utiliser la mesure de puissance réfléchie comme un complément.



FIGURE 4.4 – Comparaison entre la vitesse de focalisation des particules de polystyrène de 5 μm en fonction de la fréquence avec la puissance réfléchie mesurée par le wattmètre. La fréquence optimale mesurée par les deux méthodes est la même : 1,95 *MHz*.

4.5 Influence de la fréquence acoustique sur le processus de reconcentration

4.5.1 **Reconcentration de particules**

Nous avons montré dans les sections précédentes qu'il est possible de changer la position axiale du plan de lévitation (et donc de la zone de focalisation acoustique) tout en changeant la vitesse de migration des particules sous l'effet de la FRA. Lorsqu'on travaille dans un canal avec un écoulement, ces paramètres deviennent critiques puisque les particules vont être exposées à la FRA pendant un temps qui va dépendre du débit appliqué. En fonction du temps de vol et de la vitesse de focalisation acoustique, les particules pourront, ou pas, rejoindre le plan de lévitation (ou d'agrégation). De plus, la position du plan d'agrégation peut être modifiée en changeant la fréquence. On peut donc, si besoin, forcer les particules à migrer vers une des trois sorties du canal.

Pour valider ce principe, nous avons fait des tests de reconcentration dans un canal PMMA de 400 μm de hauteur soumis à un champ acoustique piloté par un transducteur 2 *MHz*. Les particules sont injectées par l'unique entrée centrale et récupérées dans une des trois sorties en aval du canal : les sorties adjacente (ou haute, dans le cas des mesures sur microscope inversé), centrale ou opposée (basse) au transducteur. Pour ces expériences, il est important de s'affranchir de la gravité afin de ne pas fausser les résultats. Pour ce faire, les expériences sont réalisées avec un canal vertical et un flux qui va du bas vers le haut du canal (Fig. 4.5).

Le transducteur est placé à égale distance entre l'entrée et les sorties du canal soit 67,5 *mm* entre la surface effective du transducteur et les extrémités du canal. Les tests ont été effectués sur une bande de fréquences allant de 1,7 *MHz* à 2,5 *MHz* avec un incrément de 0,1 *MHz*. Des particules en polystyrène de 5 μ m de diamètre ont été utilisées. Nous avons appliqué trois débits différents, pilotés par des pompes péristaltiques (Gilson Minipuls 3) : 0,5 *mL.min*⁻¹, 1,0 *mL.min*⁻¹ et 1,5 *mL.min*⁻¹.



FIGURE 4.5 – Schéma du montage utilisé pour la reconcentration de particules ou de cellules. Une pompe péristaltique prélève la suspension présente dans l'échantillon initial pour l'envoyer dans le canal soumis à l'acoustique. Les 3 sorties en aval du canal collectent la suspension dans des échantillons différents qui seront ensuite analysés.

Une tension de 10 *V* a été appliquée au transducteur pour toutes les expériences. Le diamètre effectif du transducteur est de 5 *mm*. Avec un débit de 0,5 *mL.min*⁻¹ le temps de passage des particules devant celui-ci est de 3,125 *s*. Pour les débits de 1,0 *mL.min*⁻¹ et 1,5 *mL.min*⁻¹, le temps de passage est de 1,56 *s* et 1,04 *s* respectivement. Dans le cas d'un débit de 0,5 *mL.min*⁻¹ les particules auront bien plus de temps pour être affectées par la FRA et donc de migrer vers le nœud de pression qu'avec un débit de 1,5 *mL.min*⁻¹.

Un suspension de particules de concentration $0.5 mg.mL^{-1}$ est injectée. Les échantillons sont collectés en sorties de canal. Chaque échantillon est alors analysé à l'aide d'un compteur cellulaire Luna-FL Dual Fluorescence. Une fraction de l'échantillon est placée sur une lame de comptage qui est ensuite analysée par le compteur cellulaire.

Sans acoustique, pour les 3 débits appliqués, le taux de reconcentration est le même dans les 3 sorties soit 33 % (Fig. 4.6).

On notera tout de même un taux de reconcentration un tout petit peu moindre pour la sortie opposée mais cela reste une différence très faible.

Sur les Fig. 4.7 nous montrons a), b), c) les résultats obtenus pour les trois débits. Chaque graphe correspond à un débit et montre l'évolution du pourcentage de particules récupérées dans chaque sortie en fonction de la fréquence appliquée. Le taux de reconcentration est défini comme le pourcentage de particules récupérées dans chaque sortie par rapport au nombre total de particules récupérées. C'est à dire que dans un cas parfait pour lequel toutes les particules sont collectées au centre, nous aurions 100 % au centre et 0 % sur les sorties latérales.

Si l'on considère les trois débits, le taux de reconcentration maximal est environ de 55 % à 2 *MHz* en sortie centrale pour le débit le plus faible : $0.5 mL.min^{-1}$.



FIGURE 4.6 – Taux de reconcentration de particules de polystyrène de 5 μ m dans les 3 sorties du canal sans acoustique à 3 débits différents : 0,5 mL.min⁻¹, 1,0 mL.min⁻¹ et 1,5 mL.min⁻¹

Les trois graphes montrent une évolution similaire, avec une augmentation progressive du pourcentage de particules récupérées au centre, jusqu'à un maximum, suivi d'une décroissance plus ou moins rapide. Cette évolution est corrélée à la diminution progressive de particules collectées dans les sorties latérales, là aussi jusqu'à un minimum correspondant bien au maximum obtenu en sortie centrale.

Pour le plus faible débit (Fig. 4.7 a)) les sorties latérales sont grandement dépeuplées à mesure que l'on s'éloigne de la fréquence de résonance. A 1,7 *MHz* les sorties adjacente et centrale sont privilégiées de façon équivalente tandis que ce sont les sorties opposée et centrale qui le sont aux alentours de 2,5 *MHz*. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment qui montraient clairement qu'à basse fréquence le plan de focalisation se trouve près de la paroi haute (côté adjacent au transducteur) et qu'à haute fréquence le nœud de pression est déplacé près de la paroi opposée au transducteur.

On ne trouve cependant pas de sortie qui récupère la majorité des particules car à ces fréquences-là, comme montré sur la Fig. 4.2, la vitesse de focalisation est très faible. Bien que le nœud de pression soit placé à une position spécifique, les particules vont migrer lentement vers celui-ci en comparaison de leur déplacement le long du canal imposé par le débit.

Lorsqu'on augmente le débit de $0.5 \ mL.min^{-1}$ à $1.0 \ mL.min^{-1}$ la reconcentration maximale en sortie centrale passe de 55 % à 50 % (Fig. 4.7 b)). On peut remarquer que la maximum est obtenu pour une fréquence légèrement supérieure à 2,1 *MHz*. Le taux de reconcentration diminue encore pour le débit de $1.5 \ mL.min^{-1}$ avec un taux de reconcentration de 40 % (Fig. 4.7 c)).

Les résultats obtenus sont globalement cohérents avec les variations de hauteur et vitesse de focalisation en fonction de la fréquence présentée précédemment. Il apparaît clairement possible de reconcentrer les particules en sortie centrale ou dans



FIGURE 4.7 – Taux de reconcentration de particules de polystyrène de 5 μ m en fonction de la fréquence à a) 0,5 $mL.min^{-1}$ b) 1,0 $mL.min^{-1}$ c) 1,5 $mL.min^{-1}$

les sorties latérales en jouant sur la fréquence. Pour des raisons pratiques (disponibilité) ces expériences ont été réalisées avec des particules de 5 μm , pour lesquelles les vitesses de focalisation acoustique sont les plus faibles (Fig. 4.2). On peut raisonnablement penser que les taux de reconcentration auraient été bien plus élevés avec des particules de plus grand diamètre (facteur proche de 10 entre les vitesses des particules de 5 μm et celles de 15 μm).

4.5.2 Décalage en fréquence induit par la suspension

Lorsque les particules migrent vers le nœud de pression, cela augmente localement la concentration. Si la concentration initiale est significative, cela peut amener à des concentrations locales importantes au centre du canal. L'existence d'une couche de particules relativement concentrée peut entraîner un décalage de la fréquence de résonance qui est proportionnel à la fraction volumique de particules X_p dans le milieu (KWIATKOWSKI et MARSTON, 1998).

Ce décalage Δf_{ac} s'exprime en fonction de la fraction volumique selon l'équation suivante :

$$\Delta f_{ac} = -f_{ac} \left(1 - \frac{\beta_p}{\beta_f} \right) \frac{X_p}{2} \frac{\sin\left(\alpha\right)}{\alpha} \cos\left(\frac{2\pi z_c}{h}\right)$$
(4.1)

avec $\alpha = \frac{\pi w}{h}$, *w* est l'épaisseur de la couche de particules regroupées à la hauteur z_c qui correspond à la mi-hauteur du canal de hauteur *h*.

Cela est valide lorsque $\frac{\rho_p - \rho_f}{\rho_f}$ est petit. Dans notre cas les particules de polystyrène ont une densité de $\rho_p = 1060 \ kg.m^{-3}$ et le milieu utilisé, l'eau, une densité de $\rho_f = 1000 \ kg.m^{-3}$. On obtient donc un rapport $\frac{\rho_p - \rho_f}{\rho_f} = 0,06$. Nous sommes donc bien dans le cas favorable. Cette valeur sera d'autant plus faible pour des cellules ayant une densité moindre que le polystyrène (section 3.6) et leur milieu qui est plus dense que de l'eau.

En sachant que $w \ll h$ et $z_c = \frac{h}{2}$ on peut simplifier l'équation et on obtient :

$$\Delta f_{ac} = f_{ac} \frac{X_p}{2} \left(1 - \frac{\beta_p}{\beta_f} \right) \tag{4.2}$$

Dans notre étude de vitesse de focalisation, nous sommes en régime très dilué $(X_p < 0.001)$ tandis que lors de nos tests de reconcentration nous sommes dans des régimes un peu plus concentrés mais où la fraction volumique de particules reste faible $(X_p < 0.01)$ ce qui donne des décalages en fréquence de $\Delta f_{ac} < 1 \ kHz$ et $\Delta f_{ac} < 10 \ kHz$ respectivement. Cependant il s'agit de la fraction volumique de référence. La fraction volumique locale va être significativement plus importante lorsque les particules viennent s'accumuler dans le plan de lévitation acoustique. Dans cette hypothèse, on peut supposer que la fraction volumique locale ne dépassera pas dix fois la fraction volumique de référence. Cela pourrait amener à un décalage en fréquence de l'ordre de $\Delta f_{ac} < 100 \ kHz$ ce qui n'est plus tout à fait négligeable.

Notre étude de vitesse de focalisation suivant la fréquence étant précise sur une variation de fréquences de 0,05 *MHz* on en conclut que la suspension pourrait induire un décalage en fréquence, en particulier pour les débits plus faibles. Il en est de même pour notre étude sur le taux de reconcentration de particules en fonction de la fréquence où nous avons un incrément en fréquence de 0,1 *MHz*. Afin d'évaluer l'existence d'un tel effet, il faudrait réaliser des expériences similaires pour différentes fractions volumiques initiales. Au-delà d'une fraction volumique critique, on

devrait pouvoir observer un décalage en fréquence. Malheureusement nous n'avons pas pu réaliser une telle étude.

Cependant, on pu observé lors de certaines expériences une variation de la fréquence optimale indiquée par le Wattmètre de l'ordre de 0,1 *MHz* voire 0,2 *MHz*. La fraction volumique injectée était très faible et pourtant parfois on observait une fréquence optimale décalée de 0,1 *MHz*. Cela justifie de faire des expériences dédiées pour confirmer/infirmer ces observations préliminaires.

4.5.3 Reconcentration des cellules souches non parenchymateuses

Nous avons démontré la possibilité de reconcentrer des particules et de les orienter vers les sorties latérales en changeant la fréquence acoustique. L'objectif est maintenant d'appliquer cette technique à des cellules.

Depuis octobre 2016 l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et le Secrétariat Général pour l'Investissement (SGPI), dans le cadre du "Projet d'Investissement d'Avenir" (PIA), financent le projet iLite (innovation in Living tissue engineering). Ce projet de Recherches Hospitalo-Unversitaire (RHU) a 3 objectifs qui sont la biofabrication d'un foie bio-artificiel, d'un foie-sur-puce et d'un tissu hépatique transplantable. La bioconstruction du foie est réalisée par l'assemblages de briques élémentaires - organoïdes hépatiques et réseaux vasculaires et biliaires - construits séparément et intégrés au sein d'une matrice. Les réseaux vasculaires et biliaires sont produits par un mélange de technologies comprenant la culture organotypique, le micropatterning et la stéréolithographie. Les organoïdes, eux, incluent des hépatocytes, cellules endothéliales et cholangiocytes différenciées à partir de cellules souches pluripotentes.

Aenitis Technologies fait partie de ce consortium d'entreprises et laboratoires participant au projet iLite. Son rôle était initialement de faire de la séparation de cellules différenciées/indifférenciées via acoustophorèse pour faciliter la récupération cellulaire pour différentes équipes venant de d'autres laboratoires.

Biopredic International est une autre entreprise participant au projet iLite spécialisée dans l'isolation et la production de cellules du foie.

Ces cellules issues du foie sont composées de 4 types cellulaires :

- Les cellules de Kupffer (KC) qui font 5 μm et ont un petit cytoplasme en comparaison de leur noyau,
- Les cellules endothéliales du foie (LEC) qui sont de l'ordre de 10 μm et ont une apparence granulaire,
- Les cellules étoilées hépatiques (HSC) qui font 20 μm avec une apparence granulaire,
- Les cellules humaines primaires hépatocytes (PHH) qui ont un diamètre entre 20 μm et 30 μm et possèdent un grand cytoplasme.

Les LEC, HSC et KC sont des cellules dites non parenchymateuses (NPC). Biopredic est capable de séparer aisément les NPC des PHH à l'aide d'une simple centrifugation cependant l'isolation de chaque type cellulaire des NPC est bien plus complexe. Le mélange KC, LEC et HSC est ensuite récupéré puis placé en boîte de culture. Les KC sont des cellules adhérentes permettant de les isoler des LEC et HSC. Enfin pour isoler ces 2 derniers types cellulaires, une colonne de séparation sous champ magnétique est utilisée. Des micro-particules se fixent sur les HSC qui lorsqu'elles passent dans la colonne sont piégées et permettent ainsi de les séparer des LEC. On voit ici que le processus de séparation de ces quatre types cellulaires nécessite plusieurs étapes qui peuvent être contraignantes et invasives. Etant intéressés par une alternative technologique pour améliorer leurs procédés de récupération, l'acoutophorèse apparait comme une piste à explorer. C'est ainsi que l'entreprise nous a aimablement fourni un échantillon de cellules NPC pour voir s'il nous était possible de séparer ces différents types cellulaires.



FIGURE 4.8 – a) Répartition de cellules non parenchymateuses dans les 3 sorties en fonction de la fréquence acoustique, pour 1,9, 2,1 et 2,5 *MHz*. b) Taux de reconcentration des cellules dans les 3 sorties pour ces 3 fréquences. A 1,9 MHz les cellules se reconcentrent principalement dans les sorties adjacente et centrale. A 2,1 MHz on a une nette reconcentration en sortie centrale tandis qu'à 2,5 MHz la majorité des cellules sont collectées en sortie opposée.

Nous avons utilisé le même montage expérimental et réalisé la même variation en fréquences que pour les particules, de 1,9 *MHz* à 2,5 *MHz* avec un incrément de 0,1 *MHz*. Comme pour les particules, les cellules sont collectées aux trois sorties et les échantillons sont analysés. Dans ce cas, les cellules sont placées sur une lame de verre et visualisées (Fig. 4.8).
Pour 1,9 *MHz* les cellules sont majoritairement reconcentrées entre la sortie adjacente au transducteur (45,3 %) et la sortie centrale (38,8 %). Pour 2,1 *MHz*, les cellules sont principalement reconcentrées en sortie centrale (68,3 %) et pour 2,5 *MHz* les cellules sont reconcentrées en sortie opposée : 53,6 %. On retrouve donc le même comportement qu'observé sur la Fig. 4.1 : à mesure que la fréquence augmente, les cellules sont envoyées près de la paroi adjacente au transducteur puis vers la paroi opposée à celui-ci lorsque la fréquence est maximale.

Au terme de cette expérience nous n'avons pas pu séparer les différents types cellulaires, ceux-ci étant tous regroupés dans la même sortie de collecte. Nous n'avons par la suite pas continué notre collaboration avec Biopredic. Cependant grâce à cette étude nous avons montré qu'il nous était possible, suivant la fréquence établie, de choisir la sortie de collecte des cellules, tout comme les particules. Les résultats semblent aussi bon qu'avec les particules. On observe en particulier une forte reconcentration pour 2,5 *MHz*. Nous n'avons malheureusement pas pu quantifier le taux de reconcentration pour ces expériences.

4.5.4 Processus de reconcentration des cellules HepaRG

Nous avons pu réalisé des expériences sur un second type cellulaire qui nous a également été fourni dans la cadre du projet iLite : les cellules HepaRG. Les cellules HepaRG sont des lignées cellulaires de cellules souches hépatiques qui ont l'avantage de coûter moins cher et sont plus faciles à utiliser que les cellules hépatocytes primaires humaines. Ces cellules nous proviennent de l'équipe de l'Unité de Thérapie Cellulaire de l'Hôpital Saint Louis AP-HP. Nous avons appliqué le même processus expérimental que celui utilisé pour les cellules non parenchymateuses.

Nous avons fait plusieurs tests de reconcentration avec différentes fréquences : de 1,7 MHz à 2,5 MHz avec un pas de 0,2 MHz. Le meilleur résultat a été obtenu pour une fréquence de 2,1 MHz (Fig. 4.9). Dans ce cas, la majorité des cellules sont collectées dans la sortie centrale avec un taux de reconcentration de 76,5 % en sortie centrale contre 18,1 % et 5,7 % dans les sorties adjacentes et opposées respectivement. Dans le cas 1,7 MHz nous avons un comportement similaire à la Fig. 4.1, le nœud de pression est situé plus proche de la paroi adjacente au transducteur que la paroi opposée. Les cellules sont donc principalement collectées par la sortie adjacente ainsi qu'une bonne partie dans la sortie centrale. Cela se retrouve dans les résultats avec un taux de reconcentration de 49,9 %, 38,7 % et 11,4 % de cellules collectées dans les sorties adjacente, centrale et opposée respectivement. Si l'on se reporte à nouveau à la Fig. 4.1, on observe qu'à 2,1 *MHz*, les particules se focalisent à 200 μm de hauteur ce qui correspond au centre du canal et par conséquent à la sortie centrale. De plus, sur la Fig. 4.2, 2,1 MHz est la fréquence la plus proche correspondant à un maximum de vitesse. Les résultats de reconcentration obtenus sont en adéquation avec les études de position et de vitesse en fonction de la fréquence.



FIGURE 4.9 – Reconcentration de cellules hepaRG sous acoustique à 1,7 MHz et 2,1 MHz. a) Des photos dans les 3 sorties du canal ont été prises : la sortie adjacente, la sortie centrale et la sortie opposée au transducteur. b) Taux de reconcentration dans les 3 sorties à ces 2 fréquences. On observe une importante reconcentration en sortie centrale à 2,1 MHz.

4.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons mis en évidence l'impact de la fréquence sur le comportement de particules et/ou cellules dans un canal microfluidique. En appliquant la fréquence de résonance du canal, on obtient un plan de focalisation à mi-hauteur de ce dernier, position où migrent les particules. En augmentant la fréquence le nœud de pression se déplace vers la paroi opposée au transducteur tandis qu'en la diminuant le nœud de pression se rapproche de la paroi adjacente au transducteur.

Nous avons également mesuré les vitesses de focalisation de particules migrant vers le nœud de pression en fonction de la fréquence appliquée. On observe une vitesse maximale à la fréquence de résonance et une diminution de cette vitesse à mesure que l'on s'éloigne de la fréquence de résonance. Un "split" de la fréquence de résonance a également été observé dans certains cas, se caractérisant par deux fréquences autour de la fréquence de résonance où la vitesse de focalisation est maximale. Ce résultat montre l'inhomogénéité des canaux lors de leur fabrication. Ces différences de microfabrication, bien qu'étant minimes, peuvent entraîner un léger décalage de la fréquence optimale pour une reconcentration.

Ces mesures de hauteur et vitesse de focalisation sont utilisées pour reconcentrer des particules transportées par un écoulement dans le canal. On retrouve un taux de reconcentration de particules dans les différentes sorties (adjacente, centrale, opposée) qui dépend fortement de la fréquence. Pour la fréquence de résonance le taux de reconcentration est maximal et les particules sont reconcentrées majoritairement en sortie centrale. En appliquant des fréquences plus basses on a une diminution du taux de reconcentration maximal avec une augmentation du nombre de particules en sortie adjacente et à l'inverse pour les hautes fréquences on a également une diminution du taux de reconcentration maximal avec cette fois-ci une augmentation du nombre de particules en sortie opposée au transducteur. On précise également que le taux de reconcentration maximal diminue à mesure que l'on augmente le débit, le temps de passage des particules devant le transducteur étant réduit.

Ce protocole expérimental est également appliqué à des cellules souches non parenchymateuses et cellules HepaRG. En appliquant différents décalages en fréquence nous sommes capables de choisir dans quelle sortie les cellules vont être collectées et on observe un taux de reconcentration maximal proche de la fréquence de résonance (on a un effet de "split").

Chapitre 5

Mesures des propriétés acoustiques des cellules

5.1 Introduction

S'il est essentiel de caractériser et connaître les propriétés acoustiques des canaux utilisés, il est tout aussi important de connaître les propriétés acoustiques des objets manipulés. Si nous connaissons les propriétés des particules utilisées, ce n'est en général pas le cas des cellules. C'est pourtant essentiel pour savoir à l'avance si une cellule pourra être déplacée par la FRA et avec quelle vitesse. Cela permettra de dimensionner le canal, choisir les débits, les amplitudes de force appliquée. Enfin, cela peut permettre également d'évaluer à priori les possibilités de séparer des cellules.

On cherche donc à connaître les propriétés des cellules, à savoir leurs tailles, densités, compressibilités. La taille peut être aisément déterminée par observation sous microscope. Pour la densité, il existe différentes méthodes. On pourra citer la centrifugation par gradient ficoll, l'utilisation de résonateurs nanomécaniques (GROVER et al., 2011) ou encore l'utilisation de la force magnétique (DURMUS et al., 2015). Une autre possibilité consiste à mesurer la vitesse de sédimentation des cellules. C'est cette technique que nous appliquons un peu plus loin dans cette partie.

En revanche il est bien plus difficile de mesurer la compressibilité des cellules. D'ailleurs ces données sont très peu documentées dans la littérature. Seules les tailles et densités des cellules les plus connues comme les globules rouges sont documentées (HOPPE-SEYLER et al., 1953; DANON et MARIKOVSKY, 1964; BRINKE et REGT, 1970).

C'est là tout l'intérêt de l'acoustofluidique qui peut permettre de remonter à cette information. D'ailleurs cela a déjà été fait pour certains types cellulaires. On peut citer des mesures de compressibilité des globules blancs et cellules cancéreuses de prostate (BARNKOB et al., 2011), des cellules issues d'une lignée cellulaire mésencéphale ventrale embryonnaire humaine ainsi que ces mêmes cellules différenciées dans un milieu spécifique 4 jours plus tard (AUGUSTSSON et al., 2010), des cellules cancéreuses du sein et des cellules cancéreuses du colon (HARTONO et al., 2011) ou encore des lignées cellulaires cancéreuses de tête et du cou (WANG et al., 2018).

5.2 Mesures du facteur de contraste acoustique et de la densité

Nous allons dans ce chapitre mettre en oeuvre une méthodologie basée sur la réponse des cellules à la FRA pour déterminer les densités/compressibilités de quatre types cellulaires. Pour ce faire nous allons mesurer la vitesse de focalisation acoustique ainsi que la vitesse de sédimentation, en utilisant la méthode de défocalisation présentée dans le Ch. 3.

Cette étude a été réalisée dans une cavité cylindrique en aluminium présentée dans le Ch. 3 (Fig. 3.5). Pour rappel, la cavité a un diamètre de 28 *mm* et une épaisseur de 330 μ m. Un disque de silicium de 25 *mm* de diamètre et 500 μ m d'épaisseur est placé au fond de la cavité tandis qu'un disque de quartz de 30 *mm* de diamètre et 1 *mm* d'épaisseur est utilisé pour sceller la cavité et créer une réflexion de l'onde acoustique conduisant à la création d'une onde stationnaire. La cavité a une capacité de 200 μ L.

Hormis la cavité qui remplace le canal PMMA, nous utilisons le même matériel : un générateur TiePie, un Wattmètre KPO - DG - 503, une source lumineuse CoolLed pE-4000-F-SYS-ZZ et un transducteur "Signal Processing" 2 *MHz*.

L'avantage d'utiliser la cavité par rapport au canal est la configuration hydrostatique du fluide qui évite les mouvements de particules mais également le fond en silicium qui offre un meilleur contraste entre l'objet étudié et le milieu environnant, en particulier avec des cellules.

5.3 Mesures de l'énergie acoustique du système

Les densité et compressibilité des objets sont regroupées dans le terme du facteur de contraste acoustique qui quantifie la réaction d'un objet à l'acoustique par rapport au milieu dans lequel il est plongé. Dans l'équation 2.3, nous avons 2 inconnues : l'énergie injectée dans notre système et le facteur de contraste acoustique des cellules.

Nous allons utiliser la même méthode que DRON et AIDER, 2012b qui consiste à mesurer la vitesse de focalisation pour remonter à l'énergie acoustique du système. Nous commençons donc par utiliser des particules de densité et compressibilité connues (données du fournisseur). Pour une fréquence et un voltage donnés nous mesurons la vitesse de focalisation de ces particules à l'aide de la méthode présentée au Ch. 3. Une fois la vitesse mesurée, nous pouvons en déduire l'énergie injectée dans notre système $\langle Eac \rangle$ en $J.m^{-3}$. Cette valeur est une moyenne temporelle. Elle est locale, ainsi une mesure à deux endroits différents du transducteur nous donne deux valeurs de $\langle Eac \rangle$ différentes. Nous nous efforçons donc de mesurer les focalisations acoustiques au même endroit dans la cavité.

Les particules utilisées (5, 10 et 15 μm de polystyrène) ont une densité et une compressibilité connues. Une particule de polystyrène a une densité de 1060 $kg.m^{-3}$ (données fournisseur) et une compressibilité de 2,20 $.10^{-10}Pa^{-1}$. On peut en déduire leur facteur de contraste acoustique.

Les valeurs d'énergies obtenues sont indiquées Fig. 5.1. Les énergies pour 5, 6, 7, 8 et 9 V ont été mesurées. On observe une évolution linéaire de l'énergie en fonction du voltage au carré peak to peak, en accord avec de précédentes études (BRUUS, 2012; BARNKOB et al., 2010).

A titre de comparaison, lors d'une précédente étude, nous avions également fait des mesures d'énergie acoustique dans une cavité similaire, mais avec un élément piézoélectrique de 2 *MHz* collé sur la paroi en silicium, à la place du transducteur packagé. L'évolution de l'énergie acoustique en fonction de V^2 est montrée sur la même Fig. 5.1.

Les mesures ont été faites de 5 à 9 *V* avec un incrément de 1 *V*. Pour les faibles voltages on observe la même linéarité que celle obtenue dans le cas du transducteur.



FIGURE 5.1 – Evolution de l'énergie acoustique en fonction du voltage au carré pour un transducteur packagé 2 MHz et un piézoélectrique en céramique 2 MHz. Des mesures ont été faites à 5, 6, 7, 8 et 9 V.

Une comparaison intéressante est la gamme d'énergies acoustiques atteinte pour les deux systèmes. Avec le transducteur packagé on évolue entre 15 et 100 $J.m^{-3}$ tandis que pour le piézoélectrique on est entre 5 et 20 $J.m^{-3}$. Le piézoélectrique, même à 20 V, ne peut délivrer une énergie supérieure à 100 $J.m^{-3}$.

On note donc l'efficacité d'un transducteur packagé en comparaison d'un piézoélectrique classique collé pour ce qui concerne la conversion du signal électrique en onde acoustique et son émission vers la cavité. Ceci s'explique sans doute par le fait que le transducteur est optimisé pour émettre l'onde dans une direction privilégiée (à l'aide de la backing layer) ce qui n'est pas le cas du piézoélectrique.

5.4 Mesures du facteur de contraste acoustique et de la compressibilité

5.4.1 Méthodologie

Maintenant que l'énergie dans notre système nous est connue, nous pouvons en déduire les propriétés des cellules. Le protocole utilisé est résumé sur la Fig. 5.2. Comme évoqué précédemment, la première étape est de mesurer l'énergie acoustique avec des particules dont les propriétés sont connues (Fig. 5.2 a)). Une fois l'énergie connue, nous pouvons mesurer la vitesse de focalisation acoustique de la particule ou cellule dont les propriétés sont inconnues. Cette fois, la seule inconnue dans l'équation 3.2 est le facteur de contraste acoustique. La mesure de la vitesse de focalisation acoustique nous permet donc d'en déduire directement leur facteur de contraste acoustique.

Pour nous simplifier l'étude nous avons pris l'énergie correspondant à 5 *V* soit $\langle E_{ac} \rangle = 18,7747 J.m^{-3}$. La vitesse de focalisation acoustique des cellules est plus lente à ce voltage comparé aux autres mesures. Cela nous permet un meilleur suivi de la cellule, une détermination plus précise de sa position au cours du temps et donc une meilleure estimation de sa vitesse.



FIGURE 5.2 – Méthodologie pour déduire les propriétés acoustiques des cellules. Etape a) En mesurant la vitesse de focalisation maximale de particules dont les densité et compressibilité nous sont connues on en déduit l'énergie acoustique dans notre système. Etape b) Grâce à la mesure de la vitesse de focalisation des cellules et à l'énergie acoustique précédemment calculée, on en déduit le facteur de contraste acoustique des cellules. En parallèle des mesures de vitesse de sédimentation sont effectuées pour trouver la densité. Les densité et facteur de contraste acoustique nous permettent d'en déduire la compressibilité des cellules.

Nous utilisons le code Matlab présenté dans le Ch. 3 pour mesurer la position puis la vitesse de focalisation acoustique des cellules.

Afin de déterminer la compressibilité des cellules, il nous faut mesurer leur densité. En effet, si le facteur de contraste acoustique et la densité sont connus, il est alors possible d'en déduire la compressibilité en utilisant l'équation 2.8.

La densité des cellules n'est en général pas connue ou peut varier significativement d'une cellule à l'autre. Puisque nous mesurons les propriétés des cellules individuelles, il nous faut systématiquement mesurer la densité de la cellule soumise à la force acoustique. Pour ce faire, nous utilisons la même procédure et le même code Matlab pour cette fois mesurer la vitesse de sédimentation. La différence est qu'à t = 0 la cellule apparaît focalisée dans le plan de lévitation avant de se défocaliser sous l'effet de la sédimentation.

5.4.2 Validation : mesure du facteur de contraste acoustique des particules

Afin de valider notre approche, nous l'avons d'abord appliquée à des particules dont on connaît la taille, la densité et la compressibilité et donc le facteur de contraste acoustique. Si notre méthode est cohérente et pertinente nous pouvons mesurer le facteur de contraste acoustique de ces particules. Nous avons appliqué le protocole à des particules de polystyrène de 5 μm , 10 μm et 15 μm dans la cavité dont on a mesuré l'énergie acoustique. Le résultat est illustré sur la Fig. 5.3. Les particules ont

les mêmes propriétés physiques. Seul le diamètre change. On peut voir que l'on retrouve bien la bonne valeur de facteur de contraste acoustique. Les meilleurs résultat sont obtenus avec les particules de 10 μm pour lesquelles le diamètre et le montage optique offre sans doute le meilleur compromis. Ces mesures valident donc notre approche.



FIGURE 5.3 – Facteur de contraste acoustique des billes de polystyrène de 5, 10 et 15 μm avec leur valeur théorique : G = 0,573

5.5 Mesure du facteur de contraste acoustique et de la compressibilité des cellules

5.5.1 Application aux cellules

Pour déterminer les propriétés acoustiques et mécaniques des cellules, nous allons donc appliquer le protocole décrit précédemment.

Il est à noter que contrairement aux particules, les cellules ne respectent pas totalement les critères d'utilisation de l'équation. Les cellules issues d'un même échantillon, à la différence des particules, ne font pas toutes la même taille. On peut avoir de grandes variations d'une cellule à l'autre. De plus, nous utilisons des marqueurs membranaires pour observer ces cellules. Or il arrive régulièrement que la membrane ne soit pas marquée de façon homogène. Cela implique que la lumière émise par les cellules n'est pas forcément isotrope. Nous arrivons cependant à identifier et suivre un anneau d'Airy.

Un autre souci peut venir du fait que les cellules ne sont pas des sphères parfaites, si bien que l'expression de la force acoustique utilisée n'est peut-être plus tout à fait adaptée. Cependant nous arrivons à suivre les cellules, mesurer leurs vitesses dont le comportement semble bien décrit par l'équation utilisée dans le code Matlab. Le principe de la mesure reste donc pertinent. Pour faciliter la comparaison des mesures de facteur de contraste acoustique entre notre étude et celles faites par d'autres équipes, nous allons exprimer le facteur de contraste acoustique non plus sous la forme F_y mais plutôt selon l'expression suivante :

$$G = \frac{5\rho_p - 2\rho_f}{2\rho_p + \rho_f} - \frac{\beta_p}{\beta_f}$$
(5.1)

avec $G = 3 F_Y$.

Nous travaillons à une tension de 5V. Cette valeur permet aux cellules de se concentrer rapidement sur le nœud de pression tout en étant suffisamment lente pour enregistrer leur mouvement à 80 fps.

Nous avons cherché par la suite à caractériser le maximum de types cellulaires pour évaluer la robustesse de notre démarche et pour alimenter une base de données importante pour les études futures d'Aenitis comme d'autres groupes de recherche en biophysique pour lesquels il est important de connaître les propriétés mécaniques des cellules.

5.5.2 Cellules AM-MSCs et BM-MSCs

Cellules souches

Une partie des cellules étudiées sont des cellules souches. Les cellules souches se caractérisent par leur capacité à produire une copie d'elle-même lorsqu'elles se divisent. L'une reste indifférenciée et garde les mêmes propriétés que la cellule mère tandis que l'autre se différencie (Fig. 5.4). La cellule dite différenciée va appartenir à une lignée cellulaire et donner à terme une cellule spécifique (PASCAL, 2019).

Il existe différents types de cellules souches n'ayant pas toutes le même potentiel de différenciation. Nous ne rentrerons pas ici dans les détails.



FIGURE 5.4 – Différenciation de cellules souches. Une cellule souche peut se renouveler ou se différencier. En se différenciant elle donne naissance à une cellule progénitrice qui peut uniquement se différencier de manière ciblée. On obtient la cellule en question voulue.

Cellules stromales mésenchymateuses

Les premières cellules étudiées sont des cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux (ou Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells : AD-MSCs). Les cellules nous sont fournies par Hugo Sugier, doctorant CIFRE au sein de Aenitis et du Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) situé à Clamart.

Le tissu adipeux blanc est récupéré par des liposuccions (prélèvement d'excès de graisse sous la peau par aspiration) faites au niveau du ventre et des cuisses. Dans ce tissu, il existe de nombreux types cellulaires : des globules rouges, des globules blancs, des péricytes, des cellules endothéliales, des cellules adipocytes progénitrices et matures et des cellules stromales mésenchymateuses. Ces dernières sont le type cellulaire le plus étudié notamment dans le domaine des thérapies cellulaires et des essais cliniques.

Les autres cellules provenant du CTSA sont des cellules stromales mésenchymateuses issues de moelle osseuse (ou Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells : BM-MSCs). Ces cellules sont récupérées dans la crête iliaque, partie supérieure de l'os coxal (ou os iliaque) qui est l'os principal de la hanche. Le prélèvement brut contient des BM-MSCs, des globules rouges, des globules blancs, des cellules souches hematopoïétiques et des cellules dites de "soutien" qui permettent de répondre à tous les besoins nécessaires aux autres cellules dans le tissu. Un comptage cellulaire est effectué sur le prélèvement brut afin de mettre les cellules en culture à une densité cellulaire de 100000 *cellules.cm*⁻² dans une flasque de culture. Les BM-MSCs vont adhérer au plastique tandis que les autres types cellulaires, non adhérents, vont être éliminés suite aux changements de milieu. Seuls des macrophages (issus des globules blancs) peuvent également adhérer au plastique cependant ils sont en quantité infime comparé aux BM-MSCs et cette tendance s'accentue et au fur et à mesure du temps de culture.

Cellules iPS

Nous avons également étudié des cellules souches pluripotentes humaines induites (iPS). Ces cellules nous ont été aimablement fournies par TreeFrog Therapeutics, start-up francaise produisant à grande échelle ces fameuses cellules très convoitées par les thérapies cellulaires de par leur capacité à se différencier en n'importe quelle cellule du corps humain. Afin de rendre fluorescentes les cellules nous avons utilisé de la phosphatase alcaline.

Cellules N2a

Nous avons également caractérisé des cellules Neuro-2a (ou cellules N2a) qui proviennent de l'Insitut de Biologie Paris-Seine (IBPS). Les cellules N2a sont issues d'une lignée cellulaire dérivée de la crête neurale de la souris.

Elles sont principalement utilisées pour étudier la différenciation neuronale et la croissance des axones. Celles-ci ont la faculté de se différencier en neurones en quelques jours.

Pour marquer les cellules N2a nous avons utilisé du 5-hexadecanoylaminofluorescein, marqueur membranaire qui vient se fixer sur la double couche lipidique de la cellule. Ce marqueur correspond à une longueur d'émission de 525 *nm*.

Les cellules N2a étudiées ont effectué 31 passages avant d'être analysées.

Culture cellulaire et passages

Les cellules mises en culture sont sur un substrat d'une surface donnée. Les cellules vont se multiplier jusqu'à atteindre la confluence c'est à dire qu'elles couvrent toute la surface de la flasque de culture. A ce moment-là, celles-ci seront retirées du



FIGURE 5.5 – Evolution de la tâche d'Airy d'une cellule AD-MSC lors de sa migration vers le plan de focalisation

substrat grâce à l'utilisation de trypsyne, une enzyme dégradant la matrice extracellulaire. Les cellules ainsi récupérées sont alors placées dans une nouvelle flasque de culture à faible densité (4000 *cellules.cm*⁻²) afin qu'elles se multiplient à nouveau. On appelle cette étape un passage.

Ici nous avons étudié des cellules stromales mésenchymateuses allant du passage 1 au passage 5. Le but est d'observer une potentielle évolution de leurs propriétés mécaniques en fonction du nombre de passages effectués.

5.5.3 Mesures des propriétés des cellules AD-MSCs et BM-MSCs

Les cellules AD-MSCs et BM-MSCs baignent dans un sérum physiologique composé d'eau avec 0,9 % de NaCl.

Enfin pour marquer les cellules nous avons utilisé trois marqueurs membranaires fluorescents : le CD29, CD44, et CD90 qui sont exprimés par les cellules stromales mésenchymateuses. La longueur d'onde d'émission est de 617 *nm*.

Grâce à cette fluorescence, on observe une tâche d'Airy (Fig. 5.5) et nous en déduisons les positions et vitesses de focalisation lors de leur remontée.

Un exemple d'évolution du rayon, de la position et de la vitesse de focalisation d'une cellule AD-MSC est montré sur la Fig. 5.6.

Mesures du facteur de contraste acoustique des cellules AD-MSCs

Nous avons réalisé des mesures sur des cellules AD-MSC issues de cinq donneurs différents (notés A, B, C, D et E). Pour chaque donneur nous avons étudié les cellules après un, deux puis trois passages (notés 1, 2 et 3). Afin d'obtenir un poids statistique suffisant nous avons mesuré le facteur de contraste acoustique d'une dizaine de cellules pour chaque couple (donneur/passage). Il est important de souligner ici la difficulté et le temps pris pour réaliser ces mesures. Non seulement nous ne disposons pas de cellules de façon permanente, mais bien intermittente. De plus il faut à chaque fois réaliser les cultures, avec les risques de pertes. Enfin, cela prend du temps, avec près d'une semaine par passage. Ces cultures ont été réalisées en grande partie par H. Sugier, autre doctorant cifre d'Aenitis.



FIGURE 5.6 – Mesures effectuées lors de la focalisation d'une cellule AD-MSC vers le plan de focalisation. a) Rayon de la tâche d'Airy en fonction du temps, b) Position de la cellule par rapport au plan de focalisation au cours du temps, c) Vitesse de focalisation de la cellule au cours du temps d) Vitesse de focalisation de la cellule en fonction de sa position par rapport au plan de focalisation.



FIGURE 5.7 – Facteur de contraste acoustique de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3.



FIGURE 5.8 – Facteur de contraste acoustique de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (A, B, C, D, E) au cours de 5 passages

Le résultat est présenté sur la Fig. 5.7. On observe une forte inhomogénéité du facteur de contraste acoustique pour des cellules de même passage. De plus, *G* varie beaucoup entre les cellules de différents donneurs. Il est important ici de souligner que ce sont des cellules dérivées de patients. Les cellules sont issues de liposuccion et on constate une grande variabilité de la qualité des échantillons qui dépend à la fois du patient mais aussi de la façon de prélever le tissu par le chirurgien. Cela explique la grande hétérogénéité du facteur de contraste acoustique, à la fois pour un patient donné, et entre patients, en particulier au premier passage (Fig. 5.7 a)).

Il est intéressant de constater que l'hétérogénéité se réduit avec des distributions plus resserrées au passage 3. Passage après passage, les cellules semblent "perdre la mémoire" de leurs origines. Cela est confirmé par la Fig. 5.8 sur laquelle nous avons inclus les résultats obtenus jusqu'au passage 5 pour les donneurs A, B et C. Les cultures ont malheureusement été perdues pour les donneurs D et E après le troisième passage. Sur cette figure nous pouvons observer, à partir du passage 4 et pour les passages suivants, une convergence de la valeur du facteur de contraste acoustique vers une valeur moyenne G = 0, 1732. Les cellules réagissent de manière similaire à l'acoustique après quelques passages car les populations de cellules se sont "standardisées" et homogénéisées. En effet, après chaque passage, les cellules sont sélectionnées par leurs capacités de croissance, ce qui conduit à une homogénéisation des cellules et de leurs propriétés.

Mesures du facteur de contraste acoustique des cellules BM-MSCs

Dans le cas des cellules BM-MSCs nous avons pu étudier des échantillons issus de trois donneurs (α , β et γ) que nous avons pu cultiver au cours de trois passages.

Là aussi on observe un facteur de contraste acoustique très variable entre les donneurs et entre chaque passage (Fig. 5.9). Contrairement aux cellules AD-MSCs, on n'observe pas de tendance d'homogénéisation du facteur de contraste acoustique ici.

Malheureusement nous avons eu des soucis de culture des cellules BM-MSCs ce qui a rendu impossible toute analyse des passages 4 et plus. La valeur moyenne du facteur de contraste acoustique après trois passages est G = 0,1776, mais cette valeur est moins robuste que celle obtenue pour les AD-MSCs après 5 passages.



FIGURE 5.9 – Facteur de contraste acoustique de cellules BM-MSCs en fonction de 3 donneurs (α , β , γ) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3



FIGURE 5.10 – Diamètre moyen de cellules AD-MSCs en fonction du nombre de passages effectués pour chaque donneur.

Facteur de contraste acoustique et diamètre des cellules

Lors de leur mise en culture, les cellules grandissent jusqu'à atteindre la confluence. Par ce processus nous avons donc un accroissement moyen du diamètre des cellules au cours des passages.

La Fig. 5.10 nous montre l'évolution du diamètre moyen des cellules AD-MSCs des 5 donneurs en fonction des passages effectuées.

Il semblerait que le diamètre des cellules tende à s'homogénéiser avec une augmentation du diamètre moyen jusqu'au passage 3. Puis on observe une forte chute lors du passage 4 avant une réaugmentation du diamètre lors des passages suivants.

En complément nous avons ajouté la Fig. 5.11 où nous avons le diamètre moyen de cellules AD-MSCs pour tous les donneurs mélangés en fonction du passage.

Nous retrouvons une augmentation du diamètre entre les passages 1 à 3 ainsi que 4 à 6. Cette augmentation est due aux cellules, qui une fois à confluence, sont placées dans une boîte de culture plus grande leur permettant de grandir à nouveau. Cependant, concernant la chute du diamètre entre les passages 3 et 4, actuellement



FIGURE 5.11 – Diamètre moyen de cellules AD-MSCs en fonction du nombre de passages effectués. Pour chaque passage tous les donneurs ont été mélangés.

nous n'avons pas d'explication claire et identifiée de cette diminution soudaine du diamètre. Cela pourrait être, une conséquence phénotypique, la culture de cellules placées dans des boîtes plus petites ou à des concentrations importantes.

Nous avons étudié le facteur de contraste acoustique des AD-MSCs en fonction de leurs tailles pour les différents donneurs. En effet, nous avons pu observer une grande variabilité dans la taille des cellules, en particulier au premier passage. Le résultat est montré sur la Fig. 5.12.

Pour chaque donneur tous les passages ont été confondus. Nous observons une diminution du facteur de contraste acoustique à mesure que la taille des cellules augmente. Cette tendance s'observe pour tous les donneurs. Dans tous les cas nous avons une corrélation de Pearson qui est significative.

Cette tendance a également été observée par WANG et al., 2019. Les cellules cancéreuses du sein qu'ils ont étudiées ont un facteur de contraste acoustique qui diminue avec l'augmentation de la taille de la cellule (représentée dans leur cas par la surface de la cellule).

Cette variation nous a amené à nous interroger sur la présence d'un possible échange osmotique entre la cellule et son milieu.

Dans notre protocole expérimental, les cellules analysées lors de la focalisation acoustique sont traitées environ 2 heures avant les cellules analysées pour la sédimentation. La même population de cellules est analysée mais ce ne sont pas strictement les mêmes entre les focalisations et les sédimentations.



FIGURE 5.12 – Facteur de contraste acoustique en fonction du diamètre des cellules AD-MSCs pour les donneurs a) *A*, b) *B*, c) *C*, d) *D*, e) *E*. Dans chaque cas, tous les passages ont été confondus

5.5.4 Pression osmotique

Une cellule est composée d'une membrane semi-perméable séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Cette membrane aura pour rôle de délimiter la cellule et d'en réguler les échanges avec le milieu extracellulaire. Ces transports pourront être effectués de façon active par le biais de transporteurs protéiques, ou de façon passive par diffusion à travers la membrane. L'osmose est le mouvement de solvant d'une région de faible concentration en solutés vers une région à plus forte concentration afin d'homogénéiser la concentration des deux régions. La régulation de la pression osmotique est essentielle pour le bon fonctionnement cellulaire. De façon générale, la membrane est imperméable aux grosses molécules polaires telles que les protéines, ions et sucres. Elle est cependant perméable aux molécules nonpolaires ou hydrophobiques et aux petites molécules telles que l'oxygène. L'osmose cellulaire sera en charge de réguler les flux, principalement d'eau, afin d'équilibrer la balance de pression osmotique (Fig. 5.13).



FIGURE 5.13 – Phénomène de pression osmotique caractérisé par 3 cas : hypertonique, isotonique et hypotonique. Issu de Biology for AP Courses

Il existe 3 types de conditions osmotiques différentes :

- Milieu hypotonique
- Milieu isotonique
- Milieu hypertonique

Dans un milieu hypotonique, la concentration en solutés du milieu est inférieure à celle de la cellule. Ceci aura pour conséquence d'entraîner une entrée d'eau dans la cellule. La taille de la cellule augmentera. Dans un milieu hypertonique, la concentration en solutés du milieu est supérieure à celle de la cellule. Ceci aura pour conséquence d'entraîner une sortie d'eau depuis la cellule. La taille de la cellule diminuera. Enfin un milieu isotonique présente une concentration en solutés égale à celle de la cellule n'entraînant pas de variation du contenu cellulaire et donc pas de variation de la taille cellulaire. Ainsi, dans le cadre de la manipulation de cellules, le choix du milieu est essentiel afin de ne pas modifier la taille ou densité de la cellule.

Afin de nous assurer que le milieu utilisé au cours de nos expériences n'avait pas d'impact sur les cellules, nous avons suivi l'évolution de la taille de nos cellules plongées dans notre milieu (i.e. serum physiologique). Nous n'avons pas observé de variation de taille cellulaire, attestant donc que le milieu choisi est bien isotonique. Il n'y a donc pas d'effet de pression osmotique pouvant modifier les propriétés physiques des cellules.

5.6 Caractérisation des propriétés mécaniques des cellules

5.6.1 Mesure de la densité des cellules

Le facteur de contraste acoustique est un paramètre crucial pour la communauté acoustofluidique puisqu'il détermine la réponse de l'objet à la FRA. Sa valeur indique comment les objets réagissent à l'acoustique, leur migration vers le nœud de pression ou l'antinœud et leur vitesse de focalisation. Connaître le contraste acoustique permet donc de savoir à priori si l'on pourra déplacer un objet et à quelle vitesse et donc de dimensionner le montage pour s'assurer d'une reconcentration ou d'une séparation efficace. Les résultats obtenus sont donc d'ores et déjà très utiles. Cependant, il est possible d'aller plus loin. En effet, il est possible également de mesurer les propriétés mécaniques des cellules, à savoir la densité, compressibilité. Pour cela, la première étape consiste à mesurer la densité pour pouvoir ensuite déduire la compressibilité à partir de la définition du facteur de contraste acoustique.

Nous pouvons utiliser exactement le même protocole pour mesurer la vitesse de sédimentation que pour mesurer la vitesse de focalisation. Connaissant la vitesse de sédimentation on peut aisément remonter à la densité. En effet, l'équilibre entre la force de Stokes et la flottabilité est :

$$\vec{F}_S = \vec{P}_A \tag{5.2}$$

avec

$$F_S = 6\mu \pi \frac{d_p}{2} u_s \tag{5.3}$$

et

$$P_A = \frac{4}{3}\pi (\frac{d_p}{2})^3 \Delta \rho g \tag{5.4}$$

avec

$$\Delta \rho = \rho_p - \rho_f \tag{5.5}$$

On en déduit alors la vitesse de sédimentation :

$$u_s = \frac{d_p^2 \Delta \rho g}{18\mu} \tag{5.6}$$

Enfin, nous obtenons la densité d'une particule :

$$\rho_p = \frac{18\mu u_s}{gd_p^2} + \rho_f \tag{5.7}$$

Mesurer u_s permet donc d'en déduire la densité de la particule ou de la cellule.

Dans le cas des mesures de vitesse de sédimentation, notre plan d'observation est toujours confondu avec le plan de focalisation. On active l'acoustique pour placer la cellule dans le plan de focalisation puis on coupe les ultrasons. On va donc observer une tâche d'Airy qui s'agrandit au cours du temps à mesure que la cellule s'éloigne du plan de focalisation pour sédimenter au fond de la cavité. Nous utilisons le même code Matlab que précédemment.

Le résultat obtenu pour une cellule AD-MSC est illustré sur la Fig. 5.14. La cellule atteint rapidement sa vitesse maximum, la vitesse de Stokes, sédimente à vitesse constante avant de ralentir progressivement en s'approchant de la paroi.

Nous avons mesuré les vitesses de sédimentation des cellules AD-MSCs pour les 5 donneurs et pour les trois passages, comme pour les mesures de facteur de contraste acoustique. Le résultat est montré sur la Fig. 5.15. On note d'importantes variations pour certains donneurs comme le "A" tandis que d'autres (comme le "E") ont un écart-type bien plus faible. Cet écart-type diminue entre le passage 1 et le passage 3 pour la majorité des donneurs (A, B, C et E). Là encore, la sélection des cellules faite après chaque passage crée une homogénéisation de la population qui s'observe sur leurs propriétés.

La densité varie d'un donneur à l'autre, tout en restant dans une fenêtre assez étroite, entre $1035-1050 kg.m^{-3}$. L'effet des passage est de réduire l'écart-type des distributions, mais sans changer significativement les valeurs moyennes pour chaque donneur. La variabilité de densité est plutôt liée à l'origine des cellules, c'est-à-dire au donneur, et persiste après trois passages.



FIGURE 5.14 – Mesures effectuées lors de la sédimentation d'une cellule AD-MSC vers le fond de la cavité. a) Rayon de la tâche d'Airy en fonction du temps, b) Position de la cellule par rapport au plan de focalisation au cours du temps, c) Vitesse de sédimentation de la cellule au cours du temps d) Vitesse de sédimentation de la cellule en fonction de sa position par rapport au plan de focalisation



FIGURE 5.15 – Densité de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (A, B, C, D, E) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3.

Nous avons fait les mêmes mesures pour les cellules BM-MSCs, avec trois donneurs et trois passages. Le résultat est illustré sur la Fig. 5.16. On observe sensiblement le même comportement, avec une variabilité associée aux donneurs et un effet moindre du passage. Les densité obtenues varient dans une plage similaire à celle



FIGURE 5.16 – Densité de cellules BM-MSCs en fonction de 3 donneurs (α , β , γ) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3.



FIGURE 5.17 – Densité moyenne de cellules AD-MSCs pour les donneurs A, B, C, D et E en fonction du nombre de passages. On observe une homogénéisation de la densité à mesure que les cellules subissent des passages.

trouvée pour les cellules AD-MSCs, entre 1035 et 1050 $kg.m^{-3}$.

Sur la fig. 5.17 nous avons affiche la densité moyenne de cellules AD-MSCs pour les 5 donneurs en fonction du passage. On observe une diminution de l'hétérogénéité pour les cellules d'un même donneur au cours des passages avec un minimum observé au passage 4. Il en est de même pour l'hétérogénéité entre tous les donneurs qui est minimale également au passage 4.

Les densités des cellules ont été quantifiées et, grâce au facteur de contraste acoustique de celles-ci mesuré précédemment, nous sommes maintenant en mesure d'en déduire leur compressibilité.

5.6.2 Mesure de la compressibilité des cellules

Afin de calculer la compressibilité des cellules AD-MSCs et BM-MSCs, nous utilisons l'équation suivante :

$$\beta_p = \left(\frac{5\rho_p - 2\rho_f}{2\rho_p + \rho_f} - G\right)\beta_f \tag{5.8}$$

Nous utilisons les résultats présentés dans la section précédente pour calculer la compressibilité des cellules. Nous utilisons ici les densités moyennes obtenues pour chaque donneur pour calculer la compressibilité des cellules, pour chaque donneur et pour chaque passage.

Les résultats obtenus pour des cellules AD-MSCs sont présentés sur la Fig. 5.18. Les compressibilités obtenues varient entre 3 $.10^{-10}Pa^{-1}$ et 4,30 $.10^{-10}Pa^{-1}$ pour les AD-MSCs. On a donc des variations relativement importantes entre les différents donneurs mais comme pour la densité, on a des valeurs qui tendent à s'homogénéiser à mesure que l'on augmente le nombre de passages, avec une valeur moyenne au troisième passage $\beta_p = 3.93 . 10^{-10}Pa^{-1}$.



FIGURE 5.18 – Compressibilité de cellules AD-MSCs en fonction de 5 donneurs (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3

Nous avons étudié l'évolution de la compressibilité pour les cinq donneurs de cellules AD-MSCs en fonction du nombre de passage Fig. 5.19. Nous observons la même tendance que celle observée sur la densité : une hétérogénéité très importante sur le premier passage puis une homogénéisation au cours des suivants qui culmine avec le passage 4. Ce comportement, aussi bien pour la densité que la compressibilité tend à homogénéiser fortement le facteur de contraste acoustique de ces cellules à partir du passage 4.



FIGURE 5.19 – Compressibilité moyenne de cellules AD-MSCs pour les donneurs A, B, C, D et E en fonction du nombre de passages. De la même manière qu'avec la densité, on observe une homogénéisation de la compressibilité au fur et à mesure des passages effectués.

Dans le cas des BM-MSCs, il est plus difficile de commenter la variabilité. La compressibilité varie entre 3,1 $.10^{-10}Pa^{-1}$ et 4 $.10^{-10}Pa^{-1}$ (Fig. 5.20). Nous obtenons une valeur moyenne après trois passages (mais seulement pour deux donneurs) de $\beta_p = 3,87 \cdot .10^{-10}Pa^{-1}$, légèrement inférieure à la valeur obtenue pour les AD-MSCs.



FIGURE 5.20 – Compressibilité de cellules BM-MSCs en fonction de 3 donneurs (α , β , γ) suivant le a) passage 1, b) passage 2, c) passage 3

5.6.3 Synthèse

Nous avons également réalisé ces mesures pour les iPS et pour les N2a, mais seulement pour un passage. Nous avons mesuré les vitesses de focalisation et sédimentation de 75 cellules N2a et de 30 cellules iPS, si bien que les valeurs moyennes obtenues sont significatives. Il s'agit d'un travail long et laborieux puisque cela représente 200 manipulations de cellules suivies de 200 trajectoires à analyser.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la Fig. 5.22, avec les résultats obtenus pour les MSCs et les billes de polystyrène.

Les cellules iPS sont les cellules avec le facteur de contraste acoustique le plus faible ($G \approx 0,0718$) tandis que les N2a ont un facteur de contraste acoustique de $G \approx 0,1766$ nettement supérieur, beaucoup plus proche des cellules AM-MSCs et



FIGURE 5.21 – a) Facteur de contraste acoustique, b) Densité, c) Compressibilité des particules de polystyrène de 5, 10 et 15 μ m, ainsi que de cellules AD-MSCs (passages 1 et 4), BM-MSCs (passages 1 et 3), iPS et N2a.

BM-MSCs. Les iPS et N2a n'ont pas d'écart-type au niveau de leur compressibilité puisque ces dernières n'ont pas été étudiées sur plusieurs passages (Fig. 5.21).

Sur la Fig. 5.21 les facteurs de contraste acoustique, densités et compressibilités des passages 1 et 4 des AM-MScs et des passages 1 et 3 des BM-MScs ont été affichés. On observe une diminution du facteur de contraste acoustique entre les passages 1 et 4 dans le cas des AD-MSCs. Pour les BM-MSCs on observe également une diminution du facteur de contraste acoustique entre les passages 1 et 3 mais celle-ci est bien

	Mean diameter (μm)	Acoustic contrast factor	Density (kg.m ⁻³)	Compressibility (10 ⁻¹⁰ Pa ⁻¹)
AD-MSC's	19,5936	0,1693	1042,26	3,6276
Passage 1	± 3,6870	± 0,1618	± 5,3150	± 0,4867
AD-MSC's	18,9123	0,1340	1042,19	4,0039
Passage 4	± 3,4620	± 0,0726	± 3,6600	± 0,0955
BM-MSC's	17,7599	0,1785	1042,31	3,7704
Passage 1	± 3,1730	± 0,0930	± 6,1830	± 0,1344
BM-MSC's	18,9441	0,1676	1042,28	3.9369
Passage3	± 3,4579	± 0,1051	± 6,5030	± 0,1910
iPS cells	13,9857 ± 2,5450	0,0718 ± 0,0176	1035,5 ± 3,7030	4,2770
Neuro2a cells	11,6690 ± 2,2340	0,1766 ± 0,0623	1040,95 ± 3,7290	3,8233

FIGURE 5.22 – Tableau récapitulatif des diamètres moyens, facteur de contraste acoustique, densités et compressibilités obtenus pour chaque type cellulaire étudié.

moins nette. Dans les 2 cas on ne note pas d'évolution de la densité entre les passages. En revanche on observe une augmentation de la compressibilité. C'est cette augmentation de la compressibilité qui est la cause de la diminution du facteur de contraste acoustique pour les AD-MSCs et BM-MSCs pour les passages avancés.

On terminera sur le fait que, comme on pouvait s'y attendre, toutes les cellules ont un facteur de contraste acoustique moindre que les particules de polystyrène. Elles sont moins denses et plus compressibles ce qui traduit une réaction à l'acoustique moindre à diamètre équivalent.

L'ensemble des résultats accompagnés des diamètres moyens des cellules sont finalement rassemblés dans le tableau présenté sur la Fig. 5.22. Ces résultats sont les prémices de la caractérisation des propriétés mécaniques des cellules. L'objectif est de mesurer ces propriétés de manière systématique pour tous les types cellulaires afin de mieux connaître les différentes populations de cellules qui existent. Ces résultats pourront intéresser autant les biologistes que les biophysiciens.

Ils sont importants puisqu'ils montrent qu'il est préférable de caractériser des cellules souches en indiquant le passage, les propriétés des cellules pouvant varier au fur et à mesure des passages effectués.

Enfin, mesurer le facteur de contraste acoustique des différentes populations de cellules nous renseigne sur la faisabilité de séparer deux populations de cellules par acoustophorèse. Deux types cellulaires ayant des facteurs de contraste acoustique très différents seront aisément séparables avec l'acoustique contrairement à deux populations cellulaires dont les facteurs de contraste acoustique seraient proches.

Dans le cas où les facteurs de contraste acoustiques sont trop proches, il n'est plus possible d'utiliser la FRA pour les séparer. Il nous faudra alors chercher un autre critère de séparation. La longueur d'onde d'absorption optique des cellules en est un. En effet, le phénomène d'optoacoustophorèse découvert par l'équipe AcoustofluidiX (DUMY, HOYOS et AIDER, 2019) permet d'effectuer un processus de séparation en introduisant une lumière monochromatique dans notre système afin d'illuminer des agrégats en lévitation acoustique. Les cellules qui absorbent la longueur d'onde optique sont alors éjectées de la zone d'agrégation tandis que le second type cellulaire insensible à la lumière reste agrégé dans le plan de lévitation.

5.7 Ouverture : le cas des globules rouges

La plupart des cellules peuvent être considérées en première approximation comme des sphères et le modèle proposé par Yosioka-Kawasima nous permet d'étudier avec pertinence la force de radiation acoustique s'exerçant sur celles-ci.

Cependant toutes les cellules ne sont pas sphériques. On peut citer les globules rouges qui ont une forme biconcave. Une étude faite par Udroiu (UDROIU, 2014) compare le volume d'un globule rouge approximé par différentes formes géométriques : une sphère, un cylindre et une forme biconcave. La forme biconcave étant beaucoup trop complexe pour être exploitée dans notre étude, nous nous intéressons davantage à la sphère et au cylindre. Approximer le globule comme une sphère entraîne une sur-approximation trop importante de la réalité (20 % pour l'homme). L'approximer comme un cylindre, à l'inverse, donne une sous-approximation de 3 % beaucoup plus raisonnable.

Une piste pertinente serait de s'intéresser à la force acoustique s'exerçant sur un disque pour déterminer les propriétés acoustiques des globules rouges.

Pour cela nous pouvons utiliser la relation proposée par AWATANI, 1955 pour un globule se déplaçant selon l'axe z:

$$F_x = \frac{4}{3} k_x r_p^3 \left\langle E_{ac} \right\rangle \frac{\sigma}{\sigma+1} \left(1 + \frac{\sigma}{\sigma+1} \frac{(kr_p)^2}{5}\right) \sin(2kz) \tag{5.9}$$

avec

$$\sigma = \frac{3m_d}{8\rho_d r_p^3} \tag{5.10}$$

et

$$m_d = \rho_d \pi a r_p^2 t_d \tag{5.11}$$

Les forces transverses F_x et F_y sont 100 fois inférieures à F_z et peuvent être considérées comme négligeables.

On peut se demander si lors de leur focalisation acoustique les globules sont orientés selon le plan (x,y), ou un des plans (x,z) et (y,z). Lorsque soumis à la force de radiation acoustique, une rotation du disque a lieu plaçant celui-ci dans le plan (y,z). Cette rotation a lieu sur un temps plus court que la remontée du disque, parfois même avant que le disque ne commence à focaliser (GARBIN et al., 2015).

L'équation utilisée serait donc adaptée à notre cas, le disque étant la forme la moins complexe à étudier tout en approximant correctement le volume d'un globule rouge. Cependant le modèle reste insuffisant. En effet, il est valable pour les objets rigides, la compressibilité du disque étant négligée. On pourrait donc remonter à la densité mais nous n'aurions aucune information sur la compressibilité.

La même problématique se pose pour la sédimentation. OKA, 1985 a aussi approché la forme biconcave du globule par un disque. La force de traînée d'un disque est égale à celle d'une sphère de rayon effectif $R_{eff} = k_{or}r_{gb}$ avec k_{or} un coefficient qui dépend de l'orientation du globule (0,56 et 0,85 étant les 2 extrêmes) et r_{gb} le rayon du globule rouge . Ensuite ils citent le fait que les globules rouges sont déformables et en concluent une force de traînée :

$$F_{S_{gb}} = 6\pi\mu R_{eff} u_{gb} f_{def} \tag{5.12}$$

avec f_{def} un paramètre de déformation sans dimension inférieur à 1.

Cette expression pourrait être un bon point de départ pour mesurer la densité des globules rouges. Pour ce qui est de l'orientation d'un globule lors de sa sédimentation, Groom et al. ont observé que l'orientation de ce dernier varie constamment (GROOM et ANDERSON, 1972). Il serait donc adéquat d'établir $k_{or} = 0,71$ la valeur moyenne entre 0,56 et 0,85. C'est d'ailleurs la valeur prise par OKA, 1985 dans son étude.

Un paramètre à prendre en compte dans la mesure de densité des globules rouges est la longévité de ceux-ci (environ 120 jours). Des études ont déjà montré que la densité des globules augmente au fur et à mesure qu'ils "vieillissent" (PIOMELLI et SEAMAN, 1993).

D'autres études comme Link et al. ont étudié la déformation d'un globule rouge soumis à l'acoustique (LINK et FRANKE, 2020) ce qui est en lien avec la compressibilité des globules.

Il existe donc plusieurs pistes pertinentes pour caractériser les globules rouges à l'aide de l'acoustique et ainsi remonter à leur densité et compressibilité, mais cela demandera des développements spécifiques.

5.8 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons mesuré la densité d'énergie acoustique dans la cavité acoustique pour plusieurs voltages. En mesurant la vitesse de focalisation maximale de particules dont on connaît les propriétés mécaniques (densité, compressibilité), nous en déduisons cette densité d'énergie. Cette dernière augmente linéairement avec le carré du voltage.

La densité d'énergie varie également suivant le transducteur utilisé. Un transducteur packagé est optimisé pour générer une onde vers la cavité contrairement à un piézoélectrique en céramique. En utilisant un transducteur packagé on augmente la densité d'énergie d'un facteur 5 pour un même voltage donné. Cette densité d'énergie nous permet, à l'aide des mesures de vitesse de focalisation maximale, d'en déduire les facteurs de contraste acoustique et compressibilités de cellules qui nous sont inconnues.

Les facteurs de contraste acoustique ont été mesurés pour des cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux prélevées chez 5 donneurs différents et des cellules stromales mésenchmateuses issues de moelle osseuse prélevées chez 3 donneurs. On observe une grande hétérogénéité suivant les donneurs, tendance qui s'homogénéise à mesure que les cellules subissent des passages, cette homogénéisation étant due à une sélection des cellules qui se développent le mieux. On note également une diminution du facteur de contraste acoustique à mesure que le diamètre de la cellule est important.

En parallèle des mesures de vitesse de sédimentation pour en déduire la densité de ces cellules ont été effectuées. Les BM-MSCs sont en moyenne plus denses que les AD-MSCs.

En couplant les mesures de facteur de contraste acoustique et de densité nous sommes en mesure d'en déduire la compressibilité des cellules. La compressibilité des AD-MSCs est légèrement supérieure à celle des BM-MSCs et en reprenant les valeurs indiquées par les densités, nous sommes capables de dire que les AD-MSCs ont un facteur de contraste acoustique moindre que les BM-MSCs et donc une réaction moindre à l'acoustique. Cette étude a été étendue à des cellules iPS et Neuro2a. Nous avons donc pu établir des données quantitatives sur le facteur de contraste acoustique, la densité et la compressibilité de ces quatre types cellulaires. Ces travaux devraient être poursuivis de façon systématique afin de disposer d'un tableau des propriétés physiques des cellules ce qui intéresserait une large communauté de biologistes et biophysiciens.

Chapitre 6

Effets collectifs sur la vitesse de focalisation acoustique

6.1 Introduction

Le modèle théorique décrivant la force de radiation acoustique s'exerçant sur une sphère individuelle est bien établi comme vu précédemment. Cependant ses conditions de validité sont limitées : objet sphérique, de dimensions petites devant la longueur d'onde acoustique, etc. lorsque l'on manipule des suspensions à haute fraction volumique telles que le sang, la réalité est qu'il existe de multiples intéractions entre une cellule et ses voisines qui l'entourent. On peut penser en particulier aux plaquettes composant le sang et d'un diamètre de 2 μm et dont il serait pertinent de mesurer les propriétés mécaniques. En marquant ces dernières pour les rendre fluorescentes, les tâches d'Airy résultantes s'entrecroisent et on ne distingue pas de délimitation claire. De plus, ces cellules sont très sensibles au streaming acoustique, il nous est donc difficile d'isoler une seule plaquette et de la suivre individuellement même en diminuant drastiquement la fraction volumique de l'échantillon. Pour contourner ce problème, nous décidons de mesurer la vitesse moyenne de focalisation d'un agrégat de plaquettes grâce au temps de focalisation T_{foc-ag} .

A travers cette problématique appliquée se pose la question de la prise en compte des effets collectifs sur la focalisation acoustique. S'il est très complexe d'aborder ce sujet d'un point de vue théorique et même numérique, il est possible de réaliser des expériences modèles pour évaluer l'effet de la présence de plusieurs billes sur la dynamique de focalisation acoustique. L'objectif est donc de réaliser des expériences aussi contrôlées que possible sur des groupes de particules afin, si possible, de déterminer des corrections à apporter à l'expression de la force de radiation acoustique, ou tout au moins d'en définir les limites d'applications et des comportements génériques qui nous permettraient de mieux anticiper l'efficacité d'un processus d'acoustophorèse appliqué à une suspension dense, ou en tout cas au-delà de la limite du régime dilué.

6.2 Effets collectifs : analogie avec la sédimentation.

Il est très difficile de décrire le mouvement de particules en dehors des régimes dilués pour lesquels on peut négliger les interactions entre particules. Dès que les particules sont suffisamment proches les unes des autres, les interactions deviennent très vite complexes et il n'est plus possible de décrire analytiquement les trajectoires des particules. Ces phénomènes ont été particulièrement étudiés pour comprendre la sédimentation de plusieurs particules ou de nuages de particules qui ont révélés



FIGURE 6.1 – Déstabilisation d'un nuage de particules au cours de sa sédimentation.

de nombreux comportements complexes et inattendus dépendant à la fois de la vitesse de sédimentation et de la fraction volumique de particules. Il existe clairement des analogies entre la mise en mouvement d'un groupe de particules par la force acoustique vers le plan de lévitation et la sédimentation de particules sous l'effet de la gravité. C'est pourquoi nous allons nous inspirer de ces travaux pour décrire et analyser les différents phénomènes que nous avons observés.

Ainsi, GUAZZELLI, 2006 a décrit différents types de sédimentation d'une suspension de particules. Les deux premiers sont la sédimentation de particules réparties de façon homogène dans une suspension ainsi que la sédimentation d'une suspension de fibres. Le troisième, qui est la sédimentation d'un nuage compact de particules, est celui qui nous intéresse. Elle montre qu'un nuage de particules qui sédimente subit trois phases distinctes qui sont cycliques (Fig. 6.1) :

- La première est le nuage sous forme de sphéroïde. En se déplaçant, des particules à la périphérie de ce dernier se dirigent dans la direction opposée et sont éjectées du sphéroïde.
- La seconde est l'agrégat qui s'allonge dans deux directions lui donnant un aspect plus aplati. Celui-ci ne perd plus de particules en périphérie.
- La troisième partie est la rupture de cet agrégat en 2 parties ou plus qui prennent la forme de sphéroïdes également et on revient à la première étape.

Pour quantifier le passage d'un régime à l'autre, nous nous basons sur les travaux de HUISMAN et al., 2016. Ceux-ci utilisent un paramètre appelé le nombre de Galilée *Ga* pour identifier les différents régimes. Ce nombre s'exprime comme :

$$Ga = V_g \frac{D_n}{\nu} \tag{6.1}$$

avec V_g la vitesse de sédimentation, D_n le diamètre du nuage de particules et ν la viscosité cinématique du milieu (l'eau dans notre cas).

Avec ce nombre de Galilée, Huisman et al. ont mis en évidence quatre principaux régimes de sédimentation d'une particule, comme illustré sur la Fig. 6.2 : un régime de sédimentation verticale ($Ga \le 155$), un régime de sédimentation oblique, mais rectiligne ($155 \le Ga \le 185$), un régime de sédimentation oblique insatble oscillant ($185 \le Ga \le 215$) et enfin un régime chaotique lorsque $Ga \ge 215$.

D'autres études ont montré que le nombre de Galilée définissait la tendance de particules à s'aligner les unes derrière les autres en colonnes de cluster (UHLMANN et DOYCHEV, 2014, DOYCHEV, 2015). Grâce au nombre de Galilée il est donc possible



FIGURE 6.2 – Les différents régimes de sédimentation d'une particule en fonction du nombre de Galilée. Le premier régime correspond a une sédimentation verticale stable. Le second correspond a une sédimentation oblique stable. Le troisième régime est considéré comme oblique oscillatoire. Enfin le quatrième est dit chaotique. Issu de (HUISMAN et al., 2016).

de déterminer les différents régimes de sédimentation d'une particule ainsi que d'un cluster de particules.

Nous proposons d'introduire un paramètre permettant de déterminer de façon quantitative le passage d'un régime à un autre. Ce paramètre sera le nombre de Reynolds de focalisation acoustique Re_{ac} et sera défini comme :

$$Re_{ac} = V_{foc-ag} \frac{D_{ag}}{\nu} \tag{6.2}$$

avec V_{foc-ag} la vitesse de focalisation acoustique de l'agrégat et D_{ag} le diamètre de l'agrégat.

6.3 Méthode expérimentale

Nous nous intéressons ici aux dynamiques de focalisation acoustique de groupes de particules. Il faut donc pouvoir mesurer les vitesse axiales des groupes de particules, sans écoulement. Nous allons réaliser ces expériences avec la cavité en aluminium de hauteur $h = 330 \ \mu m$ et une fréquence acoustique de 2 *MHz* présentée au Ch. 3. Nous n'allons pas utiliser la technique de défocalisation utilisée pour les particules fluorescentes isolées puisqu'il n'est pas possible de déterminer la tâche d'Airy pour ce type d'objets. Nous allons donc systématiquement mesurer le temps de focalisation T_{foc-ag} , c'est-a-dire le temps pris par l'agrégat pour passer de sa position initiale, sans acoustique, à la position finale dans le plan de lévitation. Afin d'être aussi reproductible que possible, nous allons fixer les conditions expérimentales pour réaliser ces mesures. Pour mesurer la vitesse de focalisation d'un agrégat, nous allons utiliser systématiquement les mêmes conditions initiales, illustrées sur la Fig. 6.3.

Nous commençons par former un agrégat de particules de même taille dans le plan de lévitation, comme illustré sur la Fig. 6.4. Cela permet de positionner l'agrégat et de compter le nombre de particules qui le composent. Puis nous coupons l'acoustique. L'agrégat sédimente alors rapidement vers le fond de la cavité. Lorsqu'il atteint le fond de la cavité, nous réactivons l'acoustique et mesurons le temps que l'agrégat met à atteindre le plan de focalisation, que nous avons appelé T_{foc-ag} .



FIGURE 6.3 – Position initiale de l'agrégat dans la cavité avant sa remontée vers le plan de focalisation sous acoustique

La mesure de ce temps se fait grâce à des mesures par caméra rapide (PCO Panda Bi) à une fréquence d'acquisition de 80 fps. Connaissant la distance entre le plan de focalisation et le fond de la cavité (165 μm), nous en déduisons une vitesse moyenne de focalisation acoustique pour l'agrégat V_{foc-ag} .



FIGURE 6.4 – Remontée d'un agrégat de particules de polystyrène de 25 μm de diamètre au cours du temps. a) un agrégat dans le plan de focalisation avant sédimentation. Puis les images successives ont été prises au moment où l'acoustique est activée b) t = 0 ms, c) t = 50 ms, d) t = 100 ms, e) t = 150 ms, f) t = 200 ms, g) t = 300 ms et h) t = 2 s respectivement

Le temps d'exposition pour chaque image est de 10 *ms* et nous travaillons avec un objectif 5 *X*, Ce grossissement est nécessaire pour avoir sur l'image l'ensemble de l'agrégat.

6.4 Particules individuelles

C'est avec cette problématique que nous décidons d'analyser la vitesse de focalisation d'un groupe de particules formant un agrégat. Le but est d'étudier la dynamique de focalisation d'un agrégat de particules et de la comparer à celle d'une particule unique.



FIGURE 6.5 – Vitesse de focalisation pour des particules de 10, 25 et 40 μm en fonction de l'énergie acoustique du système. Chaque remontée vers le plan de focalisation est individuelle sans effets collectifs. Chaque point est la moyenne de 5 mesures.

Pour faciliter notre étude, nous nous intéressons à de grosses particules (minimum 10 μm de diamètre). Pour pouvoir approcher au mieux le comportement des plaquettes, il nous faudrait utiliser des particules de l'ordre de 2 μm de diamètre. Cependant, comme nous allons le voir par la suite, la physique régissant ces phénomènes est dense et complexe donc pour essayer de la comprendre au mieux, il nous apparaît pertinent d'utiliser de grosses particules.

Individuellement nous avons vu Fig. 4.2 que le diamètre des particules avait un impact sur la vitesse de focalisation de celles-ci. Cela est vrai en fonction de la fréquence mais également en fonction de l'énergie acoustique. Nous montrons sur la Fig. 6.5 l'évolution de la vitesse de focalisation en fonction de l'énergie acoustique pour trois diamètres de particules de polystyrène.

L'influence du diamètre est très nette. Une particule de 40 μm migrera plus vite (jusqu'à 1367 $\mu m.s^{-1}$) vers le nœud de pression qu'une particule de 25 μm (jusqu'à 498 $\mu m.s^{-1}$) qui elle-même atteindra ce nœud de pression plus rapidement qu'une particule de 10 μm (jusqu'à 108,7 $\mu m.s^{-1}$). Nous souhaitons savoir si l'on observe la même tendance pour des agrégats de différentes tailles.

6.5 Caractérisation de l'agrégat

Chaque agrégat a un diamètre que nous mesurons dans le plan de lévitation D_{ag} . Les agrégats ont la forme de disques plus ou moins circulaires. Nous entendons par cela le fait que les particules ne s'agrègent pas à l'agrégat de façon isotrope. On observe des "axes" d'agrégation qui peuvent former des agrégats s'apparentant à des ellipses. C'est pour cela que pour définir le diamètre de l'agrégat D_{ag} nous établissons D_h et D_v les diamètres horizontal et vertical qui passent par le centre de l'agrégat respectivement. Le lien entre D_{ag} et les termes D_h et D_v sont :

$$D_{ag} = \frac{D_h + D_v}{2} \tag{6.3}$$

Nous obtenons ainsi 7 diamètres d'agrégats répartis en 3 groupes, chaque groupe étant défini par la taille des particules qui composent ces agrégats. Nous avons :

- 2 agrégats de particules de diamètre $d_p = 10 \ \mu m$: $D_{ag} = 42 \ \mu m$ et 457 μm ,
- 3 agrégats de particules de diamètre $d_p = 25 \ \mu m$: $D_{ag} = 60,5 \ \mu m$, 141 μm et 502 μm ,
- 2 agrégats de particules de diamètre $d_p = 40 \ \mu m$: $D_{ag} = 103 \ \mu m$ et 434 μm .

6.6 Influence de la taille de l'agrégat

On travaille maintenant avec des agrégats de particules identiques. En fonction du diamètre des particules utilisées pour constituer l'agrégat, on pourra avoir un nombre plus ou moins important de particules constituants l'agrégat.

6.6.1 Agrégats de particules de 10 μm



FIGURE 6.6 – Vitesse de focalisation de deux agrégats de tailles différentes en fonction de l'énergie acoustique injectée dans le système. Les agrégats sont composés de particules de 10 μm de polystyrène. Nous avons inclus la focalisation d'une particule de polystyrène de 10 μm isolée.

Nous avons comparé la vitesse de focalisation de deux agrégats de tailles différentes à celle d'une particule individuelle. Dans tous les cas, des particules de 10 μm de diamètre ont été utilisées. Les mesures ont été faites à différentes densités d'énergie acoustique (Fig .6.6).

Le premier agrégat a un diamètre de 42 μm tandis que le second a un diamètre de 457 μm . Les vitesses de focalisation de la particule isolée et du petit agrégat sont très proches. En revanche la vitesse de focalisation du grand agrégat est très nettement supérieure aux autres. On observe une augmentation drastique de la vitesse

de focalisation liée à la taille de l'agrégat. On a un facteur multiplicatif de 23 entre les vitesses de focalisation du petit agrégat de 42 μ m et celles du grand agrégat de 457 μ m.



6.6.2 Agrégats de particules de 25 μm

FIGURE 6.7 – Vitesse de focalisation de 3 agrégats de tailles différentes en fonction de l'énergie acoustique injectée dans le système. Tous les agrégats sont composés de particules de 25 μm de polystyrène. Une particule de polystyrène de 25 μm focalise seule pour référence.

Nous avons effectué le même processus pour de 3 agrégats de différentes tailles composés de particules de 25 μm (Fig. 6.7). Nous avons mesuré les vitesse d'un agrégat de 60,5 μm de diamètre, de 141 μm de diamètre et de 502 μm de diamètre. Nous avons également mesuré la vitesse d'une particule de 25 μm isolée pour avoir une référence.

L'agrégat de 60 μm focalise légèrement plus rapidement que la particule individuelle. Pour ce qui est du cas des agrégats de 192 et 585 μm de diamètre on a une vitesse de focalisation qui augmente drastiquement. Cette différence de vitesse de focalisation avec la particule individuelle est d'autant plus importante que l'énergie acoustique est grande, atteignant jusqu'à 5000 $\mu m.s^{-1}$ pour 30 $J.m^{-3}$).

La taille de l'agrégat a donc bien un impact sur la vitesse de focalisation des particules qui composent cet agrégat. Il est clair que des effets collectifs majeurs apparaissent au-delà d'une taille d'agrégat critique, autour de 100 μm .

Cela pourrait également être associé à un nombre de particules contenues dans l'agrégat qui se situerait entre 8,64 et 88,47 particules composant cet agrégat.

6.6.3 Agrégats de particules de 40 μm

Nous avons également mesuré la vitesse de focalisation d'agrégats de particules de 40 μm . Deux agrégats ont été formés. L'un possède un diamètre de 103 μm et le second un diamètre de 434 μm . Les résultats sont présentés sur la Fig. 6.8.

De la même façon que pour les agrégats de particules de 10 μm et 25 μm , on observe une augmentation de la vitesse de focalisation à mesure que la taille de l'agrégat augmente. L'effet est moins spectaculaire que pour de plus petites particules car


FIGURE 6.8 – Vitesse de focalisation de deux agrégats de tailles différentes en fonction de l'énergie acoustique injectée dans le système. Les agrégats sont composés de particules de 40 μm de polystyrène. La vitesse d'une particule de polystyrène de 40 μm isolée est ajoutée pour référence

la vitesse d'une grosse particule est déjà très importante. Cependant on voit un effet net à partir de 20 $J.m^{-3}$, ce qui semble confirmer que la taille critique à partir de laquelle la focalisation est accélérée se situe autour de 100 μm .

6.7 Caractérisation des différents régimes de focalisation acoustique

Maintenant que nous avons quantifié les vitesses de focalisation des agrégats et mis en évidence l'augmentation de cette dernière avec l'augmentation de la taille de l'agrégat, nous nous intéressons aux différents régimes de focalisation. Lors de nos observations de focalisation acoustique d'agrégats nous avons observé trois comportements distincts que nous illustrons sur la Fig. 6.9 :

- l'agrégat focalise vers le nœud de pression en gardant sa forme de disque dans le plan (x,y). Cette observation est faite pour de petits agrégats (inférieurs à 100 μm de diamètre) et composés de petites particules (inférieures à 40 μm de diamètre) pour une gamme de densités d'énergie acoustique allant de 7 $J.m^{-3}$ à 80 $J.m^{-3}$.
- l'agrégat subit un réarrangement lors de sa remontée. Les particules focalisent sous la forme d'une colonne, les unes derrière les autres. On a ainsi des particules focalisant "en tête" suivies dans leur sillage des autres particules. Les particules sont toujours en contact les unes des autres. Arrivées dans le plan de focalisation les particules vont se repositionner les unes à côté des autres et reformer ce qui s'apparente à un ellipsoïde.
- l'agrégat se divise en plusieurs agrégats de plus petite taille qui vont focaliser jusqu'au nœud de pression avant de se réassembler afin de former de nouveau un agrégat unique dans le plan de focalisation.



FIGURE 6.9 – Les différents régimes de focalisation acoustique d'un agrégat de particules de 25 μm de diamètre. Chaque image a été prise lorsque l'agrégat arrive dans le plan de focalisation. a) Le premier régime correspond à une focalisation acoustique où l'agrégat garde sa forme initiale, celle d'un "discoïde". b) Dans le second régime l'agrégat remonte sous forme de colonne, les particules étant dans le sillage les unes des autres. c) Le troisième régime correspond à une focalisation acoustique où l'agrégat se divise en plusieurs parties. Ces parties vont se réassembler entre elles une fois arrivées dans le plan de focalisation.



FIGURE 6.10 – Les différents régimes de focalisation acoustique d'agrégats en fonction du nombre de Reynolds de focalisation acoustique. La structure des agrégats est présentée grâce à des vues de dessus et de côté. On observe trois régimes : une focalisation sous forme de disque pour $Re_{ac} \leq 0,015$, une focalisation en colonne pour $0,015 \leq Re_{ac} \leq 0,50$ et un split de l'agrégat pour $Re_{ac} \geq 0,050$.

Dans le dernier cas cité les agrégats font au minimum 100 μm de diamètre allant jusqu'à 500 μm de diamètre pour les plus gros. Nous avons donc des agrégats qui s'étendent sur une grande surface. Or précédemment nous avons précisé que la densité d'énergie acoustique était locale dans le plan (x,y). Cela implique qu'à même hauteur z les particules ne subissent pas la même densité d'énergie acoustique suivant leur position dans l'agrégat et donc migreront avec des vitesses différentes. Cela peux donc se traduire par un éloignement croissant des particules entre elles et par conséquent une rupture de l'agrégat en multiples "fragments", chaque "fragment" étant composé d'un nombre de particules plus ou moins variable.

Une seconde explication peut être une analogie avec le comportement observé lors de sédimentation d'agrégats, comme illustré sur la Fig. 6.1). Les agrégats de particules se sépareraient de la même façon et la composante radiale de la force acoustique forcerait les petits agrégats ainsi formés à se rassembler dans le plan de lévitation.

Après avoir mesuré le nombre de Reynolds de focalisation acoustique Re_{ac} pour chacune de ces configurations nous avons pu résumer le scénario de passage d'un régime à un autre en fonction de Re_{ac} sur la Fig. 6.10.

En dessous de $Re_{ac} \approx 0,015$ l'agrégat focalise sous sa forme initiale, celle d'un disque. Au-delà de $Re_{ac} \approx 0,015$ et jusqu'à $Re_{ac} \approx 0,050$, celui-ci se réarrange sous la forme d'une colonne de particules. Les premières focalisent vers le nœud de pression suivies dans leur sillage par le reste de l'agrégat, les particules étant toujours en contact les unes avec les autres. Enfin, au-delà de $Re_{ac} \approx 0,050$ l'agrégat se fragmente en de nombreux morceaux, chaque morceau étant composé de plusieurs particules, avant de se reformer dans le plan de focalisation sous l'effet de la composante radiale de la force acoustique.

6.7.1 Porosité des agrégats

Enfin, nous avons cherché à calculer la porosité des différents agrégats cités précédemment afin d'évaluer son rôle dans la dynamique de focalisation des agrégats. La porosité φ se définit comme :

$$\varphi = \frac{A_{pores}}{A_{ag}} \tag{6.4}$$

avec A_{pores} la surface occupée par les pores et A_{ag} la surface totale de l'agrégat respectivement.



FIGURE 6.11 – Reynolds de focalisation acoustique en fonction de la porosité de l'agrégat. Pour les faibles Reynolds on a des agrégats qui focalisent sous forme de disque. Cette région s'étend sur une grande gamme de porosités. Pour les hauts Reynolds on a une région plus concentrée correspondant à une division de l'agrégat lors de sa remontée. On se situe sur des porosités faibles en comparaison du dernier régime dans lequel l'agrégat focalise en colonne.

La surface de l'agrégat A_{ag} a été mesurée via le logiciel ImageJ. Nous quantifions A_{pores} en comptant le nombre de particules présentes dans l'agrégat étudié puis nous calculons la surface solide de l'agrégat A_{sol} . Cette surface se définit comme :

$$A_{sol} = \pi \left(\frac{d_p}{2}\right)^2 N_p \tag{6.5}$$

avec N_p le nombre de particules et d_p le diamètre d'une particule.

Enfin A_{pores} est la différence entre la surface de l'agrégat A_{ag} et la surface solide de l'agrégat A_{sol} occupée par les particules :

$$A_{pores} = A_{ag} - A_{sol} \tag{6.6}$$

La configuration optimale pour empilement de disques sur une surface est de $A_{sol-max} = 0,9069$. La porosité minimale d'un agrégat est donc $A_{pores-min} = 0,0931$.

Grâce à cela nous avons tracé le Reynolds de focalisation acoustique en fonction de la porosité (Fig. 6.11).

Nous pouvons distinguer trois régimes pour la dynamique de focalisation des agrégats dans ce que l'on peut considérer comme un diagramme de phase :

- Le premier régime correspond à des Reynolds de focalisation acoustique faibles ($Re_{ac} \le 0,015$) et qui est très étalé dans le diagramme. Cela correspond à des agrégats focalisant sous l'apparence de disques qui restent cohérents. On a une grande variation de la porosité pour ce même régime allant de $\varphi = 0,1075$ à $\varphi = 0,2617$.
- Le second régime se situe à des Re_{ac} compris entre 0,015 et 0,050 mais cependant possède une porosité élevée variant entre 0,185 et 0,284. Dans cette configuration l'agrégat focalise en colonne.
- Enfin le troisième régime, à des $Re_{ac} \ge 0,050$, correspond à une division de l'agrégat. La porosité est moindre que dans le second régime (entre $\varphi = 0,1078$ et $\varphi = 0,211$).

On note une frontière très proche entre le second et le troisième régime. C'est une observation que nous avons fait lors des expériences. Dans les mêmes conditions, à une densité d'énergie acoustique donnée, un agrégat pouvait focaliser en colonne une fois puis la seconde fois se séparer en 2 morceaux distincts, suggérant une transition dans le diagramme de phase.

On remarque également une grande variation de la porosité pour les agrégats focalisant sous forme de disque, mais seulement si le nombre de Reynolds ne dépasse une valeur critique $Re_{ac} \leq 0,02$. On observe une porosité élevée et des nombres de Reynolds intermédiaires pour les agrégats remontant en colonne. Enfin pour les nombres de Reynolds les plus élevés et une porosité comprise entre 0,1078 et 0,211, on observe des agrégats qui se séparent en plusieurs morceaux.

6.8 Conclusion

La dynamique de focalisation d'objets individuels est la plus communément étudiée. Cependant dans la réalité nous observons souvent des objets collectifs. C'est particulièrement vrai lorsque l'on manipule des agrégats cellulaires. Dans le cas de particules regroupées dans le plan de focalisation, celles-ci forment un agrégat d'apparence discoïde. Plus le nombre de particules contenues dans l'agrégat est important, plus son diamètre augmente. Nous avons montré qu'un agrégat de grande taille décuple la vitesse de focalisation des particules qui le composent. Cette augmentation drastique de la vitesse de focalisation est un résultat que nous allons chercher ensuite à exploiter dans le dernier chapitre afin d'optimiser au mieux l'efficacité de reconcentration de particules dans des canaux. Il est important de souligner une autre conséquence importante de ce résultat, à savoir le bénéfice énergétique. En effet, on peut constater que la vitesse de focalisation acoustique peut être augmentée d'un facteur proche de 23 lorsque l'agrégat atteint une taille critique. Cela veut dire que l'on peut s'attendre à une bien plus grande efficacité de la force acoustique pour des suspensions denses, contrairement à ce que l'on pouvait penser. Cela peut se révéler déterminant pour des applications industrielles puisque cela impliquerait d'utiliser moins d'énergie, tout en limitant les risques de dissipation thermique.

Un second point important observé est la différence de comportement d'un agrégat lors de sa remontée en fonction de sa taille et de sa vitesse. Pour les petits agrégats focalisant lentement, ceux-ci vont focaliser sous forme de disque. Une seconde forme est celle d'une colonne de particules tandis que pour les gros agrégats focalisant à grande vitesse on observera une division de ces derniers en de multiples agrégats de petite taille.

Le parallèle avec la sédimentation de nuages de particules a été faite et a permis via l'introduction du Reynolds de focalisation acoustique de quantifier le passage d'un régime à un autre.

Une étude de la porosité dans les différents régimes a également montré une variation de cette dernière. Les agrégats en régime de "disque" possèdent une porosité très variable. Dans le régime "colonne" les agrégats ont une grande porosité, celle-ci diminuant lorsqu'on passe au régime de "split".

La dynamique de focalisation d'agrégats est extrêmement complexe. Cependant cela pourrait être une alternative pertinente pour la caractérisation de cellules très petites et qui sont impossible à isoler. La focalisation sous forme de disque, régime le plus simple à étudier, serait intéressant à approfondir afin d'en déduire les propriétés des particules qui le composent et à terme de cellules aussi petites que des plaquettes.

Chapitre 7

Influence du plasma sanguin

7.1 Introduction

L'objectif initial d'Aenitis est de proposer à des clients professionnels un processus de tri cellulaire efficace : séparer les plaquettes du reste du sang et concentrer les plaquettes (concentrés plaquettaires - CP) contenues dans le PRP (Plama Riche en Plaquettes). Aenitis a décidé de commencer par l'étape de reconcentration du PRP en CP. Ces plaquettes sont issues de PRP produit par centrifugation douce (low spin) du sang total pour ne pas activer les plaquettes, l'activation de plaquettes étant due à des cisaillements importants ayant lieu dans la suspension.

Les plaquettes sont de très petites cellules (2 μ *m*) ayant un faible facteur de contraste acoustique et donc difficilement manipulables. Par ailleurs, le plasma est un fluide complexe, contenant de nombreuses protéines, débris cellulaires, microvésicules, facteurs de coagulation, hormones, entre autres. Cette application n'est donc pas nécessairement la plus facile.

C'est dans ce contexte et afin d'améliorer les rendements de reconcentration que nous nous sommes intéressés au comportement des plaquettes dans du plasma sanguin soumis à l'acoustique, mais aussi au plasma sanguin sans plaquettes.

7.2 Méthodes expérimentales

Pour ces expériences nous voulons faire une observation de la réponse des plaquettes et/ou du plasma à une stimulation acoustique. Il faut donc un environnement bien contrôlé, sans écoulement, et permettant une observation dans des conditions optimales. En effet, nous allons chercher à observer des plaquettes qui, même marquées avec un marqueur fluorescent, restent difficiles à observer.

Nous allons donc utiliser la cavité cylindrique en aluminium de 330 μm de hauteur présentée dans le Ch. 3. Nous utiliserons le montage avec le microscope à réflexion, équipé de la caméra PCO Panda Bi et les filtres optiques adaptés au marqueurs fluorescents, quand nécessaire.

7.3 Premières observations

Lors de nos différentes tentatives de reconcentration du Plasma Riche en Plaquettes (PRP), nous avons observé de multiples phénomènes empêchant une bonne reconcentration. Contrairement aux cellules qui se concentrent en un point local, les plaquettes, lorsqu'elles sont dans le plasma sanguin, focalisent très lentement et sont sensibles au streaming acoustique ce qui a pour conséquence de les déplacer dans une large portion de la cavité.



FIGURE 7.1 – Création d'un agrégat de plaquettes au cours du temps. Les plaquettes sont dans le plan de focalisation et se déplacent vers un point local dans le plan (x,y). L'agrégat croît entre a) 1 *min*, b) 2 *min*, c) 10 *min*, d) 20 *min*.

L'utilisation de hautes fréquences ou d'une cavité de dimensions réduites permet, comme cité précédemment, de réduire cet effet de streaming.

Cependant toutes les observations réalisées avec des plaquettes dans du plasma montrent des mouvements conjoints des particules et du plasma, avec des mouvements grandes échelles complexes et difficiles à maîtriser.

Par ailleurs, il n'est pas possible de mesurer la vitesse de focalisation axiale des plaquettes car le signal émis par les plaquettes marquées est très faible et ne permet pas de distinguer un anneau d'Airy. Nous allons donc procéder différemment.

7.4 Influence du plasma sur la vitesse d'agrégation des plaquettes dans le plan de lévitation

7.4.1 Principe

Les différentes observations réalisées nous ont amenées à penser que le plasma, et plus particulièrement les protéines présentes dans le plasma sanguin réagissent aux ultrasons. Parmi les protéines du sang, on pense en particulier à l'albumine qui est la principale protéine (60 %) dans le plasma sanguin (AL-HARTHI et al., 2019). Pour justifier notre hypothèse, nous avons donc effectué des tests d'agrégation de plaquettes dans la cavité cylindrique.

Pour justifier notre hypothèse et comme nous ne pouvons mesurer la vitesse de focalisation des plaquettes, nous utilisons la force de radiation acoustique transverse $\vec{F_T}$. La composante radiale de la FRA permet en effet aux cellules dans le plan de focalisation de se regrouper localement et ainsi de former un agrégat. Ainsi plus des cellules migrent rapidement vers le nœud de pression, plus la formation d'un agrégat sera rapide. A l'inverse, des cellules qui focalisent lentement, en raison

d'un faible facteur de contraste acoustique, prendront un certain temps pour former un agrégat. En mesurant la taille de l'agrégat au cours du temps, pour une même concentration donnée, on est donc capable de comparer la réponse acoustique des plaquettes suivant les propriétés du milieu.

Un exemple de formation d'agrégat plaquettaire est montré sur la Fig. 7.1. On peut voir les mouvements collectifs de bandes de plaquettes qui convergent vers la zone d'agrégation (Fig. 7.1. a)). L'agrégat central grossit progressivement avant de former, après une vingtaine de minutes, un gros agrégat plaquettaire entouré de plasma fortement appauvri en plaquettes (Fig. 7.1. d)).

Sur la Fig. 7.2, nous avons tracé l'évolution de la surface d'un agrégat de plaquettes en fonction du temps.



FIGURE 7.2 – Evolution de la surface d'un agrégat de plaquettes en mm^2 au cours du temps.

On voit que cette évolution se fait en 2 temps : Une première d'environ 200 s où on a une augmentation drastique de la surface de l'agrégat puis une seconde augmentation, moins accentuée, qui est linéaire. Cette première phase s'explique par l'agrégation massive de plaquettes tout autour de la zone d'agrégation. Durant les premières secondes les plaquettes migrent vers l'agrégat de façon isotrope. Cela a pour effet d'augmenter drastiquement la surface de ce dernier. Puis une fois que les toutes plaquettes d'un certain rayon autour de l'agrégat ont été captées, on observe des axes d'agrégation. Le champ acoustique étant inhomogène dans le plan (x,y) les plaquettes ne vont plus se déplacer de façon isotrope mais en suivant des lignes de courant spécifiques. Nous avons donc l'agrégat qui est alimenté par un ou deux axes qui amènent les plaquettes de façon continue et régulière. La surface de l'agrégat continuera à augmenter avec cette tendance linéaire tant que des plaquettes seront emportées par ces axes.

Pour quantifier notre observation et discriminer l'effet des plaquettes et de l'albumine, des tests avec différentes concentrations de plaquettes, mais aussi d'albumine (bovine serum albumin ou BSA) ont été effectués. Les échantillons originaux que nous avons utilisés pour faire nos mélanges contiennent une concentration de PRP de 365 $.10^3$ plaquettes. μL^{-1} , du Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP) pur et du PPP avec de l'albumine à 320 $g.L^{-1}$.

Six échantillons ont été préparé à partir de ces 3 échantillons originaux :

- $-\frac{1}{2} PRP + \frac{1}{2} PPP pur;$ $-\frac{1}{3} PRP + \frac{2}{3} PPP pur;$

 $-\frac{1}{4}$ PRP + $\frac{3}{4}$ PPP pur;

 $-\frac{1}{2}$ PRP + $\frac{1}{2}$ PPP avec albumine;

- $-\frac{1}{3}$ PRP + $\frac{2}{3}$ PPP avec albumine;
- $-\frac{1}{4}$ PRP + $\frac{3}{4}$ PPP avec albumine.

Si nous ajoutons l'échantillon de PRP pur, nous avons donc 7 échantillons à analyser.

7.4.2 Influence de l'albumine



FIGURE 7.3 – Formation d'agrégats plaquettaires en fonction de la concentration d'albumine après 20 *min* d'attente. On a des échantillons contenant respectivement : a) 40 $g.L^{-1}$, b) 180 $g.L^{-1}$, c) 227 $g.L^{-1}$ d) 250 $g.L^{-1}$

Une fois l'échantillon injecté dans la cavité, on active l'émission des ultrasons et on attend 20 *min*. Les plaquettes se mettent en mouvement et, éventuellement, se déplacent vers le plan de focalisation et s'agrègent. Pour quantifier l'impact de l'albumine, nous allons mesurer la surface d'agrégation obtenue au cours du temps en fonction des différents échantillons $S_{plat}(t)$.

Nous montrons sur la Fig. 7.3) une visualisation dans le plan de lévitation après 20 *min* sous ultrasons.

L'échantillon de PRP pur, très réactif, donne un agrégat massif $(3,6 mm^2)$ du à la réaction des plaquettes à l'acoustique. En augmentant la concentration d'albumine, le comportement des plaquettes change drastiquement. Avec une dilution de seulement $\frac{1}{2}$ / $\frac{1}{2}$, les plaquettes sont fortement ralenties et prennent beaucoup de temps pour s'agréger. Cette observation est confirmée lorsque nous augmentons la concentration d'albumine. Pour l'échantillon $\frac{1}{4}$ / $\frac{3}{4}$, aucun agrégat n'est observé et les plaquettes sont présentes sur une épaisseur importante de la cavité après 20 *min* d'attente.

Lorsque nous diluons nos échantillons, la concentration en plaquettes diminue également. Or nous avons démontré dans la partie précédente que l'agrégation peutêtre fortement accélérée par des effets collectifs. Il est donc important de distinguer les effets de la concentration en albumine des effets de la concentration en plaquettes.



FIGURE 7.4 – Formation d'agrégats de plaquettes en fonction de la concentration cellulaire dans l'échantillon après 20 *min* d'attente. La concentration d'albumine est fixe : 40 *g.L*-1. La concentration de plaquettes est respectivement de : a) 365 .10³ plaquettes. μL^{-1} b) 182,5 .10³ plaquettes. μL^{-1} c) 121,6 .10³ plaquettes. μL^{-1} d) 91,25 .10³ plaquettes. μL^{-1}

7.4.3 Influence de la concentration en plaquettes

Pour être sûr que la faible agrégation observée sur la Fig. 7.3 est une conséquence de l'albumine et non d'une faible concentration de plaquettes, nous avons donc fait les mêmes tests sur des échantillons contenant du PRP et du PPP pur. Les dilutions sont les mêmes.

Les résultats sont montrés sur la Fig. 7.4. Sous l'effet de l'acoustique, les plaquettes se déplacent rapidement pour obtenir de grands agrégats après 20 minutes d'observation. Cependant, on constate que les agrégats ont une surface de plus en plus petite à mesure que la dilution augmente.

7.4.4 Bilan

Afin d'y voir plus clair nous avons rassemblé sur une même figure l'évolution de la surface des agrégats en fonction de la concentration plaquettaire pour les deux cas, avec et sans albumines. Les résultat sont présentés sur la Fig. 7.5.



FIGURE 7.5 – Evolution de la surface d'un agrégat de plaquettes en fonction de la concentration plaquettaire pour deux cas : avec et sans albumine.

On a une diminution de la taille des agrégats lorsqu'on diminue la concentration de plaquettes dans l'échantillon (à concentration d'albumine constante : 40 $g.L^{-1}$). En augmentant la concentration d'albumine on diminue également la taille des agrégats formés. L'albumine a donc un fort impact sur la focalisation acoustique des plaquettes.

Ce résultat est important car il montre que le plasma sanguin, avec sa forte concentration en albumine, ne peut être traité comme un fluide standard. Il possède des propriétés acoustiques spécifiques que nous devons caractériser.

Nous nous sommes donc intéressés à la composition de la protéine d'albumine. Représentant 60 % de la masse des protéines composant le plasma sanguin, l'albumine en est la protéine majeure (AL-HARTHI et al., 2019). Les protéines principales restantes sont les anticorps (appartenant à la famille des immunoglobulines) et la fibrinogène.

7.5 Processus de fabrication des protéines

Pour pouvoir espérer comprendre comment l'albumine a un effet sur la dynamique d'agrégation des plaquettes il nous faut revenir au processus de biosynthèse des protéines.

Une cellule eucaryote possède une membrane plasmique contenant le cytoplasme, un noyau mais également de nombreux organites (aussi appellés organelles). Ces organites ont chacun un rôle, dont parmi eux le noyau, le reticulum endoplasmique (RE) ou encore l'appareil de Golgi.

Le processus de synthèse protéique débute par l'étape de transcription : l'information génétique contenue dans le noyau sous forme d'ADN sera transcrite sous forme d'un ARN séquence nucléique qui sera adressée au réticulum endoplasmique. L'ARN y sera pris en charge par un ribosome qui aura pour rôle de décoder la séquence, 3 acides nucléiques par 3, afin de recruter et d'assembler les acides aminés



FIGURE 7.6 – structure 3D d'une protéine d'albumine humaine (SUGIO et al., 1999)

correspondant au code génétique. Cette étape est appelée traduction. L'enchaînement d'acides aminés, aussi appelé peptide, s'effectuera dans la lumière du RE où la protéine, à ce stade immature, subira des modifications post-traductionnelles afin d'acquérir leur conformation tri-dimensionnelle (Fig.7.6). La protéine pourra ensuite être adressée à l'appareil de Golgi afin d'y subir différents types de modifications post-traductionnelles, ou afin d'être adressée à la membrane plasmique ou encore à l'espace extracellulaire.

Il existe un système de contrôle qualité des protéines produites permettant leur adresse au lysosome en cas de défaut, afin que les protéines y soient dégradées.

L'albumine est une protéine globulaire (forme sphérique et hautement soluble) et représentant plus de la moitié de la quantité protéique contenue dans le serum humain.

Une protéine d'albumine humaine mature possède 585 acides aminés et une masse moléculaire de 66,5 kDa.

Il a été démontré que l'albumine a un rôle majeur dans la pression oncotique et dans le transport de ligands exogènes et endogènes vers des organes tels que le foie, l'intestin, le rein et le cerveau (HE et CARTER, 1992).

Il nous est assez difficile de cibler ce qui dans l'albumine et sous acoustique, entraîne une faible reconcentration des plaquettes. Nous décidons donc d'étudier les propriétés du plasma pour espérer trouver une réponse.

7.6 Mesures de densité et vitesse du son du plasma

Afin de caractériser au mieux le plasma nous avons cherché à déterminer les densité et compressibilité de ce dernier. Pour remonter à cette information nous avons utilisé un densimètre numérique compact DMA 501 Anton Paar (Fig.7.7).

La mesure de densité du plasma se fait via la technologie de densimètre à tube vibrant. Le fluide circule dans un tube en U vibrant à une fréquence donnée grâce à un dispositif électromagnétique. Cette fréquence correspond à la fréquence de résonance du tube sous vide.



FIGURE 7.7 – Technologie de mesure de densité et vitesse du son de Anton Paar. La mesure de vitesse du son se fait par un capteur de mesure tandis que la mesure de densité s'effectue via un tube de forme géométrique U qui oscille. Issu de DirectIndustry

$$\rho_f = A\tau^2 + B \tag{7.1}$$

avec τ la période d'oscillation du tube (RECHBERGER et al., 2019).

Les constantes *A* et *B* sont déterminées en mesurant les périodes d'oscillation du tube avec des fluides connus. Cela permet d'établir une relation linéaire entre densité et période d'oscillation. Une fois ces 2 constantes déterminées, on en déduit la densité inconnue d'un échantillon étudié grâce à la nouvelle période d'oscillation mesurée.

Le densimètre nous a donc permis de mesurer la densité du PRP. En parallèle nous avons fait des mesures de densité de différents échantillons d'eau avec une concentration d'albumine plus ou moins importante (Fig. 7.8).

La densité de l'eau augmente lorsque l'on augmente la concentration d'albumine. On en conclut que c'est également le cas lorsque l'on rajoute de l'albumine dans du plasma.

Cette augmentation en densité dans le plasma sanguin entraîne un facteur de contraste acoustique plus faible pour les plaquettes se situant dans ce dernier. Plus la concentration d'albumine sera importante, plus le plasma sanguin sera dense et plus le facteur de contraste acoustique des plaquettes dans ce milieu sera faible. Tout cela entraîne une diminution de la vitesse de focalisation des plaquettes vers le noeud de pression lorsque ces dernières sont soumises à l'acoustique.

Le densimètre nous donne la densité du fluide mesuré mais nous permet également de mesurer la vitesse du son dans le milieu. Nous avons donc mesuré la vitesse du son dans les échantillons d'eau de concentration d'albumine différents (Fig. 7.9).

De même que la densité augmente avec la concentration d'albumine, la vitesse du son augmente également. On passe de 1482 $m.s^{-1}$ sans ajout d'albumine à 1542 $m.s^{-1}$ pour 250 $g.L^{-1}$ en plus.

Cette augmentation de la densité et de vitesse du son traduisent une diminution de la compressibilité dans le milieu du fait de la relation :

$$\beta_f = \frac{1}{c_f^2 \rho_f} \tag{7.2}$$



FIGURE 7.8 – Densité de l'eau en fonction de la concentration d'albumine présente dans l'échantillon.



FIGURE 7.9 – Vitesse du son dans de l'eau en fonction de la concentration d'albumine présente dans l'échantillon.

Une diminution de la compressibilité entraîne une augmentation du facteur de contraste acoustique des cellules et donc une meilleure dynamique de focalisation. Cependant ce n'est pas le cas ici. On peut en conclure que la variation de densité a un impact plus important sur le changement du facteur de contraste acoustique que la variation en densité. En connaissant ce résultat, il serait dans notre intérêt de réduire au maximum le taux d'albumine dans le plasma sanguin afin de favoriser la dynamique de focalisation des plaquettes et donc d'améliorer notre taux de reconcentration de plaquettes. Il existe des filtres à protéines qui pourraient purifier le plasma sanguin cependant une sous concentration d'albumine étant utile pour transporter des hormones ou encore des enzymes dans l'organisme. De plus il est important de ne pas altérer les propriétés du plasma récupéré en bout de chaîne de production des produits sanguins labiles. C'est en effet le produit le plus valorisé par l'EFS car vendu pour fabriquer des médicaments dérivés du plasma.

7.7 Conclusion

Ici nous avons mis en évidence l'impact du fluide sur la vitesse de focalisation de cellules soumises à l'acoustique. Nous avons utilisé du plasma sanguin avec un taux d'albumine variable. A mesure que l'on augmente ce taux d'albumine le diamètre d'un agrégat formé par l'accumulation de plaquettes diminue pour un même délai temporel donné. On note également une diminution du diamètre de l'agrégat lorsqu'on diminue la concentration de plaquettes. Pour justifier l'impact de l'albumine sur la formation des agrégats et donc la vitesse de focalisation des plaquettes nous avons mesuré à l'aide d'un densimètre les vitesses du son et densités d'échantillons d'eau composés de différents taux d'albumine. A mesure que l'on ajoute de l'albumine, la vitesse du son dans l'échantillon augmente ce qui se caractérise par une augmentation de la densité de l'échantillon. On a donc une différence de densité réduite entre le milieu et les plaquettes et donc un facteur de contraste acoustique faible qui se traduit par une faible vitesse de focalisation des plaquettes.

Chapitre 8

Reconcentration des cellules

8.1 Introduction

L'étude de la dynamique des cellules dans un canal est étudiée depuis longtemps. Dans le corps on retrouve cette configuration avec la circulation du sang dans les vaisseaux sanguins. On parle alors d'hémodynamique. Il s'agit d'un écoulement particulièrement complexe puisque le plasma transporte les cellules sanguines et plus particulièrement les globules rouges (GR) en grande quantité. La spécificité de ces écoulements est la haute fraction volumique de GRs transportés. La fraction volumique de GR, l'hématocrite, noté Ht, varie entre Ht = 40 % et Ht = 50 %, en fonction de l'âge, du sexe et de l'état de santé de l'individu. De telles fractions volumiques ne sont accessibles que grâce à la déformation des GRs. La déformation des globules soumis aux lignes de courant du fluide lors de leur migration vers le centre du vaisseau a ainsi été étudiée par DANKER, VLAHOVSKA et MISBAH, 2009.

Les globules peuvent prendre différentes formes : on parle de tank-treading (FISCHER, STOHR-LISSEN et SCHMID-SCHONBEIN, 1978) lorsque la membrane se déforme allongeant le globule ou de mouvement de tumbling lorsque celui-ci tourne sur luimême. Dans un profil de Poiseuille les globules prennent une forme de parachute (KAOUI, BIROS et MISBAH, 2009).

Une observation intéressante faite par Poiseuille est l'absence de cellules proche des parois des vaisseaux. Cette zone est appelée "free-cell layer" et est responsable d'une diminution de la viscosité dynamique du sang.

Cette évolution de la viscosité se nomme l'effet Fahraeus-Lindqvist (FAHRAEUS et LINDQVIST, 1931). Cet effet est du à la migration des globules rouges vers le centre du vaisseau ce qui crée deux phases dans l'écoulement : la région centrale de l'écoulement qui contient tous les globules rouges et du milieu tandis que la région périphérique n'est composée que de milieu (plasma) et de plaquettes (COKELET et GOLDSMITH, 1991). La raison pour laquelle les globules rouges migrent vers le centre du vaisseau est une conséquence d'interactions hydrodynamiques cellule-paroi et d'interactions cellules-cellules qui dispersent les globules rouges (GOLDSMITH, 1971).

La "free-cell-layer" sert de lubrifiant, réduisant la viscosité effective du sang et permettant au sang de s'écouler de façon fluide même à des hématocrites élevés.

Plusieurs études ont cherché à mesurer l'épaisseur de cette free-cell layer de façon numérique (FEDOSOV et al., 2010) ou expérimentale (KIM et al., 2007a; MAEDA et al., 1996). Cette épaisseur dépend du diamètre du canal, du taux d'hématocrite et du débit.

L'effet Fahraeus-Lindqvist conduit a un second effet : la margination. Lorsque les globules rouges migrent vers le centre du canal, la fraction volumique locale augmente. Cela a pour conséquence d'éjecter les autres types cellulaires tels que les globules blancs ou plaquettes vers les parois (GOLDSMITH et SPAIN, 1984; KUMAR et GRAHAM, 2012; KRÜGER, 2016), comme illustré sur la Fig. 8.1. On obtient donc une



FIGURE 8.1 – Illustration du phénomène de margination des plaquettes pour différents diamètres de vaisseaux sanguins. On peut clairement voir les plaquettes (jaunes) se concentrer vers la paroi du vaisseau au niveau de la Free-Cell-Layer. Illustration obtenue par simulation Lattice-Boltzmann (KRÜGER, 2016).

augmentation de la concentration en globules rouges au centre du vaisseau tandis que la concentration en plaquettes augmente près des parois.

Ces phénomènes qui apparaissent spontanément dans les vaisseaux sanguins, à haute fraction volumique, pourraient être des atouts qui pourraient être utilisés pour favoriser la séparation entre les globules et les plaquettes dans un canal acoustofluidique avec des concentrations de cellules élevées.

Il est à noter que des tests de séparation globules rouges/plaquettes par le phénomène de margination ont déjà été tentés et se sont révélés concluants (GEISLINGER et al., 2012). Un effet de lift à faible nombre de Reynolds entraîne une migration perpendiculaire à l'écoulement d'objets non symétriques comme prédit par Olla et al. (OLLA, 1997).

L'ajout de l'acoustique pour accélérer et accentuer ce phénomène (margination forcée par acoustique) nous permettrait d'avoir des résultats que nous pensons prometteurs.

Jusqu'ici nous avons étudié les positions et vitesses de particules et cellules soumises à l'acoustique dans un micro-canal, quantifié la réaction de ces dernières en mesurant le facteur de contraste acoustique, observé les effets de focalisation collective versus individuelle et enfin mis en évidence l'impact du milieu sur la reconcentration.

Avec toutes ces informations maintenant en notre connaissance nous avons cherché à proposer une alternative à la configuration de canal dite "classique" afin d'améliorer les taux de reconcentration de particules/cellules ce qui permettrait, en toute logique, d'augmenter le débit dans le canal et donc de traiter des volumes de cellules plus importants et plus rapidement, cette demande étant la plus discutée. Nous proposons donc ici deux configurations originales qui nous paraissent théoriquement pertinentes à étudier, puis nous comparons leurs taux de reconcentration à puissances et débits donnés par rapport à la configuration de canal "classique".

8.2 Canal Multinœuds en cascade

8.2.1 Configuration Multinœuds

La configuration mononœud est la plus classique dans l'usage de l'acoustophorèse. Il existe cependant un autre configuration, le multinœuds, qui est moins utilisée. Dans cette configuration on observe deux nœuds ou plus distribués sur la hauteur du canal. En conséquence, les particules peuvent focaliser à plusieurs hauteurs (Fig. 8.2).



FIGURE 8.2 – Schéma multinœuds. Nous avons créé deux nœuds dans le canal en appliquant une fréquence deux fois plus élevée que la fréquence de résonance correspondant à la hauteur du canal. Nous obtiendrons ainsi 4 nœuds si nous appliquons une fréquence de 4 *MHz* dans un canal de hauteur 750 μm .

Pour créer ces configurations, deux méthodes peuvent être appliquées : utiliser un transducteur avec une fréquence deux fois plus importante sur le canal de dimensions identiques ou bien dimensionner un canal deux fois plus épais en gardant la même fréquence de résonance. Ainsi dans un canal de 750 μm , on obtient deux nœuds si on utilise un transducteur 2 *MHz* et quatre nœuds si on utilise un transducteur 4 *MHz*.

Dans un premier temps nous nous intéressons à la hauteur de focalisation de particules de polystyrène lorsque nous appliquons une fréquence de 4 *MHz* à un canal de 400 μm puis une fréquence de 4 *MHz* à un canal de 750 μm .

Configuration à deux nœuds

Dans la configuration présentée ici, la fréquence du transducteur est 2 fois plus grande que la fréquence de résonance du canal (1 *MHz*). Le canal est en PMMA, comme présenté dans le Ch. 3, avec une hauteur de 750 μm . L'observation se fait à travers la paroi du canal à l'aide du microscope inversé. La position des nœuds est repérée pour chaque fréquence en faisant la mise au point sur les particules stabilisées dans le plan de lévitation.

En général deux nœuds sont observés comme on peut le voir sur la Fig. 8.3, mais parfois un seul nœud ou trois nœuds sont repérés. On constate également que l'on



FIGURE 8.3 – Position de focalisation de particules de 20 μm de polystyrène en fonction de la fréquence. On observe 2 nœuds de focalisation pour une fréquence donnée. En se déplaçant vers les basses fréquences les nœuds se déplacent vers la paroi adjacente au transducteur. A l'inverse vers les hautes fréquences les nœuds se déplacent vers la paroi opposée au transducteur. Lorsqu'un nœud disparaît sur une des parois, un nouveau nœud apparaît sur la paroi opposée.

retrouve l'évolution de la position axiale des plans de lévitation en fonction de la fréquence, de façon comparable à ce que nous avons décrit dans le Ch. 4. Autour de 2 *MHz*, les nœuds sont situés environ à $\frac{1}{3}$ et $\frac{2}{3}$ de la hauteur du canal. En diminuant la fréquence, les nœuds se déplacent vers la paroi adjacente au transducteur. Et en augmentant la fréquence les nœuds se déplacent vers la paroi opposée. A 2,15 *MHz*, lorsque le nœud inférieur atteint cette paroi, un nouveau nœud apparaît sur la paroi adjacente. Il devient le nouveau nœud supérieur et sa position se déplace vers le centre du canal lorsque nous augmentons la fréquence.

Configuration à quatre nœuds

Comme dit précédemment nous pouvons également créer 4 nœuds dans le canal. En utilisant un transducteur 4 *MHz* appliqué au canal de 750 μm , nous obtenons cette configuration. L'évolution de la position des nœuds en fonction de la fréquence est illustrée sur la Fig. 8.4.

On observe le même comportement que dans la configuration à deux nœuds. En diminuant la fréquence, les nœuds se déplacent vers la paroi adjacente tandis qu'en augmentant la fréquence, les nœuds se déplacent vers la paroi opposée. Enfin, lorsqu'un nœud disparaît, un nouveau nœud apparaît sur la paroi opposée.



FIGURE 8.4 – Position de focalisation de particules de 20 μm de polystyrène en fonction de la fréquence. On observe jusqu'à 4 nœuds de focalisation pour une fréquence donnée. En se déplaçant vers les basses fréquences les nœuds se déplacent vers la paroi adjacente au transducteur. A l'inverse vers les hautes fréquences les nœuds se déplacent vers la paroi opposée au transducteur. Lorsqu'un nœud disparaît sur une des parois, un nouveau nœud apparaît sur la paroi opposée.

8.2.2 Effet de l'augmentation de la concentration locale sur la vitesse de focalisation

Dans le Ch. 6 sur la focalisation collective, nous avons montré que des particules agrégées entre elles ont une vitesse de focalisation bien plus importante que des particules individuelles isolées. Cependant il s'agit de cas "extrêmes" puisque ce sont des agrégats avec une distance inter-particules très faible. Il existe une situation intermédiaire qui consiste à considérer l'évolution et l'effet de la concentration locale en particules ou cellules. En effet, lorsque les particules migrent vers le nœud de pression lors de leurs transports par l'écoulement, la concentration en particules/cellules va passer d'une distribution homogène en début de canal à une distribution inhomogène avec une diminution de la concentration près des parois et une augmentation dans la région centrale, comme illustré sur la Fig. 8.5 tirée de DRON et al., 2009.



FIGURE 8.5 – Evolution du profil de concentration en particules en aval du transducteur pour différents débits (DRON et al., 2009). On peut clairement voir le passage d'une concentration homogène sur la hauteur du canal (sans acoustique) à une concentration inhomogène, avec un maximum plus ou moins marqué à mi-hauteur du canal.

Dron et al. (DRON, 2011) ont également montré qu'en augmentant la concentration locale de particules, on observe une augmentation de la vitesse de focalisation de ces dernières. Pour cela ils ont défini une épaisseur pour le plan focal et donc son volume. Ce volume possède un nombre initial de particules présentes rassemblées dans cette couche (Fig. 8.6). A chaque instant *t*, le nombre de particules dans ce volume va augmenter lorsque l'acoustique est activée. En mesurant la vitesse à laquelle le nombre de particules augmente au cours du temps, il a été possible d'estimer l'impact de la concentration locale sur la vitesse de focalisaton des particules (Fig. 8.7).

Après expérience, ils obtiennent une vitesse de focalisation plus de 3 fois supérieure pour une concentration de 9 $.10^9 particules.L^{-1}$ comparée aux autres concentrations : entre 0,5 $.10^9 particules.L^{-1}$ et 7 $.10^9 particules.L^{-1}$. La concentration locale a donc pour effet d'augmenter la vitesse de focalisation des particules ou cellules à partir d'une concentration critique (entre $7.10^9 particules.L^{-1}$ et $9.10^9 particules.L^{-1}$ dans leur cas). Ce résultat demandait à être confirmé, mais il semble bien indiquer un effet de la concentration locale sur la dynamique de focalisation, déclenchant un

- Out-of-plane particles
- In-plane particles



FIGURE 8.6 – Schéma du volume illuminé pour étudier l'augmentation du nombre de particules au cours du temps en fonction de la concentration locale. Les particules comprises dans le volume (et donc comptabilisées) sont en rouge tandis que les particules qui n'y sont pas (non comptabilisées) sont en jaune (DRON, 2011)



FIGURE 8.7 – Influence de la concentration locale sur la vitesse de focalisation de particules (ici β_F). Nous n'observons pas de tendance significative avant 7 .10⁹ *particules*.*L*-1. La vitesse de focalisation est relativement constante. Puis, au-delà de 9 .10⁹ *particules*.*L*-1, on a la vitesse de focalisation qui augmente drastiquement (DRON, 2011)



FIGURE 8.8 – Canal multinœuds en cascade. Les cellules se concentrent sur chacun des 4 nœuds de pression le long de la hauteur du canal. Cela augmente la concentration locale permettant aux cellules de réagir plus rapidement à l'acoustique. Ensuite, nous réduisons le nombre de nœuds sur chaque partie du canal pour les amener à mi-hauteur et les collecter dans la sortie centrale.

processus en cascade : l'augmentation de la concentration locale entraîne une augmentation de la vitesse de focalisation, qui accélère l'accroissement de la concentration locale, qui accélère encore la focalisation acoustique.

La raison qui explique l'augmentation de la vitesse de focalisation en fonction de la fréquence semble être la même qui explique l'importante vitesse de focalisation des agrégats : pour de faibles concentrations les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres et ont un comportement individuel. Lorsqu'on augmente la concentration au-delà d'un certain seuil, la force de Bjerknes entre en jeu et accentue la vitesse de focalisation. Nous espérons pouvoir bénéficier de cet effet dans notre montage.

Un autre avantage de cette approche par rapport à une configuration monofréquence est que les régions de captation des particules ou cellules sont plus étroites, donc les distances à parcourir pour atteindre un nœud restent faibles. On peut donc travailler dans un canal plus haut, donc avec un débit plus élevé, tout en collectant le maximum d'objets sur la hauteur du canal.

C'est donc ces phénomènes que nous avons voulu exploiter pour améliorer le processus de reconcentration des cellules. L'idée est de créer de multiples nœuds dans la partie amont du canal pour augmenter la concentration locale à chaque nœud de pression. Puis, successivement, nous diminuons le nombre de nœuds au fur et à mesure que nous avançons dans le canal. Les zones d'agrégation initiales (ici 4 nœuds) devraient alors fortement réagir collectivement à la force acoustique appliquée un peu en aval, sous le second transducteur, avec deux fois moins de nœuds de pression (doublement de la longueur d'onde acoustique).

Dans la partie aval, nous terminons par un nœud de pression unique placé à mi-hauteur du canal en face de la sortie centrale (Fig. 8.8).

Concrètement cela consiste à utiliser trois transducteurs de fréquence différentes



FIGURE 8.9 – Montage de reconcentration multinœuds en cascade.
D'amont en aval nous avons une configuration 4 *MHz-2 MHz-*1 *MHz-1 MHz*. Le canal est placé à l'horizontale. Sur l'image l'écoulement a lieu de gauche à droite.

le long d'un canal droit 1 entrée/3 sorties de sections. La partie amont comportera 4 nœuds, la partie intermédiaire aura 2 nœuds et la partie aval un seul nœud. Nous travaillons avec un canal d'une hauteur de 750 μm , donc un transducteur de 4 *MHz* est placé sur la partie amont, un de 2 *MHz* sur la partie médiane et un de 1 *MHz* sur la partie aval.

En résumé, théoriquement, nous nous attendons à ce que les cellules se déplacent vers les 4 nœuds créés dans la partie amont. La concentration locale augmente sur ces 4 hauteurs. Puis les cellules arrivent dans la partie médiane. Les 4 nœuds de pression passent à 2 lorsque les cellules s'y déplacent. Leurs déplacements sont plus rapides à cause de l'augmentation de la concentration locale. Dans les nouveaux 2 nœuds, la concentration locale a encore augmenté. Nous répétons ce comportement avec la partie aval où toutes les cellules se déplacent vers l'unique nœud de pression, au centre du canal. Ensuite, les cellules sont collectées dans la sortie centrale.

Nous avons mis en pratique ce système de reconcentration pour des particules de 5 μ m à 3 débits différents : 0,5 $mL.min^{-1}$, 1,0 $mL.min^{-1}$, 1,5 $mL.min^{-1}$. Dans notre configuration nous utilisons un canal à l'horizontale et 4 transducteurs (Fig. 8.9). D'amont en aval nous avons des transducteurs 4 MHz-2 MHz-1 MHz-1 MHz qui se traduisent par une configuration 4 nœuds - 2 nœuds- 1 nœud.

Sur la Fig. 8.10, nous avons mesuré l'épaisseur de reconcentration des particules en aval des 4 transducteurs. Pour cela le microscope inversé a été utilisé. Chaque ligne représente une extrémité de l'épaisseur de reconcentration pour 0,5 $mL.min^{-1}$ (rouge), 1,0 $mL.min^{-1}$ (bleu) et 1,5 $mL.min^{-1}$ (vert).

À $0.5 \ mL.min^{-1}$ on a une reconcentration de 230 μm d'épaisseur. Cette épaisseur augmente fortement jusqu'à 410 μm lorsqu'on passe à 1,0 $mL.min^{-1}$. Enfin pour 1,5 $mL.min^{-1}$, cette épaisseur s'étend à 490 μm . Cette augmentation de l'épaisseur est une conséquence d'une diminution du temps de passage des particules devant chaque transducteur. Leur temps de passage est plus court, elles sont donc soumises à l'acoustique sur une période plus courte et se déplacent vers le nœud de pression sur une distance moins importante.



FIGURE 8.10 – Epaisseur de reconcentration de particules de polystyrène de 5 μm en aval d'une configuration multinœuds en cascade 4 *MHz*-2 *MHz*-1 *MHz*-1 *MHz*. L'observation a été faite dans le canal en aval des 4 transducteurs pour 3 débits : 0,5 *mL.min*⁻¹ (rouge), 1,0 *mL.min*⁻¹ (bleu) et 1,5 *mL.min*⁻¹ (vert)

Par la suite nous avons voulu comparer de manière rigoureuse le potentiel de reconcentration d'un canal Multinœuds par rapport à d'autres configurations en n'utilisant que 3 transducteurs dans la configuration 4*MHz*-2 *MHz*-1 *MHz* soit 4 nœuds - 2 nœuds - 1 nœud.

Les résultats sont présentés sur la Fig. 8.21.

8.3 Canal Multi-steps

8.3.1 Principes

A l'entrée d'un canal dit "classique", les cellules se trouvent réparties sur toute la hauteur de celui-ci. A des débits élevés, elles n'ont pas le temps d'atteindre le nœud de pression. La distance à parcourir est trop importante et le temps de présence des particules devant le transducteur est trop faible. Nous avons donc cherché un système qui permette le déplacement des particules sur une distance minimum pour atteindre le nœud de pression. C'est le principe qui a prévalu pour proposer la configuration "Multi-nœuds en cascade" présentée dans la section précédente.

D'autres options sont possibles. Suite aux expériences sur la configuration multinœuds, nous avons eu l'idée d'une géométrie encore plus prometteuse pour les processus de reconcentration/séparation : une préfocalisation géométrique et acoustique et une géométrie de canal dite "Multi-steps en cascade".

Les cellules traversent différentes portions d'un canal, chacune ayant sa propre dimension. La partie amont est la plus étroite, puis nous étendons cette section à une



FIGURE 8.11 – Canal Multisteps. Les cellules sont introduites dans la partie amont du canal qui est de 187 μm . Elles sont confinées géométriquement et le profil de pression les déplace vers le centre. Les autres parties les maintiennent au centre du canal pour être collectées dans la sortie centrale.

autre et enfin à une troisième dans la partie aval par une succession d'expansion géométrique (Fig. 8.11). Nous utilisons une fois de plus des transducteurs avec des fréquences différentes, adaptés aux variations de hauteur du canal. La première partie, qui a une hauteur de 187 μm , est soumise à un transducteur de 4 *MHz*, la deuxième partie avec une hauteur de 375 μm , correspond à un transducteur de 2 *MHz*. Enfin la troisième partie avec 750 μm de hauteur, correspond au transducteur 1 *MHz*.

Nous obtenons une compétition entre l'effet de l'expansion géométrique sur le fluide qui essaie de remplir le volume de chaque nouvelle partie, entraînant les cellules avec lui tandis que les nœuds de pression maintiennent les cellules sur l'épaisseur initialement établie par la géométrie du canal et alignée avec la sortie centrale.



8.3.2 Utilisation des effets hydrodynamiques

FIGURE 8.12 – Schéma du canal Multisteps, vue de côté. On a un profil de Poiseuille qui s'évase avec une vitesse maximum au centre du canal qui diminue à chaque changement de section.

L'écoulement dans un canal dit "classique" est associé à un profil de Poiseuille : un gradient de vitesse entre le centre du canal où la vitesse du fluide est maximale et les parois latérales où la vitesse est nulle. Ainsi des particules au centre du canal seront transportées plus rapidement vers la sortie que des particules proches des parois.

Avec la configuration "Multisteps", nous avons trois sections de même largeur mais de hauteurs différentes. Un des principes fondamentaux de la mécanique des fluides est la conservation de la matière et donc du débit : le débit est constant en toute section du canal. Cela se traduit par :

$$Q = u_h S \tag{8.1}$$

avec Q le débit volumique, u_h la vitesse moyenne du fluide et S la section par laquelle le fluide passe. Ainsi lorsque la section diminue, la vitesse du fluide augmente. A l'inverse lorsque la section augmente, la vitesse du fluide diminue de façon à toujours garder un débit constant.

Dans notre cas la portion 1 MHz étant la plus haute, c'est dans cette section que la vitesse du fluide sera la plus faible. Dans la section 2 MHz la section est moins importante ce qui va augmenter la vitesse maximale du fluide. Enfin la section 4 MHz étant la plus petite, c'est dans celle-ci que le fluide aura sa vitesse maximale (Fig. 8.12).

La portion 4 *MHz* étant en amont du canal, le fluide va donc ralentir lors de son passage dans la portion 2 *MHz*. Ce processus sera à nouveau répété lors du passage du fluide de la section 2 *MHz* à la section 1 *MHz*. Si une suspension est introduite dans ce canal, les particules vont être éjectées dans la nouvelle section de par leur inertie. Ainsi ces particules vont se retrouver sur une épaisseur de 187 μm dans la



FIGURE 8.13 – a) Schéma d'une expansion avec un taux d'expansion E = 3, et la transition d'un écoulement symétrique à un écoulement asymétrique stable. b) Diagramme de bifurcation pour un écoulement à faible nombre de Reynolds dans un canal en expansion avec un taux d'expansion de 3, comme dans nos canaux. Le nombre de Reynolds critique $Re_c = 58$. Issu de HAWA et RUSAK, 2001.

section 2 *MHz* qui fait 375 μm . De la même façon des particules quittant la section 2 *MHz* vont être éjectées dans la section 1 *MHz* sur une épaisseur de 375 μm . Avec cette succession de sections 4 *MHz*-2 *MHz*-1 *MHz* on espère limiter au maximum la répartition des particules sur une épaisseur de 187 μm tout le long du canal afin qu'elles soient collectées aisément en sortie centrale.



FIGURE 8.14 – Evolution du Re_c en fonction du taux d'expansion. On peut voir que le Re_c augmente considérablement pour les taux d'expansion inférieurs à 3. Issu de QIAN et al., 2016.

Cependant d'un point de vue hydrodynamique ce type de géométrie peut se révéler inadaptée. On caractérise l'expansion par le rapport de la hauteur totale du canal sur la hauteur du canal d'injection $E = h_2/h_1$. En effet, de nombreuses études ont montré que, pour des canaux ayant des rapports d'expansion modérés, lorsque le nombre de Reynolds Re, basé sur la vitesse moyenne, est relativement faible, l'écoulement dans le canal est régulier, bidimensionnel et symétrique avec deux zones de séparation près des coins d'expansion. Dans les zones de séparation, près des coins de l'expansion, des bulles de recirculation stables apparaissent dont la taille augmente avec *Re*. Cependant, pour des valeurs plus élevées de *Re*, l'écoulement reste bidimensionnel et stable mais devient asymétrique avec deux zones de séparation près des coins d'expansion de longueurs différentes qui s'attachent à la paroi supérieure ou inférieure de la chambre d'expansion (Fig.8.13 a). Enfin, pour des valeurs de *Re* encore plus élevées, des zones de recirculation supplémentaires apparaissent le long des parois du canal. Il est donc important de s'assurer que, dans notre cas, le nombre de Reynolds reste suffisamment faible. HAWA et RUSAK, 2001 ont montré que pour un taux d'expansion E = 3 le nombre de Reynolds critique est $Re_c = 58$. Quand $Re > Re_c$ l'écoulement connaît sa première bifurcation (Fig.8.13 b) qui le fait d'un état symétrique à un état asymétrique.

Par ailleurs, de nombreuses études démontrent la forte influence du taux d'expansion sur Re_c . En effet, augmenter le taux d'expansion diminue le Re_c alors qu'au contraire le diminuer augmente le Re_c . C'est ce que montrent QIAN et al., 2016 à la fois à travers une synthèse bibliographique et des simulations numériques. Lorsque le taux d'expansion passe de E = 3 à E = 2 le Reynolds critique augmente considérablement et tend vers $Re_c = 1000$ (Fig.8.14).

Dans notre cas, le taux d'expansion est E = 2 et le nombre de Reynolds, pour un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$, est de l'ordre de Re = 33, donc bien en-dessous du Re_c . Cela veux dire que l'on peut encore augmenter considérablement le débit sans risquer de passer la première bifurcation qui rendrait l'écoulement asymétrique.

Si nous restons dans une gamme de nombre de Reynolds inférieur au Reynolds critique, nous pensons que cette configuration sera pertinente car son couplage à de l'acoustique permettrait aux cellules/particules d'être focalisées par la force de radiation acoustique, la première section jouant le rôle de région de préfocalisation acoustique lors de leur arrivée dans la nouvelle section, et de les maintenir au centre, là où la vitesse est maximum. Nous développerons ce point un peu plus loin.

8.3.3 Utilisation des effets hémodynamiques

Précédemment nous avons mentionné les différents effets très spécifiques que l'on peut observer dans les écoulements sanguins, et particulièrement l'effet Fahraeus-Lindqvist. Lorsqu'une suspension de cellules s'écoule dans une conduit cylindrique (les globules dans les vaisseaux sanguins) les cellules migrent vers le centre de celleci. Ce déplacement en masse a pour conséquence de fluidifier l'écoulement proche des parois, grâce à la création de la zone appelée "free-cell-layer" étant dépourvue de cellules. Dans un canal Multi-steps l'effet Fahraeus-Lindqvist pourrait être exploité à notre avantage (Fig.8.15) si la fraction volumique de cellules est suffisamment élevée.

Dans la partie 4 *MHz*, sans acoustique les particules ou cellules vont naturellement s'éloigner des parois latérales afin de faciliter l'écoulement de la suspension. L'épaisseur sur laquelle les cellules vont se répartir en sortie de section 4 *MHz* sera donc inférieure à 187 μm .

De même en sortie 2 *MHz* les cellules seront réparties sur une hauteur inférieure à 1 *MHz*. Cela nous amène à la même tendance que celle observée sur l'aspect hydrodynamique : les particules s'éloignent des parois. La concentration augmente donc dans la partie centrale du canal ce qui favorisera leur captation lors de la mise en place d'un champ acoustique dans le canal.

Nous avons également cité précédemment le phénomène de margination. Dans un canal Multisteps la migration des globules vers le centre entraînerait l'éjection des plaquettes vers les parois latérales, ce qui serait un bénéfice pour du tri cellulaire.

Enfin, une configuration "constriction-expansion" est favorable à la séparation des plaquettes/globules rouges par phénomène purement hydrodynamique. Un système se rapprochant du notre mais n'utilisant pas d'acoustique a ainsi réussi une séparation hydrodynamique (LAXMI et al., 2020) en isolant des plaquettes issues de sang total afin de créer du plasma enrichi en plaquettes (Fig. 8.16).



FIGURE 8.15 – Canal Multisteps. Vision hémodynamique. On a une free-cell-layer qui se crée au niveau des parois du canal.



FIGURE 8.16 – Dispositif de séparation des plaquettes du sang total à l'aide d'une succession de portions "restriction-extension" par LAXMI et al., 2020.

La différence majeure entre leur configuration et la notre est la géométrie d'expansion du canal. Si on se réfère à la Fig. 8.16, Laxmi et al. utilisent une configuration qui permet de maintenir un régime laminaire dans l'écoulement car utilisant une expansion douce. La façon dont on construit nos canaux nous contraint malheureusement à utiliser des expansions à angle droit.

8.3.4 Canal acoustofluidique Multisteps

L'ajout de transducteurs sur notre canal Multisteps est la dernière étape du montage. Chaque portion du canal a été conçue pour correspondre à la fréquence de résonance des transducteurs utilisés. La première partie, utilisée pour la préfocalisation acoustique, a une hauteur de 187 μm , ce qui correspond à un transducteur de fréquence de résonance 4 *MHz*. La deuxième section a une hauteur de 375 μm adaptée pour le transducteur de 2 *MHz* et enfin la troisième section a une hauteur de 750 μm adaptée au transducteur de 1 *MHz*. On obtient ainsi un nœud de pression à mi-hauteur de chaque section (Fig.8.11), donc sensiblement aligné sur l'axe de symétrie haut-bas du canal. Ce sera également la région où la vitesse de l'écoulement sera maximale pour chaque section (puisque la vitesse maximale va décroître en passant d'une région à l'autre).

Dans la partie hydrodynamique nous avons montré que la préfocalisation géométrique et les différences de débit entre les multiples sections permettent aux particules d'être éjectées dans la section suivante sur une épaisseur égale à la section précédente. Cette épaisseur est réduite du fait de l'effet Faraheus-Lindqvist qui déplace les particules vers le centre et crée une "free-cell layer" pour fluidifier l'écoulement.

La première section permet la préfocalisation des particules ou cellules. En effet, le champ acoustique établi par le transducteurs va faire migrer les particules vers le nœud de pression au centre de la première portion. L'objectif est donc de créer un profil de concentration piqué au centre du premier canal (Fig. 8.5), si bien que l'on bénéficiera de la forte concentration locale pour maximiser l'effet de la force acoustique dans la section suivante (cf Ch. 6). Afin de bénéficier de cet effet de préfoca-lisation, les transducteurs sont placés le plus près possible du début de l'expansion du canal, pour chaque nouvelle section.

Après la préfocalisation, les cellules arrivant dans la deuxième section sont instantanément soumises à la Force de Radiation Acoustique qui les maintient ou les envoie vers le nœud de pression à mi-hauteur. Le premier bénéfice de ce système est la faible distance que doivent parcourir les cellules pour atteindre ce nœud de pression. Même dans les portions 2 *MHz* et 1 *MHz* les cellules se déplaceront au maximum sur une hauteur d'environ 90 μm de par la préfocalisation géométrique imposée par la portion 4 *MHz*. Le second point positif est que du fait de la migration des cellules au centre du canal dès leur arrivée dans une nouvelle section, celles-ci s'éloignent des parois latérales favorisant une zone sans cellules près des parois.

La FRA permet également un effet de margination amplifiée par acoustique. Du sang total soumis à la FRA se caractériserait par une addition des effets Faraheus-Lindqvist et la Force de Radiation Acoustique. En conséquence les globules rouges migrent plus rapidement vers le centre du canal ce qui expulse a grande vitesse les plaquettes vers les parois.

Dans l'objectf d'un tri cellulaire, le canal Multisteps semble pertinent. Cependant il faudrait sans doute réduire le taux d'expansion pour éviter la transition de l'écoulement vers un mode asymétrique. L'idée serait de créer un canal qui bénéficie des avantages hydrodynamiques et hémodynamiques tout en appliquant le plus tôt possible un champ acoustique dans chaque nouvelle portion traversée par l'écoulement. On concentrerait ainsi les globules rouges au centre et les plaquettes seraient éjectées sur les parois latérales.

En résumé cette configuration est pertinente en vue de la reconcentration cellulaire car elle nous permet de tirer parti de plusieurs phénomènes qui se couplent les uns aux autres :

- Nous commençons par créer une préfocalisation géométrique et acoustique.

- L'augmentation de la concentration locale des cellules accroît leur vitesse de focalisation. Ces dernières étant initialement confinées géométriquement dans une petite épaisseur (188 μm), la concentration locale est élevée.

- Ensuite, nous avons montré dans le Ch. 4 que la focalisation dynamique des cellules était maximale lorsque la focalisation en hauteur était située à mi-hauteur du canal, condition que nous respectons dans notre configuration.

- Enfin, nous terminerons sur le phénomène de margination cité précédemment : dans les vaisseaux sanguins, les globules rouges, pour éviter tout risque de blocage des voies, se concentrent au centre du canal et s'éloignent de la paroi du canal. Ceci implique une éjection naturelle des plaquettes vers les parois du canal (KRÜGER, 2016).

Dans le cas d'un tri du sang total, ce phénomène de margination s'applique sur les globules rouges qui sont majoritairement au centre du canal, éjectant les plaquettes vers les parois du canal.

Tous ces phénomènes tendent vers un processus de reconcentration ou de tri avantageux. Nous pensons que cette configuration pourrait être efficace même à des débits élevés.

Bien que l'objectif principal d'Aenitis soit la reconcentration de plaquettes. La séparation des cellules du sang, à des hématocrites élevés, reste d'intérêt. Avec un système Multisteps, nous pensons avoir ici un potentiel de séparation plus efficace que via un canal "classique". La préfocalisation géométrique, la dynamique de focalisation maximale à mi-hauteur du canal, la concentration locale importante, les différences de débit et le phénomène de margination devraient favoriser ce phénomène de séparation.

8.3.5 Montage Multisteps

Pour favoriser la comparaison entre notre montage et celui utilisé par Aenitis, nous avons décidé d'utiliser les mêmes transducteurs. Il s'agit d'éléments piézoélectriques rectangulaires de dimensions 2 *cm* X 1 *cm* qui couvrent toute la surface du canal.

Ce changement nous permet d'utiliser une plus grande puissance acoustique (jusqu'à 10 W environ). Cependant cela implique d'ajouter un système de refroidissement : la puissance utilisée entraîne une dissipation thermique importante qui endommage le canal. Nous perdons ainsi l'efficacité de notre montage acoustique. Un phénomène de cavitation peut également apparaître. La cavitation est utile dans certaines applications comme le mélange rapide de 2 fluides (SHI et al., 2009a; LIU et al., 2003) cependant elle peut endommager les cellules. Il est essentiel de l'éviter.

Pour surmonter cela nous ajoutons un système de refroidissement avec des Peltiers. Ces objets transfèrent avec une grande efficacité la chaleur du piézo vers un radiateur où elle est dissipée. Un scotch thermique est placé entre le Peltier et le radiateur pour assurer une bonne conduction thermique.

Dans le cas du canal Multisteps, nous avons différentes épaisseurs de piézoélectriques puisque nous utilisons différentes fréquences. Les piézoélectriques de 4 *MHz*, 2 *MHz* et 1 *MHz* ont respectivement une épaisseur de 0,376 μ m, 0,804 μ m et 1,565 μ m. Les piézo étant fixés sur un même Peltier, cela implique que seul le transducteur le plus épais sera en contact avec le canal et que les autres auront un mince espace d'air entre eux et le canal. Ce petit espace réduit drastiquement l'efficacité d'émission du transducteur et conduit à une mauvaise propagation des ondes acoustiques. Il est donc essentiel de résoudre ce problème.

Pour résoudre cela nous avons donc usiné des trous d'épaisseurs différentes dans le radiateur. Ces épaisseurs correspondent à l'écart d'épaisseur entre les piézo de 1 *MHz* et 4 *MHz* et entre les piézo de 2 *MHz* et 4 *MHz* respectivement.

Des blocs de cuivre de 2 *cm* X 2 *cm* de long et de large sont placés dans les espaces usinés. De la pâte thermique est placée entre le radiateur et le bloc de cuivre. Du scotch thermique est placé entre le Peltier et le bloc de cuivre. Enfin, le piézoélectrique est placé sur le Peltier.



FIGURE 8.17 – Dispositif Multisteps composé de trois piézoélectriques. Chaque piézoélectrique est alimenté par un générateur et refroidi par un système de refroidissement piloté par ordinateur. La chaleur dégagée par les piézoélectriques est transmise par la pâte thermique dans le radiateur où elle est dissipée. Deux pompes péristaltiques placées en entrée et sortie permettent de faire circuler le fluide dans le canal. Ce montage n'a malheureusement pas fonctionné en raison de l'impossibilité d'adapter la fréquence émise par les piézo aux épaisseurs variables du canal.

Avec ce montage, nous pouvons finalement refroidir le piézoélectrique de manière efficace. La Fig. 8.17 montre la complexité à mettre en place un tel système.

Après de multiples tentatives de reconcentration de globules rouges, nous n'avons pas observé le moindre effet de reconcentration. Différents débits ont été testés : de $0.5 \ mL.min^{-1}$ à $4.5 \ mL.min^{-1}$. La principale raison pour laquelle nous pensons qu'aucune reconcentration n'a été observée est le fait que les transducteurs utilisés sont à bande de fréquence étroite. En effet, du fait de la configuration complexe du canal, nous ne respectons pas les conditions de résonance : La portion à $4 \ MHz$ correspond en réalité à du $3 \ MHz$ et la portion $2 \ MHz$ correspond à du $1.75 \ MHz$. Ce décalage en fréquence rend nos transducteurs non appropriés car leur efficacité diminue grandement lorsqu'on s'éloigne de la fréquence de résonance. De plus, pour maintenir le canal plaqué sur les transducteurs en position verticale, nous utilisons une pince. Cette pince déforme le canal ce qui change la fréquence de résonance.

Pour palier à ces problèmes, nous avons décidé finalement d'utiliser les transducteurs large bande utilisés par l'équipe AcoustofluidiX. Cela va permettre, entre autre, de déterminer les hauteurs de focalisation des particules dans les différentes section du canal.

Le montage s'en trouve significativement simplifié puisqu'il n'y a plus besoin de système de refroidissement. Chaque transducteur est donc alimenté par un générateur TiePie comme présenté dans le Ch. 3.



FIGURE 8.18 – Position des nœuds de pression en fonction de la fréquence pour chaque portion du canal Multisteps.

8.3.6 Caractérisation du montage Multisteps

Nous avons utilisé le même protocole expérimental que dans le Ch. 4 pour mesurer dans chaque portion du canal les hauteurs de focalisation en fonction de la fréquence acoustique. Les résultats sont représentées sur la Fig. 8.18. On retrouve une évolution nette de la position du plan de lévitation en fonction de la fréquence autour des fréquences de résonance de chaque section. On constate cependant un comportement différent pour la section à 1 *MHz*. En effet, le transducteur fonctionne sur une bande plus étroite que les transducteurs 2 *MHz* et 4 *MHz*. Il n'est pas possible d'explorer la partie supérieure du canal, contrairement aux deux autres sections. Cela suffit néanmoins puisque l'on cherche à positionner les nœuds de pression au milieu de chaque section. On peut donc normalement sélectionner pour chaque section la fréquence qui assurera de concentrer les particules ou cellules au centre du canal sur toute sa longueur.

L'avantage d'utiliser ces transducteurs large bande est de ne pas avoir besoin de système de refroidissement. En contrepartie, nous ne pouvons injecter beaucoup d'énergie acoustique dans le canal. Cela affectera donc l'efficacité du système.

De plus, la surface active des transducteurs est nettement plus faible, puisque les piézo couvraient toute la surface du canal. Les particules passeront donc moins de temps sous l'influence de l'ARF, ce qui diminuera également l'efficacité du processus de reconcentration.

Nous décidons donc de comparer la capacité de reconcentration de cette configuration à celle du multinœuds en cascade ainsi qu'à la configuration "classique" (hauteur constante) à débits et puissance identiques.



FIGURE 8.19 – Hauteur de focalisation de particules de $5\mu m$ de silice et $20\mu m$ de polystyrène en fonction de la fréquence. Les mesures sont effectuées au niveau du transducteur central tandis que les transducteurs amont et aval, situés sur la même paroi, sont également activés

Pour la configuration "classique" trois transducteurs "2 *MHz*" sont placés le long du canal classique afin d'avoir une comparaison pertinente avec les 2 autres configurations de canaux qui utilisent 3 transducteurs répartis sur la longueur du canal.

8.3.7 Caractérisation de la configuration "classique" (canal droit équipé de trois transducteurs)

Dans cette configuration, les trois transducteurs sont tous placés sur la même paroi haute du canal droit comme décrit dans le Ch. 3. Dans la mesure où les transducteurs ne sont pas synchronisés, il est important de s'assurer que le système continue de fonctionner comme dans la configuration avec un seul transducteur utilisé dans l'étude de l'influence de la fréquence (Ch. 4).

Pour s'assurer que ces transducteurs de même fréquence n'aient pas d'effet néfaste sur leurs voisins respectifs, nous avons donc refait des mesures de la position axiale du plan de lévitation en fonction de la fréquence, sous le transducteur central, pendant que les transducteurs amont et aval sont activés à leurs fréquences de résonance.

Le résultat est montré sur la Fig. 8.19. L'évolution de la position du plan de lévitation en fonction de la fréquence a été mesurée pour deux particules différentes, des particules de $5\mu m$ de silice et des particules de $20\mu m$ de polystyrène.

On observe le même comportement qu'avec un seul transducteur. On a toujours les particules à mi-hauteur du canal pour la fréquence de résonance (2 *MHz*). En diminuant la fréquence les particules migrent vers la paroi adjacente au transducteur tandis qu'en augmentant la fréquence, le plan de lévitation se déplace vers la paroi opposée.

La seule légère différence que l'on observe est au niveau des fréquences extrêmes : il est possible de garder les particules proches de la paroi adjacente pour des fréquences plus basses qu'avec un seul transducteur. De la même manière, on maintient les particules en lévitation à des fréquences plus hautes à l'aide de deux transducteurs qu'avec un seul. La vibration de la paroi due au transducteur amont


FIGURE 8.20 – Reconcentration de particules de 5 μ m en fonction du canal utilisé sans acoustique. Dans les 3 cas un débit de 0,5 mL.min⁻¹ a été imposé.

expliquerait ce comportement. Cependant ce résultat est à prendre avec précaution. Nous avons vu que les canaux n'étaient pas parfaitement identiques entre eux et les micro-différences de fabrication peuvent être à l'origine du maintien de particules en lévitation sur une bande de fréquence plus étendue.

8.3.8 Comparaison des différentes configurations

Maintenant que l'on sait qu'il n'y a pas d'effets destructeurs sur le champ acoustique lorsque plusieurs transducteurs sont placés côte à côte, nous pouvons comparer l'efficacité de reconcentration des trois configurations de canaux.

Des suspensions contenant des particules de 5 μm de polystyrène sont utilisées à un débit défini de 0,5 $mL.min^{-1}$. Nous mesurons dans un premier temps le taux de reconcentration dans les trois sorties pour les trois configurations sans acoustique (Fig. 8.20).

Le taux de reconcentration est pratiquement identique quelque soit la sortie et quelque soit la configuration. On note une reconcentration légèrement plus importante pour les sorties adjacente et latérale que dans la sortie opposée, constat déjà effectué sur la Fig. 4.6.

Ensuite, pour toutes les configurations, une puissance de 0,94 W est appliquée à chaque transducteur. Nous utilisons des Wattmètres afin de déterminer aisément la fréquence optimale pour chaque transducteur.

Nous comparons les taux de reconcentration obtenus sur les trois sorties pour les trois configurations. Les résultats sont présentés sur la Fig. 8.21. Pour chaque taux de reconcentration indiqué, 3 mesures ont été effectuées.

On constate que pour les canaux Classique et Multisteps on obtient une forte reconcentration en sortie centrale, comme attendu, tandis que pour le canal Multinœuds on observe une reconcentration majoritaire sur les sorties latérales : environ 39,7 % et 40 % sur les sorties adjacente et opposée contre 20,3 % en sortie centrale. On peut en conclure que la majorité des particules se reconcentrent au niveau des 2 nœuds dans la portion 2 *MHz* cependant la force appliquée par le transducteur



FIGURE 8.21 – Reconcentration de particules de 5 μm en fonction du canal utilisé. Dans les 3 cas un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$ a été imposé.

1 *MHz* n'est pas suffisamment importante pour ramener ces particules au niveau de la sortie centrale malgré l'augmentation de concentration locale. Ceci est sans doute associé au comportement différent du transducteur 1 *MHz*. En effet, on a vu sur la Fig. 8.19 qu'il fonctionne sur une bande fréquence bien plus étroite que les autres. On voit également qu'au-delà de la fréquence de résonance, on n'observe plus de plan de lévitation. Si nous n'avons pas pu faire de mesure de vitesse de focalisation pour ce transducteur, on peut penser que la vitesse de focalisation chute rapidement lorsqu'on s'éloigne de la fréquence de résonance ce qui fait perdre toute efficacité à cette dernière étape de focalisation à un nœud.

En ce qui concerne les deux autres types de canaux, on retrouve bien le fonctionnement attendu avec une reconcentration bien plus importante en sortie centrale en comparaison des sorties latérales. Le canal Classique a un taux de reconcentration de 72,8 % tandis que celui du canal Multisteps est de 76,9 %. On obtient donc bien une augmentation de la reconcentration en sortie centrale en utilisant le canal Multisteps par rapport au canal classique. Il s'agit d'un premier résultat très encourageant.

Malheureusement nous n'avons pas pu aller plus loin dans cette étude par manque de temps et en raison des difficultés de fabrication des canaux. Cependant, nous pensons que le canal Multisteps pourrait vraiment se démarquer de façon nette pour des débits plus élevés et des puissances acoustiques plus importantes. Ce sera une piste intéressante à poursuivre dans le futur.

8.4 Discussion

Ces premiers résultats sont très encourageants, mais doivent être approfondis. On voit en particulier qu'il faut bien caractériser le fonctionnement du transducteur 1 *MHz* si on veut utiliser cette stratégie avec un canal de 750 μm de hauteur. Il faut également pouvoir augmenter l'amplitude du signal appliqué aux transducteurs pour améliorer les performances. Enfin, dans le cas des transducteurs packagés, on peut également envisager d'utiliser deux transducteurs par section pour le canal Multisteps et Multinœuds, et augmenter le nombre de transducteurs pour la



FIGURE 8.22 – Processus de séparation cellulaire utilisant des SAW. L'originalité du système réside dans une préfocalisation géométrique couplée à un champ acoustique multinœuds. A) Les cellules injectées en entrée (1) migrent vers les 2 nœuds présents dans la partie préfocalisation. Une expansion légèrement abrupte a lieu juste avant la section "a" puis un processus de séparation à l'aide d'un seul nœud de pression fait migrer les grosses cellules vers la sortie centrale (2) tandis que les petites cellules sont collectées en sortie latérale (3). B) Vue de côté du canal. On a la même épaisseur tout le long de celui-ci. Issu de ANTFOLK et al., 2015.

configuration classique pour s'assurer que les particules ou cellules passent le maximum de temps sous l'influence de la FRA lors de leur passage dans le canal.

Une configuration se rapprochant du Multinœuds et du Multisteps combinés a été testé par Antfolk (ANTFOLK et al., 2015). On a une première partie de préfocalisation où les cellules subissent un confinement géométrique couplé à deux nœuds permettant d'accroître la concentration locale. Puis vient une seconde partie de canal plus large où les cellules sont rassemblées au centre grâce à un nœud de pression unique. Les cellules sont ensuite collectées en sortie de canal (Fig. 8.22).



FIGURE 8.23 – Schéma d'un canal multisteps/multifréquence idéal pour de la reconcentration. La condition $\frac{\lambda}{2}$ est respectée dans la portion fluide tandis que les parois ont une épaisseur $\frac{\lambda}{4}$.

La différence majeure entre leur système et le notre est l'utilisation de SSAW dans leur cas et l'utilisation de BAW dans notre cas. La seconde différence est l'expansion qui est similaire à celle de Laxmi et al.

Une piste d'amélioration pour notre canal Multisteps serait d'appliquer la condition $\frac{\lambda}{4}$ sur les parois (GLYNNE-JONES, BOLTRYK et HILL, 2012), cela permettrait d'obtenir un canal optimisé également sur le plan acoustique (Fig. 8.23), mais on a vu que cela représente une vraie difficulté de fabrication. Mieux vaut utiliser le contrôle en fréquence que nous avons démontré pour optimiser les performances de nos systèmes, mais cela demande une étude paramétrique assez vaste que nous n'avons malheureusement pas eu le temps de réaliser.

Nous pourrions en particulier mettre en oeuvre une démarche d'optimisation en recherchant un moyen de quantifier en temps réel le taux de reconcentration au moins sur une sortie. Dans ce cas, nous pourrions utiliser des algorithmes génétiques pour chercher à identifier les meilleurs paramètres amenant à un taux de reconcentration maximal. Nous pourrions par exemple utiliser le système développé par Baptiste Pialot au cours de sa thèse (chez Aenitis). Il a en effet mis au point un système acoustique pour mesurer la vitesse et la concentration en particules dans un microcanal (PIALOT et al., 2020). Ce capteur pourrait tout à fait être piloté dans une boucle de contrôle et ainsi faciliter grandement la recherche des paramètres optimaux pour notre système.

8.5 Conclusion

Dans cette partie nous avons étudié la pertinence de deux configurations de canaux microfluidiques originaux et nous avons comparé leur efficacité par rapport à un canal classique. Le premier est le canal Multinœuds en cascade qui se base sur le système du multinœuds en multipliant la fréquence de résonance par 2 voire 4. Chaque portion du canal est composée respectivement de 4 nœuds, 2 nœuds puis 1 nœud. L'intérêt est d'augmenter la concentration locale qui a pour effet d'augmenter drastiquement la vitesse de focalisation des particules.

Une seconde configuration appelée Multisteps utilise une géométrie en escaliers afin de n'avoir à chaque fois qu'un seul nœud dans chaque portion du canal. Cette configuration permet une préfocalisation géométrique, une hauteur et dynamique de focalisation optimales, un phénomène de jet entre chaque portion permet aux particules d'être captées plus facilement par le nœud suivant, une augmentation de la concentration locale et donc de la vitesse de focalisation des particules et enfin le phénomène de margination.

En comparant l'efficacité de reconcentration pour les différentes configurations on s'aperçoit que le Multisteps permet un taux de reconcentration en sortie centrale légèrement supérieur à un canal Classique. A l'inverse, les particules se reconcentrent majoritairement dans les sorties latérales pour le cas Multinœuds en Cascade. Ce résultat indique que les particules n'ont pas le temps d'atteindre l'unique noœud de pression, la force exercée par le transducteur 1 *MHz* étant trop faible. On retient donc la configuration Multisteps comme étant pertinente pour accentuer l'efficacité du taux de reconcentration de particules et/ou cellules.

Chapitre 9

Conclusion

Aujourd'hui l'industrialisation des procédés de thérapie cellulaire est un enjeu majeur dans le domaine de la santé. Un des moyens d'y parvenir est d'utiliser des procédés de tri cellulaire efficaces. Parmi les différentes voies possibles l'acoustophorèse est une technologie prometteuse, en pleine expansion depuis une dizaine d'années.

Dans ce contexte, il nous faut comprendre comment optimiser nos processus de reconcentration et séparation. L'acoustophorèse est un processus multiphysiques qui implique la maîtrise de nombreux paramètres, la connaissance de nombreuses propriétés si l'on veut le maîtriser. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à décomposer le problème global en plusieurs questions physiques "simples" auxquelles nous pouvons apporter une contribution et qui, in fine, pourront nous servir à proposer une approche originale et mieux maîtrisée d'un processus de reconcentration en flux.

Les études de hauteur et vitesse de focalisation dépendant de la fréquence nous ont permis d'établir les paramètres optimaux pour notre canal acoustofluidique, ceux-ci correspondant à une vitesse de focalisation maximale des particules à mihauteur du canal. Cependant nous avons montré qu'il est possible de contrôler la position axiale du plan de focalisation acoustique sur toute la hauteur du canal en variant la fréquence de l'onde ultrasonore. Ceci permet de choisir la sortie du canal par laquelle on veut récupérer une espèce. Ce contrôle par la fréquence acoustique a été démontré sans écoulement puis vérifié en écoulement grâce à la reconcentration de particules puis de cellules non parenchymateuses et de cellules Hepa-RG.

L'optimisation des processus de reconcentration passe aussi par la caractérisation des cellules à trier. En effet, la force acoustique dépend directement du facteur de contraste acoustique, et donc de la densité et de la compressibilité des objets en suspension. Si nous connaissons en général les propriétés physiques des particules manipulées (taille, matériaux), ce n'est en général pas le cas des cellules ou microorganismes. Il est alors essentiel de disposer d'une méthodologie permettant de mesurer ces propriétés avant de chercher à les manipuler ou de les séparer. Cela permet de savoir avant de faire les expériences s'il sera possible ou non de les séparer et avec quelle efficacité.

Nous avons ainsi validé un protocole expérimental et développé un code Matlab permettant de déterminer les propriétés acoustiques d'objets en suspension grâce à la méthode de la tâche d'Airy. Cette technique nous permet de mesurer l'énergie acoustique du système puis de remonter au facteur de contraste acoustique d'objets dont on ne connaît pas les propriétés en mesurant leur vitesse de focalisation acoustique. Enfin, nous appliquons la même technique expérimentale à l'étape de sédimentation depuis le plan de lévitation, ce qui nous donne accès à la mesure de la densité de la cellule. Il est alors possible de remonter à la compressibilité des cellules, ce qui est d'un grand intérêt pour la communauté biophysique, au-delà des seules applications acoustofluidiques. Les propriétés mécaniques de quatre types cellulaires ont ainsi été mesurées. Nous avons en particulier caractérisé deux types de cellules stromales mésenchymateuses et leur évolution au cours des différents passages lors de leur mise en culture.

Lorsqu'on cherche à reconcentrer des cellules, on est souvent confronté à des suspensions concentrées qu'il est difficile de manipuler, si ce n'est en diluant les échantillons. C'est ce qui est fait en général. Cependant, il est important de déterminer des critères pour lesquels il n'est en effet plus possible de manipuler des suspensions denses, pour lesquelles les effets collectifs sont non négligeables lors de la focalisation de particules.

Nous avons donc étudié la focalisation acoustique d'agrégats afin de clarifier l'impact d'un groupe de particules sur les dynamiques de focalisation. Nous avons réalisé plusieurs expériences avec des agrégats de différentes tailles, composés de particules de mêmes tailles. Nous observons une augmentation très importante de la vitesse de focalisation pour des agrégats à partir d'une taille critique.

Grâce à une analogie avec la sédimentation de nuages de particules nous avons pu identifié trois régimes de focalisation d'agrégats : la focalisation sous forme de disque, de colonne et une division de l'agrégat en de multiples parties. L'introduction du nombre de Reynolds de focalisation acoustique nous a permis de quantifier le passage d'un régime à un autre et une étude de la porosité des agrégats dans ces différents régimes est venue enrichir la discussion.

D'une manière générale, cette étude est importante pour la manipulation de suspensions denses. Elle démontre qu'il est sans doute possible d'augmenter l'efficacité d'un processus de reconcentration en augmentant la concentration de la suspension. En effet, à énergie équivalente, il sera possible de concentrer bien plus vite des particules proches qui vont alors former des agrégats. Il s'agit là aussi d'un phénomène original que nous chercherons à exploiter pour atteindre notre objectif final.

Un autre paramètre critique pour l'acoustofluidique est la nature du milieu dans lequel baigne les particules ou les cellules. En effet, le contraste acoustique dépend des propriétés des objets en suspension mais aussi des propriétés du milieu dans lequel ils se trouvent. C'est en particulier vrai pour les cellules du sang qui baignent dans le plasma qui est un fluide complexe. Nous avons cherché à le caractériser, ce qui nous a permis de mettre en évidence l'influence de l'albumine sur la focalisation des plaquettes vers le plan nodal et de comprendre que le plasma réagit à l'acoustique. Une augmentation du taux d'albumine augmente la densité du milieu et entraîne donc un facteur de contraste acoustique moindre pour les cellules s'y trouvant. En conséquence on observe une dynamique de focalisation atténuée, dynamique que nous avons quantifié par la surface de formation d'agrégats de plaquettes au cours du temps. C'est évidemment un aspect important à prendre en compte lorsqu'on manipule les cellules du sang et plus particulièrement du PRP.

Enfin nous avons cherché à mettre en oeuvre une partie de ces résultats en proposant deux nouvelles configurations pour la reconcentration (ou washing) de particules ou cellules en écoulement.

La première configuration correspond à la géométrie de canal droit à une entrée et trois sorties utilisée dans le manuscrit. La différence majeure est que nous utilisons trois fréquences acoustiques décroissantes le long du canal. L'idée s'appuie à la fois sur le contrôle en fréquence que nous avons démontré et sur l'effet d'accélération de la focalisation acoustique lorsque des agrégats sont formés. En augmentant la fréquence, on augmente le nombre de régions de reconcentration locale qui deviennent ensuite plus réactives à la fréquence deux fois moindre qui est appliquée. La seconde configuration repose sur le même principe d'utilisation de fréquence acoustique décroissante le long du canal, mais vise à n'utiliser qu'un seul nœud de pression en augmentant progressivement la hauteur du canal. Le principe est donc d'utiliser la première partie comme un canal de préfocalisation acoustique qu'on laisse concentrer au centre ensuite d'autant plus facilement que nous avons créé une région à plus forte concentration locale, qui va réagir d'autant plus fortement que les effets collectifs sont importants.

Malheureusement ce sont des configurations plus lourdes à mettre en œuvre et à évaluer, puisqu'il faut gérer plusieurs sources ultrasonores en même temps, ce qui multiplie le nombre de paramètres à tester. Il faut par exemple s'assurer qu'il n'y a pas d'effets indésirables induits par plusieurs sources utilisées en même temps à travers une même paroi. Nous avons cependant pu tester ces deux configurations, mais seulement avec un type de particules, à faible concentration, et avec une variation paramétrique limitée. Si nous n'avons pas obtenu les résultats espérés dans le cas du canal Multinoeuds, le canal Multisteps a montré son efficacité légèrement supérieure dans le cas de faibles débits. Il est nécessaire de continuer cette exploration car on s'attend à ce que ces configurations se révèlent plus performantes pour de plus hauts débits et de plus fortes concentrations initiales. Par ailleurs, nous n'avons pas utilisé des sources ultrasonores optimales puisque nous nous sommes limités aux transducteurs packagés alimentés par les générateurs TiePie, ce qui limite à la fois la puissance injectée mais aussi limite l'étendue de la région de l'écoulement effectivement soumise aux ultrasons. Cela nous permet donc d'envisager une efficacité bien plus importante avec des sources plus puissantes appliquées aux sections de canaux entiers.

9.1 Ouverture

Nous pensons que les résultats attendus pour le canal Multinoeuds seront obtenus en utilisant des suspensions avec une concentration supérieure, comme illustré par la Fig. 8.7 exposant clairement un saut de vitesse de focalisation au-delà d'une concentration critique. Un second moyen d'améliorer la reconcentration est d'envoyer davantage d'énergie dans notre système. Chaque transducteur reçoit le même voltage, or pour une même densité d'énergie acoustique, la FRA est supérieure pour une fréquence de 4 *MHz* comparé à une fréquence de 1 *MHz*. Il nous faudrait envoyer davantage d'énergie dans le transducteur 1 *MHz* de façon à avoir une FRA équivalente dans toutes les portions.

L'utilisation de canaux PMMA n'étant pas optimale pour les processus de séparation et/ou séparation, il faudra tester la configuration Multisteps dans des canaux issus de d'autres matériaux biocompatibles. On peut penser au silicone et surtout à l'inox, matériaux qui ont des impédances acoustiques bien meilleures que le PMMA (LENSHOF et al., 2012). L'inox permettrait d'accélérer le processus de reconcentration grâce à plusieurs facteurs :

- une meilleure transmission des ondes vers l'épaisseur du canal
- l'utilisation de puissances acoustiques plus importantes, la chaleur dégagée par les transducteurs ne déformant pas le canal.

Le design de canal Fig. 8.23 permettrait également d'optimiser notre système et d'obtenir des taux de reconcentration plus importants.

9.1.1 Perspectives

Une meilleure compréhension des phénomènes collectifs via une étude plus poussée de la dynamique de focalisation d'agrégats avec un nouveau modèle de Force de Radiation Acoustique (en particulier pour le régime "disque") permettrait la caractérisation des propriétés mécaniques de cellules qu'on ne peut analyser individuellement. Les plaquettes en sont le parfait exemple et la caractérisation de celles-ci améliorera la compréhension et l'efficacité d'un processus de séparation de sang total.

Il serait également intéressant de tester le canal Multisteps à des débits plus importants en utilisant un design optimisé et des matériaux adéquats comme évoqué précédemment. On peut s'attendre en effet à une meilleure conjonction des effets de reconcentration couplés aux effets inertiels, induits entre autre par les expansions successives.

On pourrait également tester le potentiel de ce design pour des processus de séparation, et non pas seulement de reconcentration. On peut penser que la séparation globules rouges/plaquettes pourrait être améliorée, y compris pour des hématocrites élevés. En effet, le phénomène de margination accentué par acoustique couplé à un canal de configuration Multisteps avec son design de restriction-expansion pourrait se révéler efficace, mais seulement pour certains paramètres qu'il faut déterminer en explorant un espace de paramètre assez vaste, ce qui prendra un peu plus de temps, mais semble tout à fait accessible et devrait être exploré.

Enfin il faut continuer le travail de caractérisation systématique des cellules. L'enjeu est important car la communauté biophysique a besoin de connaître les propriétés mécaniques des cellules. C'est également essentiel pour toutes les applications acoutofluidiques. La méthodologie développée dans ce manuscrit peut être appliquée de façon systématique, mais d'autres approches sont envisageables, basées sur la réponse collective de suspensions de cellules qui pourraient à la fois faciliter les évaluations et les rendre plus robustes.

Bibliographie

- ADRIAN, R. J. (1986). « An image shifting technique to resolve directional ambiguity in double-pulsed velocimetry ». In : *Applied optics* 25, p. 3855-3858.
- AHMED, Suzanne et al. (2016). « Density and shape effects in the acoustic propulsion of bimetallic nanorod motors ». In : *ACS nano* 10.4, p. 4763-4769.
- AL-HARTHI, Samah et al. (2019). « Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin ». In : *Journal of inorganic biochemistry* 198, p. 110716.
- ANTFOLK, Maria et al. (2015). « A single inlet two-stage acoustophoresis chip enabling tumor cell enrichment from white blood cells ». In : *Lab on a chip* 15.9, p. 2102-2109.
- APFEL, R. E. (1990). « Acoustic radiation pressure principles and application to separation science ». In : *Fortschritte der akustik*, p. 19-36.
- ASHKIN, Arthur et al. (1986). « Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles ». In : *Optics letters* 11.5, p. 288-290.
- AUGUSTSSON, P et al. (2010). « Measuring the acoustophoretic contrast factor of living cells in microchannels ». In : *Proceedings of 14th MicroTAS* 14.
- AWATANI, Jobu (1955). « Studies on acoustic radiation pressure. II.(Radiation pressure on a circular disk) ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 27.2, p. 282-286.
- BARESCH, Diego et Valeria GARBIN (2020). « Acoustic trapping of microbubbles in complex environments and controlled payload release ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.27, p. 15490-15496.
- BARESCH, Diego, Jean-Louis THOMAS et Régis MARCHIANO (2016). « Observation of a single-beam gradient force acoustical trap for elastic particles : acoustical tweezers ». In : *Physical review letters* 116.2, p. 024301.
- BARNKOB, R. et al. (2010). « Measuring the local pressure amplitude in microchannel acoustophoresis ». In : *Lab on a chip* 10, p. 563-570.
- BARNKOB, Rune, Christian J KÄHLER et Massimiliano ROSSI (2015). «General defocusing particle tracking ». In : *Lab on a Chip* 15.17, p. 3556-3560.
- BARNKOB, Rune et Massimiliano ROSSI (2020). « General defocusing particle tracking : fundamentals and uncertainty assessment ». In : *Experiments in Fluids* 61.4, p. 1-14.
- BARNKOB, Rune et al. (2011). « Measuring density and compressibility of white blood cells and prostate cancer cells by microchannel acoustophoresis ». In : *Proceedings of the 15th MicroTAS, Seattle, WA, USA* 26.
- BAUDOIN, Michaël et J-L THOMAS (2020). « Acoustic tweezers for particle and fluid micromanipulation ». In : *Annual Review of Fluid Mechanics* 52, p. 205-234.
- BAUDOIN, Michael et al. (2020). « Spatially selective manipulation of cells with singlebeam acoustical tweezers ». In : *Nature communications* 11.1, p. 1-10.
- BENGTSSON, Martin et Thomas LAURELL (2004). « Ultrasonic agitation in microchannels ». In : *Analytical and bioanalytical chemistry* 378.7, p. 1716-1721.
- BJERKNES, V. F. K. (1906). Fields of Force. New York : Columbia University Press.

- BOUYER, Charlène et al. (2016). « A bio-acoustic levitational (BAL) assembly method for engineering of multilayered, 3D brain-like constructs, using human embryonic stem cell derived neuro-progenitors ». In : *Advanced materials* 28.1, p. 161-167.
- BRAATEN, Julie V, Rachel A GOSS et Charles W FRANCIS (1997). « Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers ». In : *Thrombosis and haemostasis* 78.09, p. 1063-1068.
- BRILLOUIN, L. (1925). « Sur les tensions de radiation ». In : *Annales de Physique* 4, p. 528-586.
- BRINKE, M ten et J de REGT (1970). « 51Cr-Half Life Time of Heavy and Light Human Erythrocytes ». In : *Scandinavian journal of haematology* 7.5, p. 336-341.
- BRUUS, Henrik (2012). « Acoustofluidics 7 : The acoustic radiation force on small particles ». In : *Lab Chip* 12 (6), p. 1014-1021. DOI : 10.1039/C2LC21068A. URL : http://dx.doi.org/10.1039/C2LC21068A.
- BUCHANAN, RH, Graeme JAMESON et Djoeriaman OEDJOE (1962). « Cyclic migration of bubbles in vertically vibrating liquid columns ». In : *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 1.2, p. 82-86.
- COKELET, Giles R et Harry L GOLDSMITH (1991). « Decreased hydrodynamic resistance in the two-phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. » In : *Circulation research* 68.1, p. 1-17.
- COLLINS, David J et al. (2013). « Surface acoustic waves for on-demand production of picoliter droplets and particle encapsulation ». In : *Lab on a Chip* 13.16, p. 3225-3231.
- CRUM, L. A. (1975). « Bjerknes forces on bubbles in a stationary sound field ». In : *Journal of the Acoustical Society of America* 57, p. 1363-1370.
- DANKER, Gerrit, Petia M VLAHOVSKA et Chaouqi MISBAH (2009). « Vesicles in Poiseuille flow ». In : *Physical review letters* 102.14, p. 148102.
- DANON, David et Yehuda MARIKOVSKY (1964). « Determination of density distribution of red cell population ». In : *The Journal of laboratory and clinical medicine* 64.4, p. 668-674.
- DIDAR, Tohid Fatanat et Maryam TABRIZIAN (2010). « Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices ». In : *Lab on a Chip* 10.22, p. 3043-3053.
- DING, Xiaoyun et al. (2012). «On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.28, p. 11105-11109.
- DITTRICH, Petra S, Kaoru TACHIKAWA et Andreas MANZ (2006). « Micro total analysis systems. Latest advancements and trends ». In : *Analytical chemistry* 78.12, p. 3887-3908.
- DOINIKOV, Alexander A (1994). « Acoustic radiation pressure on a compressible sphere in a viscous fluid ». In : *Journal of Fluid Mechanics* 267, p. 1-22.
- (1996). « On the radiation pressure on small spheres ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 100.2, p. 1231-1233.
- (1997). « Acoustic radiation force on a spherical particle in a viscous heat-conducting fluid. II. Force on a rigid sphere ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 101.2, p. 722-730.
- DOINIKOV, Alexander A et al. (2020). « Acoustic streaming produced by sharp-edge structures in microfluidic devices ». In : *Microfluidics and Nanofluidics* 24.5, p. 1-13.
- DOYCHEV, Todor (2015). *The dynamics of finite-size settling particles*. KIT Scientific Publishing.
- DRON, O. (2011). « Acoustic manipulation of micro-particles. Application to micro-PIV measurements. » Thèse de doct. Université Paris 7 - Denis Diderot.

- DRON, O. et J.-L. AIDER (2012a). « Acoustic energy measurement for a standing wave in a micro-channel ». In : *Europhysics Letters* 97 (4), p. 44011.
- DRON, O. et al. (2009). « Parametric study of acoustic focusing of particles in a microchannel in the perspective to improve micro-PIV measurements ». In : *Microfluidics and nanofluidics* 7, p. 857-867.
- DRON, Olivier et J-L AIDER (2012b). « Acoustic energy measurement for a standing acoustic wave in a micro-channel ». In : *EPL* (*Europhysics Letters*) 97.4, p. 44011.

DRON, Olivier et Jean-Luc AIDER (2013). « Varying the agglomeration position of particles in a micro-channel using Acoustic Radiation Force beyond the resonance condition ». In : *Ultrasonics* 53.7, p. 1280-1287.

- DUAL, Jürg et al. (2012). « Acoustofluidics 19 : Ultrasonic microrobotics in cavities : devices and numerical simulation ». In : *Lab on a Chip* 12.20, p. 4010-4021.
- DUMY, Gabriel, Mauricio HOYOS et Jean-Luc AIDER (2019). « Observation of selective optical manipulation of particles in acoustic levitation ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 146.6, p. 4557-4568.
- DUMY, Gabriel et al. (2020). « Acoustic manipulation of dense nanorods in microgravity ». In : *Microgravity Science and Technology* 32.6, p. 1159-1174.
- DUQUENNOY, Marc et al. (2012). « Développement de capteurs interdigités sur substrat piézoélectrique de type PZT pour la génération des ondes de surface en haute fréquence ». In : *Acoustics 2012*, paper-000033.
- DURMUS, Naside Gozde et al. (2015). « Magnetic levitation of single cells ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.28, E3661-E3668.
- ECKART, C. (1948). « Vortices and streams caused by sound waves ». In : *Physical review* 73, p. 68-76.
- ELLER, Anthony (1968). « Force on a bubble in a standing acoustic wave ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 43.1, p. 170-171.
- EMBLETON, TFW (1954). « Mean force on a sphere in a spherical sound field. I.(Theoretical) ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 26.1, p. 40-45.
- (1956). « The radiation force on a spherical obstacle in a cylindrical sound field ». In : *Canadian Journal of Physics* 34.3, p. 276-287.
- FAHRAEUS, Robin et Torsten LINDQVIST (1931). « The viscosity of the blood in narrow capillary tubes ». In : *American Journal of Physiology-Legacy Content* 96.3, p. 562-568.
- FANG, Xiaohong et Weihong TAN (2010). « Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine : a chemical biology approach ». In : *Accounts of chemical research* 43.1, p. 48-57.
- FEDOSOV, Dmitry A et al. (2010). « Blood flow and cell-free layer in microvessels ». In : *Microcirculation* 17.8, p. 615-628.
- FERRARA, Katherine, Rachel POLLARD et Mark BORDEN (2007). « Ultrasound microbubble contrast agents : fundamentals and application to gene and drug delivery ». In : *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, p. 415-447.
- FISCHER, Thomas M, M STOHR-LISSEN et Holger SCHMID-SCHONBEIN (1978). « The red cell as a fluid droplet : tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow ». In : *Science* 202.4370, p. 894-896.
- FRANKE, Thomas et al. (2009). « Surface acoustic wave (SAW) directed droplet flow in microfluidics for PDMS devices ». In : *Lab on a Chip* 9.18, p. 2625-2627.
- FURLANI, EP (2007). « Magnetophoretic separation of blood cells at the microscale ». In : *Journal of Physics D : Applied Physics* 40.5, p. 1313.
- GARBIN, Alexander et al. (2015). « Acoustophoresis of disk-shaped microparticles : A numerical and experimental study of acoustic radiation forces and torques ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 138.5, p. 2759-2769.

- GARVIN, Kelley A et al. (2013a). « Controlling collagen fiber microstructure in threedimensional hydrogels using ultrasound ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 134.2, p. 1491-1502.
- GARVIN, Kelley A et al. (2013b). « Spatial patterning of endothelial cells and vascular network formation using ultrasound standing wave fields ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 134.2, p. 1483-1490.
- GEISLINGER, TM et al. (2012). « Separation of blood cells using hydrodynamic lift ». In : *Applied Physics Letters* 100.18, p. 183701.
- GERSHON, Diane (2002). « An array of opportunities ». In : *Nature* 416.6883, p. 887-889.
- GIDDINGS, J Calvin (1985). « A system based on split-flow lateral-transport thin (SPLITT) separation cells for rapid and continuous particle fractionation ». In : *Separation Science and Technology* 20.9-10, p. 749-768.
- (1993). « Field-flow fractionation : analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials ». In : *Science* 260.5113, p. 1456-1465.
- GLYNNE-JONES, P. et al. (2010). « Mode-switching : A new technique for electronically varying the agglomeration position in an acoustic particle manipulator ». In : *Ultrasonics* 50, p. 68-75.
- GLYNNE-JONES, Peter, Rosemary J BOLTRYK et Martyn HILL (2012). « Acoustofluidics 9 : Modelling and applications of planar resonant devices for acoustic particle manipulation ». In : *Lab on a Chip* 12.8, p. 1417-1426.
- GOLDSMITH, Harry L et Samira SPAIN (1984). « Margination of leukocytes in blood flow through small tubes ». In : *Microvascular research* 27.2, p. 204-222.
- GOLDSMITH, HL (1971). « Red cell motions and wall interactions in tube flow. » In : *Federation proceedings*. T. 30. 5, p. 1578-1590.
- GONZALEZ, I. et al. (2009). « A polymeric chip for micromanipulation and particle sorting by ultrasounds based on a multilayer configuration ». In : *Sensors and actuators B* 144, p. 310-317.
- GOR'KOV, L. P. (1962). « On the forces acting on a small particle in an acoustic field in an ideal fluid ». In : *Sov. Phys.* 6.9, p. 773-775.
- GROOM, AC et JC ANDERSON (1972). « Measurement of the size distribution of human erythrocytes by a sedimentation method ». In : *Journal of cellular physiology* 79.1, p. 127-137.
- GROVER, William H et al. (2011). « Measuring single-cell density ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.27, p. 10992-10996.
- GUAZZELLI, Élisabeth (2006). « Sedimentation of small particles : how can such a simple problem be so difficult? » In : *Comptes Rendus Mecanique* 334.8-9, p. 539-544.
- H. BIROUN, Mehdi et al. (2020). « Dynamic behavior of droplet impact on inclined surfaces with acoustic waves ». In : *Langmuir* 36.34, p. 10175-10186.
- HAAKE, A. (2004). « Micromanipulation of small particles with ultrasound ». Thèse de doct. Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- HAMMARSTRÖM, Björn et al. (2014). « Frequency tracking in acoustic trapping for improved performance stability and system surveillance ». In : *Lab on a Chip* 14.5, p. 1005-1013.
- HARTONO, Deny et al. (2011). « On-chip measurements of cell compressibility via acoustic radiation ». In : *Lab on a Chip* 11.23, p. 4072-4080.
- HAWA, T. et Z. RUSAK (2001). « The dynamics of a laminar flow in a symmetric channel with a sudden expansion ». In : *Journal of Fluid Mechanics* 436, 283–320. DOI: 10.1017/S0022112001004086.

- HAWKES, J. J. et R. M. CASTRO (2008). « Acoustic streaming : the main driving mechanism for particle clump formation in MHz ultrasonic standing waves ». In : S15.
- HAWKES, Jeremy J et al. (2004). « Continuous cell washing and mixing driven by an ultrasound standing wave within a microfluidic channel ». In : *Lab on a Chip* 4.5, p. 446-452.
- HAY, Alex E et RW BURLING (1982). « On sound scattering and attenuation in suspensions, with marine applications ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 72.3, p. 950-959.
- HE, Mingyan et al. (2005). « Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter-and femtoliter-volume droplets ». In : *Analytical chemistry* 77.6, p. 1539-1544.
- HE, Xiao Min et Daniel C CARTER (1992). « Atomic structure and chemistry of human serum albumin ». In : *Nature* 358.6383, p. 209-215.
- HEFNER, Brian T et Philip L MARSTON (1999). « An acoustical helicoidal wave transducer with applications for the alignment of ultrasonic and underwater systems ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 106.6, p. 3313-3316.
- HILL, M. (2003). « The selection of layer thicknesses to control acoustic radiation force profiles in layered resonators ». In : *Journal of the acoustical society of America* 114, p. 2654-2661.
- HILL, M., Y. SHEN et J. J. HAWKES (2002). « Modelling of layered resonators for ultrasonic separation ». In : *Ultrasonics* 40, p. 385-392.
- HOPPE-SEYLER, F et al. (1953). Handbuch der physiologisch-und pathologisch-chemischen analyse : Untersuchung der organe körperflüssigkeiten und ausscheidungen. Springer.
- HOSSEINI BIROUN, Seyedmehdi et al. (2020). « Acoustic waves for active reduction of droplet impact contact time ». In : *Physical Review Applied*.
- HUANG, Po-Hsun et al. (2014). « A reliable and programmable acoustofluidic pump powered by oscillating sharp-edge structures ». In : *Lab on a Chip* 14.22, p. 4319-4323.
- HUISMAN, Sander G et al. (2016). « Columnar structure formation of a dilute suspension of settling spherical particles in a quiescent fluid ». In : *Physical Review Fluids* 1.7, p. 074204.
- JAMSHIDI, Arash et al. (2008). « Dynamic manipulation and separation of individual semiconducting and metallic nanowires ». In : *Nature Photonics* 2.2, p. 86-89.
- JEGER-MADIOT, Nathan et al. (2021). « Self-organization and culture of Mesenchymal Stem Cell spheroids in acoustic levitation ». In : *Scientific reports* 11.1, p. 1-8.
- JIANG, Yong et al. (1999). « Fractionation and size analysis of magnetic particles using FFF and SPLITT technologies ». In : *Journal of magnetism and magnetic materials* 194.1-3, p. 53-61.
- JUNG, Jin Ho et al. (2016). « On-demand droplet splitting using surface acoustic waves ». In : *Lab on a Chip* 16.17, p. 3235-3243.
- KAOUI, Badr, George BIROS et Chaouqi MISBAH (2009). «Why do red blood cells have asymmetric shapes even in a symmetric flow? » In : *Physical review letters* 103.18, p. 188101.
- KARTHICK, S et al. (2018). « Acoustic impedance-based size-independent isolation of circulating tumour cells from blood using acoustophoresis ». In : *Lab on a Chip* 18.24, p. 3802-3813.
- KIM, Sangho et al. (2007a). « Temporal and spatial variations of cell-free layer width in arterioles ». In : American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 293.3, H1526-H1535.

- KIM, Unyoung et al. (2007b). « Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.52, p. 20708-20712.
- KIM, Unyoung et al. (2008). « Multitarget dielectrophoresis activated cell sorter ». In : *Analytical chemistry* 80.22, p. 8656-8661.
- KING, L. V. (1934). « On the acoustic radiation pressure on spheres ». In : *Proceedings* of the Royal Society of London, Ser. A 147, p. 212-240.
- KRÜGER, Timm (2016). « Effect of tube diameter and capillary number on platelet margination and near-wall dynamics ». In : *Rheologica Acta* 55.6, p. 511-526.
- KUMAR, Amit et Michael D GRAHAM (2012). « Mechanism of margination in confined flows of blood and other multicomponent suspensions ». In : *Physical review letters* 109.10, p. 108102.
- KUNDT, A. (1866). « Ueber eine neue art akustischer staubfiguren und über die anwendung derselben zur bestimmung der schallgeschwindiktei in festen körpern und gasen ». In : Annalen der physic und chemie 127, p. 496-523.
- KUNDT, A. et O. LEHMANN (1874). « Ueber longitudinale schwinungen und klangfiguren in cylindrischen flüssigkeitssäulen ». In : *Annalen der physic und chemie* 153, p. 1-12.
- KUO, Tom K et al. (2008). « Stem cell therapy for liver disease : parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells ». In : *Gastroenterology* 134.7, p. 2111-2121.
- KUZNETSOVA, Larisa A et al. (2009). « Multiple three-dimensional mammalian cell aggregates formed away from solid substrata in ultrasound standing waves ». In : *Biotechnology progress* 25.3, p. 834-841.
- KWIATKOWSKI, C. S. et P. L. MARSTON (1998). « Resonator frequency shift due to ultrasonically induced microparticle migration in an aqueous suspension : Observations and model for the maximum frequency shift ». In : *Journal of the Acoustical Society of America* 103, p. 3290-3300.
- KWON, Keon Woo et al. (2007). « Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference ». In : *Lab on a Chip* 7.11, p. 1461-1468.
- LAI, James J et al. (2009). « Dynamic bioprocessing and microfluidic transport control with smart magnetic nanoparticles in laminar-flow devices ». In : *Lab on a Chip* 9.14, p. 1997-2002.
- LAXMI, Vijai et al. (2020). « Separation and Enrichment of Platelets from Whole Blood Using a PDMS-Based Passive Microdevice ». In : *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59.10, p. 4792-4801.
- LEE, CP et TG WANG (1993). « Acoustic radiation force on a bubble ». In : *The Journal* of the Acoustical Society of America 93.3, p. 1637-1640.
- LEIBACHER, Ivo, Sebastian SCHATZER et Jürg DUAL (2014). « Impedance matched channel walls in acoustofluidic systems ». In : *Lab on a Chip* 14.3, p. 463-470.
- LENSHOF, A. et al. (2012). « Acoustofluidics 5 : Building microfluidic acoustic resonators ». In : *Lab Chip* 12 (4), p. 684-695. DOI : 10.1039/C1LC20996E. URL : http: //dx.doi.org/10.1039/C1LC20996E.
- LENSHOF, Andreas et Thomas LAURELL (2010). « Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems ». In : *Chemical Society Reviews* 39.3, p. 1203-1217.
- LENSHOF, Andreas, Cecilia MAGNUSSON et Thomas LAURELL (2012). « Acoustofluidics 8 : Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems ». In : *Lab on a Chip* 12.7, p. 1210-1223.

- LENTACKER, Ine et al. (2014). « Understanding ultrasound induced sonoporation : definitions and underlying mechanisms ». In : *Advanced drug delivery reviews* 72, p. 49-64.
- LI, Sixing et al. (2015). « Standing surface acoustic wave (SSAW)-based cell washing ». In : *Lab on a Chip* 15.1, p. 331-338.
- LIN, Sz-Chin Steven, Xiaole MAO et Tony Jun HUANG (2012). « Surface acoustic wave (SAW) acoustophoresis : now and beyond ». In : *Lab on a Chip* 12.16, p. 2766-2770.
- LINK, Andreas et Thomas FRANKE (2020). « Acoustic erythrocytometer for mechanically probing cell viscoelasticity ». In : *Lab on a Chip* 20.11, p. 1991-1998.
- LIU, Robin Hui et al. (2003). « Hybridization enhancement using cavitation microstreaming ». In : *Analytical Chemistry* 75.8, p. 1911-1917.
- MACDONALD, Michael P, Gabriel C SPALDING et Kishan DHOLAKIA (2003). « Microfluidic sorting in an optical lattice ». In : *Nature* 426.6965, p. 421-424.
- MAEDA, NOBUJI et al. (1996). « Erythrocyte flow and elasticity of microvessels evaluated by marginal cell-free layer and flow resistance ». In : *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 271.6, H2454-H2461.
- MORTON, Keith J et al. (2008). « Hydrodynamic metamaterials : Microfabricated arrays to steer, refract, and focus streams of biomaterials ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.21, p. 7434-7438.
- MYERS, Marcus N (1997). « Overview of field-flow fractionation ». In : *Journal of Microcolumn Separations* 9.3, p. 151-162.
- NAGRATH, Sunitha et al. (2007). « Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology ». In : *Nature* 450.7173, p. 1235-1239.
- NARAYANAN, Nithin, Avinash SALDANHA et Bruce K GALE (2006). « A microfabricated electrical SPLITT system ». In : *Lab on a Chip* 6.1, p. 105-114.
- NOMURA, S., K. MURAKAMI et Y. SASAKI (2000). « Streaming induced by ultrasonic vibration in water vessel ». In : *Japanese journal of applied physics* 39.6, p. 3636-3640.
- NOWOTNY, H., E. BENES et M. SCHMID (1991). « Layered piezoelectric resonators with an arbitrary number of electrodes (general one-dimension treatment ». In : *Journal of the acoustical society of America* 90, p. 1238-1245.
- NYBORG, W. L. (1978). « Physical principles of ultrasound ». In : *Ultrasound : Its Application in Medicine and Biology* 1, p. 1-75.
- OAKEY, John, Josh ALLELY et David WM MARR (2002). « Laminar-flow-based separations at the microscale ». In : *Biotechnology progress* 18.6, p. 1439-1442.
- OKA, Syoten (1985). « A physical theory of erythrocyte sedimentation ». In : *Biorheology* 22.4, p. 315-321.
- OLLA, Piero (1997). « The lift on a tank-treading ellipsoidal cell in a shear flow ». In : *Journal de Physique II* 7.10, p. 1533-1540.
- OLSEN, M. G. et R. J. ADRIAN (2000). « Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry ». In : *Experiments in fluids* 29, S166-S174.
- PAMME, Nicole (2006). « Magnetism and microfluidics ». In : *Lab on a Chip* 6.1, p. 24-38.
- PAMME, Nicole et Andreas MANZ (2004). « On-chip free-flow magnetophoresis : continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates ». In : *Analytical chemistry* 76.24, p. 7250-7256.
- PANKHURST, QA et al. (2009). « Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine ». In : *Journal of Physics D : Applied Physics* 42.22, p. 224001.
- PANKHURST, Quentin A et al. (2003). « Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine ». In : *Journal of physics D : Applied physics* 36.13, R167.

- PARK, J. K., S. SONG et H. JUNG (2009). « Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels ». In : *Lab on a chip* 9, p. 939-948.
- PARK, Seungkyung et al. (2011). « Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity ». In : *Lab on a Chip* 11.17, p. 2893-2900.
- PASCAL, Pauline (2019). « Enjeux de l'industrialisation des thérapies cellulaires ». In :
- PETERSSON, Filip et al. (2004). « Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels ». In : *Analyst* 129.10, p. 938-943.
- PIALOT, Baptiste et al. (2020). « Flow Rate and Low Hematocrit Measurements for *InVitro* Blood Processing With Doppler Ultrasound ». In : *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 67.7, p. 1293-1302.
- PIOMELLI, Sergio et Carol SEAMAN (1993). « Mechanism of red blood cell aging : relationship of cell density and cell age ». In : *American journal of hematology* 42.1, p. 46-52.
- POHL, Herbert A (1951). « The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields ». In : *Journal of applied Physics* 22.7, p. 869-871.
- POMMER, Matthew S et al. (2008). « Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels ». In : *Electrophoresis* 29.6, p. 1213-1218.
- QIAN, Jiazhong et al. (2016). « The effect of expansion ratio on the critical Reynolds number in single fracture flow with sudden expansion ». In : *Hydrological Processes* 30.11, p. 1718-1726. DOI : https://doi.org/10.1002/hyp.10745.
- QUAIA, Emilio (2005). « Physical basis and principles of action of microbubble-based contrast agents ». In : *Contrast media in ultrasonography*. Springer, p. 15-30.
- RASMUSSEN, MB, LB ODDERSHEDE et H SIEGUMFELDT (2008). « Optical tweezers cause physiological damage to Escherichia coli and Listeria bacteria ». In : *Applied and environmental microbiology* 74.8, p. 2441-2446.
- RAYLEIGH, Lord (1883). In : Proc. R. Soc. London 36, p. 10.
- (1894). *The theory of sound*. London : Macmillan.
- RECHBERGER, Andreas et al. (2019). « High precision vibration-type densitometers based on pulsed excitation measurements ». In : *Sensors* 19.7, p. 1627.
- ROSSI, Massimiliano et Rune BARNKOB (2020). « A fast and robust algorithm for general defocusing particle tracking ». In : *Measurement Science and Technology* 32.1, p. 014001.
- SBOROS, Vassilis (2008). « Response of contrast agents to ultrasound ». In : *Advanced drug delivery reviews* 60.10, p. 1117-1136.
- SEGERS, Vincent FM et Richard T LEE (2008). « Stem-cell therapy for cardiac disease ». In : *Nature* 451.7181, p. 937-942.
- SHEN, Qinglin et al. (2013). « Specific capture and release of circulating tumor cells using aptamer-modified nanosubstrates ». In : *Advanced materials* 25.16, p. 2368-2373.
- SHI, Jinjie et al. (2009a). « Acoustic tweezers : patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW) ». In : *Lab on a Chip* 9.20, p. 2890-2895.
- SHI, Jinjie et al. (2009b). « Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW) ». In : *Lab on a Chip* 9.23, p. 3354-3359.
- SHILTON, R. et al. (2008). « Particle concentration and mixing in microdrops driven by focused surface acoustic waves ». In : *Journal of applied physics* 104, p. 014910.
- SNEZHKO, Alexey et Igor S ARANSON (2011). « Magnetic manipulation of self-assembled colloidal asters ». In : *Nature materials* 10.9, p. 698-703.

- SPENGLER, J. F. et M. JECKEL (2000). « Ultrasound conditioning of suspensions studies of streaming influence on particle aggregation on a lab - and pilot-plant scale. » In : *Ultrasonics* 38, p. 614-618.
- (2001). « Observation of yeast cell movement and aggregation in a small-scale MHz-ultrasonic standing wave field ». In : *Bioseparation* 9, p. 329-341.
- SRITHARAN, K et al. (2006). « Acoustic mixing at low Reynold's numbers ». In : *Applied Physics Letters* 88.5, p. 054102.
- SUGIO, S et al. (1999). « Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution ». In : *Protein engineering* 12.6, p. 439-446.
- SUN, Lujing et al. (2020). « Recent advances in microfluidic technologies for separation of biological cells ». In : *Biomedical Microdevices* 22.3, p. 1-16.
- SUNDIN, S. M. et al. (2007). « Acoustic resonances in microfluidic chips : full-image micro-PIV experiments and numerical simulations ». In : *Lab chip* 7, p. 1336-1344.
- TAIT, Angela et al. (2019). « Engineering multi-layered tissue constructs using acoustic levitation ». In : *Scientific reports* 9.1, p. 1-11.
- TAKAHASHI, Masayo (2016). « Retinal cell therapy using iPS cells ». In : *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 120.3, p. 210-24.
- TEH, Shia-Yen et al. (2008). « Droplet microfluidics ». In : Lab on a Chip 8.2, p. 198-220.
- TRAN, SBQ, Philippe MARMOTTANT et Pierre THIBAULT (2012). « Fast acoustic tweezers for the two-dimensional manipulation of individual particles in microfluidic channels ». In : Applied Physics Letters 101.11, p. 114103.
- TUZIUTI, T., T. KOZUKA et H. MITOME (1999). « Measurement of distribution of acoustic radiation force perpendicular to sound beam axis ». In : *Japanese journal of applied physics* 38, p. 3297-3301.
- UDROIU, Ion (2014). « Estimation of erythrocyte surface area in mammals ». In : *arXiv* preprint arXiv :1403.7660.
- UHLMANN, Markus et Todor DOYCHEV (2014). « Sedimentation of a dilute suspension of rigid spheres at intermediate Galileo numbers : the effect of clustering upon the particle motion ». In : *Journal of fluid mechanics* 752, p. 310-348.
- VARGAS-JIMÉNEZ, A et al. (2021). « A 3D analysis of the acoustic radiation force in microfluidic channel with rectangular geometry ». In : *Wave Motion* 101, p. 102701.
- VIG, Asger Laurberg et Anders KRISTENSEN (2008). « Separation enhancement in pinched flow fractionation ». In : *Applied Physics Letters* 93.20, p. 203507.
- VITALI, Valentina et al. (2019). « Differential impedance spectra analysis reveals optimal actuation frequency in bulk mode acoustophoresis ». In : *Scientific reports* 9.1, p. 1-10.
- WAN, Yuan et al. (2011). « Velocity effect on aptamer-based circulating tumor cell isolation in microfluidic devices ». In : *The Journal of Physical Chemistry B* 115.47, p. 13891-13896.
- WANG, Han et al. (2018). « Single-cell compressibility quantification for assessing metastatic potential of cancer cells through multi-frequency acoustophoresis ». In : *Microfluidics and Nanofluidics* 22.6, p. 1-7.
- (2019). « A continuous-flow acoustofluidic cytometer for single-cell mechanotyping ». In : *Lab on a Chip* 19.3, p. 387-393.
- WEIBEL, Douglas B et George M WHITESIDES (2006). « Applications of microfluidics in chemical biology ». In : *Current opinion in chemical biology* 10.6, p. 584-591.
- WESTERVELT, P. J. (1951). « The Theory of Steady Forces Caused by Sound Waves ». In : *The journal of the acoustical society of America* 23, p. 312-315.
- WHEELER, Aaron R et al. (2004). « Electrowetting-based microfluidics for analysis of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry ». In : *Analytical chemistry* 76.16, p. 4833-4838.

- WHITWORTH, G., M. A. GRUNDY et W. T. COAKLEY (1991). « Transport and harvesting of suspended particles using modulated ultrasound ». In : *Ultrasonics* 29, p. 439-444.
- WIKLUND, Martin, Roy GREEN et Mathias OHLIN (2012). « Acoustofluidics 14 : Applications of acoustic streaming in microfluidic devices ». In : *Lab Chip* 12 (14), p. 2438-2451. DOI : 10.1039/C2LC40203C. URL : http://dx.doi.org/10.1039/C2LC40203C.
- WOODSIDE, S. M., B. D. BOWEN et J. M. PIRET (1997). « Measurement of ultrasonic forces for particle-liquid separations ». In : *AIChE journal* 43, p. 1727-1736.
- WU, Mengxi et al. (2017). « Acoustic separation of nanoparticles in continuous flow ». In : *Advanced functional materials* 27.14, p. 1606039.
- YAMADA, Masumi et Minoru SEKI (2005). « Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics ». In : *Lab on a Chip* 5.11, p. 1233-1239.
- YANG, Sung, Akif ÜNDAR et Jeffrey D ZAHN (2006). « A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation ». In : *Lab on a Chip* 6.7, p. 871-880.
- YOSIOKA, K. et Y. KAWASIMA (1955). « Acoustic radiation pressure on a compressible sphere ». In : *Acustica* 5, p. 167-173.
- ZAREMBO, L. K. (1971). « Acoustic streaming ». In : *High Intensity Ultrasonic Fields* 85, p. 137-199.
- ZHANG, Chuanyu et al. (2019). « Acoustic streaming near a sharp structure and its mixing performance characterization ». In : *Microfluidics and Nanofluidics* 23.9, p. 1-15.
- ZHANG, Chuanyu et al. (2020). « The effect of sharp-edge acoustic streaming on mixing in a microchannel ». In : *Annales du Congrès Annuel de la Société Française de Thermique* 2020.
- ZHANG, Naiqing, Amihai HORESH et James FRIEND (2021). « Manipulation and Mixing of 200 Femtoliter Droplets in Nanofluidic Channels Using MHz-Order Surface Acoustic Waves ». In : Advanced Science, p. 2100408.
- ZHENG, Bo et al. (2004). « A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction ». In : *Angewandte chemie international edition* 43.19, p. 2508-2511.