



**HAL**  
open science

# Sphéroïdes tumoraux en lévitation acoustique : structuration et impact des contraintes mécaniques

Xavier Mousset

► **To cite this version:**

Xavier Mousset. Sphéroïdes tumoraux en lévitation acoustique : structuration et impact des contraintes mécaniques. Biotechnologies. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS317 . tel-04315846

**HAL Id: tel-04315846**

**<https://theses.hal.science/tel-04315846>**

Submitted on 30 Nov 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.



École Doctorale n°158 : Cerveau, Cognition, Comportement (ED3C)  
*CNRS 8246, Laboratoire Neurosciences Paris Seine*

## **Sphéroïdes tumoraux en lévitation acoustique : structuration et impact des contraintes mécaniques**

Présentée publiquement par  
Xavier MOUSSET  
le 08 Juin 2023 à Paris

Dirigée par  
**Jean-Michel PEYRIN & Jean-Luc AIDER**

### *Composition du jury*

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| BARESCH Diego      | <b>Président</b>    |
| CAPELLO Giovanni   | <b>Rapporteur</b>   |
| DESCROIX Stéphanie | <b>Examinatrice</b> |
| VAYSSADE Muriel    | <b>Rapportrice</b>  |
| WHILELM Claire     | <b>Examinatrice</b> |

|                    |                           |
|--------------------|---------------------------|
| AIDER Jean-Luc     | <b>Directeur de thèse</b> |
| PEYRIN Jean-Michel | <b>Directeur de thèse</b> |



# Remerciements

Une thèse est un morceau de vie long et difficile sans finalité. Mais surtout, une thèse se fait ensemble, avec l'aide de nombreuses personnes par des discussions, de l'apprentissage, des idées nouvelles ou des cafés... Une thèse se fait avec et pour les autres. Pour ma part, je dois ma thèse à beaucoup de personnes pour beaucoup trop de raisons et j'aimerais ici les remercier. S'il n'est pas si difficile de remercier les personnes qui le méritent, trouver les mots pour les remercier à la hauteur de notre gratitude est une autre paire de manches.

Dans un premier temps, je tiens à vous remercier, Jean-Michel et Jean-Luc, de m'avoir donné cette chance de grandir à vos côtés. Cette thèse a été l'une des expériences les plus enrichissantes de ma vie et si j'ai pu la mener au bout c'est grâce à vous. Je n'oublierais ni les discussions, ni les conseils, ni l'expérience, ni toutes les choses que vous m'avez apportées. Vous êtes des personnes fondamentalement pleines de gentillesse et de bienveillance. Merci pour ces années.

Dans la même lignée, je tiens à remercier l'équipe avec laquelle j'ai collaboré, pour toutes les idées et conseils qu'ils m'ont apportés. Merci de votre accueil dans votre salle de culture, merci pour les astuces de cultures et d'analyses, merci d'avoir soutenu notre équipe comme vous l'avez fait. Merci particulièrement à toi, Marie-Pierre, pour la confiance que tu nous as accordée et l'intérêt que tu as porté à la lévitation acoustique. Tu es une chercheuse que je trouve admirable et je te souhaite le meilleur pour tes dernières années de recherche. Merci à toi Elias, d'avoir répondu à mes nombreuses questions et d'avoir réussi l'exploit de me détendre juste avant le début de la soutenance. Enfin, merci énormément à toi Virgile, pour tout ce temps passé ensemble dans le P2. Nos discussions, tant professionnelles que personnelles, me manquent déjà. Tu es une personne formidable, merci pour tout.

Viennent ensuite deux personnes, Chloé et Pierre-Ewen, avec qui j'ai partagé énormément de choses. Des joies, des galères, des vols, des bières, des gens, des bouteilles de gaz, des bureaux, des mugs, des transducteurs, des gâteaux (de Joseph), des T-shirts, des cafés, des livraisons, des crous... Vous avoir connu est l'une des plus belles choses que cette thèse m'ait apportées. A vous je ne dis pas merci, je l'ai déjà fait trop de fois et je continuerais encore longtemps. Je vous dis juste que je vous aime. Puissiez-vous léviter toujours plus haut.

Je voudrais remercier plus généralement tous les membres du PMMH et du NPS que j'ai pu côtoyer. De façon plus nominative, je voudrais remercier dans un premier temps les membres de mon bureau : Aliénor pour toutes ces discussions, notamment autour des courbes droites, Baptiste pour toutes ces énigmes ainsi que pour ton investissement pour le

PMMH, Joseph pour tes gâteaux salvateurs, un jour promis Chloé te les remboursera, ainsi qu'Hector et Pablo. Je voudrais remercier les autres membres de mon équipe, à commencer par Nathan pour toutes les aides, les explications, les inventions, les résultats et les manip que l'on a pu partager, ainsi que Guillaume, Baptiste et Lucille pour ces moments passés avec vous. Je voudrais remercier NA, Kadia et Théo pour tous les conseils, explications, formations, astuces et services que vous m'avez procurés au cours de ces années. Et enfin, je voudrais également remercier Fred et Claudette pour toutes les galères administratives que je leur ai fait subir, mais qu'elles ont toujours arrangées.

Que serait-on sans sa famille? Dans mon cas, pas grand-chose. Je voudrais donc remercier Philou et Chloé de m'avoir soutenu, de m'avoir accueilli si souvent et de m'avoir montré la voie de la réussite. Merci évidemment à Patou et Doudou, mes parents, d'avoir été mes premiers guides sur le magnifique chemin qu'est ma vie, pour leur foi inconditionnelle dans ma réussite et surtout pour leur humour, leur gentillesse et leur amour incomparable. Merci aussi à toute ma famille, Mousset comme Vals, Dupin comme Portou, qui sont des personnes chères à mes yeux, d'un altruisme et d'une tendresse débordantes. Merci à vous tous pour tous ces moments de vie partagés qui, bien plus que réchauffer mon cœur, embrasent mon âme.

Le dernier remerciement est pour ma meilleure amie, mon amour, mon épouse. Tu sais déjà tout, mais je vais au moins redire une chose. Merci de partager cette vie avec moi.

# Table des matières

|   |            |
|---|------------|
| <b>Remerciements</b>  | <b>iii</b> |
| <b>1 Introduction</b>   | <b>3</b>   |
| <b>1.1 Rôle des forces mécaniques dans la biologie des tumeurs cancéreuses</b>                                    | <b>3</b>   |
| 1.1.1 Contexte biologique : la tumeur et son environnement . . . . .  | 3          |
| 1.1.2 Une tumeur cérébrale : le glioblastome . . . . .  | 7          |
| 1.1.3 Le sphéroïde comme modèle de phénomènes tumoraux . . . . .  | 11         |
| 1.1.4 Étude mécanique des sphéroïdes . . . . .  | 19         |
| <b>1.2 Origine et théorie de la lévitation acoustique</b>   | <b>27</b>  |
| 1.2.1 Généralités sur les ondes acoustiques . . . . .   | 28         |
| 1.2.2 Force de radiation acoustique . . . . .   | 31         |
| 1.2.3 Streaming acoustique . . . . .  | 39         |
| <b>1.3 Acoustique et biologie</b>   | <b>42</b>  |
| 1.3.1 Utilisation de l'acoustique en médecine . . . . .   | 42         |
| 1.3.2 Manipulation d'objets biologiques par acoustique . . . . .  | 44         |
| 1.3.3 Effet des ondes acoustiques sur les cellules . . . . .  | 49         |
| <b>1.4 Description de l'approche proposée pendant le travail de thèse</b>   | <b>50</b>  |
| <b>2 Conception de puces acoustofluidiques pour la culture long-terme et la structuration de sphéroïdes de GB</b> | <b>51</b>  |
| <b>2.1 Conception du bioréacteur acoustique</b>   | <b>52</b>  |
| 2.1.1 Description des puces acoustofluidiques . . . . .   | 52         |
| 2.1.2 Transducteur ultrasonore . . . . .  | 54         |
| 2.1.3 Propagation des ondes acoustiques dans les puces . . . . .  | 55         |
| 2.1.4 Atténuation des ondes acoustiques . . . . .   | 57         |
| 2.1.5 Schéma d'une culture . . . . .  | 58         |
| 2.1.6 Interface microfluidique : la puce mono-noeud . . . . .   | 58         |
| 2.1.7 Injection des cellules . . . . .  | 61         |
| 2.1.8 Interface microfluidique : Puce multi-noeuds . . . . .  | 62         |
| 2.1.9 Description du streaming acoustique . . . . .   | 63         |
| <b>2.2 Viabilité des cellules maintenues en lévitation</b>  | <b>64</b>  |
| 2.2.1 Description des lignées cellulaires . . . . .   | 65         |
| 2.2.2 Test au bleu Trypan . . . . .   | 65         |
| 2.2.3 Marquage Live/Dead . . . . .  | 67         |
| <b>2.3 Formation et croissance de sphéroïdes de GB en lévitation</b>  | <b>70</b>  |
| 2.3.1 Dynamique de formation des sphéroïdes . . . . .   | 70         |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 2.3.2      | Quantification de la dynamique de formation des sphéroïdes . . . . .  | 73         |
| <b>2.4</b> | <b>Structuration d'agrégats en lévitation acoustique</b> . . . . .  | <b>76</b>  |
| 2.4.1      | Formation d'une structure concentrique . . . . .  | 76         |
| 2.4.2      | Application de la structuration : vers un modèle d'infiltration de<br>tumeurs par des cellules immunitaires . . . . .               | 78         |
| <b>2.5</b> | <b>Discussion</b> . . . . .   | <b>82</b>  |
| <b>3</b>   | <b>Caractérisation acoustique des puces acoustofluidiques</b>   | <b>87</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Création d'un modèle numérique</b> . . . . .   | <b>88</b>  |
| 3.1.1      | Description du modèle . . . . .   | 88         |
| 3.1.2      | Champ acoustique simulé . . . . .   | 90         |
| 3.1.3      | Domaine fréquentiel . . . . .   | 92         |
| <b>3.2</b> | <b>Mesure de l'ARF axiale</b> . . . . .   | <b>96</b>  |
| 3.2.1      | Méthode de mesure par PIV . . . . .   | 97         |
| 3.2.2      | Méthode de mesure par technique de défocalisation . . . . .   | 104        |
| 3.2.3      | Méthode de mesure par diminution de l'ARF . . . . .   | 107        |
| <b>3.3</b> | <b>Force de radiation acoustique transversale</b> . . . . .   | <b>113</b> |
| 3.3.1      | Méthodes de tracking . . . . .  | 113        |
| 3.3.2      | Caractérisation du streaming acoustique . . . . .   | 115        |
| <b>3.4</b> | <b>Caractérisation de la distance inter-noeud, application biologique<br/>pour le contrôle de la fusion de sphéroïdes</b> . . . . . | <b>119</b> |
| 3.4.1      | Distance inter-noeuds . . . . .   | 119        |
| 3.4.2      | Fusion de sphéroïdes . . . . .  | 121        |
| <b>3.5</b> | <b>Discussion</b> . . . . .   | <b>122</b> |
| <b>4</b>   | <b>Impact de l'ARF sur les sphéroïdes de GB</b>   | <b>125</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Ajustement thermique en fonction du voltage</b> . . . . .  | <b>126</b> |
| 4.1.1      | Mesure de température dans le bioréacteur . . . . .   | 127        |
| 4.1.2      | Modification de la température de l'incubateur . . . . .  | 130        |
| <b>4.2</b> | <b>Impact de l'augmentation d'ARF sur la formation et la croissance<br/>des sphéroïdes</b> . . . . .                                | <b>132</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Impact de l'augmentation d'ARF sur la densité et la prolifération<br/>des sphéroïdes</b> . . . . .                               | <b>135</b> |
| 4.3.1      | Analyse quantitative des marquages DAPI et Ki67 . . . . .   | 135        |
| <b>4.4</b> | <b>Compression transitoire des sphéroïdes par l'ARF</b> . . . . .   | <b>140</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Description des contraintes mécaniques appliquées aux sphéroïdes</b>   | <b>141</b> |
| 4.5.1      | Régime de diffusion de Rayleigh . . . . .   | 141        |
| 4.5.2      | Pression acoustique exercée sur les sphéroïdes . . . . .  | 143        |
| <b>4.6</b> | <b>Discussion</b> . . . . .   | <b>143</b> |
| <b>5</b>   | <b>Matériels et Méthodes</b>  | <b>149</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Dispositifs de culture acoustofluidiques</b> . . . . .   | <b>149</b> |
| 5.1.1      | Conception des différentes pièces . . . . .   | 149        |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.1.2      | Puces en PDMS . . . . .                         | 150        |
| 5.1.3      | Génération des ondes acoustiques . . . . .      | 151        |
| 5.1.4      | Mesures de température . . . . .                | 151        |
| <b>5.2</b> | <b>Culture cellulaire . . . . .</b>             | <b>152</b> |
| 5.2.1      | Culture de glioblastomes et BV2 . . . . .       | 152        |
| 5.2.2      | Culture en lévitation acoustique . . . . .      | 152        |
| 5.2.3      | Analyse au bleu Trypan . . . . .                | 152        |
| 5.2.4      | Fixation, congélation et cryosections . . . . . | 153        |
| 5.2.5      | Immunohistochimie . . . . .                     | 153        |
| <b>5.3</b> | <b>Analyses d'images . . . . .</b>              | <b>154</b> |
| 5.3.1      | Images en vue latérale . . . . .                | 154        |
| 5.3.2      | Traitement d'images en vue latérale . . . . .   | 154        |
| 5.3.3      | Image de fluorescence sur coupe . . . . .       | 155        |
| <b>5.4</b> | <b>Autres méthodes . . . . .</b>                | <b>157</b> |
| 5.4.1      | Analyses statistiques . . . . .                 | 157        |
|            | <b>Conclusion générale</b>                      | <b>159</b> |
|            | <b>A Listes des paramètres</b>                  | <b>161</b> |
|            | <b>Bibliographie</b>                            | <b>163</b> |



# Abréviations

**ARF** Acoustic Radiation Force - Force de Radiation Acoustique.

**BAW** Bulk Acoustic Waves - Onde Acoustique de Volume.

**ECM** ExtraCellular Matrix - Matrice Extra-Cellulaire.

**GB** Glioblastoma or glioblastoma cells - Glioblastome ou cellules de glioblastome.

**OCT** Optimal Cutting Temperature embedding medium for frozen tissue specimens - milieu d'enrobage à température de coupe optimale pour les échantillons de tissus congelés.

**PDMS** Poly-Di-Methyl-Siloxane.

**PIV** Particle Image Velocimetry - Vélocimétrie par Image de Particules.

**PSM** Biosafety cabinet - Poste de Sécurité Microbiologique.

**ROI** Region(s) Of Interest - Région(s) D'Intérêt(s).

**RT** Room Temperature - Température Ambiante soit environ 20°C.

**SAW** Surface Acoustic Waves - Onde Acoustique de Surface.

**TME** Tumor Micro-Environment - Micro-Environnement Tumoral.

**UV** UltraViolet.

**w/w** weight / weight - masse / masse.



# Chapitre 1

## Introduction

### Sommaire

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.1 Rôle des forces mécaniques dans la biologie des tumeurs cancéreuses</b> . . . . . | <b>3</b>  |
| 1.1.1 Contexte biologique : la tumeur et son environnement . . . . .                     | 3         |
| 1.1.2 Une tumeur cérébrale : le glioblastome . . . . .                                   | 7         |
| 1.1.3 Le sphéroïde comme modèle de phénomènes tumoraux . . . . .                         | 11        |
| 1.1.4 Étude mécanique des sphéroïdes . . . . .   | 19        |
| <b>1.2 Origine et théorie de la lévitation acoustique</b> . . . . .                      | <b>27</b> |
| 1.2.1 Généralités sur les ondes acoustiques . . . . .                                    | 28        |
| 1.2.2 Force de radiation acoustique . . . . .  | 31        |
| 1.2.3 Streaming acoustique . . . . .   | 39        |
| <b>1.3 Acoustique et biologie</b> . . . . .  | <b>42</b> |
| 1.3.1 Utilisation de l'acoustique en médecine . . . . .                                  | 42        |
| 1.3.2 Manipulation d'objets biologiques par acoustique . . . . .                         | 44        |
| 1.3.3 Effet des ondes acoustiques sur les cellules . . . . .                             | 49        |
| <b>1.4 Description de l'approche proposée pendant le travail de thèse</b>                | <b>50</b> |

---

## 1.1 Rôle des forces mécaniques dans la biologie des tumeurs cancéreuses

### 1.1.1 Contexte biologique : la tumeur et son environnement

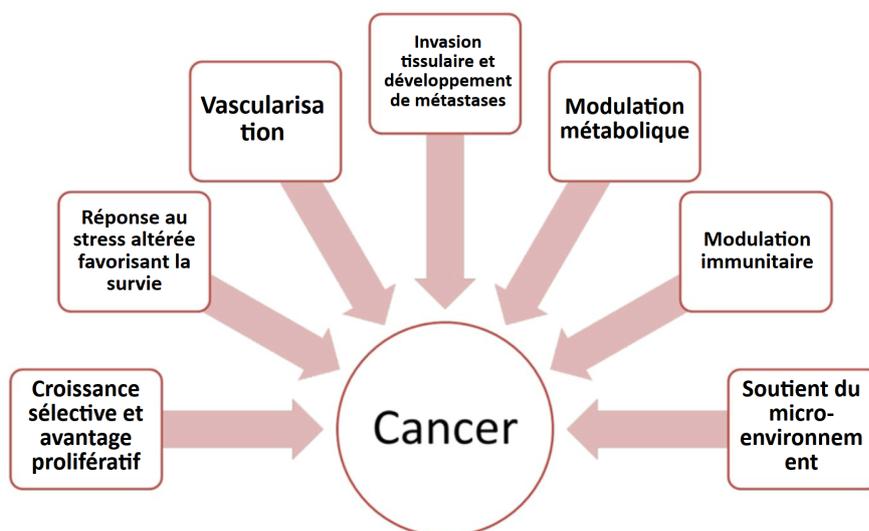
#### Émergence des tumeurs

Une tumeur, qui peut être bénigne ou maligne, réfère à l'augmentation du volume d'un tissu qui survient à la suite de mutations génétiques provoquant un dérèglement de la croissance cellulaire. Le cancer est la version maligne d'une tumeur qui est parvenue à surmonter différentes limitations imposées aux cellules afin de pouvoir se développer

comme décrit sur la figure 1.1. Les tumeurs malignes solides sont complexes. D'un point de vue histologique, les tumeurs sont principalement constituées de deux composants majeurs : le premier correspond à une masse des cellules néoplasiques en prolifération ; le second au moins aussi important que le premier étant le stroma de support tumoral qui incorpore en son sein une variété de cellules de l'environnement constituées de fibroblastes, de cellules endothéliales qui s'organisent en néo-vaisseaux sanguins irriguant la tumeur et d'une variété de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques...) infiltrant progressivement la tumeur. Si ce sont les cellules tumorales qui soutiennent principalement la croissance et la différenciation du tissu tumoral, l'ensemble des travaux récents objective l'importance du dialogue entre stroma et cellules néoplasiques dans les phénomènes de progression tumorale. Le processus de genèse et de croissance tumorale est donc un phénomène complexe et très dynamique où les relations avec le micro-environnement sont cruciales.

Au cours des processus de tumorigenèse, les cellules cancéreuses acquièrent séquentiellement différentes propriétés. L'entretien des signaux prolifératifs et leur insensibilité aux suppresseurs de croissance leur permettent de pouvoir constamment se répliquer et faire ainsi grossir la tumeur. Cela provient de la dérégulation des voies de signalisation émettrices et réceptrices de la cellule permettant une amplification ou une inhibition des signaux correspondants. La résistance à l'apoptose et l'immortalité répliquative, qui consistent en la capacité à pouvoir répliquer l'ADN indéfiniment en évitant ainsi la sénescence, permettent aux cellules tumorales d'échapper à la mort cellulaire, ce qui donne la capacité à une tumeur de pouvoir se reformer à partir d'une seule cellule ou de ne pas diminuer en taille. L'angiogenèse, qui permet la vascularisation des tissus, est essentielle. Elle permet à la tumeur d'être correctement vascularisée afin de se procurer l'oxygène et les nutriments nécessaires à son développement et permettre l'évacuation des déchets. L'inflammation et l'invasion définissent le grade et l'agressivité de la tumeur.

Bien que d'intenses recherches soient réalisées sur le cancer, il demeure une pathologie grave et complexe à fort taux de mortalité. Sa détection à un stade précoce est une nécessité afin d'endiguer au mieux la maladie. Il existe de nombreuses formes de cancer que l'on peut regrouper en deux grandes catégories : les solides comme les sarcomes, gliomes ou carcinomes et les liquides comme les leucémies ou les lymphomes. Pour les tumeurs solides, la croissance tumorale s'accompagne d'une augmentation de la contrainte mécanique. Nombre de cancers solides peuvent être détectés en observant une différence de rigidité dans le tissu comme le cancer du sein [Mahoney and Csimá, 1982]. Le tissu mammaire normal est mou avec une rigidité d'environ 200 Pa alors que les tumeurs mammaires ont une rigidité beaucoup plus élevée de l'ordre de 4000 Pa [Johnson et al., 2007]. Que ce soit par la palpation ou par d'autres techniques non invasives plus avancées comme l'élastographie, l'objectif reste le même : détecter une région aux propriétés mécaniques différentes de celles de son environnement. Des études ont notamment montré une rigidité 10 fois supérieure pour le tissu mammaire cancéreux par rapport au tissu mammaire normal [Levental et al., 2009].



**Figure 1.1 Les 7 signes distinctifs d'un cancer** Représentation de 7 caractéristiques essentielles à la progression d'un cancer. Description des signes distinctifs en les numérotant de gauche à droite. **1** Les cellules normales possèdent un cycle cellulaire précis et régulé délivrant des signaux de croissance pour une prolifération contrôlée et un maintien de l'homéostasie. Les voies de signalisation de la croissance et de la prolifération des cellules cancéreuses possèdent au moins une altération qui va favoriser leur survie et leur prolifération. **2** Les cellules cancéreuses sont soumises à de nombreux stress comme l'hypoxie, la pénurie de nutriments, les traitements médicaux, etc. Toutes les cellules s'adaptent au stress dans la mesure du possible ou enclenchent des mécanismes comme l'apoptose en cas de stress trop important. Les cellules cancéreuses, au détriment du bien global du tissu, détournent ces mécanismes afin d'assurer leur survie et leur propagation. **3** Pour continuer de se développer et se propager, la tumeur, comme tout autre tissu, doit être vascularisée. Afin de subvenir à ses besoins, elle favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-angiogenèse). **4** La capacité à envahir les tissus plus ou moins éloignés afin de former des métastases est une caractéristique d'une majorité des tumeurs malignes et une des principales causes de décès du cancer. **5** Un métabolisme modifié procure à la tumeur un avantage sélectif lors de son initiation et de sa progression. Parmi ces modifications métaboliques, on peut trouver la dérégulation de l'absorption en nutriments ou des interactions altérées avec le micro-environnement. **6** Lors de l'initiation d'une tumeur, les quelques cellules cancéreuses sont ciblées par le système immunitaire. Mais il arrive que certaines de ces cellules parviennent à échapper à cette surveillance. Elles vont alors pouvoir se développer malgré un système immunitaire intact. **7** Le micro-environnement tumoral contient des cellules non cancéreuses (eg : cellules immunitaires, fibroblastes, cellules spécifiques de l'organe atteint telles que les cellules neurales dans le système nerveux central) qui contribuent à la croissance et à la prolifération de la tumeur par de nombreux biais. Elles sont un exemple parmi d'autres du soutien fourni par le micro-environnement à la tumeur. Issu de [Fouad and Aanei, 2017]

## Mécanotransduction et micro-environnement tumoral

Il est important de comprendre qu'une tumeur ne correspond pas à la simple présence de cellules cancéreuses, mais à une modification globale du tissu dans lequel elle se développe. Les tissus avoisinants la tumeur subissent sa présence et évoluent avec elle. La tumeur bénéficie ainsi d'un micro-environnement complexe, qui participe notamment à sa résistance aux thérapies. La matrice extracellulaire (ECM) est un composant non cellulaire essentiel de ce micro-environnement. Elle permet l'ancrage des cellules et se compose de collagène, protéoglycanes et glycoprotéines. Parmi les autres composants du micro-environnement, on peut retrouver des vaisseaux sanguins ainsi qu'une large diversité de cellules immunitaires et les composants normaux de l'organe atteint.

Il est maintenant admis que les signaux biochimiques échangés entre les cellules tumorales et les éléments de leur micro-environnement sont modifiés et jouent un rôle essentiel dans son développement et sa progression. Outre les signaux biochimiques, la croissance tumorale provoque également une importante modification des pressions mécaniques en son sein et sur le tissu environnant. Les cellules, et particulièrement les cellules tumorales, possèdent des récepteurs mécano-sensibles leur permettant de percevoir, de réagir et même de modifier les propriétés mécaniques les environnant [Vogel and Sheetz, 2006]. Elles peuvent également traduire des signaux mécaniques en signaux biochimiques. Ces signaux peuvent engendrer diverses réponses à l'échelle cellulaire comme modifier la morphologie, l'adhésion, le comportement, la différenciation des cellules, etc, mais également à l'échelle tissulaire comme la rigidité illustrée sur la figure 1.2. Leipzig et Shoichet ont observé que des cellules souches neurales se différenciaient différemment selon la rigidité du substrat lors de la culture. Ils ont observé qu'une différenciation en neurones était privilégiée pour les surfaces  $< 1$  kPa, en astrocytes pour celles entre 1 kPa et 3,5 kPa et en oligodendrocytes pour les surfaces  $> 7$  kPa [Leipzig and Shoichet, 2009]. Cette capacité des cellules à réagir à des signaux mécaniques s'appelle la mécanotransduction [French, 1992, Jaalouk and Lammerding, 2009, Wang, 2017]. Plusieurs éléments ont été identifiés comme acteurs de celle-ci. On peut citer par exemple le mécanorécepteur PIEZO1 [Coste et al., 2010] ou le facteur de transmission YAP [Mendez and Janmey, 2012]. De manière plus concrète, la mécanotransduction peut se voir à travers la dégénérescence musculaire des astronautes au cours de leur mission dans l'ISS [Chen, 2008]. L'étude de la mécanotransduction au sein des tumeurs est en plein essor.

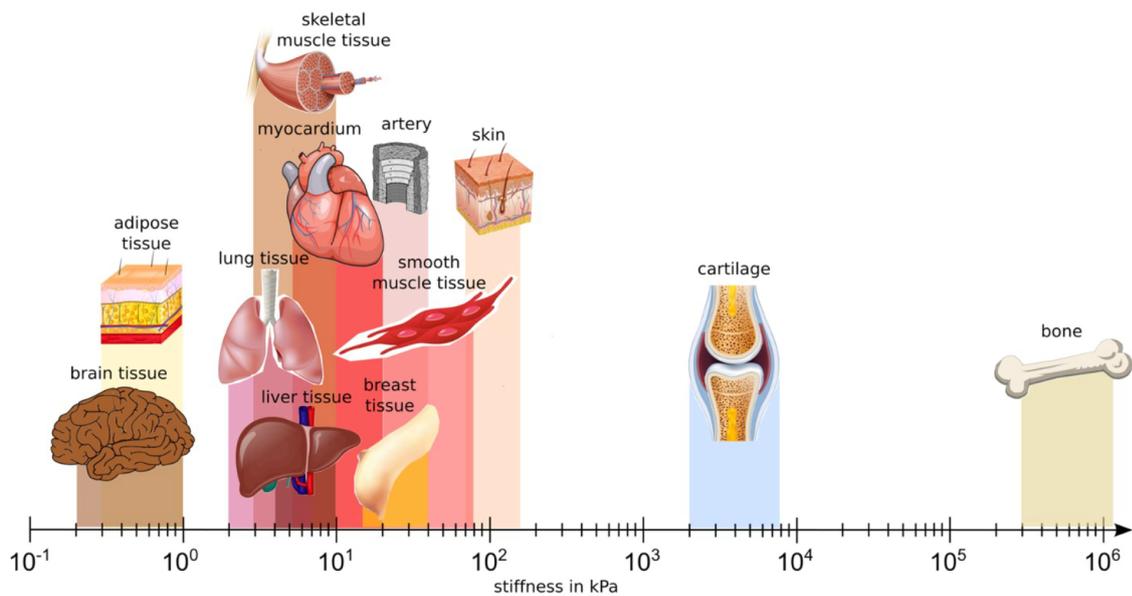
A l'échelle d'une tumeur, le rôle de la mécanotransduction est très important [Estes et al., 2004, Butcher et al., 2009], intervenant dans la croissance ou la résistance de la tumeur aux thérapies. Des modifications dans les propriétés mécaniques intrinsèques des cellules tumorales ainsi qu'une modification de rigidité au sein de la tumeur et de son micro-environnement ont été observées. En effet, pour se développer et croître, une tumeur se déforme et altère son micro-environnement. Par réaction, le tissu vient résister à la déformation et l'expansion de la tumeur, ce qui engendre des contraintes mécaniques. La rigidité élevée du tissu tumoral par rapport à son micro-environnement repose sur deux principaux facteurs. Le premier est l'interaction de la tumeur avec l'ECM, notamment via la densité de collagène de type I [Wullkopf et al., 2018]. Cette rigidification est

corrélée à la progression et à l'impact de la tumeur [Acerbi et al., 2015] et montre un dérèglement du processus de mécanotransduction des cellules tumorales. C'est notamment cette rigidité qui est recherchée lors de certains diagnostics comme évoqué précédemment. L'augmentation de cette rigidité force les adhésions cellules-matrices et augmente la tension du cytosquelette [Levental et al., 2009]. Le second provient de la prolifération exacerbée des cellules tumorales dans un espace limité, permise par la dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire [Sherr, 1996], qui engendre une densité élevée de cellules tumorales. Cette densité génère des contraintes mécaniques internes à la tumeur. Des expériences d'ouverture de tumeurs ont montré la présence de ces contraintes et notamment la différence de comportement entre le tissu tumoral interne et périphérique [Butcher et al., 2009]. Leur méthode d'analyse consiste à sectionner jusqu'à 80% du diamètre de la tumeur puis de mesurer la relaxation du tissu. Alors que les tissus normaux ne se déforment pas, les tumeurs, elles, se déforment. Les zones centrales se gonflent et la périphérie s'évase afin de relaxer les contraintes présentes dans la tumeur. Voutouri et al. [Voutouri et al., 2014] prédisent que pour s'étendre, une tumeur doit être au moins 1,5 fois plus rigide que le tissu sain environnant. Outre les contraintes mécaniques dites *solides*, il existe également des contraintes mécaniques exercées par les différents fluides présents au sein de la tumeur. Comme décrit en figure 1.1, la croissance de la tumeur s'accompagne d'une néo-angiogenèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux depuis un réseau préexistant. Pour proliférer, les cellules ont besoin des vaisseaux sanguins pour obtenir les nutriments nécessaires et éliminer leurs déchets. Les contraintes de la tumeur conduisent toutefois à la création d'un système vasculaire désorganisé qui n'assure pas un apport complet en oxygène et nutriments, ce qui favorise l'apparition de gradients de concentration entre la zone périphérique et la zone centrale d'une tumeur. Ce système vasculaire désorganisé provoque également une augmentation de la pression du fluide interstitiel.

### 1.1.2 Une tumeur cérébrale : le glioblastome

#### Physiopathologie des GB

Les gliomes diffus sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Les cellules souches neurales et progéniteurs d'oligodendrocytes sont considérés comme les sources les plus fréquentes de ces tumeurs, bien que des modélisations chez la souris aient démontré que des cellules matures telles que les astrocytes ou les neurones puissent également donner naissance à des gliomes. Les cellules souches neurales, via leur différenciation progressive en progéniteurs puis en cellules matures, donnent naissance à l'ensemble des cellules dites neurales au cours du développement, à savoir neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Astrocytes et oligodendrocytes sont des cellules dites gliales au rôle essentiel dans la survie des neurones, l'établissement de la barrière hématoencéphalique ou de l'homéostasie cérébrale. Les oligodendrocytes assurent la formation d'une gaine de myéline autour des axones, permettant ainsi d'augmenter la vitesse de propagation et la fréquence des influx nerveux. Des précurseurs d'oligodendrocytes perdurent chez l'adulte. Les as-



**Figure 1.2** Échelle de rigidité de différents tissus humains Parmi les tissus du corps humain, le tissu cérébral est l'un des plus mous. Issu de [Budday et al., 2020]

trocytes, d'abord connus comme cellules de support et de protection des neurones ayant de multiples fonctions comme l'apport d'énergie, jouent également un rôle essentiel dans la communication neuronale. Chez l'adulte, on distingue 3 types de gliomes diffus : les astrocytomes, caractérisés par la mutation de l'enzyme Isocitrate DésHydrogénase (astrocytoma IDH<sup>MUT</sup>), les oligodendrogliomes, caractérisés par la mutation d'IDH et la codélétion chromosomale 1p/19q (Oligodendroglioma, IDH-mutant, et 1p/19q-codeleted) et les glioblastomes qui se distinguent des autres gliomes diffus par une forme sauvage d'IDH (Glioblastoma, IDH-wildtype) [Louis et al., 2021]. Leur nom provient de leur ressemblance plus ou moins marquée avec des cellules gliales. Le glioblastome (GB) est le plus agressif des gliomes diffus. Il est systématiquement fatal. Il est caractérisé par l'anaplasie de ses cellules (perte de différenciation des cellules faisant en sorte qu'elles retournent à une forme immature et moins spécialisée), un fort index mitotique, des régions de nécrose, une forte néo-vascularisation et une forte densité de cellules tumorales.

Le glioblastome représente plus de 50% des cas de tumeurs malignes primaires du système nerveux central chez l'adulte, son incidence allant de 2 à 5 cas pour 100 000 personnes en occident. Au niveau mondial, le nombre de nouveaux cas est estimé à environ 250 000 par an. Le GB ne présente pas de localisation particulière au sein du cerveau, mais peut se propager rapidement en son sein [Louis et al., 2007]. Même si toutes les tranches d'âge sont concernées, ce sont les personnes de plus de 50 ans qui sont les plus touchées. Avec un taux de survie à cinq ans de 7% ainsi qu'un taux de survie médian de 8 mois pour les patients atteints [Ostrom et al., 2021], le GB est l'un des cancers au plus mauvais pronostic malgré des traitements multimodaux incluant résection chirurgi-

cale, radiothérapie et chimiothérapie. Le caractère invasif des cellules de GB ne permet pas une résection chirurgicale complète et la récurrence de ce cancer est attendue. De nombreuses approches thérapeutiques innovantes sont en cours comme l'immunothérapie, la stimulation électrique de faible intensité, la thérapie génique et la thérapie ciblée, mais le GB, de par la présence d'un micro-environnement tumoral spécifique et hétérogène, de la barrière hématoencéphalique et la grande plasticité de ses cellules qui s'adaptent et survivent aux diverses thérapies, reste un défi thérapeutique.

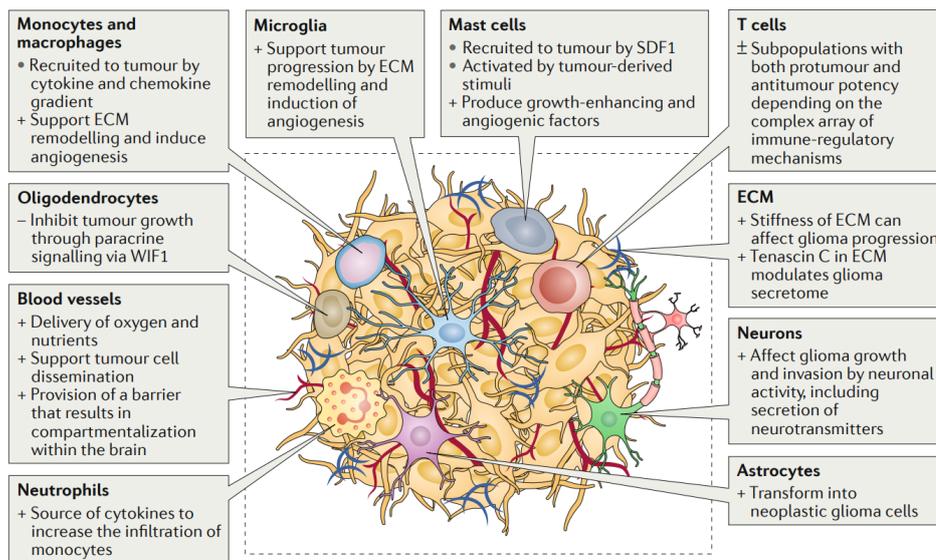
Le GB étant une maladie rare, seuls peu de patients peuvent participer aux tests cliniques. La recherche actuelle cherche donc à produire des modèles *in vitro* se rapprochant au plus près de l'*in vivo* (micro-environnement tumoral, contrainte mécanique, hétérogénéité cellulaire, interactions cellules-cellules et cellules-matrice, etc). D'un point de vue thérapeutique, avoir un modèle de GB biomimétique pouvant servir à des essais de médicaments en vue d'une médecine personnalisée serait l'idéal. Une solution afin d'obtenir un tel modèle consiste à cultiver un explant de tissu tumoral dans une boîte de pétri recouverte de collagène. Cela conserve la structure réelle de la tumeur avec tous les composants de son micro-environnement [Freeman and Hoffman, 1986]. Mais une telle technique engendre des complications de reproductibilité et de conservation des tissus. Des modèles moins fidèles, mais possédant une reproductibilité élevée, sont donc privilégiés comme le sphéroïde ou l'organoïde. Ils sont plus éloignés du modèle *in vivo*, mais offrent néanmoins une meilleure prédiction des comportements tissulaire qu'une culture en monocouche.

### Micro-environnement et contraintes mécaniques

Un autre obstacle important pour les thérapies anti-tumorales conventionnelles est l'hétérogénéité du micro-environnement tumoral (TME) du GB comme illustré figure 1.3. Ce TME est composé de différentes populations de cellules malignes et de cellules normales comme les cellules neurales, immunitaires ou endothéliales et de l'ECM. Des études ont montré la coexistence de micro-territoires distincts contenant des cellules malignes dans différents états fonctionnels [El-Habr et al., 2017, Bogeas et al., 2018, Debruyne et al., 2018]. La plasticité cellulaire de ces cellules leur permet de passer de manière réversible d'un état fonctionnel à un autre en réponse aux modifications de leur environnement.

Le GB est également l'une des tumeurs les plus vascularisées, mais les nouveaux vaisseaux formés sont souvent peu efficaces et limitent l'apport d'oxygène dans la tumeur. Ce réseau désorganisé et dysfonctionnel entraîne une hétérogénéité micro-environnementale avec un gradient d'oxygène dynamique [Evans et al., 2004]. Cet environnement affaibli en oxygène peut accroître les chances de voir apparaître un phénotype malin et ainsi augmenter l'agressivité de la tumeur [Yang et al., 2012].

A l'instar de nombreuses autres tumeurs solides, le développement du micro-environnement d'un GB s'accompagne de contraintes mécaniques. Elles sont exercées sur les cellules tumorales comme sur celles de leur environnement. Ces contraintes proviennent d'une rigidification de l'ECM et d'une vascularisation plus importante. Il est à noter qu'au sein d'un GB différentes rigidités sont observées [Ciasca et al., 2016]. Ces contraintes sont souvent associées aux symptômes neurologiques subits par les patients [Seano et al., 2019].



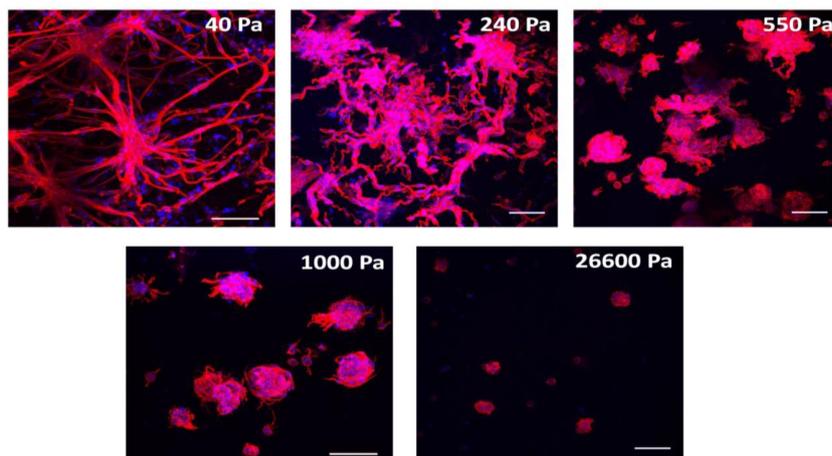
**Figure 1.3 Micro-environnement des GB** Les GB sont composés de cellules malignes, de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, microglies, mastocytes, cellules T), de cellules endothéliales (vaisseaux sanguins), de cellules neurales (oligodendrocytes, neurones, astrocytes) et de la matrice extra-cellulaire (ECM). "+" signifie une fonction profitable à la tumeur tandis que "-" signifie une fonction anti-tumorale. Issu de [Broekman et al., 2018]

et al. [Chen et al., 2018b] ont montré que PIEZO1, un canal ionique ayant la fonction de mécano-récepteur, est surexprimé dans les gliomes agressifs comme les GB, et que son expression est inversement proportionnelle à la survie du patient.

Cette rigidité accrue de la matrice extracellulaire a un impact positif sur les cellules de GB. Ulrich et al. [Ulrich et al., 2009] ont observé une différence de comportement migratoire et prolifératif des cellules de GB en fonction de la rigidité du substrat. Sur un substrat dont la rigidité est proche de celle mesurée pour le tissu cérébral normal ( $< 1$  kPa), les cellules tumorales ont une forme sphérique et ne parviennent pas à migrer efficacement. Sur un substrat rigide ( $> 1$  kPa), les cellules tumorales s'étendent et migrent rapidement. Ils ont également observé que les cellules se divisent beaucoup plus rapidement sur le substrat rigide. Bangasser et al. [Bangasser et al., 2017] montrent également qu'il existe une rigidité optimale sur laquelle les cellules migreront le plus efficacement. Ils ont également développé un modèle permettant la prédiction de cette rigidité. Leur modèle comme leurs expériences montrent que les cellules de gliomes ont une rigidité optimale plus importante que les neurones primaires du cerveau ( $\approx 100$  kPa contre  $\approx 1$  kPa).

### Modèles de GB *in vitro*

La diversité du micro-environnement tumoral du GB ainsi que la diversité des états fonctionnels des cellules le composant rendent difficile la création d'un modèle *in vitro* générique reproduisant cette complexité [Rape et al., 2014]. Différentes approches sont employées afin de créer des modèles *in vitro* de GB reproduisant partiellement la com-



**Figure 1.4** La rigidité de l’hydrogel est corrélée à l’étalement des cellules de GB et à la formation d’un réseau cellulaire interconnecté dans les hydrogels. Projection confocale en Z de la coloration du cytosquelette d’actine à 14 jours. La F-actine est marquée en rouge, les noyaux en bleu. Barre d’échelle = 100  $\mu\text{m}$ . Issu de [Wang et al., 2021a]

plexité du GB présente chez les patients. On peut prendre comme exemple la revue de Dundar et al. montrant les nombreuses approches possibles pour la modélisation et l’étude de l’invasion des gliomes *in vitro* [Dundar et al., 2020]. Parmi les modèles 3D existant, on trouve des sphéroïdes obtenus à partir de cultures de cellules dérivées de patients [Hubert et al., 2016], ou des tissus plus complexes issus de résection chirurgicale [Jacob et al., 2020]. Ces modèles *in vitro* ont notamment permis l’étude de la capacité invasive des GB [Krieger et al., 2020, Saurty-Seerunghen et al., 2022], leurs différentes réponses aux médicaments [Loong et al., 2020] ainsi que leur micro-environnement tumoral et son rôle dans le maintien de la diversité cellulaire des GB [Pine et al., 2020].

Les sphéroïdes sont un modèle particulièrement intéressant [LaBarbera et al., 2012]. Formés de cellules dérivées à partir des exérèses des tumeurs de patients, ils peuvent reproduire des caractéristiques présentes chez les patients, dont des caractéristiques histologiques, des gradients de nutriments et d’oxygène, l’hétérogénéité cellulaire, etc. Ils peuvent donc être de bons modèles pour tester les réponses aux médicaments. Ils ont l’avantage de pouvoir être générés rapidement et en grand nombre de façons reproductible. Ils n’en restent pas moins des modèles, ne reproduisant pas tous les aspects des GB comme le système vasculaire par exemple.

### 1.1.3 Le sphéroïde comme modèle de phénomènes tumoraux

#### Un modèle en trois dimensions

Les premiers sphéroïdes multicellulaires ont été développés dans les années 1970 par Sutherland et al. [Sutherland et al., 1970] pour étudier les effets de la radiothérapie. Jusqu’alors, les systèmes de culture cellulaire les plus couramment utilisés pour étudier les mécanismes biologiques de la tumorigenèse étaient les systèmes *in vitro* en deux dimensions

(2D). Dans ces systèmes, des cellules sont introduites en suspension monocellulaire au contact d'un substrat de culture bidimensionnel (généralement du verre ou du plastique), de forte rigidité (de l'ordre du GPa). Dans ce contexte, les cellules vont adhérer au support de culture et en fonction des milieux nutritifs apportés vont croître et se différencier pour former la plupart du temps des monocouches cellulaires. Certains types cellulaires (par exemple, les neurones) n'adhèrent pas spontanément au support de culture, il est possible de les voir se réorganiser en structures multicellulaires 3D (par exemple en sphère pour les neurones, appeler neurosphère). Par ailleurs, les cellules tumorales ayant perdu leur inhibition de contact, les tapis cellulaires 2D peuvent évoluer vers la formation d'agrégats 3D émergeant de la monocouche cellulaire. Ces systèmes de cultures sont particulièrement appropriés pour étudier des phénomènes tels que la signalisation intracellulaire [Dertinger and Hülser, 1984], le criblage de molécules à visée thérapeutique [Vinci et al., 2012, Carver et al., 2014], la migration cellulaire et dans une certaine mesure l'émergence de propriétés collectives [Rangarajan and Zaman, 2008]. Leur principal intérêt est de permettre de procéder à des expériences à relativement haut débit pour tester des scénarios moléculaires tout en garantissant une observation aisée des cellules avec des techniques de microscopie photonique. Cependant, même si de nombreux travaux récents visent à développer des systèmes de cultures avancés, notamment à l'aide de la conception de dispositifs microfluidiques permettant d'imposer des contraintes mécaniques aux cellules et de contrôler très finement leur micro-environnement, voire de contrôler les interactions intercellulaires, ils ne permettent pas de modéliser des phénomènes complexes comme la dynamique d'interaction des cellules en 3D [Coluccio et al., 2019]. Or, de nombreux travaux montrent que les cellules croissant dans des environnements 3D acquièrent des propriétés plus proches des situations *in vivo* [Justice et al., 2009, Knight and Przyborski, 2015]. C'est notamment le cas en cancérologie ou un nombre croissant de travaux montrent que l'évaluation de composés antitumoraux est bien plus prédictive dans les systèmes 3D que dans les systèmes 2D. Un exemple de différence entre une culture 2D et un sphéroïde est qu'il ne limite pas les interactions cellules-cellules comme les cultures en monocouches. Du fait de leur forte adhésion au support, de nombreux types de cellules cultivées sur des substrats en deux dimensions s'aplatissent, prolifèrent à un rythme anormalement rapide et perdent leur phénotype différencié par rapport à leur homologue *in vivo* [Jensen and Yong, 2020]. Cependant, les cellules retrouvent leur forme et leur fonction physiologiques lorsqu'elles sont réintroduites dans un environnement 3D. Ainsi, une cellule de sphéroïde interagira avec les autres cellules ou l'ECM en trois dimensions comme en *in vivo*. Il y a donc un essor récent de travaux portant sur le développement de systèmes de cultures tridimensionnels.

L'essor actuel des techniques de culture 3D [Lee et al., 2023] est principalement porté par le développement des techniques de genèse et de culture des organoïdes d'une part, dont l'ambition est de procéder à la reconstruction d'organes *in vitro*, d'autre part via l'avènement de nouvelles techniques de structuration, manipulation et observation d'agrégats cellulaires. Alors que les sphéroïdes sont des agrégats de cellules constitués à partir de lignées immortalisées ou de cellules primaires, les organoïdes, eux, proviennent de cellules souches embryonnaires, de cellules souches pluripotentes induites ou de cellules souches

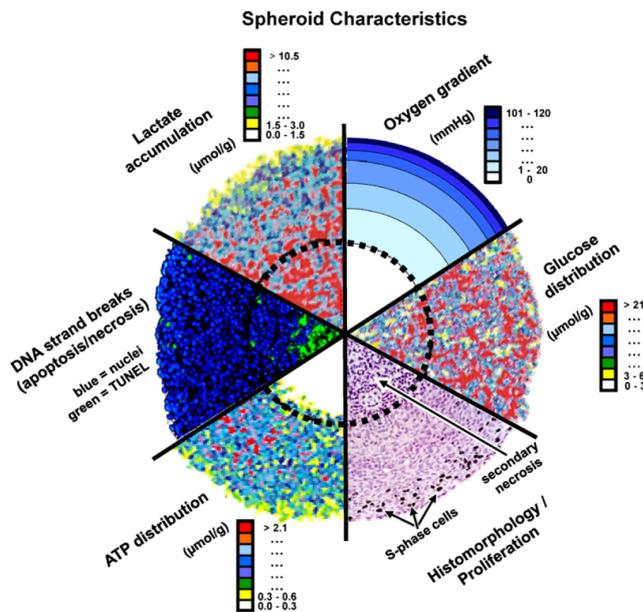
adultes [Kim et al., 2020] et récapitulent les grandes étapes de l’organogenèse. En effet, grâce à leur capacité d’auto-renouvellement et de différenciation, il est possible d’orienter ces cellules afin qu’elles s’auto-organisent pour former ces agrégats multicellulaires hétérogènes, ou organoïdes, contenant les mêmes types cellulaires présents dans un organe en particulier [Sato and Clevers, 2015, de Souza, 2018]. Ils peuvent être creux ou pleins selon le type cellulaire et de la culture réalisée. Les modèles organoïdes reproduisent un environnement personnalisé *in vivo* plus fidèlement que les sphéroïdes, mais leur génération est plus complexe et requiert plus de temps de culture que pour la production de sphéroïdes.

Si la communauté des biologistes fonde de grands espoirs sur le développement des techniques de culture d’organoïdes, ces dernières montrent un certain nombre de limitations. Premièrement, du fait d’un environnement de culture encore mal maîtrisé, de nombreux problèmes de reproductibilité sont rencontrés dans le processus d’auto-organisation des structures tridimensionnelles [Peng et al., 2018]. Ainsi, la plupart des organoïdes, quelle qu’en soit l’origine, forment spontanément des structures sphériques à l’intérieur desquelles les cellules en cours de différenciation s’auto-organisent en respectant certaines figures observées au cours du développement. C’est le cas notamment des organoïdes cérébraux, dans lesquelles des figures de rosettes constituées de précurseurs neuronaux qui vont ensuite migrer radialement, sont retrouvées de façon stochastique dans la sphère constituant l’organoïde [Lancaster et al., 2013]. Par ailleurs, s’ils sont constitués de cellules souches humaines, les temps de différenciation des organoïdes humains sont particulièrement longs. A titre d’exemple, l’émergence de rythmes neuronaux dans les organoïdes cérébraux n’apparaît qu’après plusieurs mois de culture [Trujillo et al., 2019, Gordon et al., 2021].

Si la cinétique de différenciation semble intrinsèquement liée à l’espèce animale utilisée pour fabriquer les organoïdes, les problèmes topologiques (formation spontanée de sphères) sont plus probablement liés au fait que les techniques de culture ne récapitulent pas un certain nombre d’instructions développementales (forces mécaniques, gradients environnementaux de facteurs trophiques et de nutriments etc).

Dans ce contexte, l’émergence des microtechnologies pour la manipulation de cellules laisse espérer le développement d’outils permettant d’implémenter dans les dispositifs, un contrôle dynamique de l’environnement mécanique et fluide autour des organoïdes en croissance. Ainsi, de nombreux systèmes microfluidiques, qui présentent l’avantage d’être facilement prototypables, sont actuellement à l’étude pour, par exemple, contrôler l’interaction de différents organoïdes entre eux [Zhu et al., 2023, Ao et al., 2021], tenter d’implémenter une vascularisation en procédant à une coculture des organoïdes avec des cellules endothéliales [Park et al., 2020], contrôler l’environnement mécanique des organoïdes en croissance [Scott and Huang, 2022], etc.

Dans le contexte de la cancérologie, le terme *organoïde* s’apparente en fait au terme de *tumoroïde*. Ils sont constitués, le plus fréquemment, d’agrégats multicellulaires tumoraux cultivés à partir de cellules tumorales de patients [Hirschhaeuser et al., 2010, Jubelin et al., 2022], mais peuvent également être générés à partir d’une cellule unique [Chen et al., 2018a]. Mises en culture dans des systèmes adéquats, ces cellules s’auto-organisent



**Figure 1.5** Combinaison d’images provenant de coupes histologiques de sphéroïdes. Ces images, issues de techniques d’analyses différentes, permettent la compréhension des différents gradients induisant les trois zones caractéristiques. Issu de [Hirschhaeuser et al., 2010]

en sphères pour constituer des sphéroïdes. Leur dynamique résulte de mécanismes d’adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice si celle-ci a été artificiellement introduite dans l’environnement de culture et/ou sécrétée par les cellules. Ainsi, lorsque les cellules sont d’origine tumorale, une masse cellulaire va progressivement se constituer et celle-ci présentera un certain nombre de similitudes avec une tumeur *in vivo*. Il va notamment s’établir de nombreux gradients chimiques au sein de l’agrégat tels que des gradients en nutriments (oxygène ou d’Adénosine TriPhosphate (ATP)) ou en produits du métabolisme cellulaire (lactase ou  $\text{CO}_2$ ) comme illustré figure 1.5.

En fonction des conditions environnementales (taux de renouvellement des milieux de culture, présence de facteurs trophique, de matrice extracellulaire), le sphéroïde va croître progressivement. La limite de diffusion de l’oxygène dans un tissu étant de l’ordre de  $300\ \mu\text{m}$ , il va progressivement s’établir un gradient d’oxygénation de la périphérie vers le cœur du sphéroïde en culture qui n’est pas vascularisé comme *in vivo*. Ceci va provoquer la formation d’une "zone nécrotique" au centre du sphéroïde où les cellules sont en dégénérescence. Si ce phénomène général constitue une limite importante dans le développement des organoïdes "physiologiques", certains proposent que la présence d’un "cœur nécrotique" dans les tumoroides représente une condition physiopathologique, couramment observés dans les tumeurs de patients.

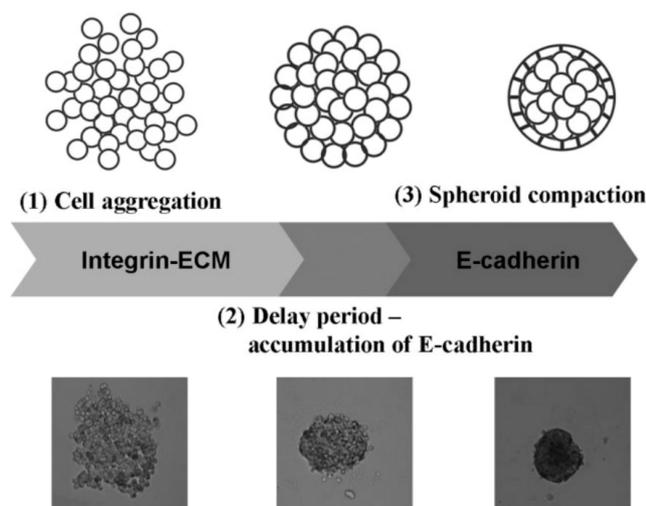
Ces gradients vont modifier l’environnement cellulaire, ce qui impacte directement le comportement des cellules et fait émerger trois zones caractéristiques [Debruyne et al., 2022] : La zone de prolifération en surface qui profite d’un apport en oxygène et nutri-

ment élevé, la zone de nécrose au centre qui, à l'inverse, a un apport très limité de ces ressources et parvient difficilement à éliminer ces déchets, et la zone de quiescence entre ces deux premières [Nath and Devi, 2016]. Des études immunohistochimiques montrent l'existence de cellules prolifératives jusqu'à 200  $\mu\text{m}$  sous la surface du sphéroïde, tandis que la zone nécrotique associée à une mort cellulaire peut apparaître entre 50 et 300  $\mu\text{m}$  selon les cellules concernées, leur taux de consommation en nutriments, leur densité, etc. On retrouve ces mêmes zones et gradients dans des nodules tumoraux inférieurs à 1 mm de diamètre. Un modèle de sphéroïde peut donc voir apparaître différents gradients et provoquer une hétérogénéité cellulaire comme au sein d'une micro-tumeur.

### Techniques de formation de Sphéroïdes

De nombreuses techniques de formation et de culture de sphéroïde ont été développées [Lv et al., 2017]. Elles ont chacune leurs caractéristiques propres, leurs avantages et leurs inconvénients. Il n'en reste pas moins que ce sont les forces mécaniques inter-cellulaires qui permettent l'émergence d'un agrégat de cellules compactes et cohésif tel qu'un sphéroïde. Il faut noter que les cellules humaines ne sont pas toutes en mesure de former un sphéroïde [Carlsson et al., 1983] qu'elles soient cancéreuses ou non. De plus, la taille d'un sphéroïde est limitée [Folkman and Hochberg, 1973]. En effet, comme décrit précédemment, à partir d'une certaine taille, le sphéroïde verra une zone de nécrose apparaître en son centre. Cette zone s'élargira à mesure que le sphéroïde grandira jusqu'à ce que le sphéroïde ait atteint un équilibre homéostatique entre division et mort cellulaire.

Les différentes techniques de formation reposent principalement sur le fait de contraindre



**Figure 1.6** **Modèle du processus de formation d'un sphéroïde** La formation des sphéroïdes peut être divisée en trois étapes : **(1)** Formation d'agrégats cellulaires via les liaisons intégrine-ECM **(2)** Expression et l'accumulation des cadhérines **(3)** Formation de sphéroïdes compacts via les interactions spécifiques cadhérine-cadhérine. Issu de Lin et al. 2008 [Lin and Chang, 2008]

les cellules à s'accumuler en un point unique, souvent par sédimentation, afin qu'elles puissent s'agréger et s'auto-organiser en sphéroïde comme décrits sur la figure 1.6. Nous allons détailler les différentes techniques actuellement utilisées [Lin and Chang, 2008, Nath and Devi, 2016, Kang et al., 2021] en les regroupant en cinq grandes catégories.

### Les techniques à support

$$\text{Poids : } \vec{P} = m\vec{g}$$

Une des techniques de formation les plus simples consiste à utiliser la sédimentation naturelle des cellules et ainsi placer suffisamment de cellules dans un micro-puits afin de forcer l'agrégation cellulaire. La simplicité de cette technique est également son défaut. La taille du sphéroïde, comme le nombre de cellules le composant, est variable. Les cellules ont tendance à s'accrocher aux parois et peuvent former plusieurs sphéroïdes distincts, ce qui affecte la reproductibilité. Il est néanmoins assez facile de corriger ces problèmes avec un contrôle précis des différents paramètres du système.

Un premier moyen de correction est le micro-modelage. Il consiste à sculpter des micro-structures dans un moule, souvent réalisé avec du polyéthylène glycol, de l'agarose ou du PDMS qui sont des matériaux inertes et non-adhésifs pour les cellules, afin de guider l'agrégation cellulaire ainsi que la géométrie finale du sphéroïde et ainsi réduire la polydispersité des structures finales [Chao and Engelward, 2020]. Cette géométrie peut être sphérique, longitudinale, toroïdale, etc. Selon la technique utilisée, généralement lithographique comme la photolithographie, la taille et le rapport d'aspect de ces micro-structures peuvent avoir une précision micrométrique. Lorsque les cellules sont déposées à l'intérieur de la micro-structure, elles vont sédimenter et finalement s'assembler en agrégats. Si elles ne sont pas récupérées, elles vont ensuite proliférer jusqu'à atteindre les bords de la micro-structure et ainsi adopter sa géométrie. Cette méthode permet de former des sphéroïdes de taille et de forme contrôlées à haut débit et facilement récupérables. Elle peut être facilement couplée avec de l'imagerie ou des tests biochimiques. Eut égard aux matériaux utilisés (généralement hydrophobes), elle peut rentrer également dans la catégorie des techniques à faible adhésion.

Parmi les techniques à support, certaines utilisent une matrice d'hydrogel servant à encapsuler les sphéroïdes dans un support physique. Il est possible de former des sphéroïdes directement au sein de ces matrices en emprisonnant une suspension cellulaire au sein de l'hydrogel. Cette technique est également largement utilisée avec des sphéroïdes préalablement formés via d'autres techniques afin d'étudier l'impact du support physique sur le sphéroïde. Cette méthode permet une bonne évaluation des interactions cellules-cellules et cellules-ECM, mais le confinement impacte la vitesse de croissance du sphéroïde. De plus, l'observation du sphéroïde à l'intérieur de l'hydrogel peut se révéler difficile.

### Les techniques à faible adhésion

$$\text{Loi de Laplace : } \Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Avec  $\Delta P$  la différence de pression intérieur-extérieur,  $\gamma$  le coefficient de tension superficielle et  $R$  le rayon de courbure.

Parmi les autres techniques à faible adhésion, illustrées en figure 1.7 A et B, on retrouve la suspension de gouttes, l'encapsulation ou encore la quasi-totalité des techniques à support auxquelles est ajouté un revêtement à faible adhésion. La technique par suspension de goutte permet la génération de sphéroïdes de taille, nombre de cellules et de composition contrôlé. Classiquement, les gouttes de milieu de culture ont un volume d'environ 20  $\mu\text{L}$  et contiennent autour de 1000 cellules. C'est la tension de surface entre le milieu et la plaque qui maintient les gouttes en place [Foty, 2011]. En sédimentant, les cellules viennent naturellement s'agréger au niveau de l'interface milieu-air. Cette technique permet notamment de former un sphéroïde sans que les cellules s'appuient sur un support solide. Elle permet de former beaucoup de sphéroïdes dans un espace limité avec peu de milieu de culture, mais produit généralement des sphéroïdes de tailles variables et à long terme, les sphéroïdes formés devront être transférés afin d'avoir accès à plus de milieu. Une autre technique ne s'appuyant pas sur un support est l'encapsulation. Via une puce microfluidique, les cellules et leur milieu de culture sont emprisonnés au sein d'une micro-capsule souvent déformable [Sart et al., 2017]. Elles sédimentent et s'agrégeront pour former un sphéroïde. Cette technique permet de générer des sphéroïdes homogènes, mais le confinement augmente la fréquence de nécrose.

### Les techniques à partie mobile

$$\text{Force centrifuge : } F = m\omega^2 R$$

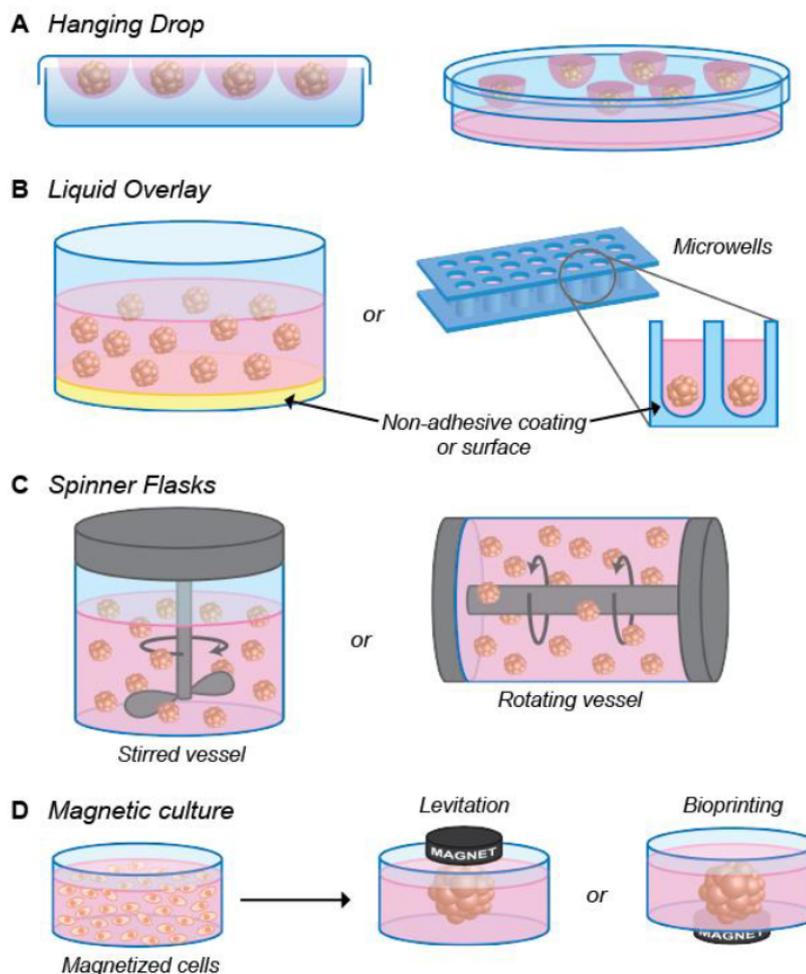
Avec  $m$  la masse,  $\omega$  la vitesse angulaire et  $R$  le rayon de rotation.

La force centrifuge est une force d'inertie s'exerçant sur des objets en rotation à une vitesse angulaire constante. Elle est dirigée dans l'axe du rayon de rotation. La culture par culot est l'exemple le plus simple de son utilisation. Elle consiste à former un culot dans un tube conique par centrifugation, forçant l'agrégation des cellules contenue dans le tube. Une centrifugation élevée peut toutefois avoir des effets indésirables sur les cellules et pourrait perturber certains processus cellulaires.

Les systèmes rotatifs sont plus courants pour la production haut débit et sont illustrés en figure 1.7 C. Les cellules sont mises en suspension dans le milieu grâce à une rotation interne ou externe afin d'empêcher les cellules d'adhérer au fond et d'augmenter la probabilité de rencontre des cellules entre-elles. Les systèmes de cultures à rotation interne utilisent un agitateur qui permet une mise en mouvement du milieu de culture offrant une répartition homogène de l'oxygène et des nutriments. Une des limites à l'utilisation de ce système est la force de cisaillement assez forte que subissent les cellules [Lin and

[Chang, 2008]. Les systèmes de cultures à rotation externe mettent en rotation le système lui-même. Ces systèmes possèdent les mêmes avantages que leurs homologues à rotation interne, mais permettent en plus de réduire les forces que subissent les cellules [Muhitch et al., 2000]. Au sein d'un tel système, les cellules restent en suspension grâce à l'équilibre entre la force gravitationnelle et la force de traînée hydrodynamique en ajustant la vitesse de rotation. On peut également placer dans cette catégorie les systèmes n'ayant pas de partie mobile autre que le milieu afin de former des sphéroïdes [Ota et al., 2010].

Ces techniques sont avant tout utilisées pour leur simplicité, leur capacité à générer un grand nombre de sphéroïdes dans les problématiques de bioproduction (scaling up). En contrepartie, elles présentent un intérêt limité pour des études de multiplexage à haut débit.



**Figure 1.7 Représentation des différentes techniques de formation et de culture de sphéroïdes** **A** et **B** Formation par goutte suspendue ou par revêtement non-adhésif faisant partie des techniques à faible adhésion. **C** Flasques rotatives faisant parties des techniques à partie mobile. On voit les deux approches possibles : faire tourner un objet à l'intérieur de la flasque ou faire directement tourner la flasque. **D** Formation par magnétisme issu des techniques à force extérieure. Issu de [Van Zundert et al., 2020]

## Les techniques à force extérieure

$$\text{Seconde loi de Newton : } \Sigma \vec{F}_{ext} = m \vec{a}$$

C'est dans ces techniques que l'on retrouve l'agrégation par acoustique ainsi que par magnétisme comme illustré figure 1.7 D. Ces techniques viennent appliquer une force extérieure supplémentaire sur les cellules afin de forcer leur agrégation et permettre la formation d'un sphéroïde. Les techniques magnétiques [Kim et al., 2013] implique l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétiques que les cellules internalisent. Ces nanoparticules, qui vont permettre de guider magnétiquement l'assemblage des cellules, ne doivent pas impacter la viabilité des cellules sur les temps de culture prévus. Un aimant est souvent placé sous la culture cellulaire pour agréger les cellules. Il est cependant possible de le placer au-dessus et de faire de la lévitation magnétique. La lévitation magnétique peut s'apparenter à une culture en goutte suspendue inversée. Les techniques acoustiques se regroupent en deux catégories : les techniques à ondes de surface (SAW) et les techniques à ondes de volumes (BAW). Dans les deux cas, une onde stationnaire est créée afin d'agréger les cellules par force de radiation acoustique aux noeuds de pression qui sont des points fixes de l'espace grâce à l'onde stationnaire. Les cellules ainsi agrégées vont adhérer puis former un sphéroïde [Liu et al., 2007]. Ces techniques produisent généralement un nombre limité de sphéroïdes et nécessitent des traitements ou du matériel spécifique comme des nanoparticules ou des transducteurs. Chen et al. [Chen et al., 2016] utilisent par exemple l'agrégation acoustique par onde de surface pour agréger rapidement les cellules entre-elles et récupérer les prémices de sphéroïdes formés.

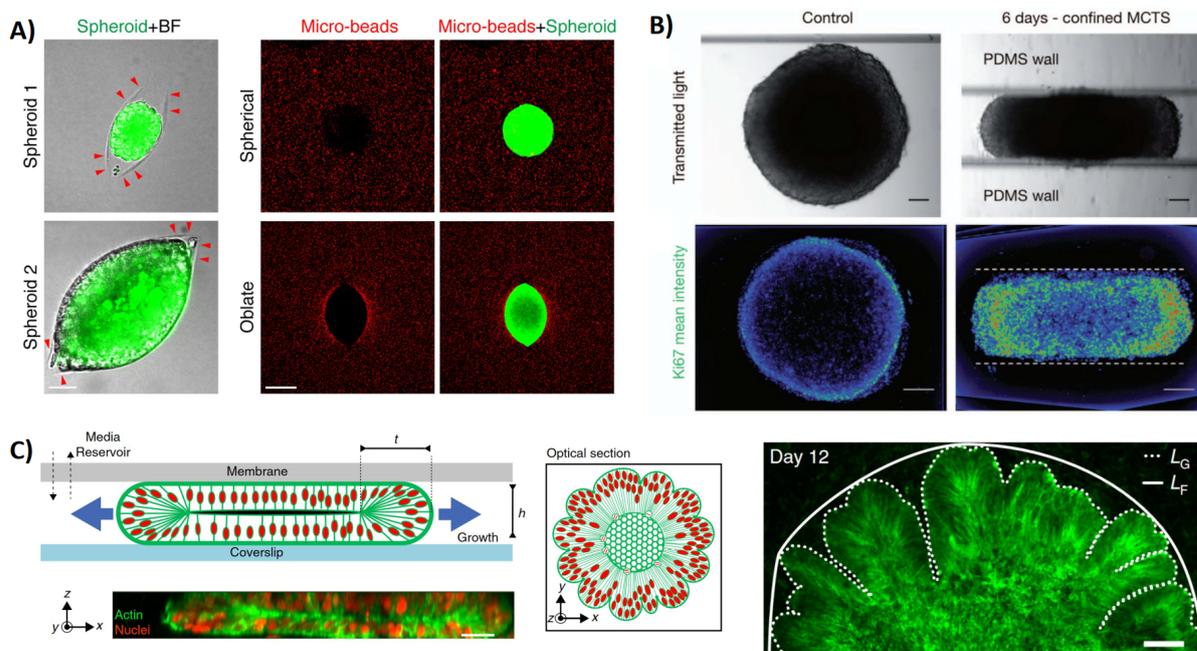
### 1.1.4 Étude mécanique des sphéroïdes

Les forces mécaniques font partie intégrante du développement et de l'auto-organisation des sphéroïdes. Elles régulent et modifient leur forme générale, leur densité et l'arrangement interne des cellules le composant ou encore la prolifération de celles-ci. Les sphéroïdes permettent donc d'étudier un large éventail de paramètres biophysiques clés qui influencent la formation des tissus, la croissance tumorale et l'invasion cellulaire sous l'effet de forces physiques et de gradients de signaux biochimiques. Afin d'étudier l'impact des forces mécaniques, différentes techniques ont été développées afin d'être utilisées sur des systèmes 2D comme 3D. Elles bénéficient d'un véritable essor depuis les dernières décennies. Nous détaillerons ici les différentes techniques développées pour l'étude sur des sphéroïdes. De la même manière que Rodriguez et al. [Rodriguez et al., 2013] identifient deux approches pour l'analyse mécanique des cellules, nous distinguons deux approches pour l'étude mécanique des sphéroïdes. On appelle "passif" un système qui laisse le sphéroïde exercer une contrainte mécanique sur son environnement. On appelle "actif" un système dans lequel, c'est l'environnement ou une force extérieure au sphéroïde qui exerce une contrainte mécanique sur celui-ci.

### Systemes passifs

Ces systèmes consistent à laisser les cellules ou le sphéroïde évoluer dans un environnement contrôlé. Ce sont ainsi les cellules qui vont entrer en contact avec cet environnement, vont appliquer des contraintes mécaniques et adapteront leur comportement en fonction des propriétés de l'environnement. On retrouve cette logique lors de la formation d'une tumeur lorsque celle-ci croît dans un espace limité et qu'elle commence à exercer des contraintes sur les cellules environnantes. C'est notamment pour cela que les systèmes passifs sont très utilisés en cancérologie afin de reproduire et d'étudier l'interaction des cellules avec la matrice extra-cellulaire. La principale propriété contrôlée est la rigidité de l'environnement. En contrôlant cette rigidité, il est possible d'observer différents comportements cellulaires. Plusieurs études au sein de la littérature montrent qu'un sphéroïde en contact avec une forte rigidité voit sa croissance et sa prolifération ralentir. Afin d'étudier la pression développée par un tissu, Helmlinger et al. [Helmlinger et al., 1997] ont utilisé des matrices d'agaroses à différentes concentrations dans lesquelles ils plaçaient des cellules tumorales. Grâce au confinement dans le gel d'agarose, les cellules formaient naturellement des sphéroïdes. Comme la rigidité d'un gel d'agarose ne dépend que de sa concentration, ils ont pu exposer leurs sphéroïdes à différentes contraintes mécaniques. Ils ont démontré que le stress mécanique dû à la rigidité du gel d'agarose inhibe la croissance des sphéroïdes tumoraux (sphéroïdes d'adénocarcinome du côlon humain). En effet, la taille de leurs sphéroïdes atteignait systématiquement un plateau, mais cette taille limite diminuait avec l'augmentation de la rigidité. En observant le déplacement du gel d'agarose, ils ont pu estimer la contrainte mécanique développée par leurs sphéroïdes entre 6 et 16 kPa. Cette contrainte est censée être fixe, car elle dépend des cellules et non de l'environnement. Durant cette étude, ils n'ont pas observé de changement significatif de la prolifération cellulaire, mais une diminution de l'apoptose. D'autres, par la suite, ont montré que la réduction de la croissance peut être liée à la réduction de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose [Cheng et al., 2009] (cellules de carcinome mammaire murin), ou que cette rigidité pouvait avoir un impact sur la résistance aux agents thérapeutiques [Rizzuti et al., 2020] (lignée cellulaire pancréatique représentative des mutations du cancer du pancréas). Les modèles d'hydrogel classique reproduisent la rigidité de l'ECM, mais ne reproduisent pas sa composition. L'effet de cette composition sur les cellules, et particulièrement les sphéroïdes, n'est pas défini et peut donc affecter certaines études. Des modèles utilisant des hydrogels dérivés de tissus décellularisés [Giobbe et al., 2019] sont développés dans le but de reproduire cette composition. Giobbe et al. ont montré qu'un tel gel, issu d'intestin grêle porcine, permettait la formation et la croissance d'organoïdes humains dérivés de l'endoderme. D'autres approches existent également comme des hydrogels synthétiques réticulés par voie enzymatique [Ng et al., 2019].

D'autres approches de compression de sphéroïdes ont émergé comme l'encapsulation dans des micro-capsules élastiques et perméables [Alessandri et al., 2013] ou entre des murs de PDMS [Desmaison et al., 2013, Alric et al., 2022] afin de restreindre spatialement la croissance des sphéroïdes. Ces études ont montré des résultats similaires avec une

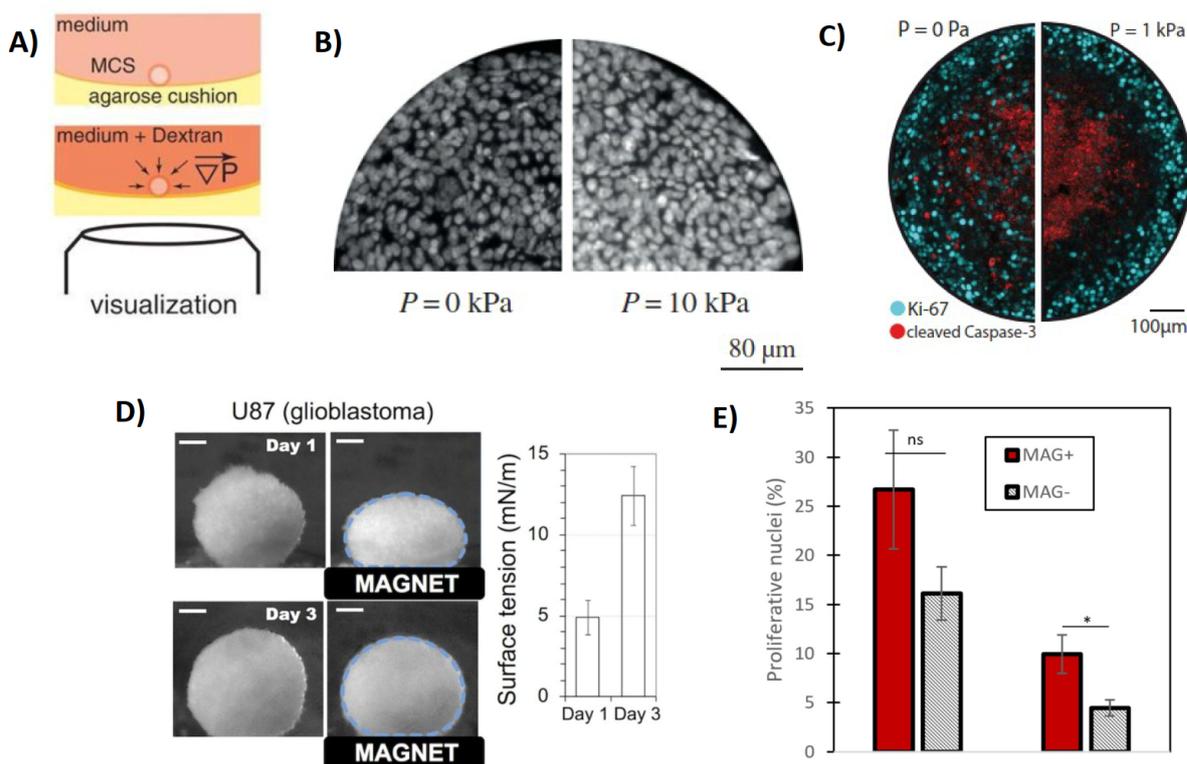


**Figure 1.8 Exemples et résultats de systèmes passifs permettant l'étude des forces mécaniques sur des sphéroïdes ou organoïdes** **A)** Analyse de la distribution des contraintes mécaniques de sphéroïdes tumoraux dans du gel d'agarose. Les pointes de flèches rouges indiquent le bord de fissures dans le gel d'agarose. Le champ de contraintes autour des sphéroïdes est visualisé avec des microbilles fluorescentes. Ces expériences montrent que la distribution des contraintes mécaniques contrôle la forme des sphéroïdes. Scalebar = 50  $\mu\text{m}$  en brightfield et 150  $\mu\text{m}$  en fluorescent. Issu de [Cheng et al., 2009]. **B)** Croissance de sphéroïdes tumoraux entre des murs de PDMS impactant leur prolifération. Intensité moyenne de fluorescence des marquages DAPI et Ki67 de cryosections après 6 jours de culture. On observe des cellules en prolifération sur la quasi-totalité du sphéroïde comprimé contrairement au contrôle. Scalebar = 100  $\mu\text{m}$ . Issu de [Desmaison et al., 2013]. **C)** Auto-organisation d'un organoïde cérébral par confinement. Schéma du montage et représentation d'une section optique de l'organoïde. Image Z-stack montrant l'actine en vert et les noyaux cellulaires en rouge. Images de l'organoïde ridé. Scalebars : 50 et 100  $\mu\text{m}$  de gauche à droite respectivement. Issu de [Karzbrun et al., 2018].

mise en évidence du lien entre la pression et la régulation négative de la prolifération cellulaire. Alessandri et al. décrivent le stress compressif comme ayant un impact bénéfique sur le ralentissement de l'évolution des tumeurs, mais également négatif en déclenchant l'invasion cellulaire et la formation de métastases. Desmaison et al. montrent que les sphéroïdes confinés ont une plus grande densité cellulaire, un gradient de prolifération différent des sphéroïdes contrôles et que le stress mécanique entrave la progression de la mitose. De nombreuses autres études, en 2D comme à l'échelle de la cellule, montrent une certaine propension de la compression à induire la mort cellulaire [Valon and Levayer, 2019, Desmaison et al., 2018, Delarue et al., 2017]. A l'inverse, Jabbari et al. [Jabbari et al., 2015] ont montré que la croissance des cellules souches était dépendante de la rigidité de la matrice extra-cellulaire. Cette équipe a montré, grâce à des hydrogels en PEGDA (diacrylate de polyéthylène glycol), que des rigidités de l'ordre de 5 kPa à 50 kPa pouvaient être optimales pour des cellules cancéreuses selon leur origine tissulaire. On voit ici un effet bénéfique de la rigidité sur la croissance cellulaire.

Une autre piste d'observation des effets des contraintes mécaniques sur les sphéroïdes *in vitro* est leur auto-organisation. Karzbrun et al. [Karzbrun et al., 2018] ont étudié la croissance et la différenciation d'un organoïde cérébral confiné entre deux plaques. Ils ont observé la formation des rides évoquant les foliations cérébrales, à la périphérie de l'organoïde. Des études physiques à base de gels de polymères ont montré que des rides apparaissaient spontanément grâce à la présence de forces de compression [Bowden et al., 1998]. Grâce à leur système, ils ont pu observer l'émergence de ces circonvolutions associées à des structures de migration radiale des précurseurs neuronaux, preuve de la nécessité des contraintes mécaniques pour une auto-organisation spécifique des tissus. De la même manière, en micro-patternant des précurseurs neuronaux sur un support rigide en 2D puis en enrobant ces derniers dans un hydrogel, de telles auto-organisations ont également été observées [Karzbrun et al., 2021].

Il existe également des systèmes passifs dont l'environnement évolue avec la croissance des cellules. Ils servent notamment à étudier différentes phases du développement, comme lorsque les cellules cérébrales prolifèrent, exerçant une force sur le crâne qui se rigidifie au fur et à mesure. Un exemple simple de ces systèmes est celui visant à atteindre un équilibre homéostatique [Basan et al., 2009, Levayer, 2020]. Les cellules sont placées dans un espace confiné dont la majeure partie des parois sont rigides. Une cependant est mobile et reliée à un ressort. Pendant leur croissance, les cellules vont exercer des forces sur cette paroi qui va reculer au fur et à mesure de la croissance, ce qui a pour effet de comprimer de plus en plus le ressort. Plus le ressort est comprimé et plus celui-ci exercera une force de compression importante. Viens le moment où les contraintes, exercées par les cellules et par le ressort, s'équilibrent et le système n'évolue plus. L'équilibre est atteint. Grâce à ce système, Basan et al. [Basan et al., 2009] montrent que la compétition entre les effets de surface et les effets de masse conduit à l'existence d'une taille critique qui doit être surmontée par les métastases pour atteindre des tailles macroscopiques.



**Figure 1.9 Exemple et résultats de systèmes actifs permettant l'étude des forces mécaniques sur des sphéroïdes** **A)** Principe de la compression par pression osmotique au niveau de la couche externe des cellules. Issu de [Delarue et al., 2014b] **B)** Coupes transversales avec un marquage nucléaire au DAPI de sphéroïdes. À gauche aucune pression n'est appliquée sur le sphéroïde tandis qu'à droite une pression osmotique de  $10$  kPa est appliquée. On observe une différence de densité entre les deux sphéroïdes. Issu de [Delarue et al., 2014a]. **C)** Effet d'un stress osmotique sur la distribution de la prolifération et de l'apoptose. Un marquage fluorescent est réalisé sur les cryosections des sphéroïdes pour marquer les divisions cellulaires (Ki67) et l'apoptose (Caspase-3 clivée). (Gauche) Demi-section d'un sphéroïde cultivé dans un milieu normal pendant 4 jours. (Droite) Demi section d'un sphéroïde cultivé avec un stress de  $1$  kPa pendant 4 jours. Issu de [Montel et al., 2011]. **D)** Images de compression magnétique de sphéroïdes de glioblastomes U-87 MG. La tension de surface est déterminée grâce à la loi de Laplace. Mesures des tensions de surface des sphéroïdes U-87 MG. Scalebar =  $200 \mu\text{m}$ . Issu de [Perez et al., 2020]. **E)** Résultats de marquage Ki67 pour des sphéroïdes comprimés magnétiquement ou non (respectivement barres rouges et grises) au jour 3 et au jour 4 de leur maturation. On observe une augmentation de la prolifération due à la compression. Issu de [Mary et al., 2022].

## Systèmes actifs

Les systèmes passifs furent les premiers à permettre de décrire l'impact des forces mécaniques. D'autres systèmes sont ensuite apparus avec une approche différente. L'objectif n'est plus de laisser le sphéroïde croître et appliquer ses propres contraintes mécaniques, mais au contraire de lui imposer une contrainte. Les sphéroïdes ainsi étudiés sont souvent

directement déformés par cette contrainte. Ces techniques sont utilisées, par exemple, pour étudier l'impact de la contrainte exercée par une tumeur sur les cellules environnantes ou modéliser un trauma. Une première approche, conduite par G. Cappello et son équipe [Montel et al., 2011, Delarue et al., 2014b] a été d'appliquer une pression osmotique contrôlée à des sphéroïdes. Cette pression osmotique est générée par un polymère biocompatible, le dextran. La membrane cellulaire étant imperméable à celui-ci, il reste présent uniquement dans le milieu, créant ainsi l'apparition d'une pression osmotique de compression. La gamme de pression générée par ces expériences va de 500 à 20 000 Pa. Ces expériences ont montré des résultats similaires à ceux observés en hydrogel par des systèmes passifs, à savoir que le stress mécanique réduit la croissance des sphéroïdes, particulièrement en leur centre. Ils ont également pu observer que les cellules situées au cœur du sphéroïde présentent une réponse au stress différente de celles situées à la périphérie, mais ils n'ont pas observé de modification de la mortalité cellulaire.

Des systèmes similaires utilisant la pression hydrostatique ont également été développés [Shang et al., 2021, Tien et al., 2012]. Ces systèmes ont pour objectif d'étudier l'impact de la pression du fluide interstitiel dans le cadre de tumeur. Les valeurs de pression exercée dans le cadre de ces études vont de 100 Pa (1 cmH<sub>2</sub>O) à 4000 Pa (40 cmH<sub>2</sub>O). Elles ont montré qu'une augmentation de la pression réduisait l'invasion des cellules cancéreuses et augmentait leur résistance aux traitements. On place également dans cette catégorie les systèmes qui compriment des sphéroïdes par contact direct comme en déplaçant un mur de PDMS [Foty et al., 1996].

Une autre approche développée par l'équipe de C. Wilhelm consiste non seulement à former des sphéroïdes tumoraux, mais également à leur appliquer une contrainte mécanique par force magnétique [Perez et al., 2020, Mary et al., 2022]. Ils utilisent des nanoparticules magnétiques que les cellules vont internaliser afin de les rendre sensibles à un champ magnétique. Avec un aimant, ils vont pouvoir déformer jusqu'à 50% ces sphéroïdes. La force magnétique appliquée est de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{N}$  soit  $\approx 90 g$ . grâce à leur système, ils ont obtenu des résultats jusqu'alors non observés. Ils montrent une augmentation de la prolifération du sphéroïde mécaniquement contraint qui va de pair avec une augmentation du nombre de cellules proliférantes en son centre. Cette équipe a également effectué des tests *in vivo* qui ont confirmé l'agressivité accrue des sphéroïdes comprimés par rapport aux sphéroïdes non stimulés.

### Modèle mécano-biologique

En plus des techniques pour étudier l'impact de contraintes mécaniques, il existe également celles visant à mesurer des propriétés physiques des sphéroïdes afin de les utiliser dans des modèles physiques et mathématiques. Afin de mieux comprendre les différentes propriétés étudiées et mesurées en mécano-biologie, nous allons rappeler deux grandeurs caractéristiques utilisées en mécano-biologie.

La première grandeur est le module d'Young, aussi appelé module d'élasticité ou module de traction. Il s'applique à des solides et est souvent utilisé en mécano-biologie pour caractériser les hydrogels et leur rigidité [Oyen, 2014]. Il est noté  $E$  et est défini comme

le rapport entre la contrainte exercée  $\sigma$  (en Pa) et la déformation  $\epsilon = \frac{\Delta l}{l}$  (sans unité). Il s'exprime en Pascal (Pa) :  $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$ . Il est classiquement mesuré par un test de traction uniaxiale.

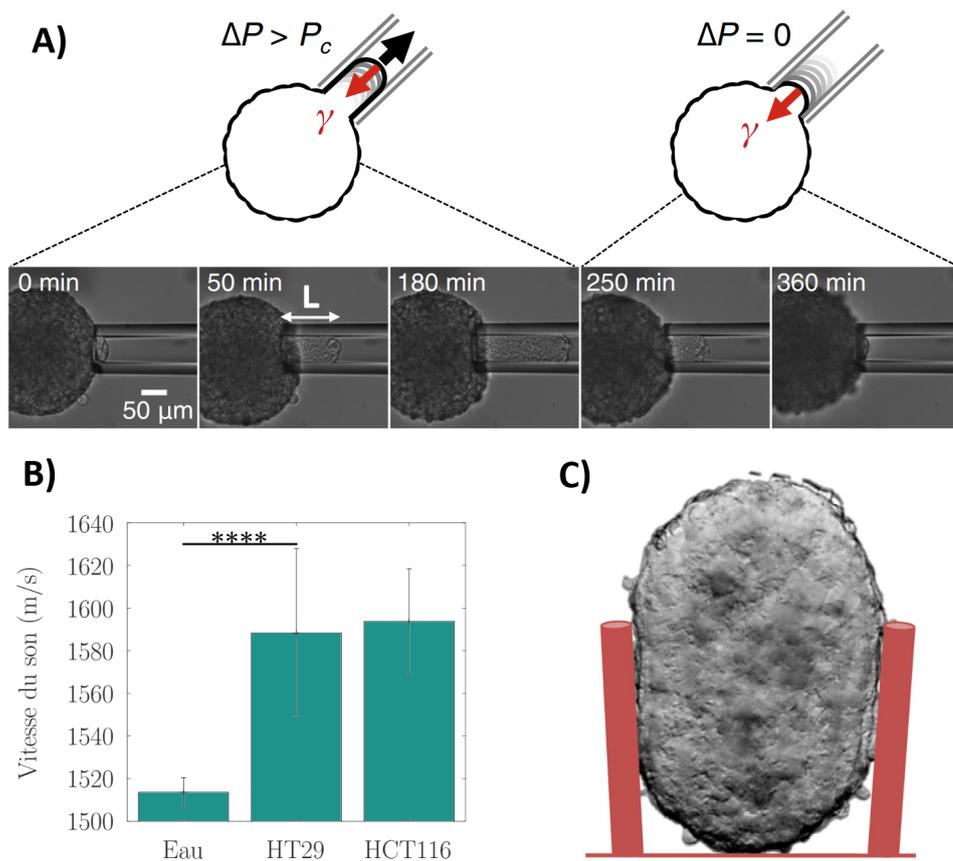
La seconde est la tension de surface, ou tension superficielle, notée usuellement  $\gamma$ . La présence d'une interface présente un excès d'énergie qui est représenté par cette grandeur. Cette énergie résulte d'interactions moléculaires s'exerçant de part et d'autre de l'interface. Un liquide aura tendance à minimiser cette énergie, et donc sa surface. La tension de surface est classiquement exprimée en Joules par mètre carré ( $\text{J/m}^2$ ) représentant une énergie surfacique, mais il arrive qu'elle soit exprimée en Newtons par mètre ( $\text{N/m}$ ) afin de traduire la force qu'il faut exercer pour augmenter une surface. Elle peut être déterminée de différentes manières. Une méthode est d'utiliser la loi de Laplace-Young qui s'applique à l'interface entre deux milieux [Foty et al., 1994]. Elle permet de relier la tension de surface  $\gamma$ , la différence de pression entre les deux milieux  $\Delta p$  et les rayons de courbure  $R$  et  $R'$  de l'interface avec l'expression :  $\Delta p = \gamma(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'})$ .

Un sphéroïde est un assemblage de cellules. D'un point de vue mécanique, ces cellules peuvent se déformer et se réarranger. Selon le comportement prédominant de ces cellules, il est possible d'assimiler le sphéroïde à différents modèles physiques.

Un premier modèle a été développé par Steinberg en 1963 [Steinberg, 1963]. Il a observé que des cellules avaient tendance à se trier et à s'associer en fonction de leurs similarités. Il fait une analogie entre un tissu et un liquide visqueux, la viscosité. On retrouve effectivement ce type de comportement avec deux liquides non miscibles comme l'eau et l'huile qui se séparent afin de minimiser leur tension de surface. Ce modèle, qu'il a nommé DAH (Differential Adhesion Hypothesis), explique que ce sont les différentes adhésions entre cellules qui donnent la tension de surface globale du tissu. Cette tension de surface permet ensuite de caractériser les phénomènes d'étalement tissulaire ou de ségrégation cellulaire. Au cours de leurs travaux, ils ont pu montrer que la tension de surface de leurs agrégats cellulaires était linéairement dépendantes de leurs expressions en cadhérines [Foty and Steinberg, 2005]. Les cadhérines étant, pour leurs agrégats, les seules molécules participant à l'adhésion cellule-cellule. Ils concluent donc que les cellules ont tendance à maximiser leurs liaisons, ce qui diminue la tension de surface globale.

D'autres expériences confirment ce modèle. Via des expériences de fusion d'agrégats, Jakab et al. [Jakab et al., 2008] montrent que la fusion se comporte de manière similaire à celle de deux gouttes de liquides visqueux. Cette dynamique résulte de l'équilibre entre la minimisation de la tension de surface et les frottements visqueux. On peut obtenir le temps caractéristique de ce type d'équilibre avec la relation  $\tau = \frac{R\eta}{\gamma}$  avec  $\tau$  le temps caractéristique,  $R$  le rayon final de l'agrégat,  $\eta$  la viscosité et  $\gamma$  la tension de surface.  $\frac{\gamma}{\eta}$  est homogène à une vitesse et son ordre de grandeur est de  $\approx 10^{-8}$  m/s ce qui donne pour un agrégat de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre un temps caractéristique  $\tau$  de  $\approx 8$  heures.

Ce modèle n'est cependant applicable qu'à une certaine échelle de temps. Lors de leurs expériences, [Foty et al., 1996], ils ont montré que les sphéroïdes compressés durant quelques secondes reprenaient leur forme originale très rapidement à la manière d'un solide élastique ; tandis que les sphéroïdes compressés pendant 3h30 mettaient plusieurs heures



**Figure 1.10 Exemple de systèmes mesurant les propriétés de sphéroïdes** **A)** Mesures de viscosité et de tension de surface par aspiration avec une micropipette et application de la loi de Laplace. Issu de [Guevorkian and Maître, 2017]. **B)** Mesures de vitesse de propagation du son l’eau à 35°C et dans des sphéroïdes HCT116 et HT29. Issu de [Bazir, 2020]. **C)** Mesure de force exercée par un sphéroïde via l’observation du flambage de micropiliers. Issu de [Aoun et al., 2019].

à retrouver cette forme à la manière d’un liquide visqueux.

Ainsi, selon la contrainte exercée et son temps d’application, on peut appliquer des modèles physiques différents aux tissus [Gonzalez-Rodriguez et al., 2012, Arjoca et al., 2022]. Mais ces modèles ne sont pas suffisants, car les tissus présentent des réponses actives que la physique de la matière molle ne prévoit pas. Par exemple, Ranft et al. [Ranft et al., 2010] montrent que la prise en compte de la division cellulaire et de l’apoptose dans la modélisation d’un tissu initialement élastique lui permettent d’avoir un comportement de liquide visqueux. Ils identifient le temps de division et de mort cellulaire comme caractérisant cette viscosité. De nombreux modèles viennent s’ajouter à la littérature [Ackermann et al., 2021], permettant de transcrire toute la complexité des tissus comme leur croissance, leur agrégation ou l’absorption et la diffusion des nutriments.

De nombreuses études cherchent donc à mesurer les propriétés mécaniques des sphéroïdes afin de pouvoir les utiliser dans divers modèles. On nommera les techniques par compression directe [Foty et al., 1996, Forgacs et al., 1998, Stirbat et al., 2013], les techniques

d'aspiration par pipette [Guevorkian and Maître, 2017, Boot et al., 2023], les techniques utilisant la pression osmotique [Delarue et al., 2014a] ou la déformation de micropiliers comme montrée figure 1.10. Un ordre de grandeur de différentes valeurs sont :  $\approx 5000$  Pa pour l'élasticité,  $\approx 1$  MPa.s ou  $0,1$  MPa.s selon le temps caractéristique pour la viscosité et  $\approx 10$  mN/m pour la tension de surface.

### Vers un nouveau système actif de compression de sphéroïdes tumoraux

Les différentes études montrent tantôt un effet bénéfique et tantôt un effet négatif des contraintes mécaniques sur les cellules et sphéroïdes cellulaires. En particulier, des études ont montré qu'une valeur optimale de rigidité pouvait être trouvée pour la motilité, et que celle-ci était plus importante pour la cellule cancéreuse que pour la cellule normale. Il faut donc comprendre et connaître les contraintes exercées sur les cellules afin d'étudier un phénomène. La tendance prône un caractère bénéfique des contraintes mécaniques sur les cellules tumorales comparativement aux cellules normales. Néanmoins, une compression trop importante entraînera quasi systématiquement une mort cellulaire. C'est notamment un des mécanismes de défense pour la résorption tumorale.

Les systèmes d'études des contraintes mécaniques sur des sphéroïdes offrent de nombreuses possibilités, mais présentent l'inconvénient de ne pas permettre un contrôle dynamique et continu des forces sur les sphéroïdes en croissance. Dans ce contexte, un système de culture et d'étude de contraintes mécaniques, basé sur les principes de la lévitation acoustique, pourrait présenter un certain nombre d'avantages. En effet, il permettrait de former et cultiver un sphéroïde sans générer aucun biais de bords, car le sphéroïde serait en constante lévitation entourée uniquement de liquide. En effet, au vu des études citées précédemment, le contact du sphéroïde avec une paroi substantiellement rigide doit nécessairement impacter ce sphéroïde. De même que pour une paroi rigide, les hydrogels peuvent avoir des effets biochimiques sur les cellules (signalisation ECM/cellules) et donc biaiser les observations. Les forces acoustiques offrent d'énormes possibilités de structuration, de manipulation et même d'observation. Le piège acoustique va également immobiliser spatialement le sphéroïde, facilitant son observation. De plus, les forces acoustiques étant modulables, il va être possible de modifier les forces du piège acoustique et observer l'impact.

Nous allons donc présenter les théories de l'acoustique et de la lévitation acoustique ainsi que leurs applications dans divers domaines de la biologie.

## 1.2 Origine et théorie de la lévitation acoustique

Dans cette partie, nous allons expliquer pourquoi les ondes acoustiques permettent la manipulation, la structuration et l'application de contraintes à nos modèles de tumoroides. Nous montrerons les grands principes de la propagation d'ondes acoustiques, puis nous détaillerons la force de radiation acoustique et son utilisation pour manipuler et mettre en lévitation acoustique des particules ou des cellules.

## 1.2.1 Généralités sur les ondes acoustiques

### Propagation d'ondes planes monochromatiques

La naissance d'une onde provient d'une relation de cause à effet perpétuelle. Si la variation temporelle d'une grandeur physique  $A$  induit la variation spatiale d'une autre grandeur physique  $B$  et réciproquement, alors une onde naît. Une forme générale de ce phénomène est représentée formellement par les équations (1.1) dont la troisième équation est appelée, **équation d'onde** et est vérifiée par les deux grandeurs physiques  $A$  et  $B$  (les  $\cdot$  pouvant être remplacé soit par  $A$  soit par  $B$ ).

$$\text{si } \frac{\partial A}{\partial t} = \alpha \frac{\partial B}{\partial x} \quad \text{et} \quad \frac{\partial B}{\partial t} = \beta \frac{\partial A}{\partial x} \quad (1.1)$$

$$\text{alors } \frac{\partial^2 \cdot}{\partial t^2} = \alpha\beta \frac{\partial^2 \cdot}{\partial x^2}$$

En acoustique, un déplacement du milieu provoque une surpression qui induira elle-même un déplacement et ainsi de suite. On peut voir que ce phénomène décrit l'équation de conservation de la masse (Eq. 1.2) et l'équation d'Euler linéarisé (Eq. 1.3), également appelée équation de conservation de la quantité de mouvement. Lorsque ces équations sont combinées d'une manière similaire aux équations (1.1), on obtient la fameuse équation d'onde (Eq. 1.4) appelée également équation de propagation.  $\Delta$  symbolise l'opérateur Laplacien et correspondant à des dérivées secondes dans les trois dimensions de l'espace (3D) :

$$\frac{1}{c^2} \frac{\partial p}{\partial t} + \rho_0 \operatorname{div}(\vec{v}) = 0 \quad (1.2)$$

$$\rho_0 \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \overrightarrow{\operatorname{grad}} p = 0 \quad (1.3)$$

$$\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = \Delta p \quad (1.4)$$

avec  $p$  la pression du milieu,  $v$  la vitesse des particules du milieu,  $c$  la célérité de l'onde acoustique dans le milieu et  $\rho_0$  la densité moyenne du milieu (donc sans prendre en compte les variations de densité due à l'onde acoustique). On peut aisément vérifier que  $\vec{v}$  et  $\rho$  vérifient également l'équation de propagation. Pour un milieu fluide, la célérité du son est donnée par l'expression  $c^2 = \frac{1}{\rho\chi}$ , tandis que pour un milieu solide, la célérité longitudinale du son est donnée par l'expression  $c = \frac{E(1-\nu)}{\rho(1+\nu)(1-2\nu)}$  avec  $\chi$  la compressibilité,  $E$  le module d'Young et  $\nu$  le coefficient de Poisson.

### Densité d'énergie acoustique

Un terme important qui reviendra souvent au cours de ce manuscrit est la densité d'énergie acoustique moyennée temporellement notée  $\langle E_{ac} \rangle$ . Cela représente l'énergie

moyenne transportée par une onde acoustique dans un milieu donné. La densité d'énergie acoustique instantanée  $E_{ac}$  possède deux composantes : l'énergie cinétique des particules  $E_c$  et l'énergie potentielle du milieu comprimé  $E_p$  (Eq. 1.5).

$$\begin{aligned} E_{ac} &= E_c + E_p \\ E_{ac} &= \frac{1}{2}\rho_0 v^2 + \frac{1}{2}\frac{p^2}{\rho_0 c_0^2} \end{aligned} \quad (1.5)$$

Pour une onde plane monochromatique de la forme  $p = p_a \cos(\omega t - kx)$ , on définit usuellement  $p_a$  l'amplitude de l'onde,  $\omega$  sa pulsation,  $f$  sa fréquence,  $T$  sa période,  $k$  son nombre d'onde et  $\lambda$  sa longueur d'onde (voir les relations entre ces différents paramètres en Annexe B). La densité d'énergie moyenne  $\langle E_{ac} \rangle$  s'obtient en moyennant la densité d'énergie  $E_{ac}$  sur une période  $T$  comme écrit en 1.6. Ce qui nous donne, en tenant compte de la relation  $v = \frac{p}{\rho_0 c_0}$ , la formule 1.7.

$$\langle E_{ac} \rangle_t = \frac{1}{T} \int_0^T E_{ac} dt \quad (1.6)$$

$$\langle E_{ac} \rangle_t = \frac{p_a^2}{2\rho_0 c_0^2} \quad (1.7)$$

La densité d'énergie acoustique moyenne n'est donc dépendante que de  $p_a$  l'amplitude de l'onde de pression acoustique.

### Impédances acoustiques et interfaces

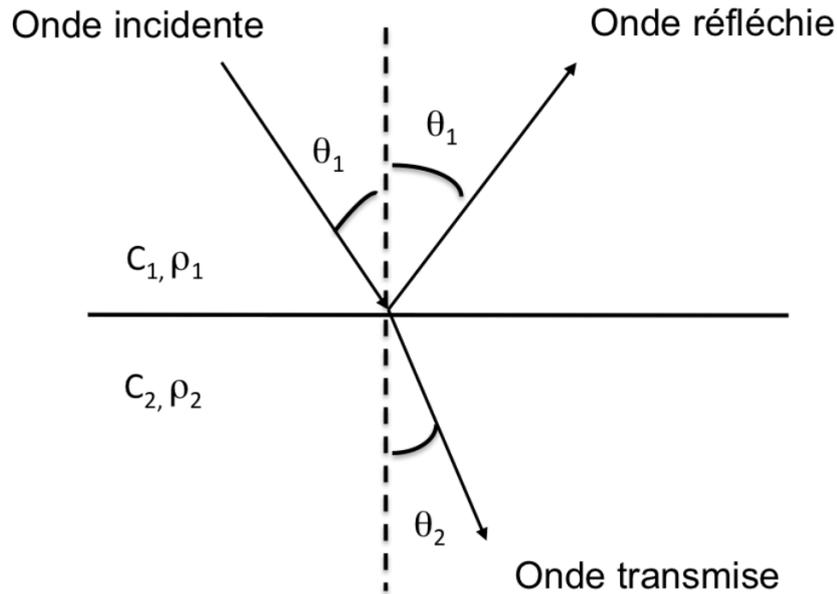
On définit l'impédance acoustique comme le rapport entre la pression et la vitesse. Dans le cas d'une onde plane monochromatique cela nous donne la relation 1.8. On a donc la relation  $p = Zv$  qui est analogue à la loi d'Ohm, plus connue,  $U = RI$ .

$$Z = \rho c \quad (1.8)$$

Dans le cadre d'une onde plane monochromatique, l'impédance spécifique est indépendante de la fréquence de l'onde et caractérise le milieu dans lequel l'onde va se propager. Elle est donc particulièrement utile pour déterminer le comportement d'une onde rencontrant une interface séparant deux milieux d'impédance distincte. Lorsqu'une onde se propageant dans un milieu 1 rencontre une telle interface, elle est divisée en une onde transmise se propageant dans le milieu 2 et une onde réfléchie se rétropropageant dans le milieu 1 comme illustrée figure 1.11.

En utilisant la continuité des pressions et des vitesses normales à l'interface, il est possible de déterminer les coefficients de réflexion (Eq. 1.9) et de transmission (Eq. 1.10) de l'amplitude de la pression en fonction des impédances des milieux. L'expression suivante est valable pour une interface séparant des milieux infinis :

$$r_{1 \rightarrow 2} = \frac{Z_2 \cos(\theta_1) - Z_1 \cos(\theta_2)}{Z_2 \cos(\theta_1) + Z_1 \cos(\theta_2)} \quad (1.9)$$



**Figure 1.11** Transmission et réflexion d'une onde plane à l'interface entre deux milieux homogènes

$$t_{1 \rightarrow 2} = \frac{2Z_2 \cdot \cos(\theta_1)}{Z_2 \cdot \cos(\theta_1) + Z_1 \cdot \cos(\theta_2)} \quad (1.10)$$

Avec  $Z_1$  et  $Z_2$  les impédances respectives des milieux 1 et 2 ainsi que  $\theta_1$  l'angle de l'onde incidente et  $\theta_2$  l'angle de l'onde transmise par rapport à la normale (Fig. 1.11). On observe deux cas particuliers pour une interface acoustique :

- premier cas :  $|Z_1 - Z_2| \gg 0$ , alors  $r_{1 \rightarrow 2} \sim \pm 1$ , l'onde incidente est parfaitement réfléchie et aucune onde n'est transmise. Si  $r_{1 \rightarrow 2}$  est positif, cela donne un ventre de pression sur la surface tandis que s'il est négatif, ce sera un noeud.
- deuxième cas :  $Z_1 \sim Z_2$ , alors  $r_{1 \rightarrow 2} \sim 0$  et  $t_{1 \rightarrow 2} = 1$ , l'onde incidente est parfaitement transmise, on dit que l'interface est adaptée.

### Conditions aux limites et ondes stationnaires

Une onde stationnaire est formée lorsque deux ondes de même fréquence et de même amplitude se propagent dans des sens opposés. En interférant entre-elles, ces deux ondes vont former une onde stationnaire dont les composantes spatiales et temporelles ne sont plus liées. Pour obtenir une telle onde, un moyen simple consiste à utiliser une cavité fermée combinant émetteur et réflecteur. Ce montage permet de faire interférer l'onde émise par l'émetteur avec l'onde réfléchie par le réflecteur. L'onde réfléchie possède la même fréquence et, dans le cas idéal, la même intensité que celle émise. Une cavité, selon ses conditions aux limites, possède une fréquence naturelle de vibration, dite fréquence de résonance. Tous les multiples entiers de cette fréquence sont également des fréquences de résonance. Dans notre cas, les conditions aux limites sont des conditions de parois rigides

impliquant une vitesse nulle. On peut alors définir la fréquence de résonance d'une cavité de hauteur  $h$  par :

$$f = n \frac{c}{2h} = n \frac{\lambda f}{2h} \quad (1.11)$$

où  $n$  est un nombre entier,  $c$  la célérité de l'onde acoustique dans le milieu,  $f$  la fréquence de résonance et  $\lambda$  la longueur d'onde associée. L'équation de la pression dans une telle cavité à la fréquence de résonance peut quant à elle s'écrire :

$$p = p_a \cos(kz) \sin(\omega t) \quad (1.12)$$

avec  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  le nombre d'onde et  $\omega = 2\pi f$  la pulsation de l'onde. On voit que cette expression possède deux parties indépendantes, une temporelle et une spatiale, caractéristique des ondes stationnaires. Cela nous donne une énergie acoustique légèrement modifiée et dépendante d'une variable spatiale  $z$  :

$$\langle E_{ac} \rangle_t(z) = \frac{p_a^2}{2\rho_0 c_0^2} \cos^2(kz) \quad (1.13)$$

Il est possible de moyenner cette expression dans l'espace afin d'obtenir une expression ne dépendant pas de paramètres spatiale ou temporelle. Ainsi, en appliquant une moyenne selon l'axe  $z$ , on peut obtenir :

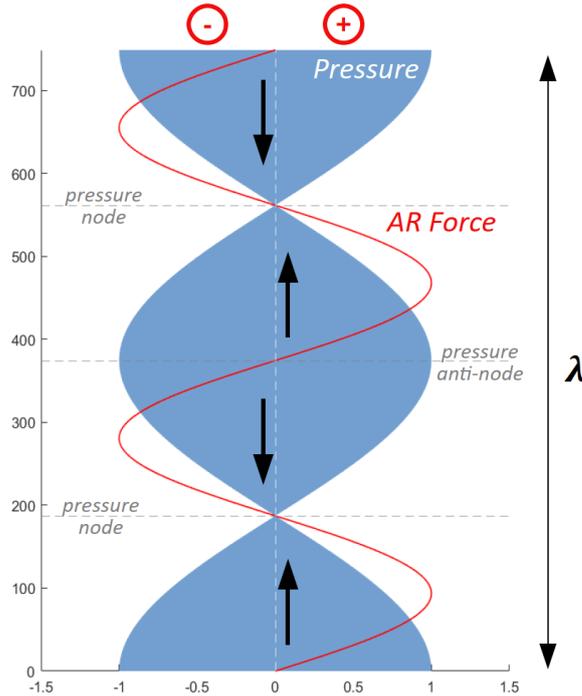
$$\langle E_{ac} \rangle_{t,z} = \frac{1}{Z} \int_0^Z E_{ac}(z) dz \quad (1.14)$$

$$\langle E_{ac} \rangle_{t,z} = \frac{p_a^2}{4\rho_0 c_0^2} \quad (1.15)$$

Nous verrons dans le chapitre 3 que cette approche de la fréquence de résonance est trop simpliste, particulièrement pour un résonateur multi-couches. Cela a été abordé notamment par Hill et al. [Hill et al., 2002, Hill, 2003]. Ils étudient le champ acoustique et la densité d'énergie dans un système multi-couche et montrent qu'il existe des résonances produisant des noeuds de pression à des positions arbitraires. D'autres études ont corroboré le fait de pouvoir déplacer le noeud de pression en contrôlant la fréquence de l'onde acoustique [Glynne-Jones et al., 2010, Dron and Aider, 2013].

## 1.2.2 Force de radiation acoustique

Nous allons maintenant appliquer les principes fondamentaux des ondes acoustiques à la lévitation acoustique. Le principe consiste à manipuler des objets en suspension dans un fluide à l'aide de la force de radiation acoustique (ARF). L'ARF vient de la diffusion de l'onde acoustique sur la particule en suspension. Cela provoque un transfert de quantité de mouvement de l'onde vers la particule, ce qui se traduit par l'ARF, et fait migrer la particule ou le maintien en lévitation. Afin d'anticiper certaines équations, nous allons définir une notation,  $\tilde{x}$ , qui nous permettra de simplifier l'écriture de certaines équations. Cette notation est définie comme le rapport entre de la grandeur  $x$  de la particule ( $x_p$ ) et



**Figure 1.12 Profil axial de la pression acoustique et de la force de radiation acoustique** L'aire bleue représente la pression acoustique. La courbe rouge représente l'ARF axiale pour un facteur de contraste acoustique positif ( $\Phi > 0$ ). Les flèches noires aident à la visualisation et représentent la direction de l'ARF selon son signe : positif vers le haut, négatif vers le bas. L'axe des abscisses est arbitraire, l'axe des ordonnées est en  $\mu\text{m}$ . La longueur d'onde correspond à une fréquence de 2 MHz dans de l'eau. Les forces convergent aux noeuds de pression et divergent aux ventres.

de celle du fluide ( $x_0$ ). On a donc l'expression  $\tilde{x} = \frac{x_p}{x_0}$  où  $\tilde{x}$  est une grandeur adimensionnée. Si l'on prend l'exemple des densités, cela nous donne  $\tilde{\rho} = \frac{\rho_p}{\rho_0}$

### Premier modèle, King 1934

Ce fut King en 1934 [King, 1934] qui considéra un terme du second ordre pour l'influence de la densité  $\rho$  sur la pression  $P$  afin d'obtenir une première expression de la force de radiation acoustique. Il utilisa plusieurs hypothèses (de façon non-exhaustive : particule sphérique isolée, rigide, dans un fluide non-visqueux ; onde plane dont la pression n'est fonction que de la densité du fluide, etc) afin de parvenir à la première expression analytique de la force de radiation acoustique (Eq. 1.16). Il considère qu'avec ces différentes hypothèses, il obtient l'expression suivante pour l'ARF :

$$\langle F_K \rangle_t = \frac{1}{4} \Phi_K V_p \rho_0 v_a^2 k \sin(2kz) \quad (1.16)$$

où  $\langle \rangle_t$  représente ici la moyenne temporelle de la force de radiation acoustique. Dans la suite de ce manuscrit, elle sera uniquement notée  $F$  mais il est important de garder en tête que cette force est la résultante d'une moyenne temporelle sur une période définie

par la fréquence de l'onde acoustique.  $v_a$  représente l'amplitude de la vitesse acoustique du fluide et est reliée à l'énergie acoustique,  $k$  son nombre d'onde,  $V_p$  le volume de la particule,  $\rho_0$  la densité du fluide et enfin  $\Phi_K$  le facteur de contraste acoustique (Eq. 1.17).

$$\Phi_K = \frac{5\tilde{\rho} - 2}{2\tilde{\rho} + 1} \quad (1.17)$$

Dans cette expression de l'ARF, ainsi que dans toutes celles qui suivront, on remarque que, hormis le sinus et le facteur de contraste acoustique  $\Phi_K$ , tous les termes sont positifs. Nous reviendrons sur cette particularité dans un second temps. On peut noter pour le facteur de contraste acoustique que si  $\tilde{\rho} = 1$ , alors  $\Phi_K = 1 \neq 0$ . Cela signifie que des particules de mêmes propriétés que celle du fluide seraient tout de même soumises à une force de radiation acoustique. C'est contre-intuitif et bien évidemment impossible dans la pratique.

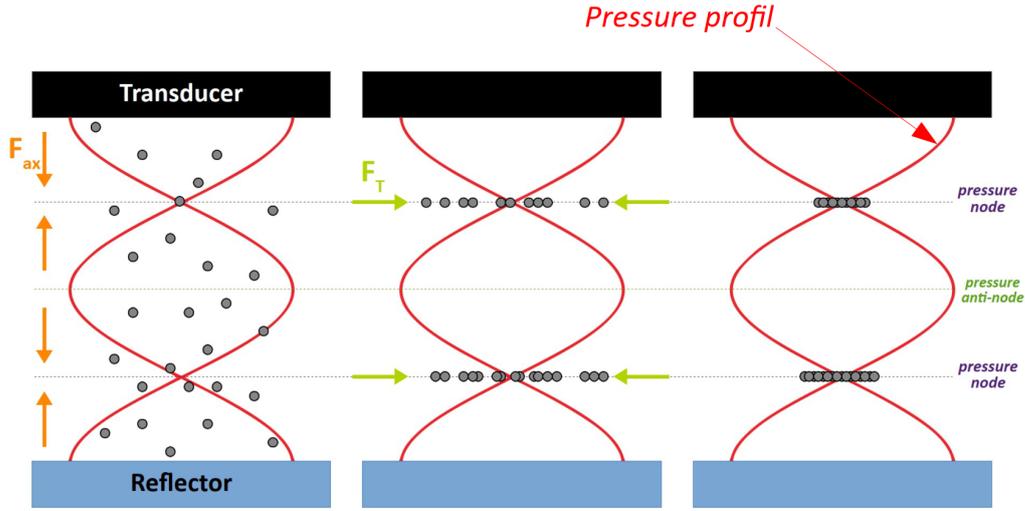
Pour comprendre le phénomène d'agrégation, c'est le terme  $\sin(2kz)$  qui est le plus intéressant. Il s'annule tous les  $\frac{\lambda}{4}$  :  $\sin(2kz) = 0$  pour  $z \equiv 0 [\frac{\lambda}{4}]$ . Cependant, l'agrégation ne se fait pas tous les  $\frac{\lambda}{4}$  mais tous les  $\frac{\lambda}{2}$ . En effet, pour qu'il y ait agrégation, il faut que les forces de part et d'autre du point d'annulation convergent. Ce n'est qu'une fois tous les  $\frac{\lambda}{2}$  que ces forces convergent, pour la moitié restante, elles divergent. C'est ce phénomène qui permet d'expliquer l'agrégation périodique aux noeuds de pression et l'absence d'agrégation aux ventres de pression. La figure 1.13 illustre ce phénomène pour un facteur de contraste acoustique positif ( $\Phi_k > 0$ ). Le sinus de l'ARF s'annule aux noeuds et ventres de pression comme représenté par la courbe rouge. Comme le montre les flèches noires, ce n'est qu'en  $\frac{\lambda}{4}$  et en  $\frac{3\lambda}{4}$  que les forces convergent, ce sont des positions d'équilibres stables. En  $0$ ,  $\frac{\lambda}{2}$  et  $\lambda$  elles divergent, ce sont des positions d'équilibres instables. Les particules vont donc aller vers les noeuds de pression.

Si un terme négatif, ne venant pas du sinus, apparaît dans cette équation, alors toute cette logique est inversée et l'agrégation se fait aux ventres de pression et non plus aux noeuds. Le seul paramètre pouvant devenir négatif dans cette expression est le facteur  $\Phi_K$  comme dit précédemment. L'agrégation aux noeuds ou aux ventres de pression est donc conditionnée par les propriétés des particules et du fluide uniquement.

### Ajout de compressibilité, Yosioka 1955

$$F_{ac} = \Phi V_p \langle E_{ac} \rangle k \sin(2kz) \quad (1.18)$$

Le modèle de King fut complété par Yosioka et Kawasima [Yosioka and Kawasima, 1955] en prenant en compte des particules compressibles, mais toujours sphériques, un fluide compressible également, mais une onde toujours plane. Cette nouvelle expression de l'ARF ressemble pour beaucoup à celle de King avec l'utilisation de la moyenne de l'énergie acoustique  $\langle E_{ac} \rangle$  plutôt que la vitesse. Dans la suite de ce manuscrit, la moyenne de l'énergie acoustique  $\langle E_{ac} \rangle$  sera noté  $E_{ac}$ . C'est dans le facteur de contraste acoustique  $\Phi$  que les changements interviennent. Ils y ajoutent un terme de compressibilité  $\Phi_Y$ .



**Figure 1.13 Mouvement en deux temps des particules** L'ARF axiale étant plus importante, elle agrège dans un premier temps les particules aux noeuds de pression ( ici  $\Phi > 0$  ). Puis l'ARF transversale, plus faible, agrège les particules latéralement au centre.

$$\begin{aligned}\Phi &= \Phi_K - \Phi_Y \\ \Phi &= \frac{5\tilde{\rho} - 2}{2\tilde{\rho} + 1} - \frac{1}{\tilde{\rho}\tilde{c}^2}\end{aligned}\quad (1.19)$$

Grâce à ce modèle, l'incohérence de King est corrigée, à savoir que si des particules ont des propriétés acoustiques identiques à celles du fluide (ie  $\tilde{\rho} = 1$  et  $\tilde{c} = 1$ ), alors  $\Phi_K = \Phi_Y = 1$  et  $\Phi = 0$ . Les particules ne subissent donc pas de force de radiation acoustique. Ce  $\Phi_Y$  est le rapport de termes homogènes à des énergies volumiques et peut être vu comme la partie de l'énergie acoustique incidente utilisée pour déformer la sphère compressible. Son signe est négatif, car cette énergie est absorbée par la sphère et n'est donc pas active dans l'ARF.

Ce modèle fut notamment amélioré par Doinikov à partir de 1994 [Doinikov, 1994]. Il ne considéra plus le fluide comme idéal, mais comme visqueux et conducteur de chaleur, ce qui lui permit de raffiner le facteur de contraste acoustique (noté  $\Phi_D$  par la suite) avec un terme visqueux et un autre thermique :

$$\begin{aligned}\Phi_D &= \Phi_K - \Phi_Y + \Phi_\nu + \Phi_{th} \\ \Phi_D &= \frac{5\tilde{\rho} - 2}{2\tilde{\rho} + 1} - \frac{1}{\tilde{\rho}\tilde{c}^2} + 2 \left( \frac{3(\tilde{\rho} - 1)}{2\tilde{\rho} + 1} \right)^2 \frac{\delta_\nu}{d_p} + 2 \left( \frac{3(\tilde{\rho} - 1)}{2\tilde{\rho} + 1} \right)^2 \frac{\delta_{th}}{d_p}\end{aligned}\quad (1.20)$$

Où  $\delta_\nu = \sqrt{\frac{\nu}{\pi f}}$  est l'épaisseur de la couche visqueuse et  $\delta_{th} = \sqrt{\frac{D_{th}}{\pi f}}$  est l'épaisseur de la couche thermique. On retrouve dans ces équations  $\tilde{\rho}$  le rapport des densités entre la particule et le milieu,  $d_p$  le diamètre de la particule ainsi que  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide et  $D_{th}$  le coefficient de diffusion thermique.

Afin de regarder l'impact de ces coefficients dans notre cas, à savoir  $f = 2MHz$ ,  $\nu = 1.10^{-6}m^2.s^{-1}$  et  $D_{th} = 1,4.10^{-7}m^2.s^{-1}$  pour de l'eau à température ambiante. On obtient alors  $\delta_\nu = 4.10^{-7}m$  et  $\delta_{th} = 1,5.10^{-7}m$  que l'on complète avec  $d_p = 20\mu m$  ce qui nous donne un ordre de grandeur similaire pour les deux rapports d'environ  $\approx 2.10^{-2}$ . A côté, nous avons  $2 \left( \frac{3(\bar{\rho}-1)}{2\bar{\rho}+1} \right)^2 = 4.10^{-3}$  ce qui nous donne l'ordre de grandeur des termes thermique et visqueux pour le facteur de contraste acoustique de l'ordre de  $\Phi_\nu \approx \Phi_{th} \approx 10^{-4}$ . En comparaison, le facteur de contraste acoustique de billes de polystyrène calculé avec les valeurs présentes en annexe A est de  $\Phi_{poly} \approx 0,6$  et celui en moyenne mesurée sur plusieurs types cellulaires est de  $\Phi_{cell} \approx 0,17$ . Par ces ordres de grandeur, on montre que l'on peut négliger ces deux termes sans pertes de cohérence dans la suite de cette étude. Par extension, l'équipe de Bruus a observé une déviation négligeable, inférieure à 1%, par rapport au résultat sans viscosité pour les particules de micrométrie à flottabilité presque neutre, comme les cellules biologiques dans l'eau [Settnes and Bruus, 2012]. Ces termes prennent de l'importance lorsque la taille des particules devient beaucoup plus petite, de l'ordre du nanomètre ou pour des fréquences beaucoup plus basses comme le kilohertz. Ce modèle n'est pas pertinent dans notre cas, nous conserverons l'approche développée par Yosioka qui est suffisante pour nos études.

### Approche par gradient, Gor'Kov 1962

En 1962, Gor'Kov [Gor'kov, 1962] parvient à calculer l'ARF pour un champ acoustique stationnaire à partir du gradient d'un potentiel d'énergie :  $\vec{F}_{ac} = -\vec{\nabla}U$  (Eq. 1.21). Cette expression est valable sous certaines conditions sur la taille de la sphère, à savoir  $R_p \ll \lambda$  appelé régime de diffusion de Rayleigh, et  $R_p \gg \frac{v_{ac}}{\omega}$ . ce qui signifie que le rayon de la sphère soit petit devant celui de la longueur d'onde, mais grand devant celui de l'amplitude du déplacement.

$$\begin{aligned} U &= V_p \left( A E_p - B \frac{3}{2} E_c \right) \\ U &= V_p \left( A \frac{1}{2 \rho_0 c_0^2} \langle p^2 \rangle - B \frac{3\rho_0}{4} \langle v^2 \rangle \right) \end{aligned} \quad (1.21)$$

avec  $A = 1 - \frac{1}{\bar{\rho}\bar{c}^2}$  et  $B = \frac{2\bar{\rho}-2}{2\bar{\rho}+1}$ . On notera que  $A + B = \Phi$ . Dans cette équation,  $\langle p^2 \rangle$  et  $\langle v^2 \rangle$  représentent respectivement les moyennes quadratiques temporelles de la pression et de la vitesse acoustique. Il est possible de retrouver l'équation 1.16 de King à partir de cette équation en ajoutant des hypothèses sur l'onde. Par exemple, dans le cas d'une onde stationnaire 1D, le potentiel d'énergie de Gor'Kov s'écrit :

$$U = V_p E_{ac} \left( A \cos^2(kz) - \frac{3B}{2} \sin^2(kz) \right) \quad (1.22)$$

ce qui peut nous redonne l'expression 1.18 en utilisant la formule  $\vec{F}_{ac} = -\vec{\nabla}U$  (correspondant à  $\vec{F}_{ac} = -\frac{\partial U}{\partial z}$ ) en supposant que l'amplitude de pression  $p_a$  ne varie pas selon  $z$ . Ce modèle reste une des meilleures descriptions de l'effet acoustofluidique dans le cas

simple d'une onde stationnaire. A l'instar de Doinikov, Bruus et son équipe continuent d'améliorer le modèle de Gor'Kov en ajoutant la viscosité du fluide [Settnes and Bruus, 2012] ou en exprimant l'ARF pour des particules fluides [Karlsen et al., 2016].

### Force transversale dans le plan d'agrégation

Dans le cas de cavité à onde stationnaire unidirectionnelle, en plus d'une force de radiation dans l'axe de propagation de l'onde acoustique, il existe une composante transversale (Fig. 1.13). Cette force est néanmoins beaucoup plus faible que sa consœur axiale, d'environ un facteur 100 d'après Tuziuti et al [Tuziuti et al., 1999]. C'est grâce à cette force transversale qu'il est possible d'agréger et de maintenir latéralement un agrégat avec une seule source d'ondes acoustiques. Comme la force axiale est bien plus importante que la force transversale, nous pouvons simplifier l'action de ces forces en deux mouvements successifs d'une particule possédant un facteur de contraste acoustique positif. Le premier mouvement est le déplacement dans l'axe  $z$  de la particule vers le noeud de pression. Ce déplacement résulte de l'action de l'ARF axiale. Dans un second temps, il y a le déplacement de la particule depuis sa position dans le noeud pression vers son centre. Ce déplacement fait suite à l'ARF transversale.

En reprenant le potentiel de Gor'Kov pour une onde stationnaire 1D (Eq. 1.22), une particule petite par rapport à la longueur d'onde et un référentiel cylindrique, on peut déterminer l'expression de la force de radiation acoustique transversale en appliquant  $\vec{F}_{ac} = -\vec{\nabla}U$  [Whitworth and Coakley, 1992] :

$$\vec{F}_T = -V_p \left( A \cos^2(kz) - \frac{3B}{2} \sin^2(kz) \right) \vec{\nabla}_r E_{ac} \quad (1.23)$$

avec  $k$  le nombre d'onde et  $\vec{\nabla}_r E_{ac}$  le gradient de la moyenne temporelle de l'énergie acoustique dans le plan à  $z$  fixé. Lorsque l'on se place dans le plan d'un noeud de pression, il vient que  $kz = n\frac{\pi}{2}$  ce qui implique que  $\cos^2(kz) = 0$  et  $\sin^2(kz) = 1$ . En se plaçant au noeud de pression, en considérant un repère cylindrique avec une symétrie de rotation selon l'axe  $z$  et en utilisant  $B = \frac{2\tilde{\rho}-2}{2\tilde{\rho}+1}$ , l'expression 1.23 devient alors :

$$\vec{F}_T = 3V_p \frac{\tilde{\rho} - 1}{2\tilde{\rho} + 1} \frac{\partial E_{ac}}{\partial r} \vec{e}_r \quad (1.24)$$

De manière similaire, on peut trouver l'expression de cette force au ventre de pression en utilisant  $A = 1 - \frac{1}{\tilde{\rho}\tilde{c}^2}$  :

$$\vec{F}_T = -V_p \left( 1 - \frac{1}{\tilde{\rho}\tilde{c}^2} \right) \frac{\partial E_{ac}}{\partial r} \vec{e}_r \quad (1.25)$$

avec  $V_p$  le volume de la particule,  $\tilde{\rho}$  le rapport des densités particule sur milieu et  $\tilde{c}$  le rapport des vitesses acoustiques particule sur milieu. On remarque via ces formules que c'est le terme de densité qui régit la force transversale pour les particules au noeud de pression avec le terme  $\frac{\tilde{\rho}-1}{2\tilde{\rho}+1}$  alors que c'est la compressibilité qui régit cette force au niveau des ventres de pression avec le terme  $\left(1 - \frac{1}{\tilde{\rho}\tilde{c}^2}\right)$ . A l'instar de  $\Phi$  pour la force axiale,

on note que ces deux termes ne sont pas forcément positifs. Il est donc possible d'avoir une force transversale répulsive comme attractive selon les propriétés des particules et du milieu, le gradient d'énergie acoustique étant supposé croissant vers l'axe central de propagation de l'onde.

Il ne faut toutefois pas négliger la composante axiale lorsque l'on se trouve dans le plan de lévitation, elle peut avoir un effet, notamment sur des objets ne possédant pas une symétrie sphérique. Lors de l'étude de nanorods en microgravité, Dumy et al. [Dumy et al., 2020] montrent l'importance de cette composante. Ils précisent que le "vrai" plan de lévitation n'est pas le noeud de pression, mais est situé juste au-dessous de celui-ci, conséquence de l'équilibre entre l'ARF et la gravité. Ils observent notamment une transition nette entre l'orientation horizontale et l'orientation axiale de l'axe des nanorods. Ils ont majoritairement leur axe principal dans le plan de lévitation en présence de gravité, mais que ce n'est plus le cas en microgravité où l'on peut observer une lévitation au vrai noeud de pression.

### Théorie de pince acoustique, Baresch 2013

En 1970, Ashkin observe qu'un faisceau laser focalisé peut accélérer axialement et confiner transversalement des particules [Ashkin, 1970], révélant ainsi l'existence des composantes de gradient et de diffusion de la force de radiation optique. Il montrera par la suite la possibilité de piéger en 3D une particule grâce à un unique faisceau focalisé [Ashkin et al., 1986]. Baresch et al. ont remarqué que les différents modèles existants décrivant la force de radiation acoustique ne leur permettaient pas de modéliser les forces qu'exerce un faisceau focalisé sur un objet dans les trois dimensions alors que de tels modèles existent en optique. En effet, nous avons vu que le modèle de King permet le calcul des forces pour une onde plane et que le modèle de Gor'Kov exprime les forces de radiation acoustiques dans le cas d'une onde stationnaire et du régime de diffusion de Rayleigh. C'est en 2013 que Baresch et al. publient leur modèle de force de radiation acoustique tridimensionnelle s'appliquant sur une sphère élastique au sein d'un champ acoustique arbitraire [Baresch et al., 2013].

On rappelle que la force de radiation acoustique exercée sur un objet est due à une pression sur la surface de cet objet [Bruus, 2012b]. La surface de cet objet n'est cependant pas fixe, celui-ci vibrant sous l'effet de l'onde acoustique rendant donc sa surface dynamique. Afin de simplifier les calculs, il faut intégrer la force, non pas sur la surface de l'objet, mais sur une surface englobant cet objet via l'utilisation du tenseur des contraintes moyens (Eq. 1.26).

$$\vec{F} = \left\langle \int_{S(t)} p d\vec{S} \right\rangle = - \int_{S_R} \langle \Pi \rangle d\vec{S} \quad (1.26)$$

avec  $S(t)$  la surface dynamique,  $S_R$  la surface sphérique de rayon  $R$  englobant l'objet et suffisamment éloignée de celui-ci et  $\langle \Pi \rangle$  le tenseur de flux de quantité de mouvement provenant de l'équation de conservation de la quantité de mouvement [Brillouin, 1926] :

$$\langle \Pi \rangle_{ij} = \left( \frac{1}{2\rho_0 c_0^2} \langle p_1 \rangle^2 - \frac{\rho_0}{2} \langle |\vec{v}_1|^2 \rangle \right) \delta_{ij} + \rho_0 \langle v_{1i} v_{1j} \rangle \quad (1.27)$$

En utilisant le formalisme des harmoniques sphériques, ils sont parvenus à faire l'équivalent acoustique de la théorie de Lorentz-Mie généralisée utilisée en optique [Maheu et al., 1988]. C'est-à-dire qu'ils ont relié le calcul des champs acoustiques dans un cadre d'harmoniques sphériques à la théorie de la pression de radiation. Ils ont ainsi obtenu la force acoustique qui s'exerce sur l'objet, quelle que soit sa position dans l'espace et dans les 3 directions de l'espace.

En se plaçant dans le régime de diffusion de Rayleigh, on peut simplifier la dynamique de l'objet à un comportement monopolaire de compression et de relaxation, ainsi qu'un comportement dipolaire d'oscillation. Dans ce régime, Baresch et al. ont pu généraliser l'approche de Gor'Kov en prenant en compte la partie progressive de l'onde acoustique. L'expression qu'ils obtiennent possède un terme de gradient et un terme de diffusion comme attendu (Eq. 1.28) [Baresch et al., 2016].

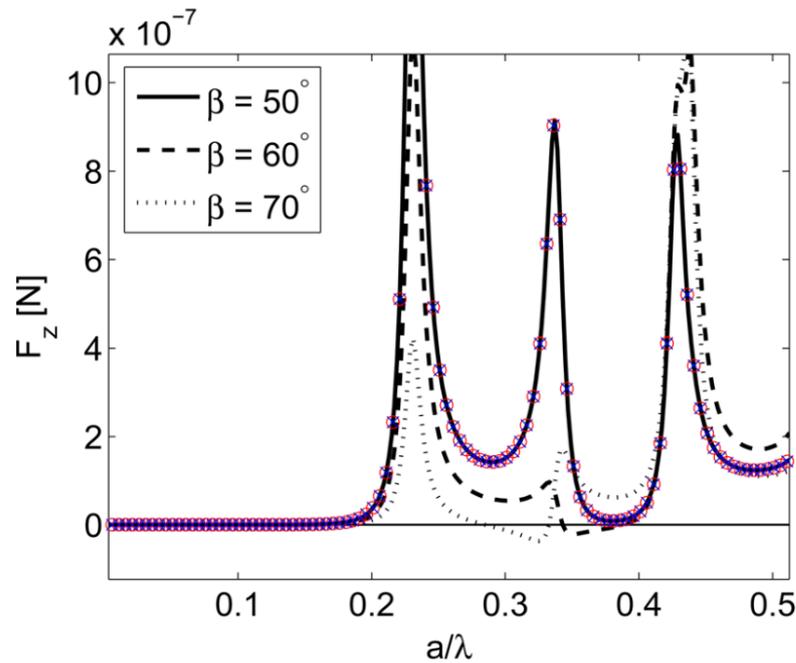
$$\vec{F} = \vec{F}_G + \vec{F}_D \quad (1.28)$$

$$\begin{aligned} \vec{F}_G &= -\frac{1}{2} \left( \frac{Re(\alpha_m)}{2\rho c^2} \vec{\nabla} |p|^2 - \frac{Re(\alpha_d)}{2} \rho \vec{\nabla} |\vec{v}|^2 \right) \\ \vec{F}_D &= \frac{1}{2} \left( \frac{k}{c} Im(\alpha_m) - \frac{k^4}{12\pi c} Re(\alpha_m) Re(\alpha_d) \right) Re(p \vec{v}^*) \\ &\quad + \frac{1}{2} \rho Im(\alpha_d) - \frac{1}{2} Im((\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v}^*) \end{aligned} \quad (1.29)$$

avec  $\alpha_m$  et  $\alpha_d$ , des termes issus des oscillations monopolaire et dipolaire de l'objet respectivement. Le terme de gradient  $\vec{F}_G$  correspond au résultat de Gor'Kov (Eq. 1.21) tandis que le terme de diffusion  $\vec{F}_D$  permet de prendre en compte la partie progressive de l'onde. Ils ont notamment observé des phénomènes de résonance sur une bille en polystyrène pour  $0,2 < \frac{a}{\lambda} < 0,8$  où  $a$  est le diamètre de la sphère (Fig. 1.14). Dans notre cas, cela correspondrait à  $a \approx 0,2\lambda \approx 150 \mu\text{m}$ , donc des particules de polystyrène de  $300 \mu\text{m}$  de diamètre.

### Force de Bjerknes

Lorsque deux sphères sont présentes dans le champ acoustique, il faut ajouter dans le calcul du champ incident total sur l'une des deux sphères le champ diffusé par l'autre sphère. De cet ajout vient une force nommée force de Bjerknes, nom de celui l'ayant calculé pour la première fois [Bjerknes, 1909]. Crum décomposa cette force en deux termes, un terme de sphère rigide et un terme de compressibilité [Crum, 1975]. Un modèle simplifié de cette force a été obtenu par Weiser sous les hypothèses  $d_{p-p} \ll \lambda$  et  $R_p \ll \lambda$ , à savoir une longueur d'onde acoustique beaucoup plus grande que l'espacement des sphères et que le rayon de ces sphères, avec la même superposition d'un terme de sphère rigide et d'un



**Figure 1.14 Phénomènes de résonance observé hors du régime de Rayleigh** Graphique de la force axiale exercée par un faisceau de Bessel sur une sphère de polystyrène en fonction de  $\frac{a}{\lambda}$  avec  $a$  le rayon de la sphère et  $\lambda$  la longueur d'onde acoustique.  $\beta$  correspond à l'angle du demi-cône du faisceau de Bessel émis. Issu de [Baresch et al., 2013]

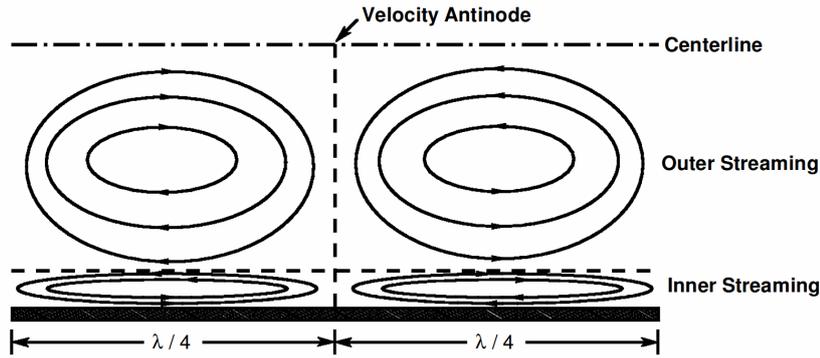
terme de compressibilité [Weiser et al., 1984]. Apfel obtient l'expression suivante pour deux particules, notées 1 et 2, de rayon distinct et petit devant  $\lambda$  [Apfel, 1988] :

$$F_{int} = \frac{-k^2 E_{ac}}{2\pi d_{p-p}^2} A_1 V_1 A_2 V_2 \quad (1.30)$$

avec  $d_{p-p}$  la distance entre les particules,  $V$  le volume et  $A = 1 - \frac{1}{\rho c^2}$  pour les particules 1 et 2. La force de Bjerknes calculée par Apfel est une force attractive dans la majorité des cas. Mais cette force, comme la force de radiation axiale ou transversale, peut être positive ou négative selon l'angle d'émission de l'onde [Woodside et al., 1997] et ainsi agir comme une force attractive ou répulsive. Il est important de noter que plus la suspension est concentrée en particules, plus la force de Bjerknes est importante, notamment lors de la formation d'agrégats. Plusieurs études sur ces forces montrent que la distance critique à laquelle cette force est significative est d'environ  $\approx 2 d_p$  avec  $d_p$  le diamètre de la particule [Garcia-Sabaté et al., 2014, Castro and Hoyos, 2016].

### 1.2.3 Streaming acoustique

Le streaming acoustique est un phénomène bien connu des acousticiens. Cependant, en raison des nombreuses formes qu'il peut prendre, il est souvent mal compris en dehors du cercle relativement restreint des chercheurs qui participent activement à son étude.



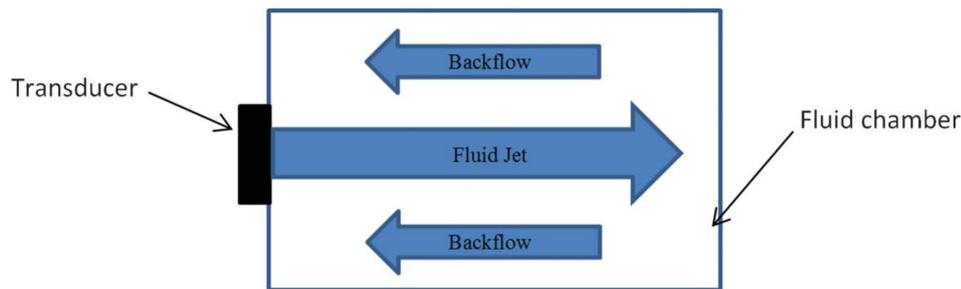
**Figure 1.15 Streaming de bords** On peut voir le "Inner Streaming" à l'intérieur de la couche limite correspondant au streaming de Schlichting et "Outer Streaming" correspondant au streaming de Rayleigh. Issu de [Boluriaan and Morris, 2003]

Lors de sa propagation dans un fluide, l'onde acoustique transfère une certaine quantité de mouvement vers le fluide, le mettant ainsi en mouvement et générant un flux. C'est ce flux que l'on appelle streaming [Lighthill, 1978]. Le streaming ne peut apparaître que dans un fluide visqueux. Il peut s'avérer gênant lorsque l'on souhaite piéger ou déplacer des objets à l'aide de l'ARF, mais également avantageux lorsque l'on souhaite mélanger deux fluides rapidement. On distingue deux types de streaming en fonction de l'échelle caractéristique  $L_s$  du système et de la longueur d'onde acoustique  $\lambda$ .

Lorsque  $L_s \ll \lambda$ , c'est un streaming de bords [Nyborg, 1958]. Dans les dispositifs acoustofluidiques soumis à des conditions de résonance, la vitesse du fluide est bien supérieure à celle de la paroi. Pour relier les deux, le fluide doit traverser une fine région appelée couche limite. Dans les dispositifs fonctionnant à des fréquences élevées (mégahertz), cette couche a une épaisseur égale ou inférieure au micromètre, ce qui entraîne de grands gradients de vitesse et donc des contraintes de cisaillement. Ce sont ces contraintes qui vont, sur quelques milliers de cycles [Muller and Bruus, 2015], créer un champ de vitesse régulier au sein du fluide que l'on nomme streaming de bords.

On distingue deux types de streaming de bords [Hamilton et al., 2003]. Le streaming de Rayleigh, décrit par Lord Rayleigh en 1883 [Rayleigh, 1883], décrit le mouvement moyen du fluide à l'extérieur de la couche limite comme indiqué sur la figure 1.15. Il est parfois appelé "Outer Streaming". Le streaming de Schlichting, décrit en 1932 [Schlichting, 1932] et également appelé "Inner Streaming", décrit le mouvement moyen du fluide à l'intérieur de la couche limite. Il est de sens opposé par rapport au streaming de Rayleigh comme le montre la figure 1.15. D'après Landeau et Lifshitz [Landau and Lifshitz, 2006], le streaming de bords est particulièrement prononcé lorsque  $L_s \gg \delta$  avec  $L_s$  la dimension caractéristique du système,  $\delta$  la couche limite et  $\lambda$  la longueur d'onde. La couche limite est définie par  $\delta = \sqrt{\frac{\mu}{\pi \rho f}} = \sqrt{\frac{\lambda \mu}{\pi \rho c}}$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $\nu$  la viscosité cinématique du milieu,  $c$  la célérité de l'onde acoustique dans le milieu et  $f$  la fréquence de l'onde acoustique. La valeur de  $\delta$  pour une onde de fréquence 2 MHz dans l'eau est d'environ 0,27  $\mu\text{m}$  [Kuznetsova and Coakley, 2007].

Lorsque  $L_s \gg \lambda$ , un streaming additionnel survient par la dissipation de l'onde



**Figure 1.16 Streaming jet ou streaming d'Eckart** On peut voir représenté le flux principal correspondant au streaming d'Eckart ou streaming jet, ainsi que le reflux causé par la paroi de la chambre fluidique. Issu de Wiklund et al. 2012 [Wiklund et al., 2012]

acoustique. Il est appelé streaming d'Eckart, streaming jet ou encore vent de quartz. Lors de sa propagation dans un fluide, une partie de l'énergie acoustique de l'onde est atténuée et absorbée par le fluide à un taux généralement proportionnel au carré de sa fréquence, comme l'a décrit Eckart en 1948 [Eckart, 1948]. Par cette dissipation, le fluide obtient une quantité de mouvement générant un flux. Dans le cas d'une chambre fluidique confinée, il découle de ce flux une circulation dans la totalité de la chambre comme le montre la figure 1.16. Il peut être généré par des ondes stationnaires ou progressives.

Pour que le streaming jet soit significatif, Squires et Quake [Squires and Quake, 2005] indiquent qu'il faut que la dimension de la chambre, dans l'axe de propagation, soit équivalente ou supérieure à la longueur d'atténuation acoustique. Ils donnent comme exemple une longueur de 8,3 mm dans l'eau à 50 MHz. On peut déduire que ce type de streaming intervient lorsque des ondes acoustiques de l'ordre du MHz sont propagées dans une chambre de dimension a minima millimétrique.

Quel que soit le streaming, les flux générés ont des nombres de Reynolds faibles au regard des particules. Une particule soumise à ces flux subira donc une force de traînée qui suit la loi de Stokes. Pour une suspension de particules piégées par acoustique, il est nécessaire que la force de radiation acoustique générée soit suffisamment forte par rapport à la traînée générée par le streaming afin d'empêcher les particules de se faire emporter par un tel flux. Si la traînée est trop importante, elle peut influencer l'agrégation des particules et donc la taille de l'agrégat.

Différentes approches pour réduire ce streaming ont été explorées. Ohlin et al. [Ohlin et al., 2011] ont, par exemple, utilisé une méthode de balayage en fréquence pour réduire le streaming au sein de leur dispositif multi-puits. Des études ont montré que le streaming peut être atténué via des ondes acoustiques pulsées [Hoyos and Castro, 2013, Goering and Dual, 2022] lorsque le duty cycle ( $\frac{T_{on}}{T_{on}+T_{off}}$  avec  $T_{on}$  le temps durant laquelle l'onde est émise et  $T_{off}$  le temps durant laquelle elle ne l'est pas) est très faible. Les raisons de cette diminution restent inconnues malgré l'approche théorique menée par Bruus et al. [Muller and Bruus, 2015]. Ces derniers proposent une approche proche de celle d'Ohlin pour réduire le streaming qui consiste à utiliser différentes fréquences de résonance au cours du temps. Ces fréquences de résonance doivent générer une force de radiation acoustique

similaire et des streamings différents afin que ces derniers s’annulent mutuellement. Dans une étude théorique [Bach and Bruus, 2020], Bach et Bruus montrent que le streaming peut être diminué de plusieurs ordres de grandeur en optimisant la forme du système sans diminuer l’ARF.

Parmi les applications au streaming acoustique, la plus évidente est le mélange. Dans le domaine des biocapteurs comme dans d’autres, il est souvent nécessaire de mélanger le milieu afin de l’homogénéiser. Plusieurs méthodes de mélange existent en microfluidique [Ottino and Wiggins, 2004] mais le streaming acoustique se révèle intéressant lors de faible volume par sa simplicité et son accessibilité. Yasuda montre son efficacité pour le mélange de globules rouges avec une fréquence de 3,5 MHz et un canal de  $1,5 \times 1,5$  mm [Yasuda, 2000]. Kuznetsova et Coakley détaillent plusieurs autres applications au streaming acoustique [Kuznetsova and Coakley, 2007].

### 1.3 Acoustique et biologie

Les ondes acoustiques sont de plus en plus utilisées dans le domaine de la biologie, que ce soit en médecine comme en recherche [Fletcher, 1992]. Elles offrent de grandes possibilités d’observation, de manipulation, voir de destruction. Nous allons rapidement faire l’inventaire des applications biologiques de l’acoustique en nous attardant particulièrement sur la culture cellulaire.

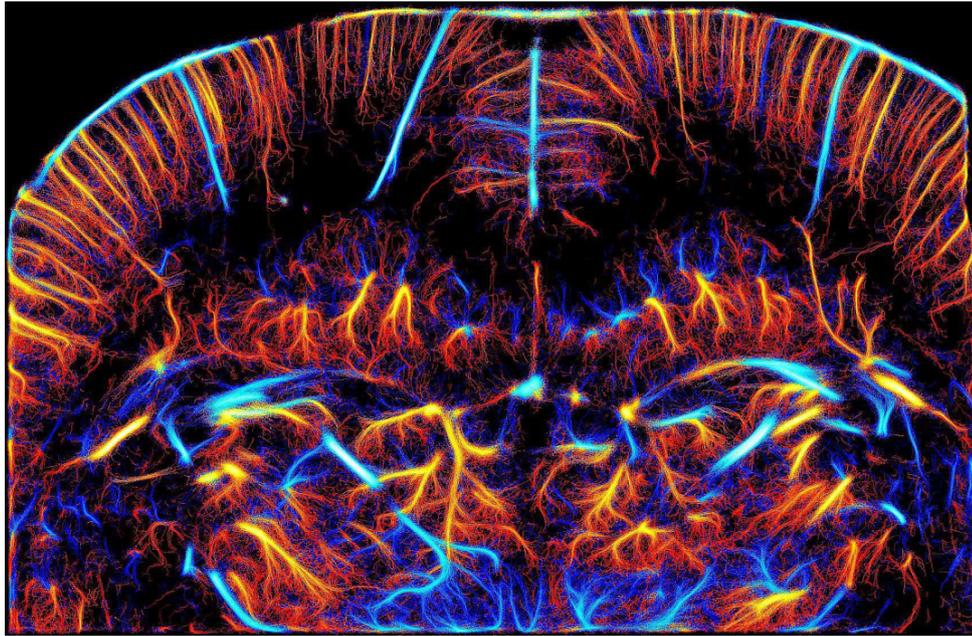
#### 1.3.1 Utilisation de l’acoustique en médecine

##### Imagerie ultrasonore

Il faut remonter aux années 1910, date à laquelle Paul Langevin étudia la propagation et la réflexion des ondes sur des objets, pour voir apparaître les premiers échographes et le fameux SONAR. La première sonde échographique, destinée à l’observation du corps, n’apparaît qu’en 1957 au Royaume-Uni grâce aux travaux de MacVicar, Bown and Donald. En 1987, la technique est utilisée pour l’observation d’un sphéroïde tumoral [Sherar et al., 1987]. Aujourd’hui, l’échographie est certainement la technique d’imagerie la plus connue et la plus répandue, notamment pour son utilisation au cours de la grossesse. Les techniques d’imagerie par ultrasons sont utilisées dans de nombreux domaines, notamment pour l’imagerie cérébrale [Zheng et al., 2022].

Le principe de base de l’échographie repose sur deux étapes, l’émission des ultrasons et leur réception [Bercoff et al., 2004]. A l’aide d’une barrette de plusieurs transducteurs piézo-électrique, des signaux ultrasonores focalisés sont émis. Ces signaux sont alors rétro-diffusés par le milieu selon ces propriétés acoustiques et enregistrés par la barrette de transducteurs puis analysés afin d’obtenir la signature acoustique de la zone focalisée. En répétant le processus pour focaliser les signaux ultrasonores aux différents endroits de la zone à imager, on peut obtenir la signature ultrasonore complète de la zone.

L’imagerie ultrasonore conventionnelle, de par son utilisation séquentielle de faisceaux



**Figure 1.17 Microscopie ultrasonore de localisation** Observation du cerveau d'un rat vivant par microscopie ultrasonore de localisation. Des microbulles servent d'agents de contraste au sein des vaisseaux sanguins et sont observées par échographie. Issu de [Couture et al., 2018]

d'émission focalisés, image les tissus ligne par ligne. Des techniques d'imagerie sonore ultrarapide ont été développées pour augmenter la fréquence d'acquisition des images jusqu'au kHz. Ce procédé n'a cessé d'évoluer depuis. Le laboratoire Physique pour la médecine et la start-up Iconeus ont notamment développé une technique d'imagerie sonore par Doppler ultrarapide permettant d'observer les flux sanguins du cerveau et ainsi obtenir des informations sur l'activité cérébrale via le couplage neurovasculaire [Macé et al., 2011]. Rabut et al. [Rabut et al., 2020] montrent l'intérêt de ce type d'imagerie peu invasive pour la surveillance des effets des médicaments sur la connectivité fonctionnelle du cerveau de la souris éveillée. D'autres techniques sont également développées comme la microscopie ultrasonore de localisation qui utilisent, non pas le mouvement des fluides corporels, mais des agents de contraste acoustique. Ces techniques pourraient révolutionner le diagnostic du cancer ou des accidents vasculaires cérébraux notamment [Errico et al., 2015].

### Histotripsie

En plus de l'imagerie, les ultrasons sont également utilisés en médecine afin de désintégrer des tissus de façon non invasive [Khokhlova et al., 2015]. Un faisceau d'ultrasons de haute intensité est focalisé à l'intérieur du corps pour affecter localement la zone ciblée sans endommager les tissus intermédiaires ou avoisinants. Ce traitement, appelé histotripsie, possède deux méthodes d'applications différentes. La première consiste à utiliser le phénomène de cavitation acoustique. La cavitation est la formation et l'effondrement de bulles de gaz dans un milieu souvent fluide en raison d'une chute de pression locale. Lors de son application, l'histotripsie va entraîner la formation de microbulles dans le tissu ciblé

qui vont se dilater puis éclater violemment. Le stress mécanique engendré par la cavitation tue localement les cellules et brise les structures tissulaires. La durée d'émission des ondes ultrasonores est de l'ordre de la microseconde. La seconde utilise la température plutôt qu'un stress mécanique pour désintégrer les tissus. Les ultrasons sont émis plus longtemps avec cette méthode (de l'ordre de la milliseconde) afin de générer des bulles en ébullition qui vont permettre de tuer les cellules environnantes.

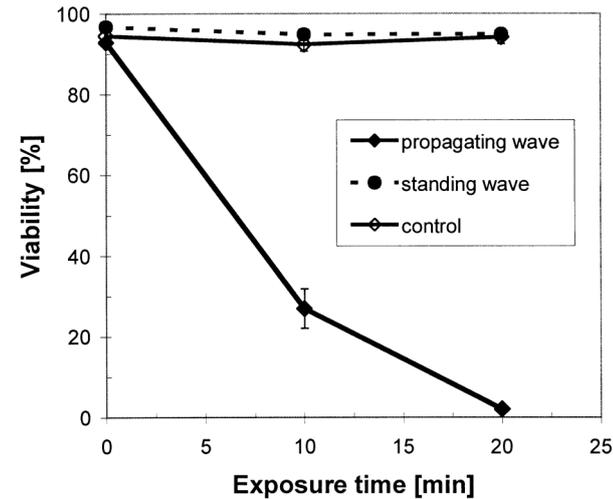
L'histotripsie est déjà utilisée dans le traitement des calculs rénaux et est prometteuse dans le traitement du cancer. Elle permettrait d'affaiblir une tumeur en tuant un bon nombre de ces cellules et en brisant sa structure, la forçant à régresser et réduisant les risques de métastases. Contrairement aux techniques comme la chimiothérapie, l'histotripsie laisse le système immunitaire intact lui permettant de supprimer les éventuels débris ou cellules cancéreuses isolées. Outre sa non-invasivité, l'histotripsie peut être utilisée en parallèle de techniques d'imagerie comme l'imagerie ultrasonore ou l'imagerie par résonance magnétique afin de surveiller en temps réel son utilisation.

### 1.3.2 Manipulation d'objets biologiques par acoustique

Dans le domaine de l'acoustique, lorsqu'il s'agit d'applications biologiques, ce sont les ultrasons qui sont le plus souvent utilisés. Pour les pièges acoustiques, cela s'explique par la dépendance favorable de la force de rayonnement vis-à-vis de la fréquence. Il se trouve qu'aux fréquences de l'ordre du MHz, le problème de la cavitation est également évité [Gould et al., 1992] ce qui évite un endommagement de l'objet piégé. Les fréquences typiques pour la manipulation d'objet en acoustique sont de 1 à 10 MHz dans des milieux fluides et de 10 à 500 kHz dans l'air. Cette différence vient des propriétés acoustiques de ces milieux. Il existe actuellement deux grandes applications aux pièges acoustiques en biologie, le tri et la culture cellulaire. D'autres applications existent comme la mesure de certaines propriétés physiques des cellules [Salari et al., 2020].

#### Culture cellulaire

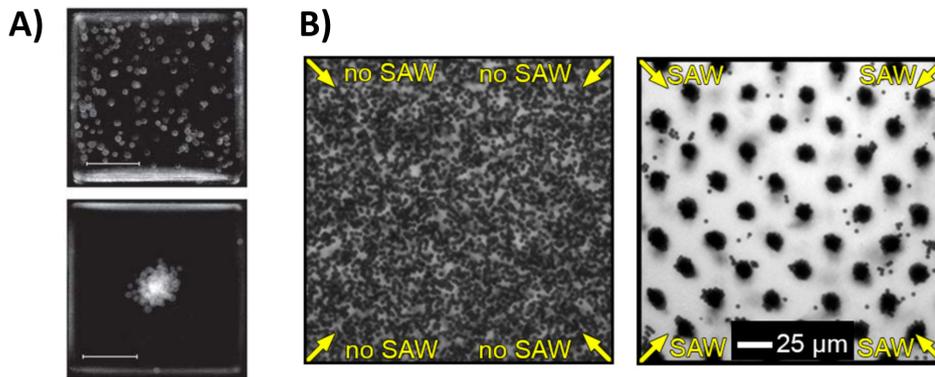
Comme évoqué précédemment avec les sphéroïdes, l'acoustique est utilisée en culture cellulaire, notamment pour sa capacité à agréger rapidement des cellules entre-elles. Différentes études ont d'abord montré que la viabilité des cellules n'était pas impactée lors de leur manipulation par ondes acoustiques [Böhm et al., 2000, Hultström et al., 2007, Wiklund, 2012]. On peut voir sur la figure 1.18 que la viabilité des cellules n'était presque pas impactée pour des ondes stationnaires alors qu'après 20 minutes d'exposition à des ondes propagatives, ces cellules ont subi une forte chute de leur viabilité. C'est pour des densités d'énergie de l'ordre de 44 et 70 J/m<sup>3</sup> qu'une baisse de viabilité est observée pour les ondes stationnaires, même si cette baisse reste plus faible que celle observée à 8,5 J/m<sup>3</sup> avec les ondes propagatives. Le facteur de contraste acoustique des cellules fait qu'elles s'agrègent naturellement aux noeuds de pression. Bohm et al. estiment que cette agrégation est préférable pour la survie des cellules, car c'est là où il y aurait le moins de stress mécanique [Böhm et al., 2000].



**Figure 1.18 Impact des ondes acoustiques sur la viabilité cellulaire** Comparaison de la viabilité cellulaire de *Petunia hybrida* exposée à des ondes ultrasonores propagatives et stationnaires de même densité d'énergie (densité d'énergie  $8,5 \text{ J/m}^3$ , fréquence 2 MHz,  $n = 2$ ). Issu de [Böhm et al., 2000].

Depuis, de nombreux systèmes de culture cellulaire utilisant les ondes acoustiques ont vu le jour. Une majorité de ces systèmes utilisent les ondes de surface, ou SAW. On trouve, par exemple, des systèmes utilisant les ondes acoustiques uniquement pour former les agrégats à haut débit [Chen et al., 2016] et avec une structure plus complexe [Wu et al., 2021]. Des études sur la formation de sphéroïdes avec ondes de volumes, ou BAW, existent également [Kuznetsova et al., 2009, Jeger-Madiot et al., 2021], mais en nombre réduit, car les systèmes à BAW sont plus difficiles à mettre en oeuvre que des systèmes à SAW. D'autres systèmes, comme celui de Wiklund et al. [Vanherberghen et al., 2010a, Ohlin et al., 2013] sont à l'interface entre SAW et BAW. Ils ont développé une plaque multi-puits acoustique où le transducteur émet des SAW, qui mettent en vibration les murs de chaque puits introduisant alors des BAW. Ce système reste donc principalement un système à SAW. Avec celui-ci, ils peuvent former et cultiver un grand nombre d'agrégats par acoustique simultanément. C'est le grand avantage des ondes de surface, il est possible d'agrandir la taille d'un système les utilisant sans trop de difficulté.

Ces systèmes offrent de nouvelles possibilités d'études de l'impact des ondes acoustiques sur les cellules, mais ils débloquent également des outils permettant de multiples études plus classiques. Par exemple, Brugger et al. utilisent les ondes acoustiques de surfaces (SAW) afin de structurer des cellules neuronales en vue de former un réseau neuronal contrôlé [Brugger et al., 2018]. Plusieurs études ont montré qu'il est possible de faire de la stimulation neuronale avec les ondes acoustiques [Blackmore et al., 2019, Yoo et al., 2022]. Parmi les mécanorécepteurs étudiés, Piezo1 semble très réceptif aux ondes acoustiques et il semble être un acteur essentiel de la stimulation neuronal par acoustique [Qiu et al., 2019]. Ce mécanorécepteur peut détecter des forces de l'ordre de la dizaine de pN [Wu et al., 2016] ce qui est l'ordre de grandeur de la force de radiation acoustique dans des



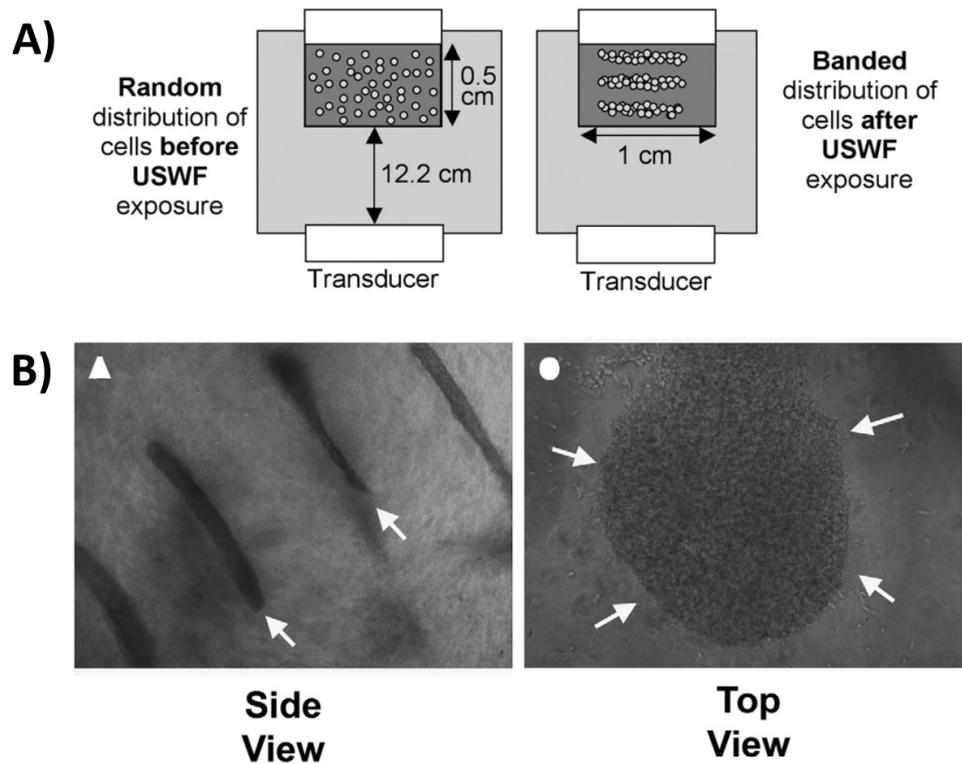
**Figure 1.19 Structuration par acoustique par SAW** **A)** Superposition d’images montrant la distribution de cellules dans des puits individuels en l’absence (image du haut) ou en présence (image du bas) d’ultrasons. Les ondes acoustiques permettent l’agrégation des cellules. Scalebar = 100  $\mu\text{m}$ . Issu de [Vanherberghen et al., 2010a]. **B)** Images à  $t = 0$  s et à  $t = 21$  s de la structuration de billes de polystyrène de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre par SAW. Les ondes acoustiques permettent également une structuration spatiale des agrégats. Issu de [Brugger et al., 2018].

systèmes de piège acoustique à ondes stationnaires.

En plus d’une répartition surfacique contrôlée via des SAW comme illustré figure 1.19, l’acoustique permet d’autres formes de structurations, notamment 3D avec des ondes acoustiques de volume (BAW). Garvin et al. [Garvin et al., 2011] utilisent l’acoustique pour structurer en plan des cellules endothéliales à l’intérieur d’hydrogels de collagène (Fig. 1.20). Ce procédé permet de vasculariser rapidement une grande surface de tissus *in vitro* de manière non invasive. D’autres études étudient la structuration en multicouches de cellules par acoustique [Bouyer et al., 2016, Tait et al., 2019] notamment pour la structuration de réseaux de neurones.

Des systèmes toujours plus complexes sont développés afin d’affiner le contrôle et la manipulation d’objet à distance. Baudoin et al. ont développé une technique de manipulation utilisant des ondes progressives hélicoïdales afin de piéger en 3D des objets dont le facteur de contraste acoustique est positif [Baudoin and Thomas, 2020]. En utilisant des fréquences allant du kHz au GHz, il leur est possible de manipuler des objets de tailles très diverses. Cette technique se différencie des autres grâce à sa capacité à manipuler individuellement et en 3D des objets. Ils ont réussi à manipuler et positionner individuellement des cellules de cancer du sein avec des forces acoustiques de l’ordre de  $\approx 100$  pN sans modification de viabilité [Baudoin et al., 2020].

Malgré le lien entre acoustique et force mécanique, peu d’étude utilise l’acoustique comme technique d’étude de contraintes mécaniques. On note des études sur la compression de cellules par acoustique [Mishra et al., 2014], mais peu d’études ont été faites sur des sphéroïdes avant le début de ce travail de thèse [Im et al., 2023].

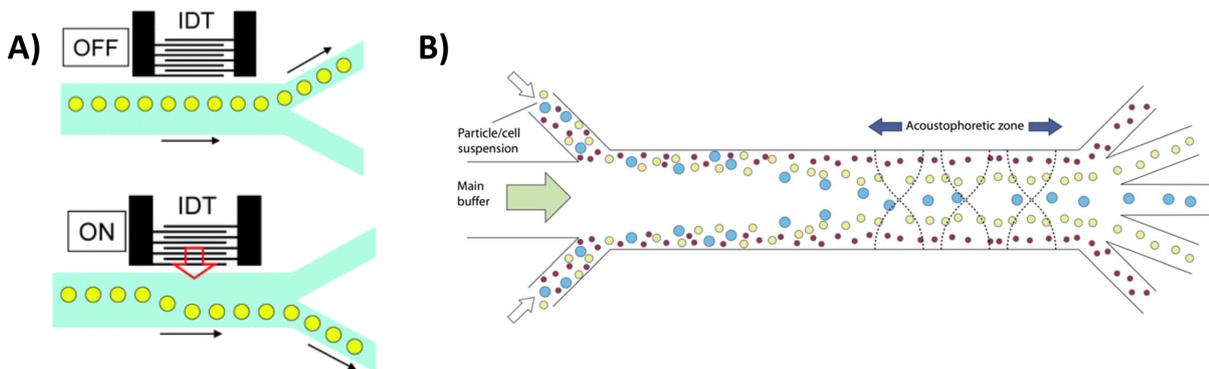


**Figure 1.20 Structuration par acoustique par BAW** **A)** Schéma du montage pour la structuration des cellules épithéliales à l'intérieur d'un hydrogel. USWF (Ultrasound Standing Wave Field) signifie champ d'ondes stationnaires ultrasonore. **B)** Images en vue latérale et axiale de la répartition des cellules épithéliales 1 h après la structuration. Les cellules ont d'abord été homogénéisées dans une solution de collagène de type-I non polymérisé puis structurées par ultrasons pendant 15 min à 1 MHz. On peut voir les différents noeuds de pression, en vue latérale, espacés d'une distance  $\frac{\lambda}{2}$ . Adapté de [Garvin et al., 2011].

## Techniques de tri sélectif

Les applications les plus abouties de l'acoustophorèse actuellement se font en microfluidique. Les ondes acoustiques, et particulièrement les ondes des surfaces, sont très utilisées pour faire du tri de particules [Johnson and Feke, 1995]. Cette technique est utilisée notamment sur des cellules pour les trier en fonction de différentes propriétés. Comme montré sur la figure 1.21 A), l'activation des ondes acoustiques permet de choisir la sortie d'un flux de cellules. En couplant ce type de tri avec d'autres techniques de caractérisation comme une technique optique par exemple, il devient possible de trier les cellules selon leur fluorescence. D'autres techniques plus précises trient les cellules selon leurs propriétés acoustiques comme illustré figure 1.21 B). Dans ce système, seule l'acoustique agit sur le tri en faisant migrer les cellules plus ou moins vite vers le noeud de pression placé au centre du canal. La vitesse de migration des cellules va être déterminée par la force de radiation acoustique agissant sur elle (Eq. 1.18). L'expression de cette force nous indique que c'est principalement leur taille et leur facteur de contraste acoustique qui vont déterminer le tri effectué. Olofsson et al. utilisent ce type de séparation couplée à un contrôle de la densité du fluide afin de séparer les cellules mortes et vivantes [Olofsson et al., 2020]. Modifier la densité du fluide permet de jouer sur le facteur de contraste acoustique  $\Phi$  des cellules. Ils parviennent ainsi, avec 25% d'iodixanol dans leur milieu, à obtenir une agrégation aux noeuds de pression pour les cellules fixées et aux ventres de pression pour les cellules mortes.

La start-up Aenitis, fondée en 2014, développe et commercialise des machines de tri et de reconcentration cellulaire par acoustophorèse [Bellebon, 2021]. L'une de leurs applications est la production de concentrés plaquettaires en partenariat avec l'établissement



**Figure 1.21** Systèmes de tri sélectif par ondes acoustiques **A)** Schéma d'une puce en PDMS couplée à un transducteur générant des SAW (IDT : InterDigital Transducer). Le canal supérieur possède une résistance à l'écoulement plus faible. Les gouttes s'écoulent donc le long du canal supérieur. L'acoustique générée par le transducteur va permettre de décaler les gouttes dans le canal inférieur de façon contrôlée. Issu de [Franke et al., 2009]. **B)** Schéma d'un processus de tri cellulaire par BAW. Les cellules sont injectées le long des parois et la force de radiation acoustique va faire migrer ces cellules plus ou moins vite vers le centre. La vitesse de migration va dépendre de leur taille et de leurs propriétés acoustiques. Issu de [Lenshof et al., 2012].

français du sang (EFS).

### 1.3.3 Effet des ondes acoustiques sur les cellules

Indépendamment des effets histotriptiques décrits précédemment et qui visent à provoquer la destruction des cellules, un nombre croissant d'études montrent que les cellules réagissent directement aux ondes acoustiques. Ainsi, en 1929, Harvey a découvert fortuitement que des préparations de nerfs périphériques répondaient à une stimulation ultrasonore [Harvey, 1929]. Ces observations ont par la suite donné lieu à des séries de travaux montrant que les ultrasons focalisés (FUS) à basse puissance modulent l'activité des réseaux de neurones dans le cerveau. L'intérêt de ces techniques de neuromodulation repose sur la capacité des ondes ultrasonores à traverser la boîte crânienne et, en fonction des paramètres acoustiques, à provoquer l'activation ou l'inhibition de certains types neuronaux [Wang et al., 2020]. Les mécanismes par lesquels les neurones répondent aux ultrasons sont longtemps restés énigmatiques et dépendent de plusieurs paramètres : l'intensité (0,1 à 15 W/m<sup>2</sup>), la fréquence (0,5 à 80 MHz) et le temps d'exposition (durée et cycles de répétitions des pulses ultrasonores) [Liu et al., 2022].

D'un point de vue mécanique, la façon dont les ultrasons transduisent leurs effets au niveau cellulaire est complexe et n'a commencé à être disséquée, que récemment. Des études de biophysique montrent en effet que les ultrasons modifient significativement les propriétés membranaires des cellules, possiblement par des effets d'augmentation de température locale, de cavitation et/ou par l'application de forces mécaniques. En fonction des paramètres acoustiques utilisés, les altérations membranaires peuvent aller de la formation de pores lipidiques (sonoporation) à la simple déformation des bicouches lipidiques.

Au niveau neuronal, des travaux récents ont montré que ce seraient principalement les déformations mécaniques provoquées par l'onde acoustique sur les membranes, via l'activation de récepteurs mécano-sensibles, qui induisent une dépolarisation des membranes en initiant un potentiel d'action [Yoo et al., 2022]. Ces observations, qui étayaient actuellement le concept de sonogénétique [Ibsen et al., 2015], montrent que les ultrasons (0,5 kHz à 20 MHz) provoquent l'activation de canaux ayant la fonction de récepteurs tels que les TRP (Transient Receptor Potential), KP2 (récepteurs Potassiques), VCG (Voltage Gated Channel) ou encore PIEZO. Ces récepteurs, présents en quantités variables sur les sous types de neurones (mais aussi sur d'autres types cellulaires) sont engagés de façon non spécifique et participent de l'entrée d'ions intracellulaires dans les cellules [Tyler et al., 2018, Qiu et al., 2019, Yoo et al., 2022]. La surexpression de récepteurs mécanosensibles (comme le récepteur bactérien MsCl) ou l'adjonction de nanoparticules piézoélectriques pouvant majorer l'effet des ultrasons laissent entrevoir la possibilité de faire des ultrasons un outil de sonogénétique permettant un contrôle de l'activité neuronale. Les cellules de glioblastome, comme d'autres cellules tumorales, exprimant certains des récepteurs mécanosensibles dont le mécanorécepteur PIEZO1, il est donc parfaitement concevable que les ultrasons initient une transduction de signal à l'intérieur des GB [Zhou et al., 2020, Qu et al., 2020].

## 1.4 Description de l'approche proposée pendant le travail de thèse

Comme exposé dans ce chapitre, il existe actuellement de nombreuses méthodes permettant d'une part la formation *in vitro* de sphéroïdes cellulaires et d'autre part d'entreprendre l'étude de l'influence des forces mécaniques sur la biologie des sphéroïdes. Étant donné la nature hétérogène des méthodologies employées pour contrôler l'application des forces sur des ensembles cellulaires, on retrouve, dans la littérature, des résultats divergeant sur l'impact des forces mécaniques sur la dynamique de prolifération et d'évolution des tumoroides en culture. L'idée sous-jacente à ce travail de thèse a donc été de tenter de tirer profit des propriétés des ondes acoustiques pour structurer un champ de contraintes mécaniques autour de sphéroïdes en culture. La preuve de concept 1) que des cultures cellulaires peuvent être maintenues en lévitation acoustique ayant été apportée au sein de notre équipe [Jeger-Madiot et al., 2021] et 2) que des études ont utilisé la force de radiation acoustique afin de comprimer et déformer des cellules uniques [Mishra et al., 2014]; l'objectif de mon travail de thèse était donc de créer un système de culture acoustofluidique permettant la culture au long terme de cellules et d'étudier l'impact de variations de contraintes acoustiques sur la dynamique de croissance de cellules tumorale.

Afin de reproduire au mieux un modèle de tumeur *in vitro*, nous souhaitons donc, dans un premier temps, optimiser un microsystème acoustofluidique permettant de former et cultiver des sphéroïdes de Glioblastomes dérivés de patients, en lévitation acoustique pendant plusieurs jours. Nous avons tiré profit de l'optimisation acoustique et fluidique pour apporter la preuve de concept qu'un système dynamique de co-culture entre les GB et des cellules immunitaires pouvait être facilement réalisé dans nos bio-réacteurs acoustiques. La Force de Radiation Acoustique (ARF) étant de nature asymétrique et ses paramètres étant contrôlables, nous avons ensuite entrepris une caractérisation acoustique du système de culture afin de mieux appréhender les forces acoustiques appliquées et les différents leviers permis par la lévitation acoustique. À l'issue de ce travail, nous avons commencé l'étude des conséquences des modifications de l'ARF sur la dynamique de réarrangement et de prolifération de sphéroïdes issus de deux lignées distinctes de Glioblastomes dérivés de patients.

# Chapitre 2

## Conception de puces acoustofluidiques pour la culture long-terme et la structuration de sphéroïdes de GB

### Sommaire

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.1 Conception du bioréacteur acoustique . . . . .</b>   | <b>52</b> |
| 2.1.1 Description des puces acoustofluidiques . . . . .   | 52        |
| 2.1.2 Transducteur ultrasonore . . . . .  | 54        |
| 2.1.3 Propagation des ondes acoustiques dans les puces . . . . .  | 55        |
| 2.1.4 Atténuation des ondes acoustiques . . . . .   | 57        |
| 2.1.5 Schéma d'une culture . . . . .  | 58        |
| 2.1.6 Interface microfluidique : la puce mono-noeud . . . . .   | 58        |
| 2.1.7 Injection des cellules . . . . .  | 61        |
| 2.1.8 Interface microfluidique : Puce multi-noeuds . . . . .  | 62        |
| 2.1.9 Description du streaming acoustique . . . . .   | 63        |
| <b>2.2 Viabilité des cellules maintenues en lévitation . . . . .</b>  | <b>64</b> |
| 2.2.1 Description des lignées cellulaires . . . . .   | 65        |
| 2.2.2 Test au bleu Trypan . . . . .   | 65        |
| 2.2.3 Marquage Live/Dead . . . . .  | 67        |
| <b>2.3 Formation et croissance de sphéroïdes de GB en lévitation . . . . .</b>  | <b>70</b> |
| 2.3.1 Dynamique de formation des sphéroïdes . . . . .   | 70        |
| 2.3.2 Quantification de la dynamique de formation des sphéroïdes  | 73        |
| <b>2.4 Structuration d'agrégats en lévitation acoustique . . . . .</b>  | <b>76</b> |
| 2.4.1 Formation d'une structure concentrique . . . . .  | 76        |
| 2.4.2 Application de la structuration : vers un modèle d'infiltra-<br>tion de tumeurs par des cellules immunitaires . . . . . | 78        |

## 2.1 Conception du bioréacteur acoustique

Au commencement de ma thèse, notre équipe a montré que des cellules souches mésenchymateuses humaines peuvent être agrégées et cultivées en lévitation acoustique pendant 24h [Jeger-Madiot et al., 2021]. Au cours de ces 24h, les cellules, initialement structurées en plan cellulaire bidimensionnel aux noeuds de pressions, s’auto-organisent progressivement en sphéroïdes. Notre objectif est de s’appuyer sur cette preuve de concept afin de concevoir un système de culture qui répond au cahier des charges d’une culture long-terme. Il va donc falloir développer un système simple à fabriquer, facile à manipuler et à imager à l’aide de microscope à fluorescence, dans lequel les écoulements fluidiques sont contrôlés et n’impliquent pas un coût de conception trop élevé. Il faudra également penser à : la récupération des cellules et sphéroïdes pour de futures analyses sans risque pour l’utilisateur ; éviter les contacts entre transducteur et milieu de culture ; éviter l’évaporation et la formation de bulles ; permettre un suivi visuel afin de s’assurer de la bonne lévitation, etc.

Afin de répondre à ces objectifs, deux puces de taille millimétriques, que l’on appelle puces acoustofluidiques, ont été conçues au cours de cette thèse afin de répondre aux différents besoins rencontrés avec ce type de culture. Nous verrons dans un premier temps comment le design de ces puces a été élaboré et les matériaux utilisés au regard de leur biocompatibilité et de leurs propriétés acoustiques. Nous vérifierons ensuite la viabilité du système de culture et nous étudierons le comportement des sphéroïdes en lévitation. Enfin, nous verrons comment cette méthode de culture en lévitation acoustique apporte d’intéressants leviers pour complexifier le modèle de sphéroïde.

### 2.1.1 Description des puces acoutofluidiques

Les deux puces conçues au cours de cette thèse sont fabriquées à partir de polydiméthylsiloxane (PDMS), un élastomère de silicone classiquement utilisé pour la conception de puces microfluidiques. Il a été montré dans de nombreuses études [McDonald and Whitesides, 2002, El-Ali et al., 2006, Subramaniam and Sethuraman, 2014, Gale et al., 2016] que le PDMS possède des caractéristiques très intéressantes pour la culture cellulaire. Il possède notamment une résistance mécanique et une flexibilité élevées, est transparent et biocompatible, n’est pas toxique et peut être stérilisé par ultraviolet (UV). Il est également durable et peu coûteux. Une autre des caractéristiques importante du PDMS, pour la culture cellulaire, est sa perméabilité au gaz et son imperméabilité aux liquides. Cette caractéristique lui permet de retenir le milieu de culture et les cellules au sein de la puce tout en permettant les échanges gazeux entre le milieu de culture et l’air de l’incubateur équilibré en CO<sub>2</sub>. Ces échanges gazeux permettent au milieu de culture de garder un pH constant. Il faut toutefois garder à l’esprit que le PDMS possède des propriétés qui peuvent potentiellement interférer avec les conditions de culture, notamment le PDMS a tendance

à absorber des petites molécules organiques [Van Meer et al., 2017], en particulier celles lipophiles, et peut les relarguer au long cours. Outre ces molécules, le PDMS relargue également des oligomères [Regehr et al., 2009] qui peuvent interagir avec les cellules présentes dans un système conçu en PDMS.

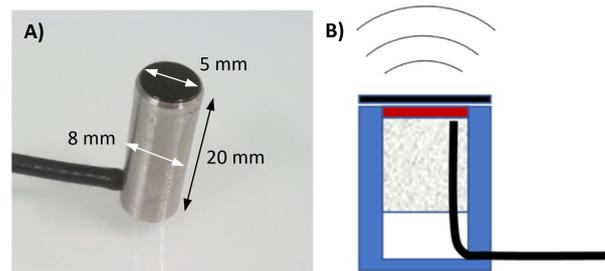
Un autre défaut du PDMS est qu'il est fortement hydrophobe. Cette hydrophobicité peut provoquer l'apparition et l'accumulation de bulles dans les canaux contenant des solutions aqueuses comme le milieu de culture. Notons tout de même que cette hydrophobicité évite également l'adhérence des cellules sur les parois de PDMS. Dans notre cas, nous souhaitons réduire au maximum l'apparition de bulles. Un PDMS hydrophile serait donc préférable. La méthode couramment utilisée pour traiter la surface du PDMS en la rendant hydrophile par oxydation est le traitement au plasma d'oxygène. Cette méthode forme des groupes silanol (-OH) à l'extrémité des groupes méthyle (-CH<sub>3</sub>). Comme les groupes silanol sont polaires, la surface traitée est facilement mouillable par des solvants polaires comme l'eau. Nous utilisons cette méthode en parallèle du collage au plasma (aussi appelé plasma bonding) qui permet de lier le PDMS à la lame de verre. Cela n'est malheureusement pas suffisant, car ce traitement est efficace pendant moins de 3 heures en présence de solutions aqueuses [Kuroki et al., 1998] [Makamba et al., 2003] et compromet donc la stabilité à long terme. Avec des cultures de cellules neuronales, nous avons observé que des bulles apparaissaient souvent après quelques jours de culture malgré les précautions prises. Avec les cultures de cellules tumorales, en revanche, ce n'est pas, ou très peu, le cas. Nous supposons que cette différence provient de la différence de milieu de culture utilisé. Il existe dans la littérature des méthodes pour maintenir le caractère hydrophile du PDMS plus durablement [Zhou et al., 2010]. Ces méthodes pourraient servir à réduire l'apparition de bulles dans toutes les cultures.

Le PDMS est donc un matériau idéal pour ces puces acoustofluidiques. Afin de minimiser l'évaporation de l'eau au cours de la culture, des cache-puits en PDMS sont fabriqués pour recouvrir les ouvertures (appelées par la suite inlet et outlet) des puces lors de la mise en incubation. A la conception des puces, de l'eau est injectée à l'intérieur directement après l'étape de plasma bonding afin de conserver au maximum l'état de surface hydrophile du PDMS. Deux ouvertures sont réalisées à travers le PDMS pour permettre l'introduction de milieux de culture dans les puces, soit en flux continu via un pousse-seringue, soit à pression atmosphérique par pipetage. Si l'on souhaite établir un flux permanent au sein de la puce, il est important de privilégier la poussée du fluide plutôt que son tirage. En effet, le PDMS étant poreux à l'air, un tirage du fluide entraîne une dépression qui va favoriser l'entrée d'air à l'intérieur de la puce via le PDMS. Des expériences préliminaires nous ont effectivement montré une forte réduction, voir une absence d'apparition des bulles lorsque le liquide est perfusé en configuration de poussée comparativement au tirage.

Comme nous avons essentiellement manipulé ces puces à l'aide d'une pipette, des ouvertures de taille différentes ont été effectuées. L'inlet fait la taille d'un cône de pipette alors que l'outlet est plus large que ce cône. Nous présenterons les avantages de cette différence par la suite. Avant d'être collé de manière covalente, par traitement au plasma,

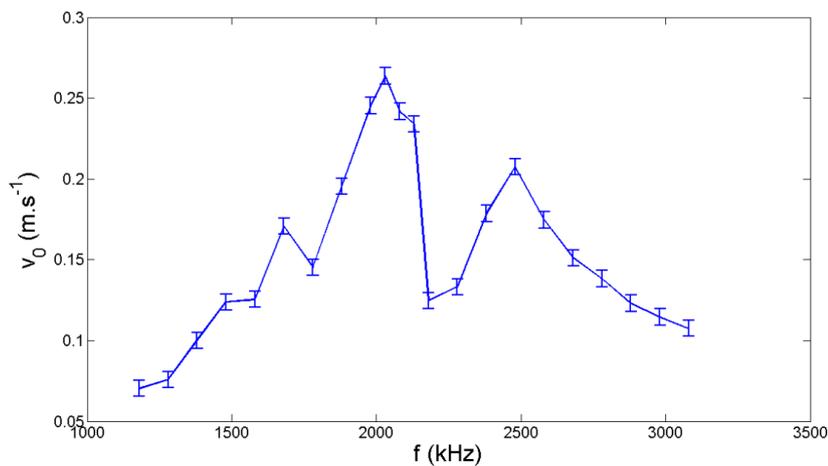
à la lamelle de verre qui constitue le support et le réflecteur des ondes acoustiques, le PDMS est contre-moulé dans des moules en plexiglas de forme contrôlée afin d'avoir une hauteur et une forme reproductible. Afin d'augmenter la reproductibilité des expériences, un adaptateur de platine permettant de fixer les puces microfluidiques et de positionner précisément le transducteur a été conçu par impression 3D.

### 2.1.2 Transducteur ultrasonore



**Figure 2.1** Description d'un transducteur *Signal Processing* utilisé **A)** Photo et dimension d'un transducteur. La partie active fait 5 mm de diamètre. **B)** Schéma du transducteur utilisé. Le piézoélectrique est représenté en rouge, la technologie de "backing" de *Signal Processing* en gris et la lame  $\frac{1}{4}$  d'onde en noir sur le schéma.

Le transducteur utilisé (Fig. 2.1) a initialement été conçu pour la vélocimétrie Doppler ultrasonore. Il peut fonctionner en émission et réception sur une large bande de fréquence comme l'a montré Olivier Dron au cours de sa thèse [Dron, 2011, Dron and Aider, 2013, Jeger-Madiot et al., 2022] en observant le déplacement d'une membrane de mylar via un vibromètre laser comme montré figure 2.2. Ce graphe montre une fréquence de fonctionnement centrée autour de 2 MHz et la possibilité d'un balayage sans trop de



**Figure 2.2** Mesure de l'amplitude de la vitesse en fonction de la fréquence Mesures de la vitesse de vibration d'une feuille de mylar par vibromètre laser. Les mesures sont faites sur l'axe acoustique, à 1 mm de la surface du transducteur à 10 V. Issu de Dron 2011 [Dron, 2011]

perdes, notamment entre 1.75 et 2.15 MHz où le signal reste supérieur à la moitié du signal maximum.

Ce transducteur, développé par *Signal Processing*, est idéal pour ce système de culture. Le champ acoustique est mieux contrôlé, l'impédance est adaptée, ses dimensions sont appropriées et il est étanche avec un caisson propre, ce qui permet une stérilisation simple et évite de possibles problèmes de contaminations lors de culture en incubateur. De plus, grâce au *backing* du piézoélectrique, *Signal Processing* assure une meilleure émission de l'énergie acoustique dans la direction de propagation par le transducteur. Dans la plupart des cas, le transducteur est alimenté par un générateur pouvant fournir jusqu'à 12 Vpp au transducteur à la fréquence voulue. Il doit cependant être connecté à un ordinateur afin de pouvoir être paramétré. Grâce à la petite taille du générateur, l'expérience est facilement transportable avec un ordinateur portable. Les câbles du générateur sont, en plus, suffisamment longs pour permettre de naviguer entre un incubateur et un poste de sécurité microbiologique (PSM).

La puce et le transducteur s'accompagnent d'un porte-transducteur, imprimé en 3D, qui permet de rendre solidaire ces deux éléments. Le câble d'un mètre du transducteur et la facilité de manipulation du porte-transducteur rendent le système aisément manipulable au sein d'une salle de culture sans risque de perdre l'agrégation acoustique à condition de ne pas faire de mouvement brusque.

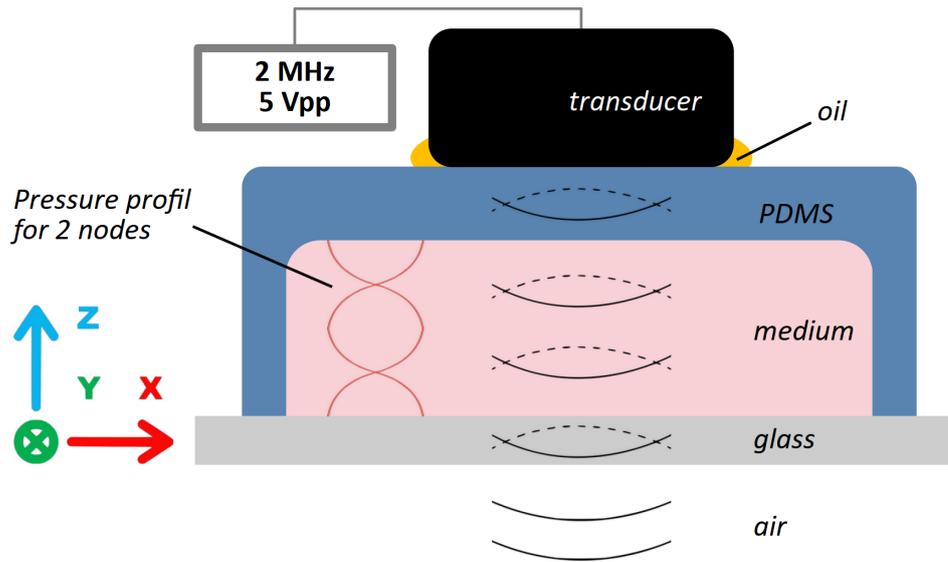
### 2.1.3 Propagation des ondes acoustiques dans les puces

Lorsque l'on conçoit une cavité résonante pour des ondes sonores, il est important de porter attention aux différents milieux et interfaces que l'onde sonore va rencontrer afin d'anticiper d'éventuelles incompatibilités. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'impédance acoustique, définie dans l'équation 1.8, permet de définir la propagation de l'onde dans un milieu indépendamment de la fréquence. Elle permet également le calcul des coefficients de transmission et de réflexion en pression. En effet, chaque fois que l'onde rencontrera une interface, elle sera décomposée en une onde transmise et une onde réfléchie. Dans notre cas, il s'agit de minimiser  $r_{1 \rightarrow 2}$ , correspondant à la réflexion de l'onde à l'interface entre deux milieux, jusqu'au sein de la chambre, puis de la maximiser afin de favoriser l'établissement d'une onde stationnaire et ainsi maximiser l'énergie acoustique dans la chambre de lévitation.

Les puces disposent, comme schématisées sur la figure 2.3, de quatre interfaces distinctes, à savoir : huile/PDMS, PDMS/eau, eau/verre et verre/air. On rappelle dans l'équation 2.1 le calcul des coefficients de réflexion et de transmission pour une onde d'incidence normale à l'interface :

$$r_{1 \rightarrow 2} = \left| \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right| \quad t_{1 \rightarrow 2} = 1 - r_{1 \rightarrow 2} \quad (2.1)$$

En regardant le tableau 2.1, on peut voir le calcul des impédances des matériaux utilisés ainsi que ces coefficients. Les valeurs des coefficients de réflexion et de transmission sont respectivement proches de 0 et de 1 jusqu'à l'interface eau/verre où la réflexion



**Figure 2.3 Schéma d'une puce acoustofluidique** Schéma des différentes couches de la puce avec les ondes ultrasonores représentées. Les traits pleins correspondent aux ondes transmises et ceux en pointillés aux ondes réfléchies. Un exemple de profil de pression pour une onde stationnaire est représenté. On peut y voir les différentes interfaces d'une puce, à savoir transducteur/huile, huile/PDMS (ou transducteur/PDMS directement), PDMS/milieu, milieu/verre et verre/air. La fréquence usuelle d'utilisation est de 2 MHz et la culture se fait avec une tension de 5 Vpp aux bornes du transducteur.

s'accroît puis l'interface verre/air qui permet une réflexion quasi parfaite. Au regard de ces coefficients, on peut conclure que cette puce est un système favorisant l'établissement d'une onde stationnaire dans la chambre et présentant peu de pertes énergétiques aux interfaces. Nous discuterons de la résonance de ce système plus en détail dans le chapitre 3.

Les coefficients de réflexion et de transmission en puissance sont également indiqués.

| Milieu       | Z                    | $r_{1 \rightarrow 2}$<br>pression | $r_{1 \rightarrow 2}$<br>puissance | $t_{1 \rightarrow 2}$<br>pression | $t_{1 \rightarrow 2}$<br>puissance |
|--------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Huile (°C)   | 1,32                 | 0,11                              | 0,01                               | 0,89                              | 0,99                               |
| PDMS (10 :1) | 1,06                 | 0,17                              | 0,03                               | 0,83                              | 0,97                               |
| Eau (°C)     | 1,49                 | 0,79                              | 0,63                               | 0,21                              | 0,37                               |
| Verre        | 12,98                | 1,00                              | 1,00                               | $10^{-4}$                         | $10^{-4}$                          |
| Air          | $0,41 \cdot 10^{-3}$ | -                                 | -                                  | -                                 | -                                  |

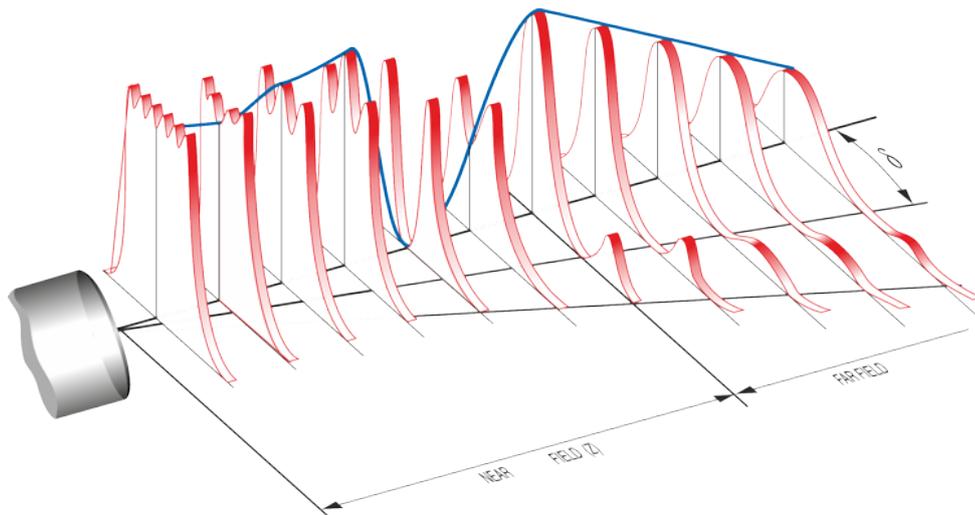
**Table 2.1 Tableau des impédances acoustiques et des coefficients interfaciaux** Le calcul des impédances acoustiques  $Z$  est basé sur l'équation 1.8 et sur les données regroupées dans l'annexe A. L'unité est  $10^6 \text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les coefficients de réflexion et de transmission sont calculés via l'équation 2.1 en considérant comme milieu 1 le milieu de la ligne actuelle et comme milieu 2 le milieu de la ligne suivante.

Ils se calculent d'une manière similaire :

$$r_{1 \rightarrow 2} = \frac{(Z_2 - Z_1)^2}{(Z_2 + Z_1)^2} \quad t_{1 \rightarrow 2} = \frac{4Z_2Z_1}{(Z_2 + Z_1)^2}$$

### 2.1.4 Atténuation des ondes acoustiques

En champ proche, les transducteurs émettent un faisceau acoustique de diamètre constant. La longueur  $L_{cp}$  sur laquelle on peut se considérer en champ proche est défini par  $L_{cp} = \frac{D_t^2}{4\lambda}$ . Dans ce système,  $f = 2\text{ MHz}$  donc  $\lambda = 750\ \mu\text{m}$  et  $D_t = 5\text{ mm}$ . Ce qui nous donne une longueur de champ proche  $L_{cp} = 8,5\text{ mm}$ . Les puces sont conçues afin d'être toujours en champ proche, et donc d'avoir une hauteur totale toujours inférieure à 8,5 mm. Le fait d'être en champ proche n'assure cependant pas une constance de la pression acoustique, car l'onde émise par le centre et celle émise par les bords du transducteur peuvent interférer et ainsi modifier l'amplitude de la pression ou de la densité d'énergie acoustique. On peut trouver en annexe A les coefficients d'atténuation des ondes acoustiques dans l'eau, le PDMS et l'huile d'olive. Il est connu qu'une atténuation de 3, 6 et 10 dB correspond à une diminution de moitié, du quart et du dixième de l'intensité acoustique respectivement. L'intensité acoustique se calculant comme  $I = \frac{p^2}{\rho c}$  avec  $p$  la pression acoustique,  $\rho$  la densité du milieu et  $c$  la célérité du milieu. Le PDMS, dont le coefficient d'atténuation vaut  $\alpha \approx 6\text{ dB/cm}$ , atténuera la pression acoustique de moitié au bout d'un centimètre. Au sein de ce système, l'épaisseur du PDMS traversé par les ondes acoustiques est de l'ordre de 2 mm, ce qui nous donne une atténuation inférieure à 25%. Cette atténuation représente le compromis pour utiliser le PDMS qui est un matériau indispensable pour ce système.

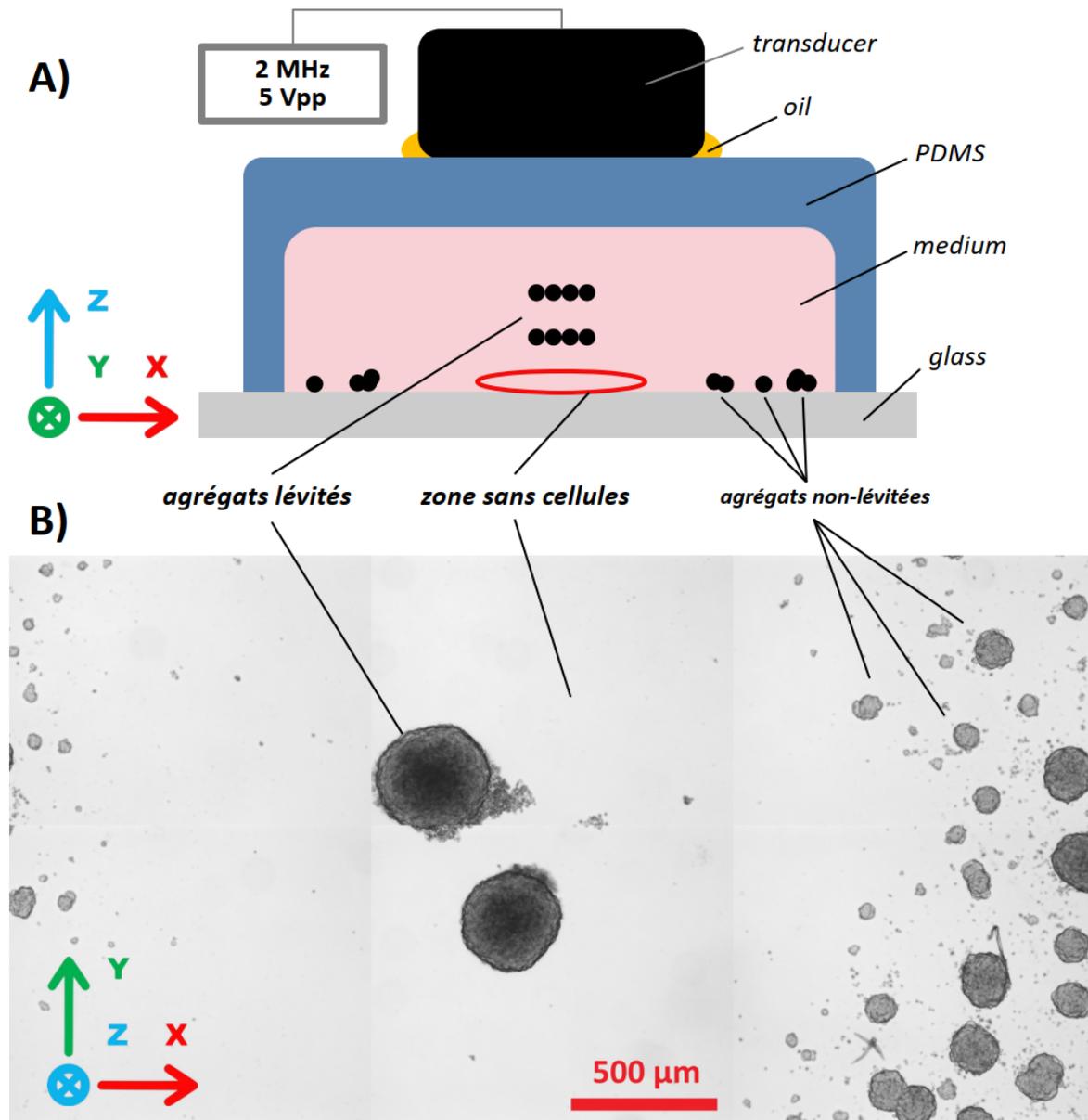


**Figure 2.4 Schéma représentant le champ proche et le champ lointain** Illustration de la distribution radiale et axiale de la densité d'énergie acoustique émise par le transducteur fourni par Signal Processing.

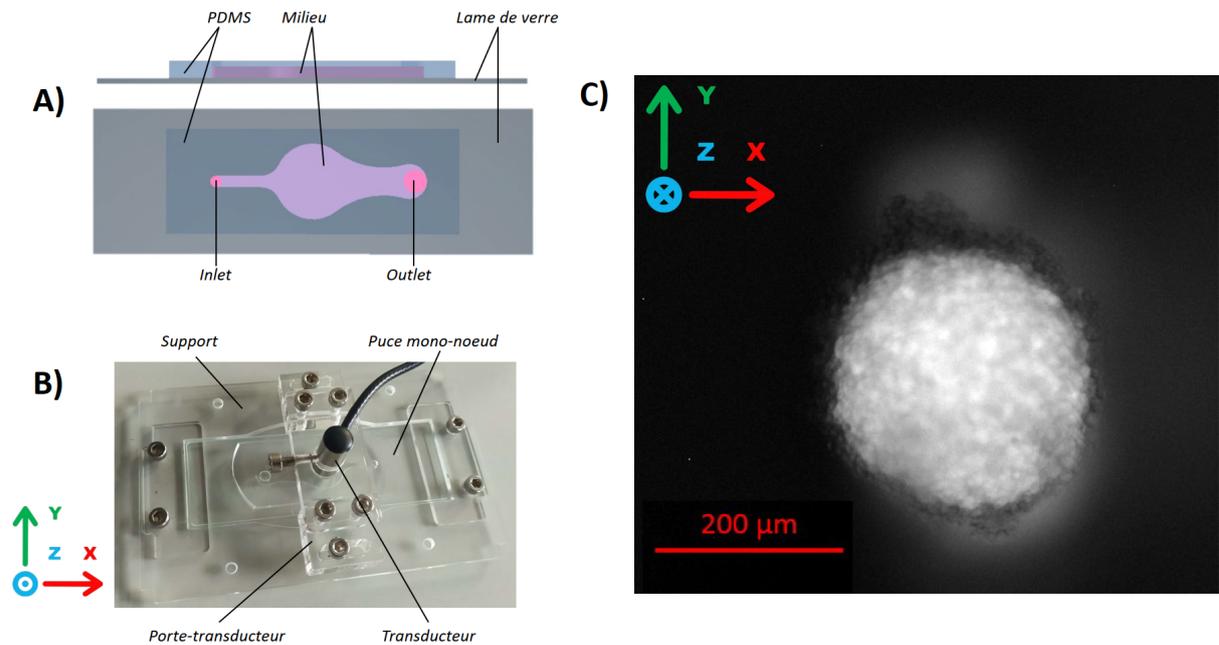
### 2.1.5 Schéma d'une culture

### 2.1.6 Interface microfluidique : la puce mono-noeud

La première puce conçue fût la puce "mono-noeud" que l'on peut voir fig. 2.6. Cette puce est longue de 35 mm et haute de 1,5 mm. Sa longueur permet de faciliter la maintenance et d'éviter que les ouvertures soient proches du transducteur et du pont qui le supporte. Sa faible hauteur permet l'agrégation des cellules sur un seul ou deux noeuds



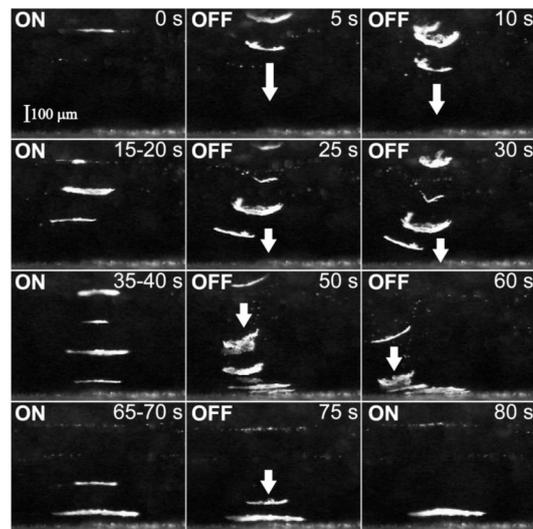
**Figure 2.5 Schéma d'une puce et image d'une culture en lévitation acoustique A)** Schéma de la puce avec les différentes couches. On peut voir des cellules en lévitation et des cellules sédimentées. **B)** Assemblage de 6 photos d'une culture de 6240 à 5 Vpp, 2 MHz et 5 jours de culture.



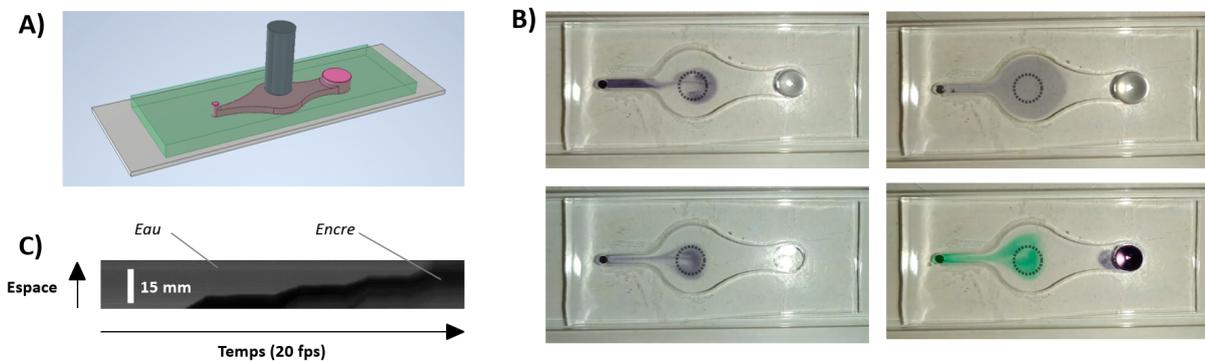
**Figure 2.6 Descriptif de la puce mono-noeud** **A)** Schéma de la puce mono-noeud avec les ouvertures en inlet et outlet prévu pour la manutention avec pipette, donc asymétrique. **B)** La puce mono-noeud en configuration de culture. L'ensemble peut être placé dans un incubateur. Le support et le porte-transducteur servent à rendre solidaires la puce et le transducteur, facilitant la manutention du système complet. Le support est prévu pour être déposé tel quel sur une platine de microscope afin d'imager les cellules directement en lévitation. **C)** Image au microscope de cellules en lévitation exprimant la GFP (lignée de GB 5706) après 2,5 jours de culture à 5 Vpp 2 MHz. On peut voir que la "corolle cellulaire" n'exprime plus la GFP.

maximum tout en conservant un volume suffisant pour l'apport de nutriments.

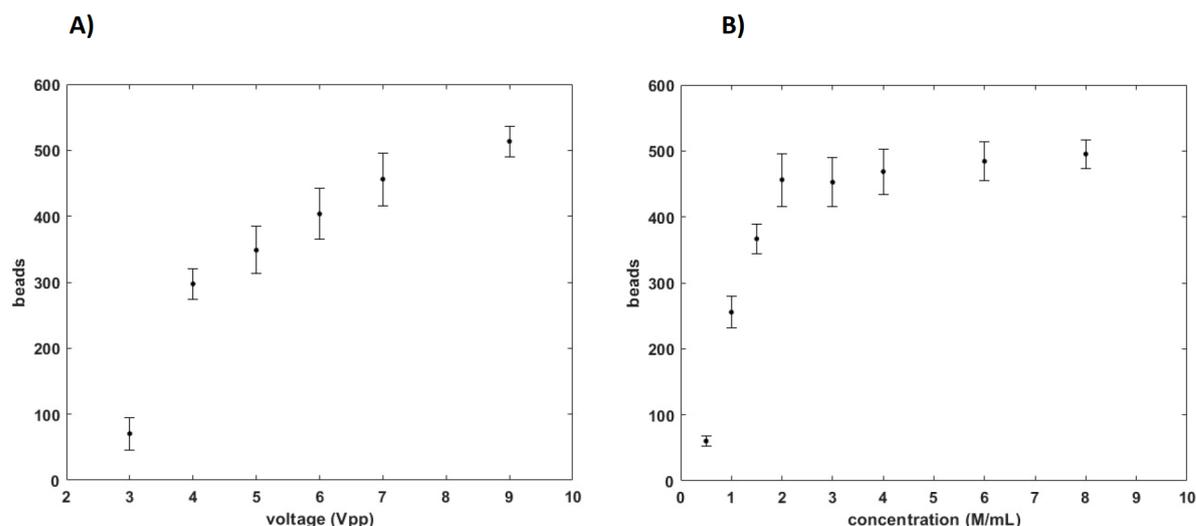
Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, une hauteur de 1,5 mm pour une fréquence globale des ultrasons de 2 MHz correspond en fait à la présence de  $n = 4$  noeuds de pression et non pas un ou deux :  $n = \frac{2h}{\lambda} = 4$  avec  $\lambda \approx 750 \mu m$ . Nous avons observé que les noeuds les plus proches du "plafond" de PDMS agrègent très peu de particules ou de cellules. On ne connaît pas encore pourquoi les noeuds supérieurs agrègent peu ou pas de particule. On suppose que cette faible d'agrégation peut provenir à la fois de la gravité et à la fois de l'interface PDMS/eau qui pourrait affecter localement le champ acoustique proche de cette interface. Si une agrégation indésirable est observée sur les noeuds supérieurs, il est tout à fait possible de s'en affranchir en faisant tomber les particules piégées. Comme illustré sur la figure 2.7, en coupant les US les particules agrégées tombent et, lorsque l'on rallume les US, elles se retrouvent toutes piégées dans le noeud inférieur. Cette technique peut être utilisée afin de réduire le nombre de noeuds, mais est difficilement contrôlable ou reproductible en dehors de la réduction à un seul noeud.



**Figure 2.7 Concentration de particules au noeud inférieur** Lévitiation acoustique de particules fluorescentes de  $4,5 \mu\text{m}$ . En activant par intermittence les US il est possible de piéger toutes les particules dans le noeud le plus bas où elles pourront être analysées par microscopie. Issu de Wiklund et al. 2004 [Wiklund et al., 2004]



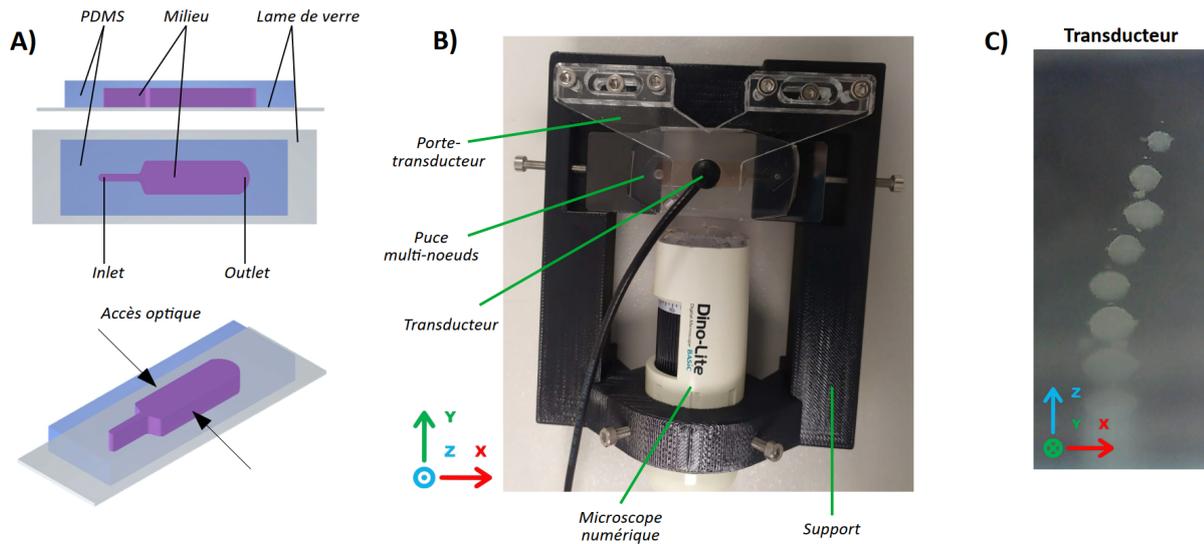
**Figure 2.8 Description de l'injection dans la puce mono-noeud** A) Schéma de la puce mono-noeud avec le transducteur positionné. B) Photos d'injection d'encre dans la puce mono-noeud. Dans l'ordre de lecture : photo après injection de  $50 \mu\text{l}$  d'encre, photo après injection de  $50 \mu\text{L}$  d'encre et plusieurs aller-retours afin d'homogénéiser, photo après injection de  $50 \mu\text{L}$  d'encre suivi d'un prélèvement de  $50 \mu\text{L}$ , photo après injection en outlet de  $50 \mu\text{L}$  d'encre suivi de plusieurs aller-retours depuis l'outlet. Le cercle pointillé correspond à la position du transducteur de  $5 \text{ mm}$  de diamètre. C) Reslice de vidéo d'injection pour déterminer la vitesse d'injection par pipette à l'intérieur de la puce lors d'une injection douce. La pente de cette image donne directement la vitesse du fluide dans la puce. L'injection d'encre a été faite en 4 fois, d'où la présence de 4 pentes visibles.



**Figure 2.9 Nombres de particules agrégées** Les injections sont de 50  $\mu\text{L}$  **A)** Nombre de particules agrégées au noeud de pression en fonction du voltage à concentration fixée (2 M cellules/mL). **B)** Nombre de particules agrégées au noeud de pression en fonction de la concentration à voltage fixé (7 Vpp). (Arthur Dervillez, stage M2, 2022).

### 2.1.7 Injection des cellules

Maintenant que l'on sait qu'un agrégat unique peut être obtenu à l'intérieur de la puce, il reste à injecter les particules ou les cellules. On rappelle que pour une manutention à la pipette, des ouvertures asymétriques (inlet/outlet) ont été faites comme illustré sur la figure 2.6. Cette asymétrie de la puce acoustofluidique permet, lors d'une injection de 50  $\mu\text{L}$ , de cibler le centre de la chambre sous le transducteur (visible Fig. 2.8). Après quelques va-et-vient (pipetage) la suspension d'origine est bien homogénéisée au sein de la puce. Les particules ainsi injectées restent dans la zone d'intérêt et ne rejoignent pas l'outlet (compromis entre volume injecté et dynamique des flux dans la puce). D'autre part, une injection par l'outlet, n'atteindra pas la zone d'intérêt (transducteur) dans la chambre de lévitation. Cette dissymétrie permet une manipulation aisée à la pipette. Afin d'avoir des sphéroïdes de taille reproductibles, il faut garder constants, le volume injecté, la concentration de particules et le voltage appliqué au transducteur. Comme on peut le voir sur la figure 2.9, le nombre de particules capturées et agrégées atteint un plateau après 2 M cellules/mL. Pour les expériences biologiques, nous avons choisi un volume de 50  $\mu\text{L}$ , une concentration de 2 millions (M) de cellules/mL et un voltage de 7 Vpp pour toutes les expériences. Cela correspond à une injection de 100 000 cellules dans la puce. Pour le voltage, il est possible d'aller au-delà de 7 pp afin d'agréger plus de cellules, mais cela implique l'utilisation d'une plus grande force acoustique. 12 Vpp étant le maximum que l'on peut délivrer avec ce système (générateur/transducteur) sans amplifier le signal.



**Figure 2.10** Système de culture pour la puce multi-nœuds **A)** Modèle de la puce multi-nœuds. **B)** Photo du système complet. Le support général permet de positionner et maintenir en place la caméra, la puce acoustofluidique et le transducteur (via le porte-transducteur) grâce aux vis intégrées. Ce système permet une navigation facile et sûre entre l'incubateur et le PSM sans modification des réglages optiques et/ou acoustiques ni de la position de la puce. **C)** Image de la caméra d'une culture de 6240 à 5 Vpp, 2 MHz et après 3 jours de culture. Il est également possible de voir les sphéroïdes à l'oeil nu comme indiqué.

### 2.1.8 Interface microfluidique : Puce multi-nœuds

La puce mono-nœud permet une visualisation aisée de la formation du premier plan de lévitation et de l'agrégation cellulaire à l'aide de techniques de microscopie inversée. Elle est également compatible pour une utilisation dans un incubateur de platine de microscope. Elle ne permet cependant pas une observation latérale des agrégats cellulaires d'une part, et d'autre part, ne permet d'obtenir qu'un seul sphéroïde (voire deux) pour des analyses ultérieures. Afin d'avoir un suivi temporel de la forme des sphéroïdes, nous avons fait évoluer ce système afin qu'il accueille une caméra qui permettrait de visualiser les sphéroïdes en vue latérale. Nous avons ainsi augmenté la hauteur de la puce, ce qui permet d'augmenter le nombre de nœuds ainsi que la conception de bords plats et lisses pour minimiser les aberrations optiques et obtenir un bon accès optique comme représenté figure 2.10. Comme vu dans le chapitre 1, l'augmentation de la hauteur implique un plus grand nombre de nœuds de pression, et donc un plus grand nombre de sphéroïdes. Cette seconde puce nous permettra donc de générer plusieurs sphéroïdes, de suivre en direct leur taille et forme et de nous assurer de la bonne tenue de la lévitation acoustique.

Le volume de cette nouvelle puce est d'environ 1 mL (dimensions :  $40 \times 8 \times 5$  mm), ce qui reste pratique pour une manipulation des fluides avec une pipette. Comme illustré sur la figure 2.10, les sphéroïdes formés sont de taille inégale le long de l'axe de lévitation, présentant plus de cellules dans les nœuds du bas que dans ceux du haut à cause de la présence de la gravité.

Cette puce s'accompagne d'un microscope numérique afin de pouvoir suivre en temps réel l'évolution des sphéroïdes en culture dans l'incubateur. Ce microscope est maintenu à l'aide d'un support général réalisé en impression 3D visible sur la figure 2.10. Ce support permet de conserver l'alignement du microscope avec la puce acoustofluidique ainsi que l'alignement de la puce et du transducteur via un portoir fixé sur le support et réalisé en plexiglas. Ce système peut être manipulé facilement. Il permet de déplacer le dispositif entre un PSM et un incubateur sans risque de modifier les réglages optiques ni de perdre les sphéroïdes en lévitation tant que l'utilisateur ne réalise pas de geste trop brusque. La facilité de manutention et la capacité à ne pas modifier les réglages optiques lors de son déplacement permettent à ce système une rapidité de mise en place au sein d'un incubateur. Cette rapidité est nécessaire afin d'éviter de faire chuter trop fortement la température au sein de l'incubateur et d'altérer les cultures qui y sont présentes.

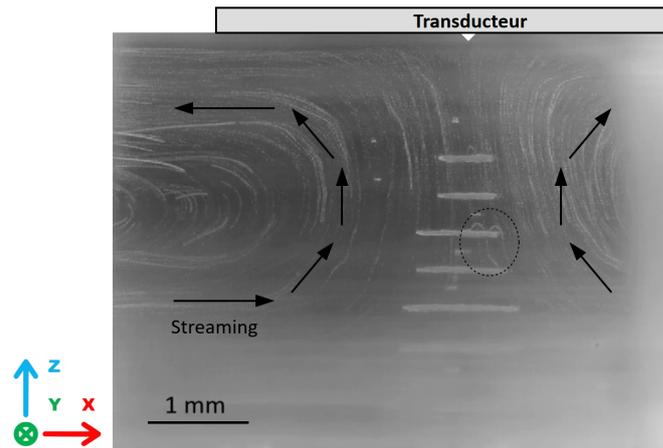
Cette puce multi-noeuds offre de nouvelles possibilités avec son accès optique latéral, notamment dans la visualisation du streaming, des vitesses d'agrégation des cellules et de la formation des sphéroïdes. Le nombre de sphéroïdes générés offrant également une flexibilité sur les analyses.

### 2.1.9 Description du streaming acoustique

Il existe au sein des puces un flux créé par la présence de l'onde acoustique appelé streaming qui a été décrit dans le chapitre 1. Le streaming est présent dans les deux types de puces, mais plus facile à observer via un accès optique latéral comme illustré figure 2.11.

Cette figure montre une projection des maxima d'intensité au cours d'une courte vidéo filmant le streaming acoustique dans une puce multi-noeuds contenant des cellules issues de la lignée de GB R633 à 5 Vpp. Le streaming observé se situe tout autour de la zone d'agrégation, mais ne vient pas perturber les agrégats. Nous n'observons aucun mouvement de la part des agrégats ou sphéroïdes tout au long des cultures, et ce, indépendamment de la puissance acoustique envoyée et donc de la vitesse du streaming. La majorité des trajectoires visibles au niveau des agrégats sont en fait des cellules qui se situent devant ou derrière ces agrégats. Le fait que sur cette image, les agrégats soit bien linéaire et non flou montrent qu'ils ne bougent pas malgré le streaming. Le suivi en temps réel, en vue latérale, nous permet également d'attester que les agrégats n'ont aucun mouvement dû au streaming lors de la culture.

Les trajectoires visibles sur cette figure sont les trajectoires des cellules qui sont encore dans le milieu et qui n'ont pas encore été attrapées par le piège acoustique, ou n'ont pas encore sédimenté. Parmi ces trajectoires, on peut en voir quelques-unes se faire piéger par l'acoustique au niveau des agrégats. Il existe, en fait, une compétition entre leur inertie provenant du streaming et la force de radiation acoustique qui les piégera hors de la zone de streaming. A terme, plus aucune cellule ne restera dans le milieu. Elles seront toutes, soit parmi les agrégats, soit sédimentées sur la lame de verre hors de la zone du transducteur. La comparaison entre le streaming et la force de radiation acoustique est variable selon la

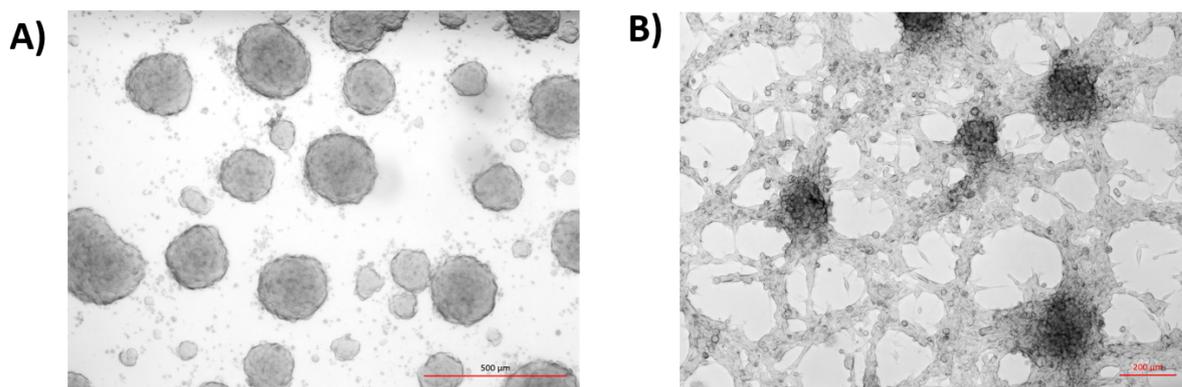


**Figure 2.11 Visualisation du streaming au sein d'une puce multi-noeuds** L'image est une projection en temps des maxima d'intensité d'une vidéo au lancement d'une culture de R633 à 5V. On peut voir les agrégats en nappe, signe que la culture n'en est qu'au début. Le streaming est similaire pour toutes les cultures et ne dépend pas des particules, mais des paramètres acoustiques et des dimensions de la puce. Le sens du streaming est représenté par les flèches noires. Le marqueur blanc représente la moitié du transducteur, car celui-ci dépasse de l'image. La zone en pointillé montre des cellules initialement prises dans le streaming qui sont agrégées.

taille des particules. A énergie acoustique fixe, des particules de faible diamètre auront une ARF plus faible que des particules avec un diamètre plus élevé dû à la dépendance linéaire avec le volume de la particule dans l'équation 1.18. Ainsi, les particules à faible diamètre seront plus facilement entraînées par le streaming et une compétitivité entre streaming et ARF pourra être observé. En effet, des particules suffisamment petites ne pourront pas être agrégées, car la force de Stokes générée par le streaming est plus importante que l'ARF. C'est ce que l'on a pu observer lorsque nous avons essayé de réaliser une culture de cellules à une fréquence d'1 MHz. En baissant la fréquence acoustique utilisée, le nombre d'onde  $k = \frac{2\pi f}{c}$  est réduit, ce qui diminue également l'ARF. Les cellules ne s'agrègent plus aussi bien et se font emporter par le streaming. Le streaming, bien que pratique pour l'homogénéisation du milieu, reste toutefois une piste à surveiller par rapport aux contraintes de cisaillement qu'il induit aux cellules et sphéroïdes.

La présence d'un streaming n'impactant pas le piégeage des sphéroïdes, on peut inférer qu'il permet l'homogénéisation du milieu de culture au sein de la puce et évite la formation de gradients de nutriments dans le dispositif, ce qui peut être considéré comme un avantage dans ce contexte.

## 2.2 Viabilité des cellules maintenues en lévitation



**Figure 2.12 Images culture de cellules dans une puce mono-noeud sans acoustique**  
**A)** cellules 6240 cultivées sur lame de verre après 6 jours de culture **B)** cellules R633 cultivées sur lame de verre après 3 jours de culture

### 2.2.1 Description des lignées cellulaires

Les cellules R633 et 6240 ont été isolées à partir d'échantillons de biopsies neurochirurgicales de GB humains [El-Habr et al., 2017]. De façon intéressante, on observe des comportements très distincts entre ces deux lignées cellulaires lorsqu'elles sont cultivées sur lame de verre ou dans des flasques comme montré sur la figure 2.12. Si ces deux lignées forment spontanément des agrégats tridimensionnels sur les supports de culture 2D, les modalités d'agrégation sont toutefois différentes. En effet, les cellules 6240 adhèrent peu au support de culture et forment spontanément des agrégats tridimensionnels alors que les cellules R633 adhèrent fortement au support de culture, forment des chemins de migration et forment tardivement des agrégats 3D mal résolus. La raison de cette différence de comportement n'étant pas identifiée, il pourrait s'agir, par exemple, de différences de forces d'adhésion intercellulaires et/ou de préférence pour un substrat dur d'une lignée par rapport à l'autre. Nous avons donc choisi, dans un premier temps, de comparer les comportements en lévitation de ces deux lignées, en étudiant leur viabilité puis la cinétique d'auto-organisation.

### 2.2.2 Test au bleu Trypan

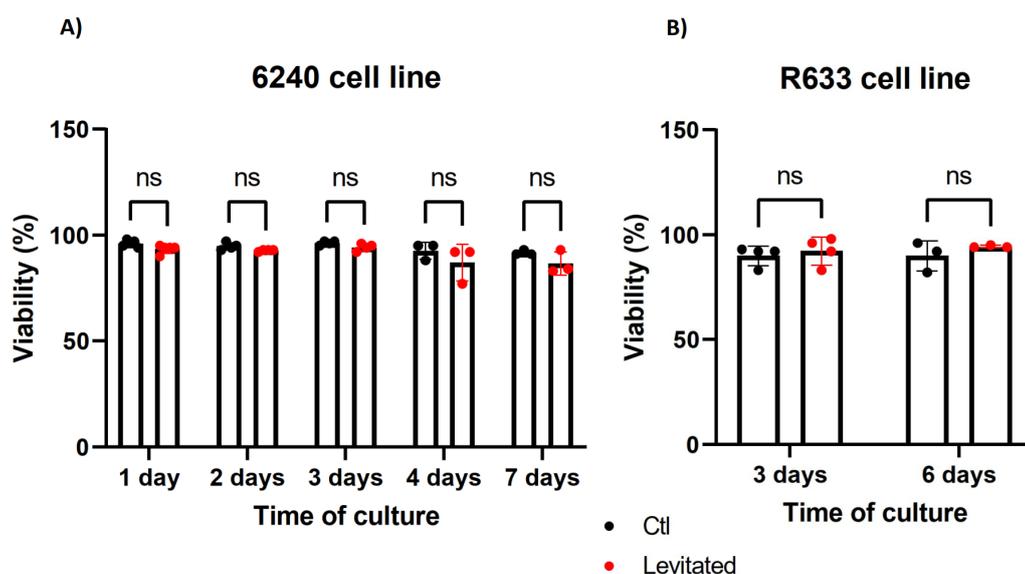
Le premier objectif que nous nous sommes fixé fut de quantifier la survie des cellules pendant plusieurs jours de culture en lévitation acoustique. De multiples applications des ondes acoustiques en biologie, notamment décrites dans le chapitre 1, montrent que les ultrasons impactent certains paramètres cellulaires. En effet, en fonction des puissances et longueurs d'onde utilisées, des phénomènes de mortalités peuvent être observés, voire recherchés (généralement à fortes puissances), mais aussi des phénomènes de neuro-modulation et d'engagement des mécano-récepteurs cellulaires (généralement à faibles puissances). Dans notre cas, la gamme d'amplitude de la force de radiation acoustique est utilisée dans les mêmes ordres de grandeur que pour les applications de tri-cellulaire [Bel-

lebon et al., 2022], de neuro-modulation ou de structuration de sphéroïdes [Vanherberghen et al., 2010b]. Si cela laissait espérer une certaine innocuité de cette méthode, la littérature ne présente pas de donnée sur l'impact à long terme (plusieurs jours) des ondes acoustiques sur la survie cellulaire.

Les puces acoustofluidiques ayant été conçues de manière à optimiser certains paramètres importants inhérents aux problématiques de culture cellulaire (pH, température, oxygénation, renouvellement des milieux), nous avons donc comparé les viabilités des sphéroïdes structurés en lévitation puis cultivés avec ou sans acoustique au long cours. Les cellules, contrôles comme sphéroïdes, proviennent toutes du bioréacteur acoustofluidique. L'origine des cellules de l'agrégat est claire, les cellules contrôles, quant à elles, sont les cellules qui se sont déposées au fond de la puce acoustofluidique comme indiqué figure 2.5. Elles sont soit en dehors du champ acoustique, soit en bordure de celui-ci, car le champ est trop faible en cet endroit pour avoir réussi à agréger ces cellules.

Dans un premier temps, nous avons effectué des tests de survie au bleu trypan. C'est un test classique en biologie cellulaire qui permet de marquer les cellules mortes et donc de déterminer la viabilité globale d'une culture. Pour ce faire, les sphéroïdes ont été formés dans une puce mono-noeud à 5V puis placés dans un incubateur plusieurs jours sans renouvellement de milieu. Afin d'être testés, les sphéroïdes sont récupérés directement au sein des puces après le temps de culture défini puis dissociés mécaniquement avec de l'acutase, un agent enzymatique de dissociation cellulaire. Du bleu trypan est ajouté aux cellules dissociées puis elles sont comptées de façon automatique. Comme le montre la figure 2.13, une viabilité de plus de 85% a été trouvée dans chaque condition. On ne remarque aucune différence significative entre les cellules provenant de l'agrégat et les cellules contrôle déposées au fond de la puce. Même si une légère baisse de viabilité est observée pour les 6240 à 4 et 7 jours, ces viabilités restent au-dessus de 85%. Nous pouvons interpréter ces résultats comme une baisse des nutriments présents à l'intérieur du milieu de culture entraînant une baisse de viabilité.

Ces fortes viabilités suggèrent une absence de forte mortalité (cœur nécrotique) à l'intérieur des sphéroïdes et objectivent que des cultures de sphéroïdes de GB peuvent être maintenues pendant plusieurs jours en lévitation sans que les ondes acoustiques (5 Vpp, 2 MHz) n'enclenchent de phénomènes dégénératifs. Les tailles des sphéroïdes que nous avons analysés variaient de 300 à 400  $\mu\text{m}$ . Certains sphéroïdes issus de neurones primaires plus gros ont pu être analysés et montraient un taux de mortalité supérieur. Ces observations suggèrent que dans ce dispositif, le paramètre critique de survie est corrélé au diamètre final des sphéroïdes structurés. Ces observations concordent avec les données de la littérature qui suggèrent l'apparition d'un cœur nécrotique dans les sphéroïdes de diamètres supérieurs à 500  $\mu\text{m}$  [Nath and Devi, 2016] objectivant un problème de diffusion au cœur des sphéroïdes cellulaires.

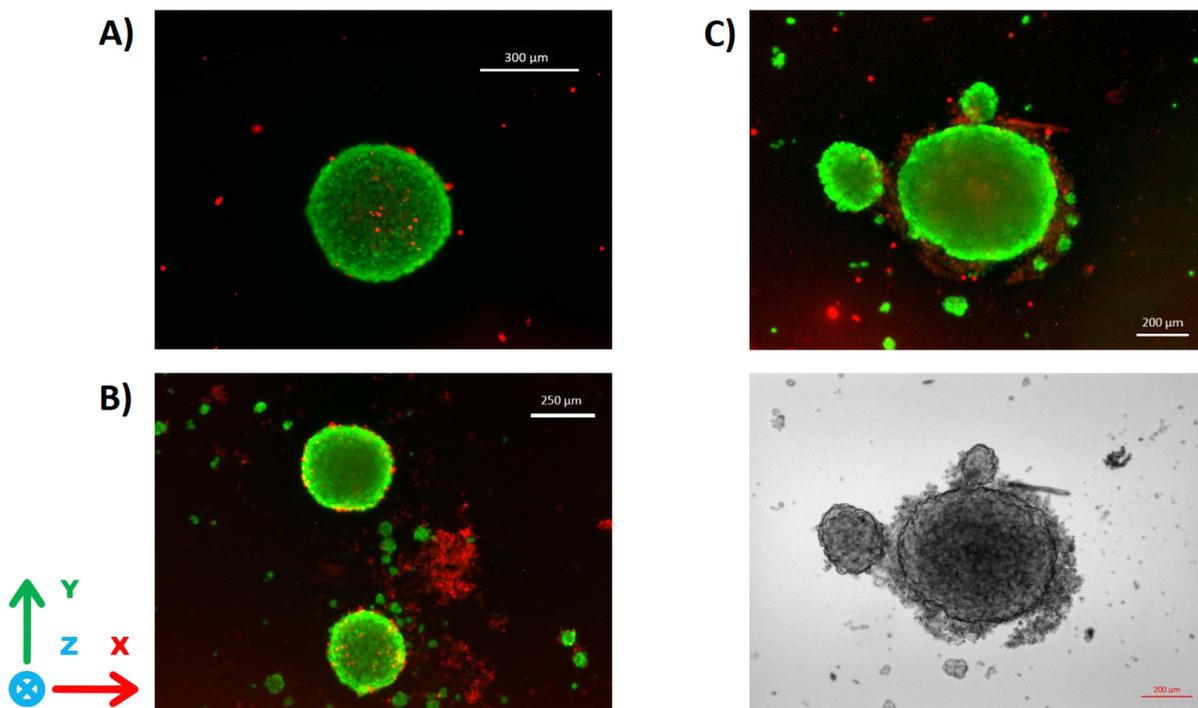


**Figure 2.13 Mesures de viabilité par test d'exclusion au bleu Trypan** Des mesures à  $N \geq 3$  ont été effectuées sur deux lignées cellulaires, les 6240 en **A)** et les R633 en **B)** à 5 Vpp dans des puces mono-noeud et différents temps de culture. Aucune différence significative fut observée entre les cellules contrôles et les cellules lévitées comme décrit sur la figure 2.5 et une viabilité comprise entre 85% et 95% a été mesurée dans chacun des cas. Les mesures ont été réalisées dans différentes puces mono-noeud à différents passages.

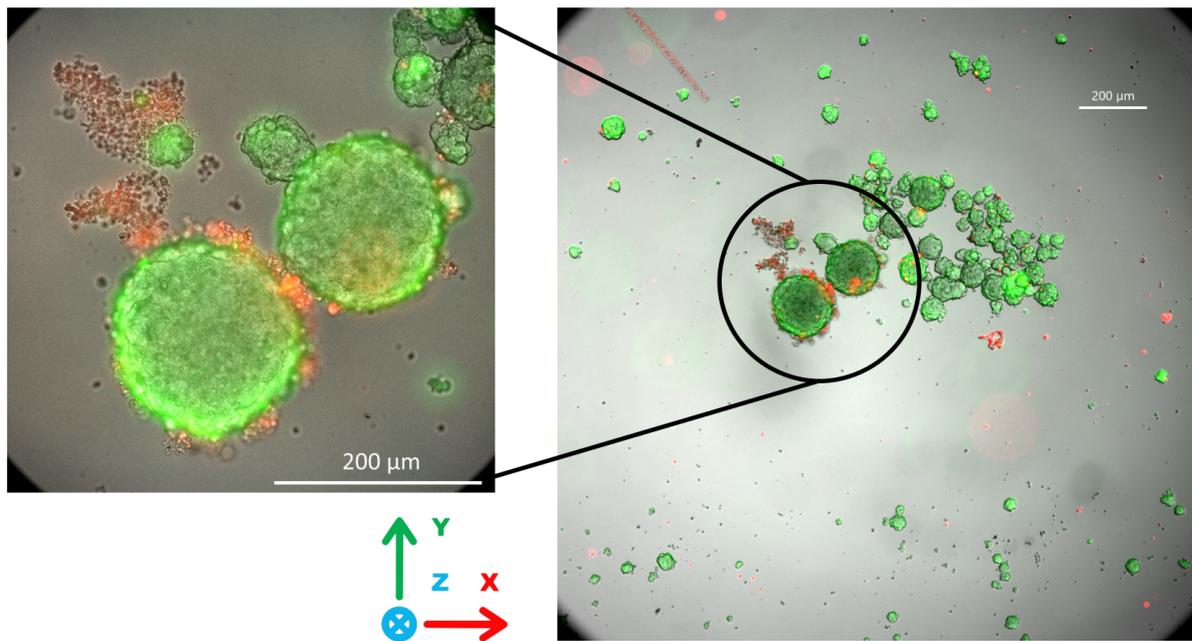
### 2.2.3 Marquage Live/Dead

La mesure de viabilité au bleu Trypan s'effectue hors de la puce de culture et après dissociation mécanique des sphéroïdes. Cela peut cependant avoir le défaut de biaiser les résultats en surestimant les cellules vivantes, les mortes étant perdues pendant la dissociation. Afin de conforter nos observations, nous avons donc vérifié les paramètres de viabilité cellulaire à l'aide du marquage "Live/Dead" qui permet de marquer en vert les cellules vivantes (sonde fluorescente verte mesurant l'activité estérase intracellulaire) ou mortes (sonde fluorescente rouge intercalent de l'ADN et ne rentrant que dans les cellules mortes dont la membrane plasmique est endommagée). La figure 2.14 montre des images de marquages de GB après 3 jours de culture en lévitation. On observe des sphéroïdes principalement vivants avec des cellules marquées en vert ainsi que quelques cellules mortes marquées en rouge. Ces cellules mortes sont situées essentiellement en périphéries des sphéroïdes (corolle de cellules). On remarque cependant, parfois, la présence de fluorescence rouge au niveau du coeur des sphéroïdes, cela pourrait suggérer que les cellules mortes se trouvent au centre, ce qui recouperait avec la zone de nécrose décrite dans le chapitre 1.

Par ailleurs, ces marquages LIVE/DEAD permettent de visualiser le phénomène de la corolle cellulaire qui lévite dans le plan équatorial des sphéroïdes. Dans la figure 2.14, en **C)** on peut observer un sphéroïde de GB entouré d'une corolle de cellules en périphérie. De la même manière, dans la figure 2.15, on peut voir le marquage Live/Dead du même



**Figure 2.14 Marquage Live/Dead de sphéroïdes lévités** Marquage Live/Dead de trois cultures **A)**, **B)** et **C)** issu de 3 expériences distinctes à 5 V et après 3 jours de culture dans une puce mono-noeud réalisé avec la lignée cellulaire 6240. On peut voir un agrégat principalement vert, ce qui indique des cellules vivantes avec quelques marquages rouges indiquant des cellules mortes. En **C)** on peut voir le marquage Live/Dead (en haut) accompagné de l'image en brightfield (en bas). On retrouve cette corolle cellulaire qui se trouve être marquée en rouge avec quelques mini-agrégats verts à l'intérieur. La corolle est donc principalement composée de cellules mortes ainsi que de quelques cellules vivantes s'y développant en sphéroïdes de tailles réduites.



**Figure 2.15** Marquage Live/Dead de l'agrégat suivi en live figure 2.17 On peut voir la corolle de cellules mortes marquée en rouge correspondant à des cellules mortes ainsi que le petit agrégat dans cette corolle en vert et donc bien vivant. Cet agrégat est visible également dans les images live. Ces 2 images ne correspondent pas à l'état de la puce à la fin de la lévitation, car le marquage, même si fait directement dans la puce, a créé des flux et modifié la position des sphéroïdes. De plus, des cellules dites contrôles ont été volontairement placées à côté des deux sphéroïdes afin de pouvoir observer leur taille qui est bien plus petite et leur viabilité qui est identique à celles des sphéroïdes.

agrégat que celui illustré figure 2.17. On retrouve la même disposition de marquage avec un agrégat bien vivant comprenant quelques cellules mortes et une corolle cellulaire composée principalement de cellules mortes qui, comme précisé précédemment, se sont agrégées dès la mise en place du piège acoustique.

### Corolle cellulaire

Tant en vue inversée que latérale, la présence d'une corolle de cellules a pu être objectivée à plusieurs reprises. Comme décrit précédemment avec le Live/Dead, les expériences d'évaluation de la viabilité cellulaire nous suggèrent qu'il s'agit de cellules mortes. Cependant, on note qu'une corolle cellulaire est rarement observée sur les sphéroïdes de cellules R633 comparé aux sphéroïdes 6240 2.17. Comme expliqué par Olofsson [Olofsson et al., 2020], le signe du contraste acoustique  $\Phi$  des cellules mortes et vivantes étant identique dans un milieu de culture normal, les débris cellulaires lèvitent sur le même plan que les sphéroïdes et s'organisent donc en anneaux autour de ceux-ci. De façon intéressante, Olofsson et al. ont réussi à modifier le signe du contraste acoustique des cellules vivantes en augmentant la densité du milieu. Ils obtiennent ainsi une agrégation des cellules vivantes aux ventres de pression tandis que les cellules mortes continuent de s'agréger aux

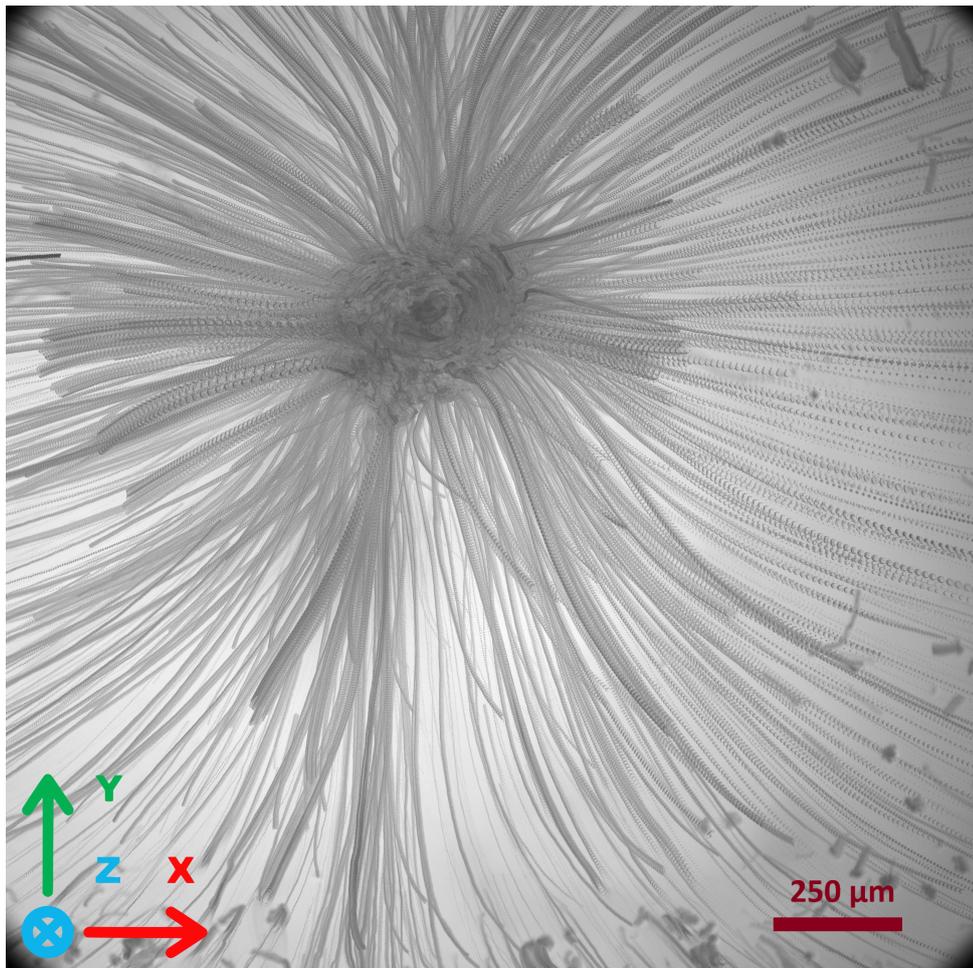
noeuds. Dans notre cas, la présence d'une corolle suggère que des cellules mortes ont été introduites à l'ensemencement, ou qu'un certain nombre de cellules dégénèrent pendant le processus de croissance des sphéroïdes. Dans le premier cas, la technique d'Olofsson et al. pourrait nous permettre éventuellement d'effectuer un tri en amont de l'injection et d'éliminer les cellules mortes de la suspension initiale, mais présenterait l'inconvénient de modifier la densité du milieu de culture et d'obérer la croissance des sphéroïdes.

## 2.3 Formation et croissance de sphéroïdes de GB en lévitation

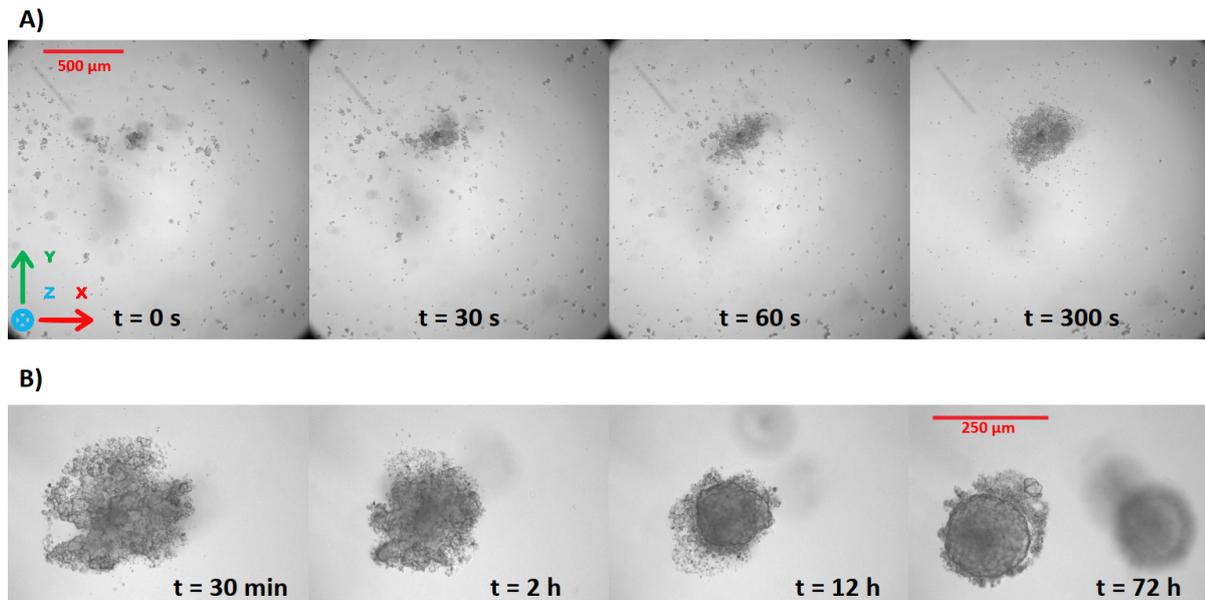
### 2.3.1 Dynamique de formation des sphéroïdes

Nous avons implémenté un suivi en temps réel des sphéroïdes afin de pouvoir suivre leur formation durant la culture. Tout d'abord, les paramètres d'agrégation (voltage, concentration et volume injecté) sont similaires, quelle que soit la puce utilisée (mono ou multi-noeuds). Cette agrégation se déroule séquentiellement : quelques secondes après l'injection, sous l'action de l'ARF axiale, les cellules sont ségréguées vers les noeuds de pressions sous forme de plan de lévitation (échelle de temps  $\approx 1 s$ ) puis, sous l'action de l'ARF transversale, vers le centre (échelle de temps  $\approx 30 s$ ) comme illustré figure 2.16. L'agrégat cellulaire est donc formé très rapidement (en quelques minutes), mais on peut observer des cellules qui continuent de rejoindre cet agrégat pendant une dizaine de minutes. Ces cellules sont en réalité piégées dans le flux généré par le streaming. Au fur et à mesure, de moins en moins de cellules restent piégées par le streaming, elles auront soit sédimenté, soit été agrégées. Cette étape de formation d'un agrégat plan centrée dans le système est identique à l'agrégation de particules de polystyrène. L'analyse par microscopie inversée montre que cellules et particules s'organisent selon un schéma hexagonal aux plans de lévitation, ce qui minimise l'espace ainsi occupé. Par la suite, à l'instar des cellules souches mésenchymateuses [Jeger-Madiot et al., 2021] et contrairement aux billes qui, elles, resteront dans cette configuration d'agrégat plan indéfiniment, les cellules de GB vont progressivement former un assemblage multicellulaire qui adoptera une forme sphérique au bout de plusieurs heures de culture ( $\approx 12 h$ ) comme en attestent les expériences de visualisation en vue latérale dans les puces multi-noeuds.

L'ensemencement de puces mono-noeud permet l'observation de l'auto-organisation des plans cellulaires vue de dessous. On peut voir sur la figure 2.17 le suivi live d'une culture de cellules 6240 dans une puce mono-noeud avec une image prise au microscope à différentes étapes clefs de la formation du sphéroïde. On voit notamment qu'au début de l'acquisition (0 s) les cellules sont déjà dans le plan du noeud de pression, mais n'ont pas encore atteint la zone centrale, objectivant la forte différence d'amplitude entre les forces acoustiques axiales et transversales. Entre 0 et 300 secondes, on peut observer la formation de l'agrégat plan ainsi que l'absence de cellules autour de cet agrégat, signe de l'efficacité du piège acoustique ne laissant pas de cellule se déposer au fond de la chambre



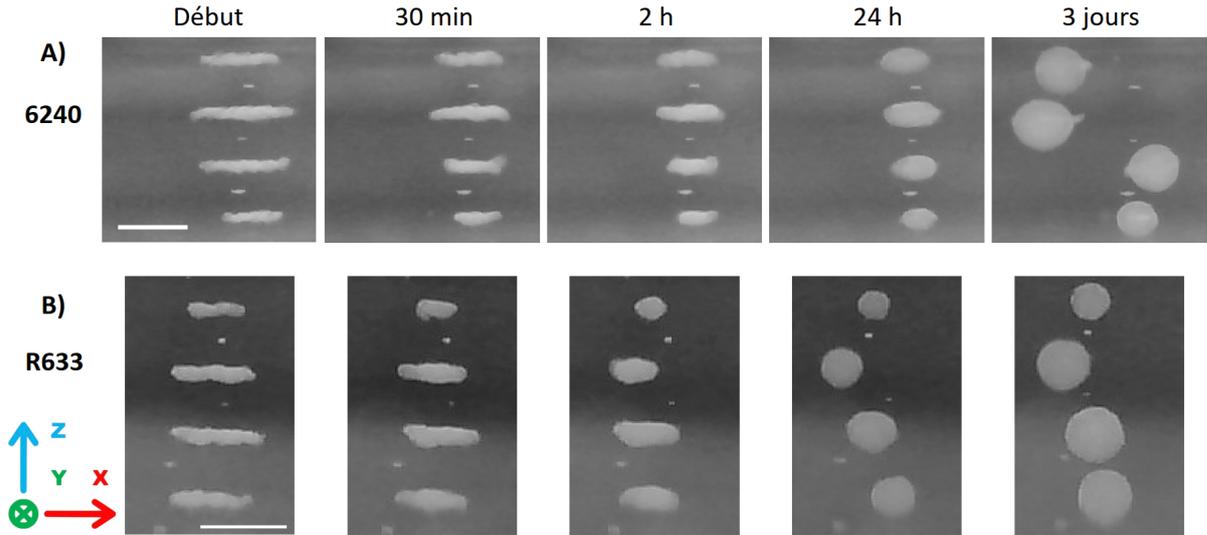
**Figure 2.16** Projection temporelle de la formation d'un agrégat de cellules Projection temporelle des minima d'intensité lors de la formation de l'agrégat de cellules. Cette image est issue de la même culture que celle montrée dans la figure 2.17. On peut voir que les cellules viennent s'agréger dans l'agrégat à partir de toutes les directions.



**Figure 2.17 Images de culture de cellules en live dans une puce mono-noeud**  
Exemple d'une culture live de 3 jours. On voit les différentes étapes de formation du sphéroïde, de l'agrégation des cellules en A) qui se fait en quelques minutes à la formation du sphéroïde en B) qui prend quelques heures. On estime qu'à partir de 45 min l'agrégation est terminée, car il n'y a presque plus de cellules qui atteignent l'agrégat. Elles ont soit sédimenté, soit se sont agrégées. C'est aux alentours de 12h que l'on considère que le sphéroïde est formé. On peut voir sur ces images la présence de la corolle cellulaire autour de l'agrégat.

sur la lame de verre. Cette étape est également représentée sur la figure 2.16 par une superposition temporelle des minima d'intensité permettant de visualiser les trajectoires cellulaires dans le plan de lévitation. On peut observer sur cette figure que les cellules s'agrègent jusqu'au centre du noeud de pression à partir de toutes les directions. Entre 30 min et 12 h, on observe le passage d'un plan de cellules à un sphéroïde. Entre 12 et 72 h, la taille du sphéroïde semble progressivement augmenter, suggérant une possible prolifération des GB dans ce dispositif. Sur la figure 2.17, un second sphéroïde peut être observé sur la dernière image (72 h). Il s'agit d'un sphéroïde lévitant dans le second noeud de pression, en arrière-plan (donc flou).

L'observation de la dynamique de réorganisation des agrégats de GB en vue latérale (puce multi-noeuds) permet de visualiser la forme de colonnes de sphéroïdes et donc d'appréhender la reproductibilité temporelle de la transition plan/sphéroïde. La régulation en température et en CO<sub>2</sub> est effectuée par l'incubateur dans lequel on va placer tout le système. Grâce à ce système, il est possible de suivre plusieurs agrégats en parallèle au sein d'une même puce comme illustré figure 2.18. On peut y voir les différentes étapes du passage de plan à sphère et la croissance de l'agrégat. On remarque également la présence d'objets aux anti-noeuds de pression. Ces objets n'évoluent pas au cours du temps et ne sont donc pas des cellules. Nous estimons qu'il s'agit de poussière ou des débris qui se sont déposés au sein de la puce lors des différentes étapes de fabrication et d'utilisation



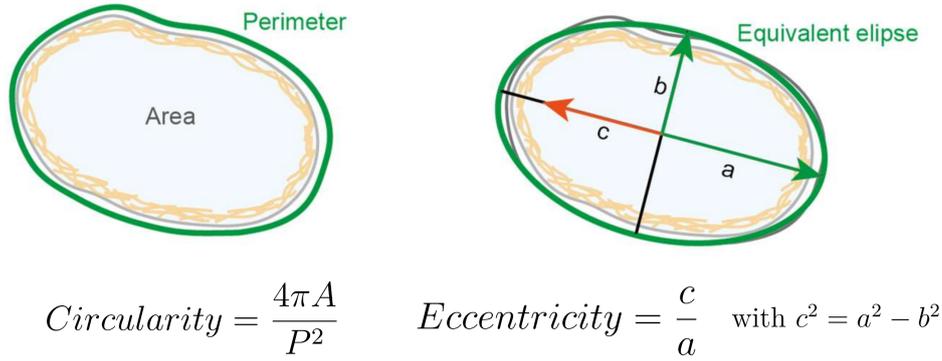
**Figure 2.18** Images en vue latérale de cultures de sphéroïdes dans une puce multi-noeuds **A)** culture live de 3 jours de cellules 6240, **B)** culture live de 3 jours de cellules R633. On observe les différentes étapes de formation du sphéroïde jusqu'à 12h puis la croissance du sphéroïde avec le changement de sa taille entre 12h et 3 jours. On observe un comportement global identique des deux lignées cellulaires, mais une différence de forme et de rapidité d'agrégation. Les R633 forment un sphéroïde plus rapidement et semblent posséder une forme plus sphérique que les 6240. Scalebar = 500  $\mu\text{m}$ .

de celle-ci.

### 2.3.2 Quantification de la dynamique de formation des sphéroïdes

Afin de caractériser la forme et la taille des sphéroïdes au cours de la culture, nous avons mis en place un algorithme MATLAB permettant d'obtenir une image binarisée donnant accès à l'aire  $A$  du sphéroïde à l'instant  $t$ . Cette aire correspond à la projection de l'agrégat sur un plan latéral. De cette aire  $A$ , il est possible de déterminer plusieurs paramètres. Un premier paramètre que nous déterminons est le diamètre équivalent correspondant à la formule 2.2. L'aire d'un cercle ayant ce diamètre est égale à l'aire mesurée. Nous l'appelons équivalent, car l'aire mesurée n'est pas un cercle parfait, particulièrement au début de la culture lorsque l'agrégat est encore plan. De cette valeur, on déduira également un diamètre équivalent normalisé  $\tilde{D}_{eq}$  (Eq. 2.3), afin de pouvoir comparer des sphéroïdes de différentes tailles. Le choix de la valeur de normalisation est important afin de pouvoir comparer efficacement les résultats. Dans la figure 2.20, nous avons normalisé par l'aire mesurée initiale, mais dans la suite de ce manuscrit, la valeur choisit sera celle mesurée à 12 h. Nous expliquerons ce choix par la suite.

$$D_{eq}(t) = 2\sqrt{\frac{A(t)}{\pi}} \quad (2.2)$$



**Figure 2.19 Paramètres de description des sphéroïdes** Schéma issu de [Janssen et al., 2022]

$$\tilde{D}_{eq}(t) = \frac{D_{eq}(t)}{D_{eq}(t = 12h)} \quad (2.3)$$

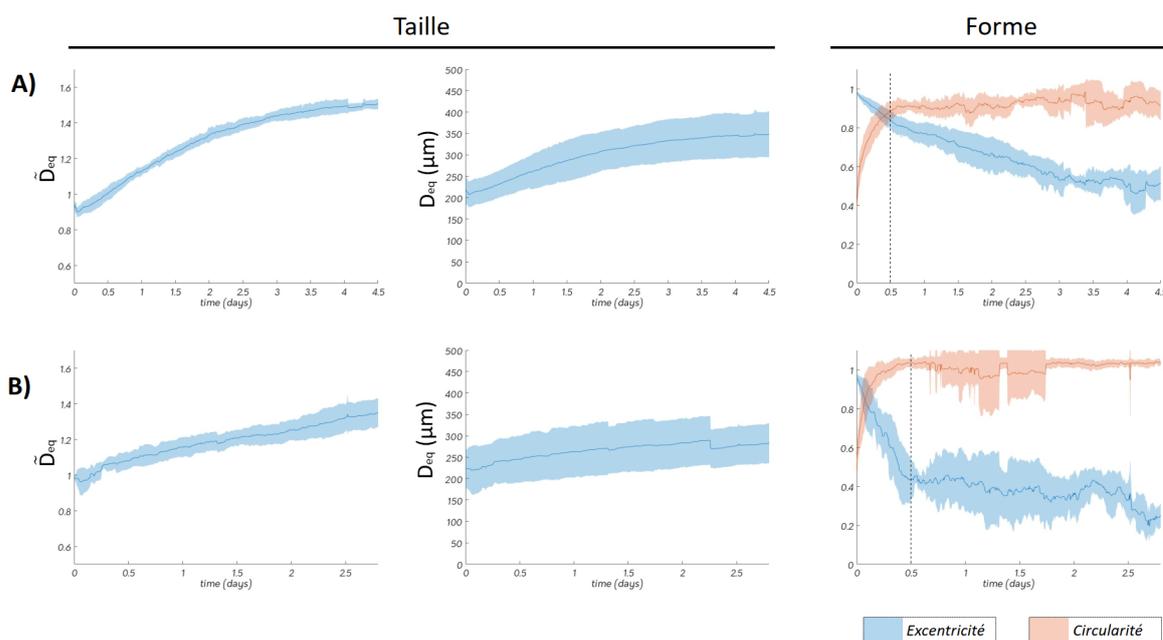
Un autre paramètre intéressant est la circularité (Fig. 2.19). Elle est calculée à partir de l'expression 2.4 où  $P$  est le périmètre de l'aire  $A$  mesuré. Un cercle parfait aura une valeur de circularité égale à 1 et tandis qu'une ellipse aplatie verra sa circularité tendre vers 0. Il est à noter que la circularité peut dépasser la valeur 1 d'un cercle parfait si elle est appliquée à des petites aires comme un carré de 3 par 3 par exemple. On peut prédire que les sphéroïdes auront, au départ, une circularité très basse proche de 0 puisque ceux-ci sont linéaires, puis la circularité grandira progressivement jusqu'à se situer aux alentours de 1 selon si l'agrégat est très sphérique ou non.

$$Circularity = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (2.4)$$

Un dernier paramètre que l'on calcule est l'excentricité donnée par la formule 2.5 (Fig. 2.19). Lorsque l'on assimile l'aire à celle d'une ellipse, on peut déterminer  $[FF']$  qui correspond à la distance entre les foyers de cette ellipse et  $L$  qui correspond à la longueur de son axe principal. La valeur de l'excentricité est comprise entre 0 pour un cercle parfait et 1 pour un segment. L'excentricité des sphéroïdes est donc supposée commencer proche de 1 pour se rapprocher de plus en plus vers 0.

$$Eccentricity = \frac{[FF']}{L} \quad (2.5)$$

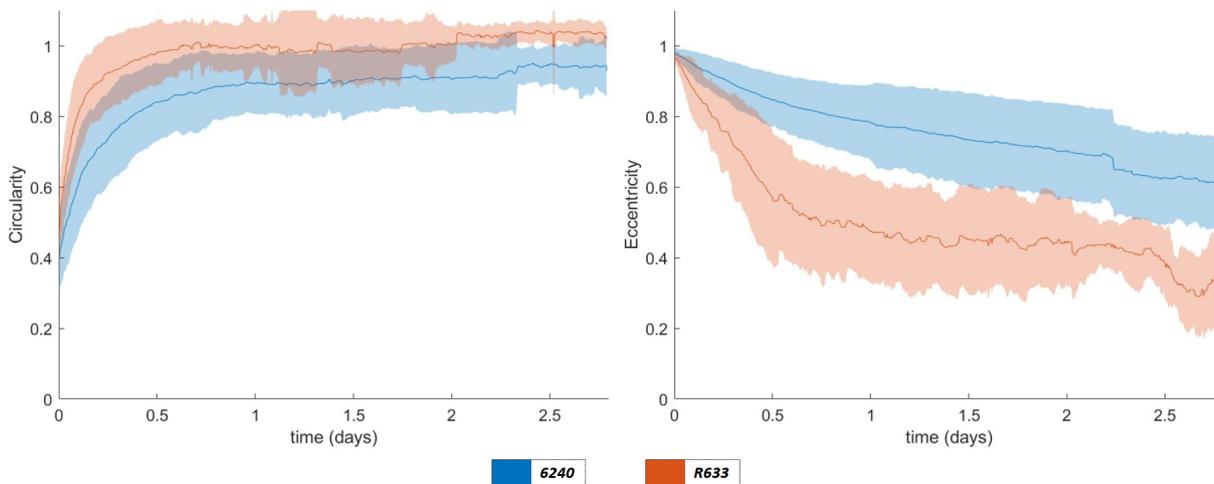
Nous illustrons sur la figure 2.20 les évolutions de taille et de forme des sphéroïdes présents dans une puce cultivée avec, soit la lignée cellulaire R633, soit celle 6240. On peut remarquer la forte reproductibilité de ces mesures au sein d'une puce, particulièrement sur le diamètre équivalent normalisé ( $\tilde{D}_{eq}$ ) des sphéroïdes (on rappelle que sur ces courbes uniquement, il est normalisé par rapport à  $D_{eq}(t = 0)$ ). Nous avons déjà évoqué pourquoi les diamètres équivalents sont différents au sein d'une puce due à la présence de la gravité,



**Figure 2.20** Courbes issues des mesures d'aires des sphéroïdes au cours la culture en lévitation Les courbes tracées en **A)** correspondent aux mesures de 4 sphéroïdes provenant de la même culture de cellules 6240. Les courbes tracées en **B)** correspondent aux mesures de 5 sphéroïdes provenant de la même culture de cellules R633. Pour toutes les courbes, les aires tracées correspondent à l'écart-type et le trait plein à la moyenne pour ces sphéroïdes. La ligne pointillée correspond à 12h de temps de culture. C'est le temps à partir duquel on estime que la forme 3D de l'agrégat est définie et ne varie plus significativement au cours du temps. C'est le temps de passage d'un agrégat plan de cellules à un sphéroïde 3D.

ce qui explique la déviation standard d'environ  $50 \mu\text{m}$ . Les mesures d'excentricité et de circularité sont fidèles aux prédictions et permettent d'observer les différents stades de la culture des sphéroïdes de GB. Ainsi, on peut voir la circularité augmenter très fortement sur les premières 12 h puis devenir relativement stable en se maintenant entre 0,8 et 1. L'excentricité a également deux tendances, elle décroît d'abord rapidement sur les 12 premières heures puis lentement sur la suite de la culture. Grâce à ces courbes, nous estimons à 12h le temps de culture pour obtenir un sphéroïde 3D à partir de l'agrégat de cellules plan, même si les cellules sont cohésives et forment un agrégat bien avant cela. Nous choisissons donc pour la suite de normalisé le diamètre équivalent par celui mesuré à 12 heures comme décrit dans l'équation 2.3.

Comme le montre la Figure 2.21, la formation des sphéroïdes au sein des puces acoustofluidiques est régie de façon générale par l'acoustique avec un passage plan-sphère, mais possède également une dépendance observable liée aux cellules. En effet, alors que les sphéroïdes de cellules R633 adoptent une forme sphérique dès 12h de culture en lévitation (ce qui explique la chute rapide de leur excentricité avant 12h puis sa relative stabilité par la suite), les sphéroïdes de GB 6240 présentent une forme ellipsoïdale accentuée à 12h et évolueront plus lentement vers la sphéricité. Nous observons donc une différence de com-



**Figure 2.21 Différence de forme selon la lignée cellulaire** Courbes de la circularité et de l'excentricité en fonction du temps pour les deux lignées cellulaires de glioblastome 6240 ( $n = 26$ ) et R633 ( $n = 17$ ) avec des mesures sur différentes cultures et à différents passages. Comme dans la figure 2.18, on observe une différence dans la formation des sphéroïdes qui transparait avec le comportement des courbes d'excentricité très différentes et une valeur finale de circularité distincte.

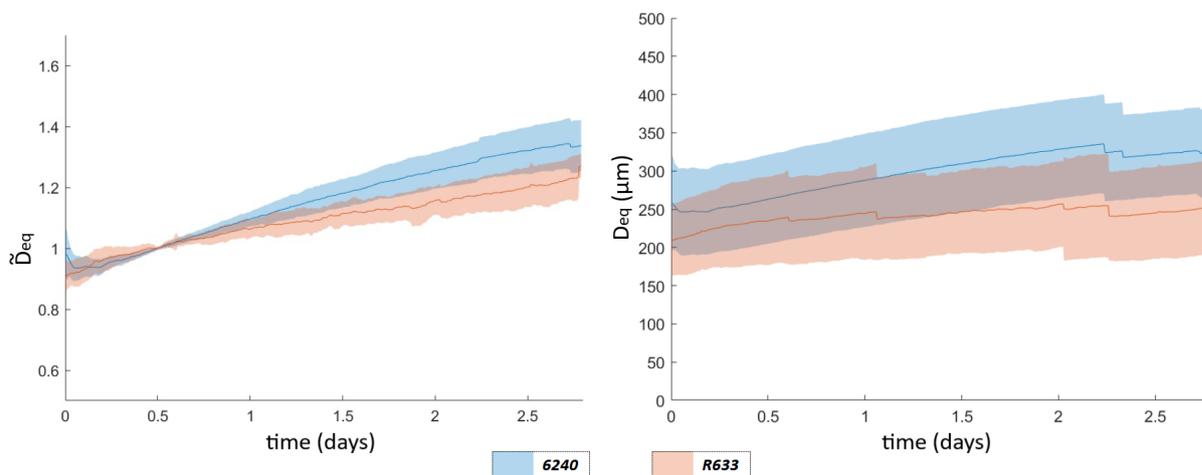
portement au sein des puces pour les deux lignées cellulaires. Les cellules 6240 s'agrègent moins rapidement et ont une forme plus ovoïdale que les cellules R633 possédant une forme plus sphérique et une dynamique d'agrégation plus rapide.

Les courbes du diamètre équivalent ainsi que celle de celui normalisé à 12h de la figure 2.22 montrent une différence de la croissance en taille entre les deux lignées cellulaires. Les sphéroïdes issus de la lignée 6240 ont une plus forte croissance que les sphéroïdes issus de la lignée R633. Cela pourrait s'expliquer par la différence du taux de prolifération des deux lignées.

## 2.4 Structuration d'agrégats en lévitation acoustique

### 2.4.1 Formation d'une structure concentrique

Afin d'avoir la possibilité d'une culture très long-terme, nous avons vérifié la faisabilité de procéder à un renouvellement du milieu de culture, par pipetage ou par l'intermédiaire d'un pousse-seringue, dans des conditions où les flux n'arrachent pas les sphéroïdes en lévitation. Comme évoqué précédemment, le dessin des puces de lévitation est asymétrique, ce qui permet de bénéficier d'un effet de résistance aux écoulements fluidiques qui sera fonction de l'accès utilisé. Des mesures de vitesse d'injection à la pipette ont été réalisées (Fig. 2.8) et donne une vitesse d'injection de l'ordre du mm/s au niveau de l'agrégat pour 50  $\mu$ L injectés doucement par à-coup. Avec ce type d'injection, on peut observer un léger déplacement latéral de l'agrégat qui est ensuite rapidement replacé au centre de la zone de lévitation par l'ARF transverse. Cette configuration permet donc un renouvellement, à la



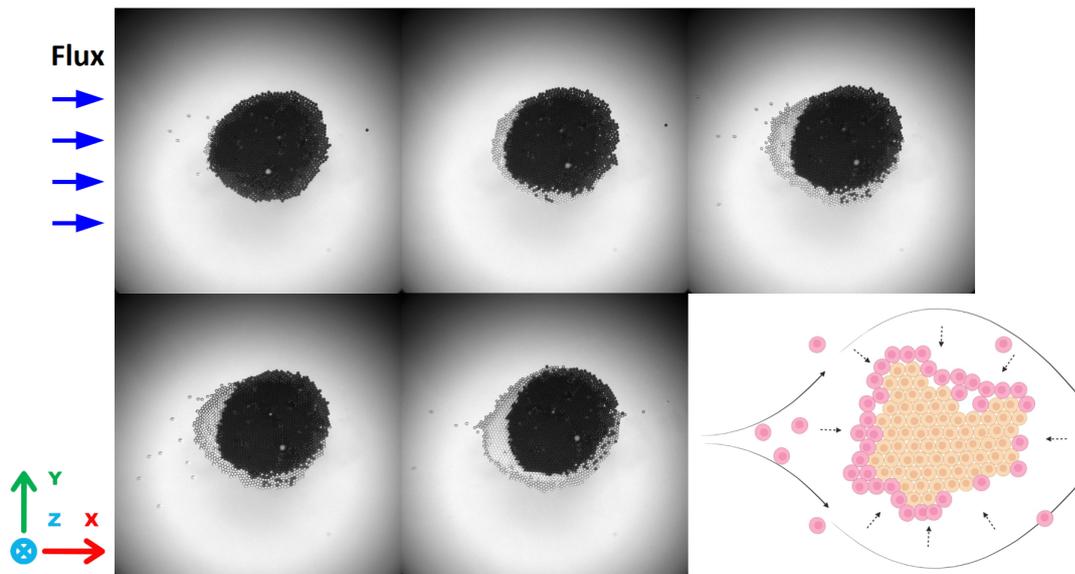
**Figure 2.22 Taille des sphéroïdes selon la lignée cellulaire** Courbes du diamètre normalisé à 12h et du diamètre équivalent en fonction du temps pour les deux lignées cellulaires de glioblastome 6240 ( $n = 26$ ) et R633 ( $n = 17$ ) avec des mesures sur différentes cultures et à différents passages.

périodicité voulue, du milieu de culture par pipetage à pression atmosphérique (équivalent aux modalités de renouvellement de milieu dans les dispositifs de culture classiques).

Il est, par ailleurs, possible de procéder à un renouvellement de milieu continu à l'aide d'un pousse-seringue ou un tire-seringue avec un débit contrôlé. Cela permet d'avoir un renouvellement avec une vitesse de fluide beaucoup plus faible et donc sans mouvement de l'agrégat. La vitesse de renouvellement à partir de laquelle on peut voir l'agrégat bouger est de l'ordre de  $10 \mu\text{m/s}$  (débit  $\approx 50 \mu\text{L/min}$  pour une section  $\approx 3 \times 8 \text{ mm}$ ). Il est préférable d'utiliser un pousse-seringue plutôt qu'un tire-seringue, car il ne provoque pas ou peu l'apparition de bulles via le PDMS. C'est la force de radiation acoustique transversale (Eq. 1.23) qui permet de garder l'agrégat au sein de la chambre et d'éviter qu'il ne parte avec le flux.

La possibilité de renouveler le milieu de culture en cours de culture en lévitation permet d'envisager d'injecter, en cours d'expériences, un liquide contenant des particules ou cellules en suspensions. Nous avons donc évalué cette possibilité en injectant dans les dispositifs un second type cellulaire après la formation de sphéroïdes de GB.

En contrôlant les paramètres d'injection, il serait donc possible de former un agrégat concentrique de particules et/ou de cellules, comme illustré dans la figure 2.23, en plaçant des particules dans le milieu renouvelé. Les particules vont alors migrer avec le milieu injecté jusque dans la chambre et se faire piéger autour de l'agrégat déjà formé. La répartition est légèrement dissymétrique en raison de la dissymétrie de l'injection, mais les particules ne se mélangent pas. On peut ainsi former des assemblages de feuillets concentriques.

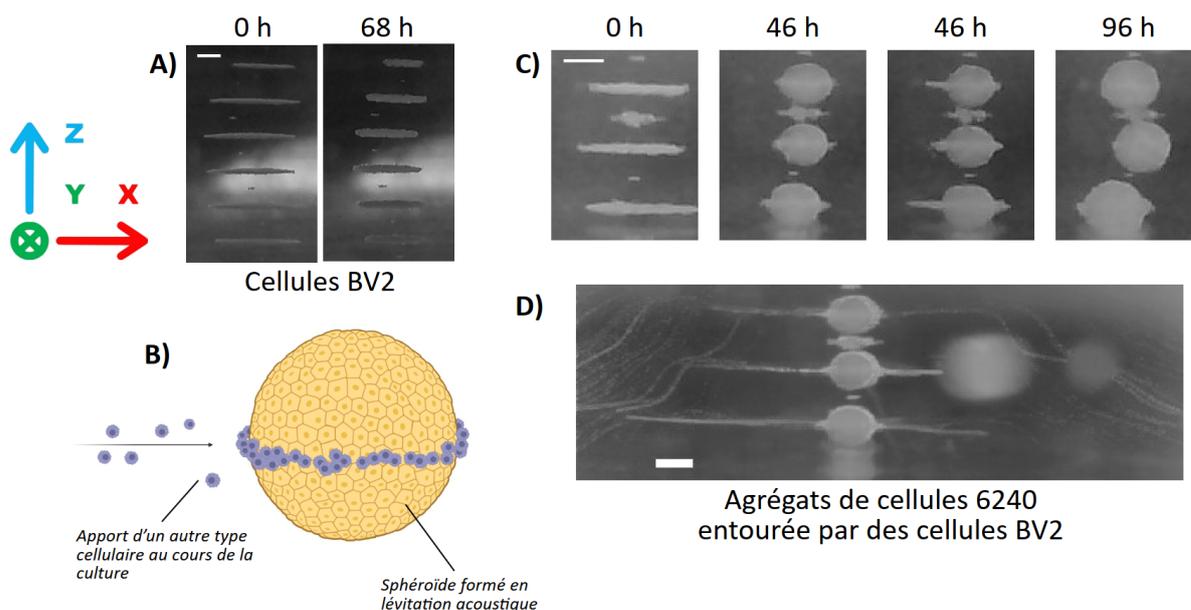


**Figure 2.23 Apport de particules par renouvellement de milieu** En plus d'un simple renouvellement de milieu, il est possible d'apporter de nouvelles particules autour de cet agrégat par effet acoustofluidique. Images de billes de polystyrène bleues formant un agrégat. Ces billes sont entourées par des billes de silices. Les deux types de billes font  $15\ \mu\text{m}$  de diamètre. Les flèches pleines correspondent à la trajectoire du fluide et les flèches en pointillés correspondent à la force de radiation acoustique radiale. *Schéma réalisé avec BioRender*

## 2.4.2 Application de la structuration : vers un modèle d'infiltration de tumeurs par des cellules immunitaires

Dans l'objectif d'une complexification des agrégats formés acoustiquement, nous avons voulu montrer la possibilité de l'apport d'un autre type cellulaire autour d'un agrégat déjà formé. La méthode est proche de celle expliquée sur la figure 2.23 à ceci près que la seconde injection se fait après la formation du sphéroïde, donc après quelques heures ou quelques jours de culture. Nous avons choisi de représenter un modèle d'infiltration de cellules immunitaires (des macrophages) au sein des sphéroïdes de glioblastomes et montrer que sous l'action de l'ARF transverse, les macrophages injectés s'organisent autour des sphéroïdes de GB puis les infiltrent.

Pour procéder à cette démonstration, nous avons utilisé une lignée cellulaire murine de cellules microgliales qui s'apparentent aux macrophages du cerveau : les BV2. Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement et l'auto-organisation de ces cellules, en lévitation, au sein de ce bioréacteur acoustofluidique. Comme le montre la figure 2.24 en A), les cellules de BV2 ne se réorganisent pas en sphéroïdes au cours de la culture comme le font les glioblastomes, les cellules souches mésenchymateuses ou les neurones primaires également étudiés au sein de l'équipe. Alors qu'elles sont viables, les cellules BV2 restent organisées en plan tout au long de la culture. Ce phénomène est probablement lié au fait que les cellules BV2 ne présentent presque aucune capacité à interagir entre elles via des interactions d'adhésion, confortant la notion que la transition plan/sphéroïde est

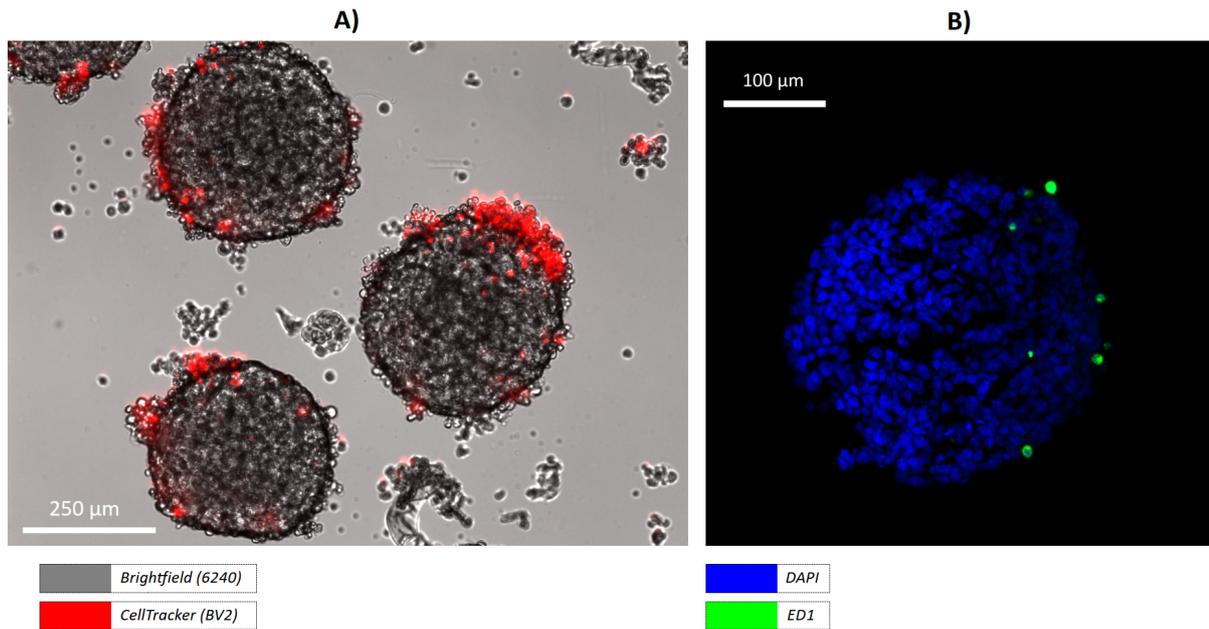


**Figure 2.24** Expérience d'infiltration d'un sphéroïde de glioblastome avec des cellules macrophages **A)** Culture de cellules BV2 en lévitation acoustique. On remarque une absence d'auto-organisation de ces cellules au cours de la culture. **B)** Schéma de l'expérience d'infiltration de sphéroïdes en lévitation acoustique. **C)** Images d'une culture en lévitation de glioblastome avec une injection de cellules BV2 à 46h de culture. **D)** L'image est une projection en temps des maxima d'intensité lors de l'agrégation des cellules BV2 autour des sphéroïdes de glioblastome. Cela correspond à l'étape intermédiaire entre les deux temps à 46h du **C)**. Scalebar = 250  $\mu\text{m}$ . Schéma réalisé avec *BioRender*

principalement dominée par les forces d'interactions inter-cellulaires.

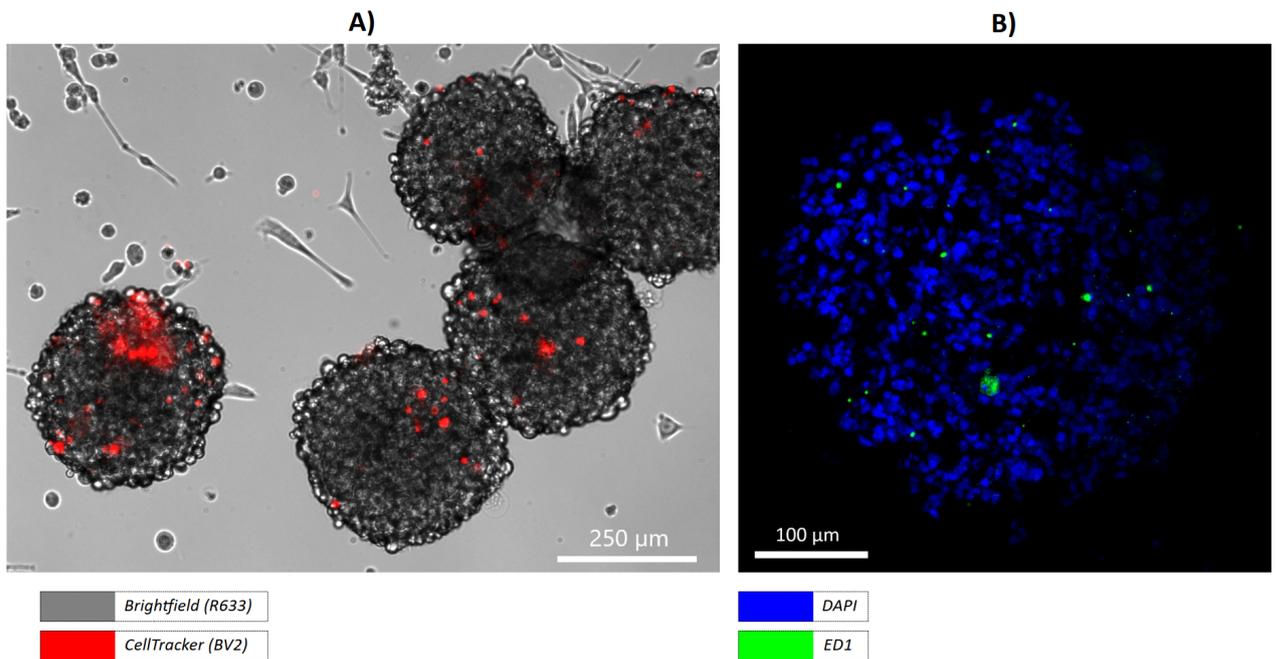
Dans un second temps, nous avons injecté des cellules BV2 autour de sphéroïdes de GB formés après 2 jours de culture comme illustré figure 2.24 **B)**, **C)** et **D)**. On peut observer que, sous l'action de l'ARF transverse, les BV2 se placent autour des sphéroïdes de GB à leur "équateur". Deux jours après l'injection des BV2, cette couronne a disparu, et on observe des agrégats bien sphériques, suggérant la possible intégration des BV2 dans les sphéroïdes de GB.

Afin de vérifier que des BV2 ont pu pénétrer le sphéroïde, des expériences avec des cellules BV2 préalablement marquées avec du *CellTracker*, une sonde membranaire fluorescente, ont été réalisées. Comme le montre les figures 2.25 et 2.26, après 2 jours de contact, des clusters de cellules BV2 peuvent être visualisés en périphérie des sphéroïdes de GB, objectivant ainsi une adhésion de ces cellules aux sphéroïdes. Afin d'évaluer si les cellules BV2 se sont infiltrées à l'intérieur des sphéroïdes, nous avons réalisé des coupes histologiques (cryomicrotome) de sphéroïdes de GB cocultivés avec les BV2. Nous avons marqué ces coupes au DAPI, afin de voir tous les noyaux cellulaires, et avec un anticorps dirigé contre ED1, un antigène exprimé sur la plupart des populations de macrophages et considéré comme un marqueur pan-macrophage, afin de visualiser les cellules BV2. Les figures 2.25 et 2.26, issu de cultures différentes de la figure 2.24, nous montre que des cel-



**Figure 2.25 Infiltration de sphéroïdes de GB - lignée 6240** Ces images proviennent d'une culture de cellules 6240 à 5 Vpp, les cellules BV2 ont été injectées après 2 jours et la culture arrêtée après 4 jours. **A)** Images après lévitation des sphéroïdes 6240 infiltrés. Les cellules de BV2 ont été marquées au *CellTracker* avant l'injection et apparaissent en rouge. **B)** Marquage DAPI et ED1 d'une coupe histologique d'épaisseur 25 μm située à plus ou moins 25 μm du centre d'un agrégat 6240 infiltré. Seules les cellules BV2 se font marquer par le marqueur ED1.

lules BV2 sont présentes à l'intérieur des sphéroïdes de GB, objectivant ainsi l'infiltration des tumorôïdes par les cellules de type macrophagique.



**Figure 2.26 Infiltration de sphéroïdes de GB - lignée R633** Ces images proviennent d'une culture de cellules R633 à 5 Vpp, les cellules BV2 ont été injectées après 2 jours et la culture arrêtée après 4 jours. **A)** Images après lévitation des sphéroïdes R633 infiltrés. Les cellules de BV2 ont été marquées au CellTracker avant l'injection et apparaissent en rouge. **B)** Marquage DAPI et ED1 d'une coupe histologique d'épaisseur 25  $\mu\text{m}$  située à plus ou moins 25  $\mu\text{m}$  du centre d'un agrégat R633 infiltré. Seules les cellules BV2 se font marquer par le marqueur ED1.

## 2.5 Discussion

Au terme de cette première partie de nos résultats, nous avons pu **1)** concevoir un bioréacteur acoustique permettant la formation et l'observation de sphéroïdes cellulaire au long cours et selon 2 angles de visualisation ; **2)** former et cultiver des sphéroïdes de GB avec d'excellentes conditions de survie pour deux lignées dérivées de patients de taille relativement homogène pendant plusieurs jours de culture sous lévitation acoustique ; **3)** observer et différencier l'auto-organisation de sphéroïdes formés à partir de deux lignées d'identité distinctes ; **4)** développer et appliquer une méthode de structuration d'agrégats concentriques avec un modèle d'infiltration de sphéroïdes tumoraux par des cellules immunitaires.

Notre point de départ initial était la preuve de concept que des cultures de cellules souches mésenchymateuses pouvaient être cultivées pendant 24h. De nombreux changements, améliorations et optimisations ont été implémentés dans le système. Comparativement à la preuve de concept, la conception des puces actuelles est simplifiée et grandement accélérée, avec plusieurs puces qui peuvent être conçues en parallèle. Ces puces permettent également une culture à long terme sans avoir de contact direct entre le transducteur et le milieu de culture. Au cours de ce travail, nous avons rencontré un certain nombre de problèmes dont le principal a été la génération de bulles dans la cavité résonnante dont la nucléation pouvait interrompre le trajet des ondes acoustiques et provoquer la chute des sphéroïdes pendant l'expérience. Nous avons progressivement augmenté le nombre d'expériences réalisables en parallèle (passant de 1 à 6/7 dispositifs). Dans un travail connexe, une puce contenant 4 dispositifs en parallèle sur le même support (compatible avec un incubateur de platine) a été conçue. L'optimisation du dessin de la chambre de culture a permis de concevoir un système présentant un schéma fluide permettant le renouvellement facile des milieux de culture, sans phénomène "d'arrachage" des sphéroïdes en cours de lévitation. Ce renouvellement peut être effectué soit à pression atmosphérique (pipetage), soit à l'aide d'un pousse-seringue qui a l'avantage de pouvoir renouveler le milieu de plusieurs puces en même temps.

Ce bioréacteur acoustofluidique optimisé a permis de réaliser et d'étudier des cultures de cellules de GB issues de patients pendant au moins une semaine. L'utilisation d'un transducteur packagé à 2 MHz et 5 Vpp permet de contraindre efficacement les sphéroïdes cellulaires et les analyses de viabilité montrent que les cellules cultivées au long cours présentent un taux de survie excellent et comparable aux sphéroïdes cultivés en absence de lévitation. Ceci objective l'innocuité de la présence constante d'ondes stationnaires sur la survie. Les cellules maintenues en lévitation sont initialement organisées en plans cellulaires aux noeuds de pression, puis s'auto-organisent en sphéroïdes au bout de  $\approx 12$  h. Ce phénomène semble lié aux capacités d'interactions intercellulaires qui dominent l'ARF puisque des cellules non adhérentes comme les BV2 (ou les globules rouges) ne s'organisent pas en sphéroïdes. De façon intéressante, nous avons comparé l'auto-organisation de deux lignées cellulaires de GB possédant des propriétés d'adhésions distinctes (dans les modèles de cultures 2D). Nous avons pu observer que l'auto-organisation en sphéroïde

était différente selon les deux types cellulaires utilisés (6240 et R633). Nous avons également observé une différence de forme. Les cellules 6240 s’organisant en sphéroïdes un peu aplatis, alors que les sphéroïdes R633 sont plus proches de la sphère parfaite. Ceci suggère que l’ARF, générée à 5 Vpp dans ce résonateur, modifie légèrement l’auto-organisation des cellules 6240 alors qu’elle ne modifie pas l’organisation des R633, un phénomène qui pourrait être lié aux propriétés d’adhésions de ces types cellulaires.

Nous avons également montré des premiers exemples de complexification des sphéroïdes formés en couplant l’acoustique avec un contrôle fluïdique. Ce couplage permet la formation d’agrégats concentriques au lancement de la culture ou pendant celle-ci. Nous avons ainsi réalisé une infiltration de sphéroïde tumoral après déjà quelques jours de culture. Nous pouvons déjà voir les premières applications potentielles d’un tel système : un agrégat concentrique serait particulièrement intéressant avec des cellules neuronales comme des neurones corticaux et striataux afin d’essayer de reproduire l’architecture et les connexions qu’il peut exister entre ces deux zones cérébrales afin de produire un modèle d’études. Nous avons déjà montré l’utilité de ce système pour un modèle d’infiltration, mais ce procédé peut être appliqué à des cellules comme avec des solutions. Ainsi, ce système peut permettre de tester des molécules pharmacologiques sur des sphéroïdes différents, formé de façon similaire et ayant accès à un milieu de culture strictement identique.

Il reste néanmoins quelques points pouvant être améliorés, à commencer par la corolle cellulaire qui n’est actuellement pas contrôlable et peut fausser les résultats, notamment sur la mesure de taille des sphéroïdes. Il paraît difficile de s’affranchir de cette corolle cellulaire, car changer les propriétés acoustiques du milieu n’est pas envisageable pour rester dans des conditions de culture classiques. Une étape de pré-injection permettant de séparer les cellules mortes des cellules vivantes, ce qui rappelle la méthode par acoustique décrite précédemment [Olofsson et al., 2020], serait un premier pas pour éliminer cette corolle de départ. Il arrive, cependant, que l’on observe cette corolle grandir légèrement au cours de la culture, mais l’origine de cette croissance reste inconnue. Elle peut provenir : d’une augmentation de cellules mortes provenant de l’agrégat ; de la prolifération de cellules saines piégées à l’intérieur (Fig. 2.17 et Fig. 2.15) ; d’une rotation du sphéroïde au cours de la culture modifiant la taille de la corolle vue de profil. Il serait intéressant de voir si les cellules mortes en bordure ou au centre de l’agrégat se retrouvent dans cette corolle.

La mesure de l’aire des sphéroïdes, malgré sa performance et sa reproductibilité, peut présenter des variations de valeurs liées au fait que les sphéroïdes peuvent pivoter autour de l’axe  $z$ . Un agrégat en lévitation est très stable, ne bouge pas et est peu enclin à la rotation, mais son auto-organisation lui fait changer de forme et c’est ce phénomène couplé au champ acoustique qui peut induire une rotation selon cet axe. Même s’il est rare qu’un agrégat pivote, cela peut arriver une ou deux fois au cours de la culture et les sauts engendrés par ces erreurs sont  $< 50 \mu\text{m}$  pour le diamètre équivalent. Un autre point qui apporte de l’imprécision est la détection de la corolle cellulaire, notamment sur les mesures d’excentricité et de circularité. Il pourrait être intéressant d’étudier les

forces en présence lors du passage plan-sphère en lévitation acoustique et d'établir un modèle d'auto-organisation. On trouve dans la littérature des études mesurant les forces lors de migration cellulaire [Treat et al., 2009, Tambe et al., 2011] sur des substrats. Il pourrait être intéressant d'effectuer ces démarches dans ce système afin de pouvoir comparer les mesures 2D à des mesures 3D où les cellules n'ont pas de contact autre que cellule-cellule. De manière similaire, il serait intéressant d'étudier la formation d'un sphéroïde en lévitation acoustique après avoir modifié la cohésion cellulaire des cellules le composant. Par exemple, la diminution de la quantité de cadhérines d'un agrégat dans ce système pourrait engendrer une absence d'auto-organisation qui résulterait en un agrégat qui resterait plan.

Un inconvénient comme un avantage est le gradient de cellules agrégées au sein de la puce multi-noeuds. Il semble difficile de ne pas obtenir ce gradient lors du lancement de la culture puisqu'il est principalement dû à la gravité. Une solution serait de modifier l'orientation de la puce lors de la culture afin de désaligner l'axe de formation des noeuds et celui de la gravité. Un autre serait d'agréger les cellules avec une force acoustique plus importante afin que l'agrégation soit plus forte, plus rapide et moins impactée par la gravité. Ce gradient de cellules débouche toutefois sur un gradient de taille des sphéroïdes. Nous projetons d'étudier l'influence de la taille du sphéroïde sur son comportement à l'intérieur de ce système.

De plus, la croissance des sphéroïdes est limitée dans ce système. Ospina et al. [Ospina et al., 2022] ont montré qu'au-dessus d'une taille critique, une particule peut se faire piéger au ventre de pression alors qu'à plus petite taille, elle se fait piéger au noeud de pression. Au cours de nos expériences, nous avons observé qu'il nous est impossible d'obtenir des sphéroïdes de diamètre comparables à la longueur d'onde ( $\approx 750 \mu\text{m}$ ) dans ce système actuel. Une solution afin de former des sphéroïdes de taille plus importante est l'utilisation d'une fréquence plus basse pour l'onde acoustique. Nous avons essayé de cultiver des sphéroïdes de GB à 1 MHz ( $\lambda \approx 1500 \mu\text{m}$ ), mais à cette fréquence l'agrégation des cellules de GB est très difficile. Il faudrait donc commencer une culture à 2 MHz puis continuer la culture à 1 MHz une fois que les sphéroïdes ont atteint une taille suffisante ( $\approx 100 \mu\text{m}$  de diamètre).

Nous avons fait remarquer la présence d'objets non vivants présents aux anti-noeuds de pression. Leur origine n'est pas claire, mais il semblerait qu'il s'agisse de poussières ou débris de PDMS résultant de la fabrication des puces (démoulage, punches, plasma, etc). En effet, le PDMS possède un contraste acoustique négatif le faisant s'agréger aux anti-noeuds de pressions ( $\Phi_{PDMS} \approx -1$  dans l'eau). Fabriquer les puces en salle blanche serait une première amélioration afin de réduire ces débris et éviter leur présence au sein de la culture. Nous avons également évoqué précédemment que le PDMS pouvait relarguer des oligomères, il faudrait également voir si ceux-ci ne sont pas à l'origine des objets observés aux anti-noeuds.

Malgré ses limites actuelles, ce système de culture innovant permet la formation rapide de sphéroïdes, leur complexification via l'apport de cellules et de solutions ou par la modification des paramètres acoustiques de voltage et de fréquence. Il est facilement utili-

sable par tous pour un faible budget dans un laboratoire disposant du matériel nécessaire à la culture cellulaire classique et possède une bonne reproductibilité sur les sphéroïdes formés.



# Chapitre 3

## Caractérisation acoustique des puces acoustofluidiques

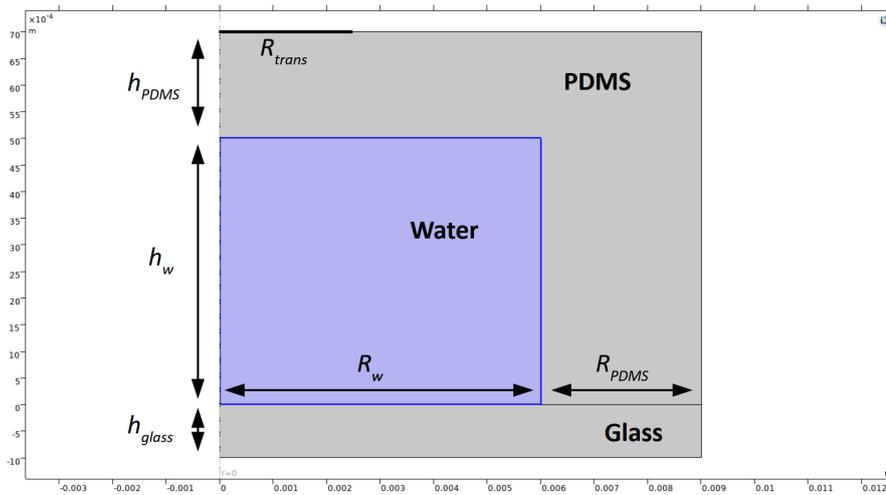
### Sommaire

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>3.1</b> | <b>Création d'un modèle numérique . . . . .</b>   | <b>88</b>  |
| 3.1.1      | Description du modèle . . . . .   | 88         |
| 3.1.2      | Champ acoustique simulé . . . . .   | 90         |
| 3.1.3      | Domaine fréquentiel . . . . .   | 92         |
| <b>3.2</b> | <b>Mesure de l'ARF axiale . . . . .</b>   | <b>96</b>  |
| 3.2.1      | Méthode de mesure par PIV . . . . .   | 97         |
| 3.2.2      | Méthode de mesure par technique de défocalisation . . . . .   | 104        |
| 3.2.3      | Méthode de mesure par diminution de l'ARF . . . . .   | 107        |
| <b>3.3</b> | <b>Force de radiation acoustique transversale . . . . .</b>   | <b>113</b> |
| 3.3.1      | Méthodes de tracking . . . . .  | 113        |
| 3.3.2      | Caractérisation du streaming acoustique . . . . .   | 115        |
| <b>3.4</b> | <b>Caractérisation de la distance inter-noeud, application biologique pour le contrôle de la fusion de sphéroïdes . . . . .</b> | <b>119</b> |
| 3.4.1      | Distance inter-noeuds . . . . .   | 119        |
| 3.4.2      | Fusion de sphéroïdes . . . . .  | 121        |
| <b>3.5</b> | <b>Discussion . . . . .</b>   | <b>122</b> |

---

Nous avons à présent un système de culture en lévitation acoustique fonctionnel avec une viabilité des cellules en culture vérifiée et des premiers résultats. L'un des points importants à présent est de caractériser acoustiquement ce système afin de mieux comprendre les phénomènes qui interviennent au sein de celui-ci. Connaître la force acoustique appliquée aux cellules nous permettra d'une part de nous comparer à la littérature, et d'autre part de pouvoir prédire le comportement du système de culture en vue de diverses applications. Enfin, l'idéal serait de parvenir à caractériser la force acoustique appliquée aux sphéroïdes lorsque ceux-ci sont en lévitation. Dans cette section, nous détaillerons donc les différentes approches développées au sein de notre équipe pour mesurer les différents



**Figure 3.1 Schéma de la simulation COMSOL** Le modèle axisymétrique se limite à 3 domaines, l'eau (Water), le PDMS et la lamelle de verre (Glass). Le transducteur est modélisé par une vitesse de vibration au niveau de l'interface supérieure du PDMS.

paramètres acoustiques des chambres acoustofluidiques. Nous détaillerons également le modèle *COMSOL* que nous avons mis en place afin de prédire le comportement des puces acoustofluidiques ainsi que la réponse au champ acoustique de différentes particules.

### 3.1 Création d'un modèle numérique

Au cours du processus de conception, nous avons utilisé des simulations numériques afin de prédire les comportements des puces acoustofluidiques et de particules placées dans ces puces. Nous avons utilisé le logiciel de simulation *COMSOL Multiphysics* pour réaliser ces simulations. *COMSOL* applique une méthode par éléments finis pour résoudre différents problèmes de physique et d'ingénierie. Il permet, entre autres, de modéliser la propagation d'ondes acoustiques en résolvant les équations aux dérivées partielles correspondantes. Les nombreux modules et solutions analytiques correspondantes du logiciel lui permettent de simuler différents phénomènes en un seul modèle afin de le complexifier. Nous présenterons dans cette section les simulations numériques qui ont été réalisées avec *COMSOL* version 6.0. Certains résultats obtenus à l'aide de cette simulation seront présentés au fur et à mesure de la présentation des résultats expérimentaux qui y sont liés.

#### 3.1.1 Description du modèle

##### Géométrie

Pour simplifier au mieux la simulation numérique, nous considérons une symétrie similaire à celle du transducteur, c'est-à-dire une symétrie cylindrique (axisymétrique). La

modélisation se résume donc à un demi-plan qui sera révolutionné sur  $2\pi$  radians afin d'obtenir la solution 3D. La cavité devient alors un rectangle disposant de trois zones : la lame de verre de hauteur  $h_{glass} = 1\text{ mm}$ , la chambre de lévitation de hauteur  $h_w = 1, 5$  ou  $5\text{ mm}$  selon la puce modélisée (mono-noeud ou multi-noeuds respectivement) et la paroi supérieure + la paroi latérale en PDMS de hauteur  $h_{PDMS} = 2\text{ mm}$ . Les rayons sont de  $R_w = 6\text{ mm}$  pour la chambre,  $R_{PDMS} = 3\text{ mm}$  pour le PDMS et  $R_{trans} = 2, 5\text{ mm}$  pour le transducteur.

Afin d'évaluer l'impact des agrégats sur le champ acoustique, nous les modélisons comme des sphères ou des ellipsoïdes fixés dans l'espace. En effet, lors des expériences, nous n'observons aucune translation des agrégats en lévitation. Ils sont donc immobiles au cours de la culture.

### Propriétés et conditions aux limites

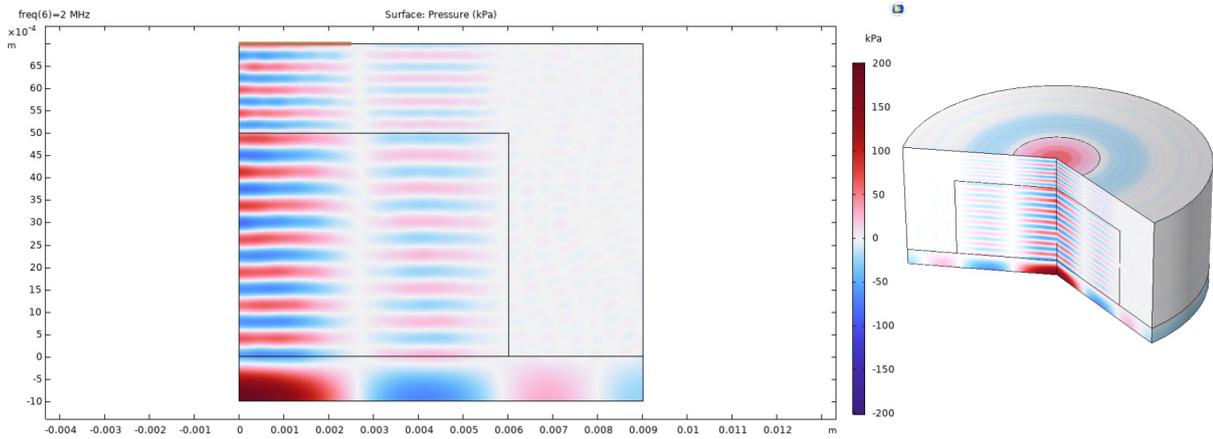
Les valeurs utilisées pour les paramètres des fluides et matériaux sont celles décrites dans l'annexe A. Pour les paramètres qui ne sont pas présents dans cette annexe, ce sont les valeurs issues de la librairie COMSOL qui ont été utilisées. Des conditions de parois dures sont imposées au niveau des interfaces extérieures excepté au niveau du transducteur.

Le transducteur et l'onde acoustique générée par celui-ci sont modélisés comme une condition de vitesse à l'interface du PDMS. La condition aux limites pour cette vitesse est définie comme  $v_{in} = \omega\delta$  avec  $\omega$  la pulsation de l'onde acoustique et  $\delta = 1\text{ nm}$  [Bruus, 2012a]. Nous montrerons par la suite que cette valeur de  $\delta$  permet d'obtenir des valeurs proches de celles observées expérimentalement. Il est possible de faire varier  $\delta$  afin de modifier l'amplitude de l'onde acoustique.

### Modèles physiques utilisés

Lorsque l'on modélise du PDMS, l'un des principaux défis est la différence entre les vitesses acoustiques longitudinale ( $\approx 1000\text{ m/s}$ ) et transversale ( $\approx 100\text{ m/s}$ ) [Xu et al., 2020]. La faible vitesse transversale de l'onde acoustique entraîne une longueur d'onde beaucoup plus courte ( $\lambda \approx 50\text{ }\mu\text{m}$ ) qui se doit d'être résolue numériquement par le maillage. Cette courte longueur d'onde entraîne un besoin en mémoire et en calcul important. De plus, l'onde transversale est également fortement amortie ( $\approx 85\text{ dB/cm}$  [Madsen et al., 1983]). Par conséquent, il semble raisonnable de négliger la propagation des ondes transversales. Il a été montré [Ni et al., 2019] que les modèles de solide élastique et de fluide sans écoulement pour le PDMS produisent des résultats similaires dans le cadre de puces acoustiques. Nous avons donc choisi de modéliser le PDMS comme un fluide sans écoulement, à l'instar de Ni et al.

La simulation utilise l'interface **Pressure Acoustics, Frequency Domain** pour les 3 domaines : **Water**, **PDMS** et **Glass**. Ces domaines sont atténués avec les modèles **Viscous**, **user-defined attenuation** et **linear elastic** respectivement. La pression acoustique est calculée via l'équation d'Helmholtz :  $\nabla(-\frac{1}{\rho_D}\nabla p_1) = \frac{k^2 p_1}{\rho_D}$  avec  $\rho_D$  la densité du matériau de ce domaine,  $p_1$  la pression acoustique à l'ordre 1 et  $k$  le nombre d'onde



**Figure 3.2 Pression acoustique dans le modèle COMSOL** Représentation de la pression acoustique au sein du modèle pour une fréquence de 2 MHz, une hauteur de chambre de 5 mm correspondant à une puce multi-noeuds et une hauteur de PDMS de 2 mm. La ligne marron représente le transducteur.

complexe (par exemple  $k_{PDMS} = \frac{\omega}{c_{PDMS}} - i \log\left(\frac{\alpha_{PDMS}}{20}\right)$ ).

Afin d'étudier le mouvement de particules soumises au champ acoustique, nous modélisons ces particules avec le module **particles tracing**. Ces particules ne modifient pas le champ acoustique, car ce module n'intervient pas dans le calcul de la pression acoustique. Leur direction et leur vitesse d'agrégation pourront être comparées aux mesures effectuées.

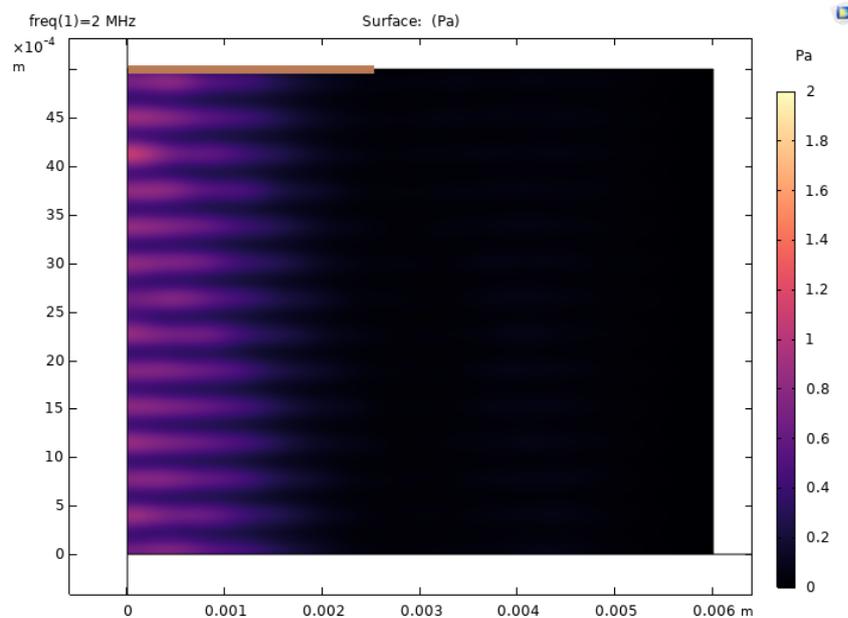
## Maillage

La simulation utilise des éléments triangulaires libres pour le maillage spatial. La taille des éléments de maillage est contrôlée par la physique du modèle en imposant 16 éléments de maillage par longueur d'onde afin de respecter le critère de Shannon. On ne remarque pas de différence sur les simulations entre les résultats obtenus avec 8, 16 ou 32 éléments par longueur d'onde, si ce n'est une précision spatiale accrue.

### 3.1.2 Champ acoustique simulé

#### Champ acoustique sans perturbation

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'organisation spatiale du champ de pression acoustique au sein des puces comme le montre la figure 3.2 représentant la pression acoustique obtenue avec cette simulation pour une fréquence de 2 MHz dans une puce multi-noeuds. On voit que le champ de pression est bien uniforme sur la hauteur et diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'axe du transducteur. La représentation de la pression n'est toutefois pas la meilleure pour représenter la force acoustique. Il est préférable de représenter la densité d'énergie acoustique calculée avec l'expression suivante :  $E_{ac} = \frac{1}{4}\rho_0 v^2 + \frac{1}{4}\frac{1}{\rho_0 c^2} p^2$ . Les modules COMSOL utilisés nous donnent accès aux

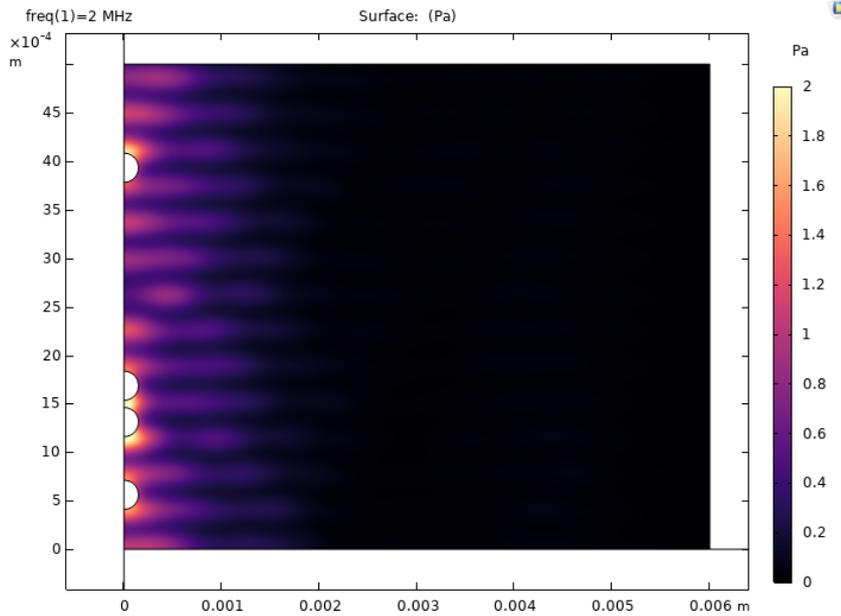


**Figure 3.3 Énergie acoustique simulée par le modèle COMSOL** Représentation de l'énergie acoustique au sein du modèle pour une fréquence de 2 MHz, une hauteur de chambre de 5 mm correspondant à une puce multi-noeuds et une hauteur de PDMS de 2 mm. Les noeuds de pression correspondent aux zones sombres, les ventres correspondent aux zones oranges/jaunes. La ligne marron représente le transducteur.

paramètres de pression et de vitesse acoustique (**acpr**) ce qui nous permet de calculer  $E_{ac}$  avec les paramètres du modèle décrits précédemment. Cette expression est entrée manuellement et calculée en chaque point de l'espace comme illustré sur la figure 3.3. On rappelle que l'énergie acoustique permet de visualiser facilement les noeuds et ventres de pression, mais permet également de mieux comprendre l'ARF car celle-ci en dépend linéairement, contrairement à la pression acoustique dont elle dépend au carré (Eq. 1.18 et 1.15). On voit donc en comparant ces deux figures que l'énergie acoustique, et donc l'ARF, est négligeable lorsque l'on s'éloigne trop de l'axe de symétrie de la simulation. Le graphique représentant la pression nous laisse croire que l'ARF est significative partout, notamment hors de la zone sous le transducteur, c'est pourquoi le graphique montrant la densité d'énergie acoustique est plus pertinent.

### Champ acoustique en présence de sphères rigides

Grâce à la simulation, il est possible d'observer la modification du champ acoustique au sein de la puce lorsque de gros agrégats y sont présents. C'est ce que l'on voit sur la figure 3.4. Les sphères sont placées de sorte à voir l'impact d'une sphère seule ou de sphères plus ou moins proches. On voit que le champ de pression est effectivement légèrement modifié en comparaison à la figure 3.3 où elles sont absentes. Ces modifications sont particulièrement présentes sur l'axe  $x$  perpendiculaire à la propagation de l'onde. La position d'équilibre d'une sphère peut donc être affectée par les agrégats supérieurs, ce



**Figure 3.4 Énergie acoustique moyenne en présence d'agrégats** Représentation de l'énergie acoustique au sein du modèle COMSOL pour une fréquence de 2 MHz, une hauteur de chambre de 5 mm (correspondant à une puce multi-noeuds) et 4 agrégats représentés comme des surfaces acoustiques rigides pour accentuer les effets sur le champ de pression.

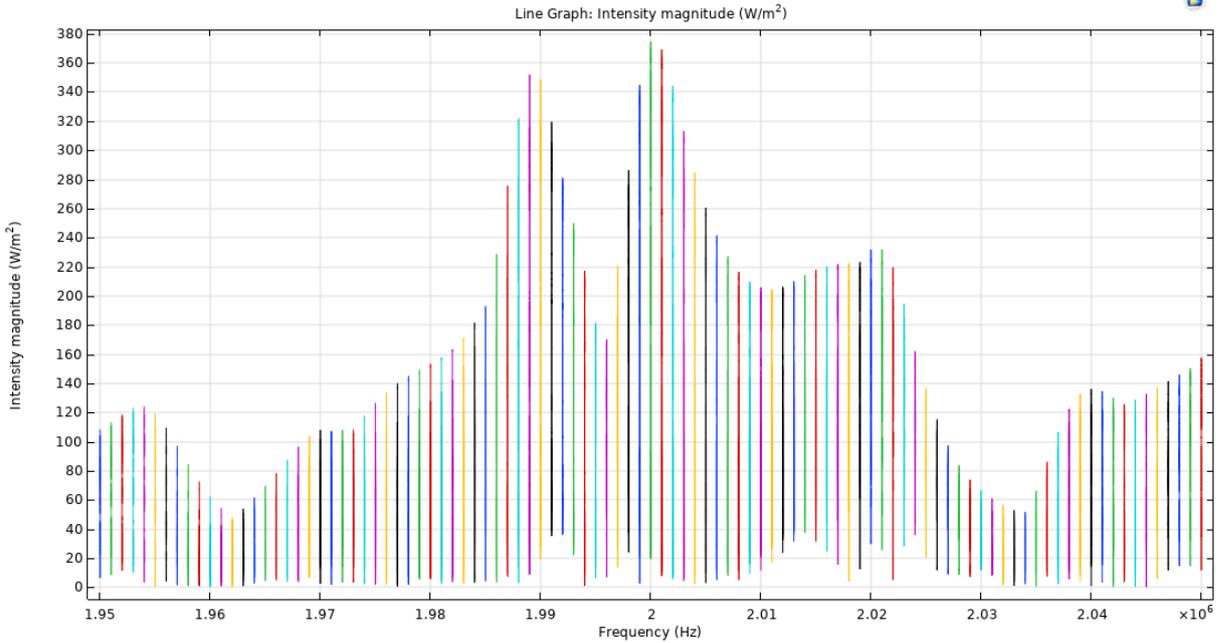
qui s'observerait par un décalage dans l'axe  $x$  de celles-ci.

On observe cet effet au cours des expériences. En effet, on observe presque systématiquement que les agrégats cellulaires sont initialement alignés dans l'axe  $z$  lorsqu'ils sont encore en forme de feuillets. Durant la culture, ces agrégats vont se désaligner en se déplaçant selon l'axe  $x$  (Fig. 2.18). Cet effet peut également être dû au champ acoustique expérimental qui n'est pas idéal et peut donc générer des zones d'agrégation décalées, ou à l'ARF dont la résultante peut varier selon la taille et la forme de l'agrégat.

### 3.1.3 Domaine fréquentiel

#### Simulation de la fréquence de résonance

Nous avons vu dans le chapitre 1 la relation  $f = n \frac{c}{2h} = n \frac{\lambda f}{2h}$  permettant de déterminer les fréquences de résonance d'une cavité. Ce modèle est valable lorsque l'on suppose des parois supérieure et inférieure acoustiquement rigides. Ce n'est évidemment pas le cas dans ce système, sinon l'onde acoustique n'atteindrait jamais le milieu liquide. Les puces acoustofluidiques sont composées de plusieurs couches à savoir PDMS, eau, lame de verre et air. Il faut donc revoir ce modèle trop simpliste pour étudier la fréquence de résonance du système en considérant un système multi-couches. Nous avons réalisé cette simulation via *MATLAB*. Au lieu de considérer le milieu liquide comme la seule cavité résonante, nous considérerons la puce entière, ce qui signifie que l'onde acoustique traverse les trois milieux différents. Pour chaque milieu, la condition  $f = n \frac{c_i}{2h_i}$  doit être remplie pour



**Figure 3.5 Intensité acoustique dans le modèle COMSOL pour différentes fréquences** Comparaison de l'intensité acoustique maximale et minimale pour différentes fréquences pour une hauteur de chambre de 5000  $\mu\text{m}$  correspondant à une puce multi-noeuds. La hauteur de PDMS est de 2000  $\mu\text{m}$ . L'intensité acoustique maximale permet de visualiser grossièrement les fréquences de résonance. Il faut toutefois comparer la répartition de l'intensité acoustique le long de l'axe  $z$  pour faire une plus juste détermination.

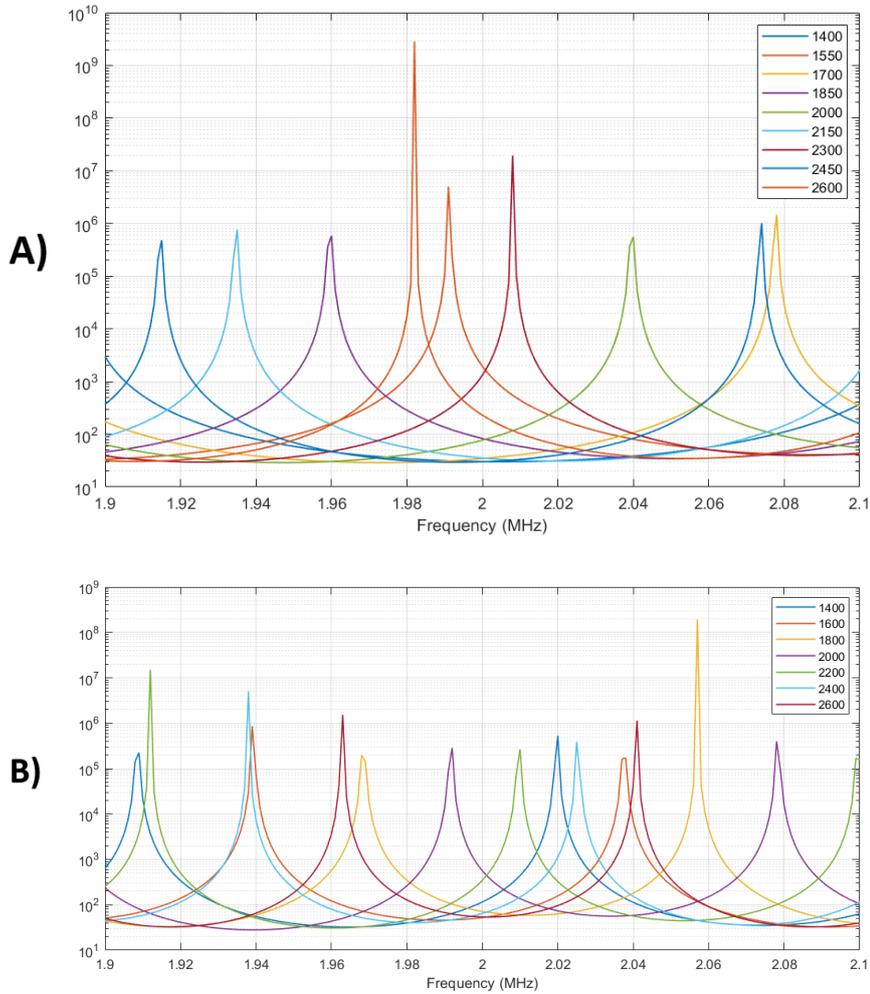
respecter les conditions aux limites de chaque interface. Il faut donc, en théorie, adapter la hauteur de chaque couche afin d'avoir une fréquence de résonance correspondant à chaque milieu traversé. Cela donnerait un système très restrictif, tant sur sa conception que son utilisation. De plus, il est expérimentalement impossible d'obtenir une telle concordance des hauteurs sur les différentes couches.

Nous avons observé les fréquences de résonance des puces via l'intensité acoustique en fonction de la fréquence. L'intensité acoustique est donnée directement par COMSOL grâce aux modules utilisés. En acoustique, elle est définie comme la moyenne temporelle du taux instantané de transfert d'énergie par unité de surface :

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T p v dt \quad (3.1)$$

avec  $p$  la pression et  $v$  la vitesse acoustique. La figure 3.5 montre l'intensité acoustique maximale et minimale pour différentes fréquences au sein d'une puce multi-noeuds avec une hauteur de PDMS de 2 mm. On peut voir 2 fréquences de résonance se distinguer sur cette figure. La fréquence 1,99 MHz et celle à 2,00 MHz. La chambre est donc bien conçue pour une fréquence de 2 MHz.

On peut voir sur la figure 3.6 une étude de la fréquence de résonance pour un système à 3 couches. Différentes épaisseurs de PDMS sont simulées afin de voir l'impact de celui-ci sur la fréquence de résonance. Cette simulation est basée sur l'étude de Folds [Folds



**Figure 3.6** **Fréquences de résonances au sein des puces acoustofluidiques** Représentation de l'hétérogénéité des fréquences de résonance en fonction de la hauteur de PDMS. En pratique, le phénomène de résonance est fortement lissé ce qui amène à une large bande d'utilisation pour ces systèmes. La légende indique l'épaisseur de la couche de PDMS en  $\mu\text{m}$ . **A)** Fréquences de résonance pour la puce mono-noeud **B)** Fréquences de résonance pour la puce multi-noeuds

and Loggins, 1977]. On peut observer sur les figures 3.5 et 3.6, respectivement issues des simulations COMSOL et MATLAB, la correspondance de la fréquence de résonance pour une hauteur de PDMS  $h_{PDMS} = 2000 \mu m$  qui se situe à  $\approx 1,99$  MHz.

### Facteur de qualité

On peut déduire, via ces deux études, le facteur de qualité (ou Q-factor) de cette chambre. Il peut être calculé en divisant la fréquence de résonance  $f_R$  par la largeur de bande  $\Delta f$  du pic de résonance [Dual et al., 2012]. La largeur de bande est généralement donnée comme la différence entre deux fréquences  $\Delta f = f_+ - f_-$  déterminées lorsque l'intensité atteint la moitié de celle de la fréquence de résonance  $f_R$ .

$$Q = \frac{f_R}{\Delta f} \quad (3.2)$$

Pour ce modèle COMSOL, lorsque l'on regarde les deux fréquences de résonance à 2 MHz et à 1,99 MHz, on obtient un Q-factor d'environ  $Q \approx 180$ .

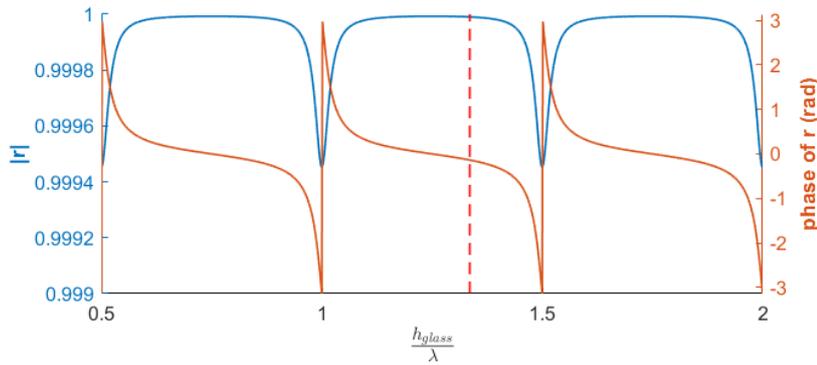
### Limites actuelles

On observe cependant que selon l'épaisseur de PDMS, la fréquence de résonance n'est pas la même et peut varier de façon significative. Les moyens actuels de production des puces ne nous permettent ni la précision ni la répétabilité nécessaire pour assurer une fréquence de résonance constante. En effet, malgré un volume fixe de PDMS qui est versé dans les moules, on observe des variations de hauteurs dues à la grande viscosité du PDMS. De plus, si le moule n'est pas posé sur une surface parfaitement plane, il en résulte un léger gradient à l'intérieur du moule. C'est pourquoi nous ne traiterons que peu les variations en fréquences dans ces puces.

De la même manière, le coefficient de réflexion de l'onde acoustique détaillé au chapitre 1 est valide pour des couches d'épaisseur infinie. Il est possible de revoir ces coefficients en considérant une couche réfléchive d'épaisseur finie (verre) et une seconde couche derrière celle-ci avec une longueur infinie (air) avec l'expression suivante [Kinsler et al., 2000] :

$$r_{eau \rightarrow verre} = \frac{Z_{verre}(Z_{air} - Z_{eau}) + j(Z_{verre}^2 - Z_{eau}Z_{air})\tan(k_{verre}h_{verre})}{Z_{verre}(Z_{air} + Z_{eau}) + j(Z_{verre}^2 + Z_{eau}Z_{air})\tan(k_{verre}h_{verre})} \quad (3.3)$$

avec  $h_{verre}$  l'épaisseur de la lame de verre. Comme le montre le graphique sur la figure 3.7, l'amplitude réfléchie reste très proche de 1 et la phase proche de 0 impliquant la condition de ventre de pression. Une lame de verre joue très bien son rôle de réflecteur au sein du système. Il se trouve que si l'épaisseur de la couche réfléchive est proche de la valeur  $\frac{\lambda}{4} + n\frac{\lambda}{2}$ , on dit que l'épaisseur de la couche est adaptée et alors le matériau composant cette couche n'influera ni sur l'amplitude ni sur la phase qui resteront proches de 1 et 0 respectivement due à la très faible impédance acoustique de l'air.



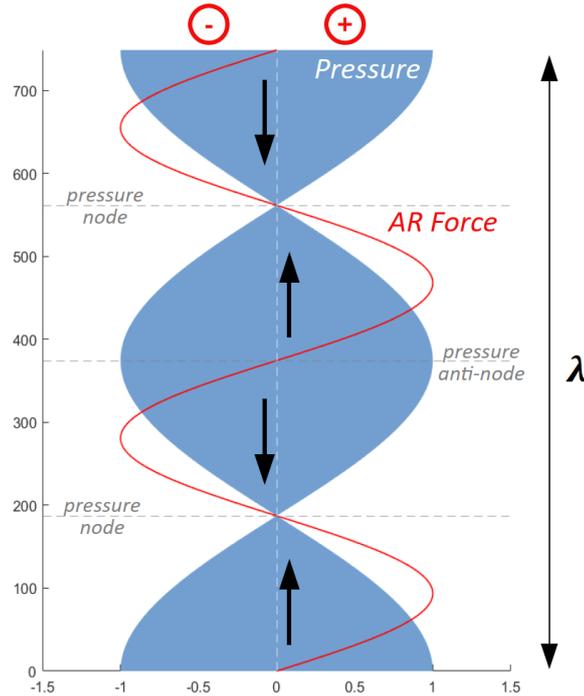
**Figure 3.7 Norme et phase du coefficient de réflexion en pression** La norme du coefficient de réflexion correspond à l'amplitude réfléchi tandis que la phase définit si la condition au niveau de la paroi impose un noeud ou un ventre de pression. On considère les valeurs d'impédances de l'eau, du verre et de l'air données au chapitre 2. La ligne en pointillé rouge correspond à ce système, donc au ratio épaisseur sur longueur d'onde pour une lame de verre de 1 mm et une fréquence de 2,00 MHz.

## 3.2 Mesure de l'ARF axiale

Afin de quantifier l'agrégation et la lévitation acoustique au sein des chambres acoustofluidiques, nous avons déterminé la force de radiation acoustique exercée sur les particules, cellules et agrégats par différents moyens. L'objectif est de pouvoir prédire le comportement des cellules et agrégats selon le champ acoustique appliqué en vue de l'étude des contraintes mécaniques. Comme expliqué dans le chapitre 1, l'ARF présente dans une cavité résonante unidirectionnelle à ondes stationnaires peut être décomposée en deux composantes distinctes, l'une axiale et l'autre transversale. Dans cette partie, nous nous intéressons aux différentes méthodes que nous avons développées au sein de l'équipe pour mesurer l'ARF axiale. On peut voir sur la figure 3.8 la représentation de l'ARF et de la pression acoustique sur une distance égale à la longueur d'onde  $\lambda \approx 750 \mu m$  et pour une fréquence  $f = 2 MHz$ .

Quelle que soit la méthode utilisée, les forces agissant sur les particules restent identiques. Comme illustré figure 3.9, nous avons en premier lieu le poids de la particule ainsi que sa poussée d'Archimède que nous regrouperons dans la flottabilité. La flottabilité s'exprime ainsi :  $\vec{F}_{flot} = (\rho_p - \rho_0) V_p \vec{g} = \Delta\rho V_p \vec{g}$  où  $\rho_p$  et  $\rho_0$  sont, respectivement, la densité de la particule et du milieu et  $V_p$  le volume de la particule. La particule subit également la force de Stokes ou traînée :  $\vec{F}_{Sto} = -3\pi \eta d_p \vec{v}_p$  avec  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide,  $d_p$  le diamètre de la particule et  $\vec{v}_p$  son vecteur vitesse. Cette force dépend de la vitesse de la particule et regroupe donc les phénomènes de traînée, de streaming ou d'injection. A cela s'ajoutent bien évidemment l'ARF que l'on décompose comme suit :  $\vec{F}_{ax} = \Phi V_p E_{ac} k \sin(2kz) \vec{e}_z$  pour la force axiale et  $\vec{F}_{trans} = 3V_p \frac{\bar{p}-1}{2\bar{p}+1} \frac{\partial E_{ac}}{\partial r} \vec{e}_r$  pour la force transversale, car elle ne sera étudiée qu'au niveau d'un noeud de pression.

Nous faisons l'hypothèse d'un régime dilué afin d'éviter les interactions entre particules. Nous négligeons donc les forces de Bjerknes. Dans le cas d'agrégats ou de particules



**Figure 3.8** Profil axial de la pression acoustique et de la force de radiation acoustique

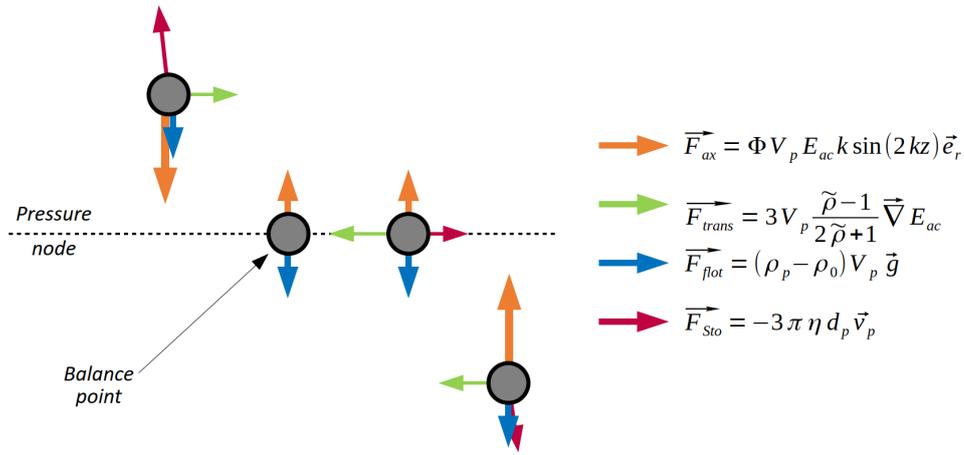
de grande taille par rapport à la longueur d'onde, les formules des forces de radiations acoustiques axiale et latérale ne sont pas applicables. Nous reviendrons sur ce point en particulier dans la discussion. La figure 3.9 représente donc les différentes forces prises en compte agissant sur les particules.

### 3.2.1 Méthode de mesure par PIV

#### Description de l'approche

La première méthode utilise les chambres multi-noeuds avec un accès optique latéral afin d'effectuer une Vélocimétrie par Image de Particules (PIV) sur les billes lors de l'agrégation selon l'axe vertical  $z$ . Il est également possible de faire du suivi de particules si celles-ci sont moins concentrées. Cette méthode est entièrement détaillée dans l'article de Jeger-Madiot, Mousset et al. [Jeger-Madiot et al., 2022]. Dans cet article, nous utilisons des chambres différentes dont le transducteur est directement en contact avec le milieu. Il n'y a donc pas de paroi supérieure en PDMS entre le transducteur et la chambre.

Dans cette expérience, nous utilisons des billes de polystyrène de  $15 \mu\text{m}$  de diamètre. En prenant les valeurs détaillées en A, on peut facilement calculer leur flottabilité :  $\vec{F}_{flot} = (\rho_p - \rho_0)V_p \vec{g} = 0,75 \text{ pN}$ . Cette force, en comparaison à celle de l'ARF axiale, est très faible et peut être négligée. Une autre force que nous ne prendrons pas en compte est l'ARF transversale. En effet, nous avons déjà détaillé dans le chapitre 1 que l'ARF transversale est orthogonale à l'ARF axiale. Comme nous nous intéressons ici au mouvement vertical des particules, l'ARF transversale n'interviendra pas dans ces mesures.



**Figure 3.9** Schéma représentant les différentes forces s'exerçant sur une particule au sein d'une puce acoustofluidique. Dans ce système, les particules sont soumises aux forces de flottabilité, de l'ARF et de Stokes. L'expression de l'ARF transversale est celle définie pour des particules situées au noeud de pression comme décrit au chapitre 1.

Les forces restantes sont donc l'ARF axiale et la force de Stokes. La seconde loi de Newton nous donne l'équation suivante pour chacune des particules observées :  $m \vec{a} = \vec{F}_{ax} + \vec{F}_{Sto}$ . Si le mouvement de la particule est lent et si la particule est petite, les effets d'inertie peuvent également être négligés en toute sécurité [Augustsson et al., 2011] [Bruus, 2012b]. On peut donc maintenant simplifier la seconde loi avec :

$$\vec{F}_{ax} = -\vec{F}_{Sto} \quad (3.4)$$

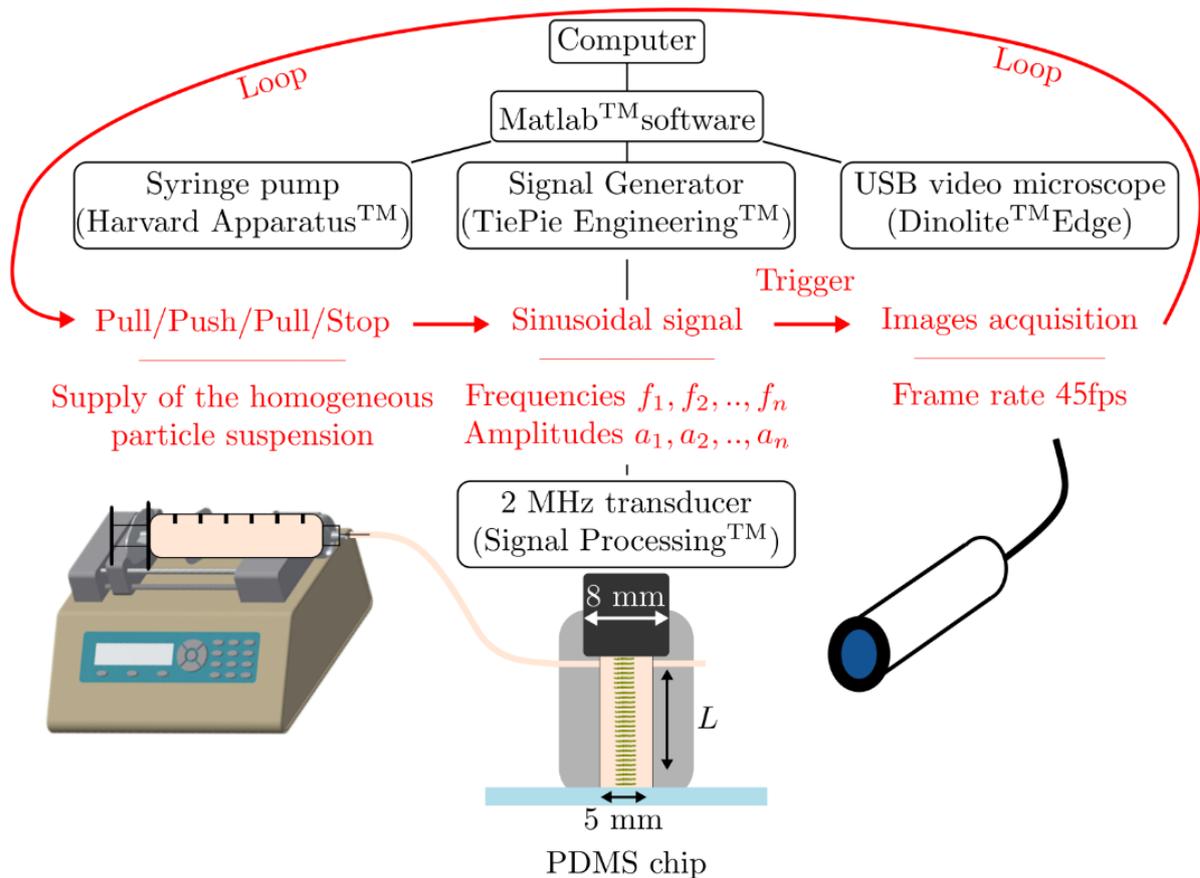
$$\Phi V_p E_{ac} k \sin(2kz) = 3\pi \eta d_p v_p$$

avec  $\Phi = \frac{5\tilde{\rho}-2}{2\tilde{\rho}+1} - \frac{1}{\tilde{\rho}c^2}$  le facteur de contraste acoustique,  $k$  le nombre d'onde,  $E_{ac}$  l'énergie acoustique moyenne,  $\eta$  la viscosité dynamique du milieu,  $z$  la position de la particule et enfin  $V_p$ ,  $d_p$  et  $v_p$  le volume, le diamètre et la vitesse de la particule respectivement. On voit avec l'équation 3.4 que la mesure de la vitesse de la particule est suffisante pour déduire l'ARF axiale, sous réserve de connaître son diamètre et la viscosité du milieu. Cette force dépend de différents paramètres et dépend du type de particule utilisé. La grandeur intéressante est l'énergie acoustique moyenne  $E_{ac}$  qui caractérise la cavité acoustique. Elle ne dépend pas des particules, mais uniquement du champ d'onde acoustique. Il est possible de la déduire à partir de l'amplitude de la vitesse si l'on connaît les propriétés des particules avec la relation :

$$E_{ac} = \frac{3\pi \eta d_p v_p}{\Phi V_p k \sin(2kz)} = \frac{18\eta}{\Phi k d_p^2} |v_p| \quad (3.5)$$

### Description de l'expérience

Pour cette expérience, la puce est reliée par des tubes à un tire-seringue d'un côté et un bécher contenant des particules et un agitateur magnétique de l'autre comme illustré



**Figure 3.10 Schéma du dispositif expérimental de mesure par PIV** Un ordinateur équipé de *MATLAB* contrôle l'ensemble de la boucle constituée de trois étapes : homogénéisation des particules dans la chambre, ajustement des paramètres acoustiques et enfin, activation des US et de l'acquisition d'images. La même séquence est répétée en boucle fermée pour permettre une large étude paramétrique. Issu de [Jeger-Madiot et al., 2022]

figure 3.10. Le tire-seringue va permettre l'injection de particules via le bécher. Lorsque les particules sont placées à l'intérieur de la puce, une simple succession d'aller-retours permet de les homogénéiser dans le volume de la chambre. Lorsqu'une suspension homogène est créée, la caméra et le transducteur sont activés simultanément jusqu'à ce que les particules atteignent le plan de lévitation afin de minimiser le nombre d'images à traiter. Les étapes d'homogénéisation et d'acquisition d'images sont automatisées de façon à balayer un grand nombre de paramètres. Au cours de cet article, un balayage en fréquence est réalisé afin de mesurer finement les variations d'énergie acoustique. Nous nous intéressons ici à la variation en amplitude de l'onde acoustique pour observer les variations d'énergie acoustique.

### Méthode PIV (Particle Image Velocimetry)

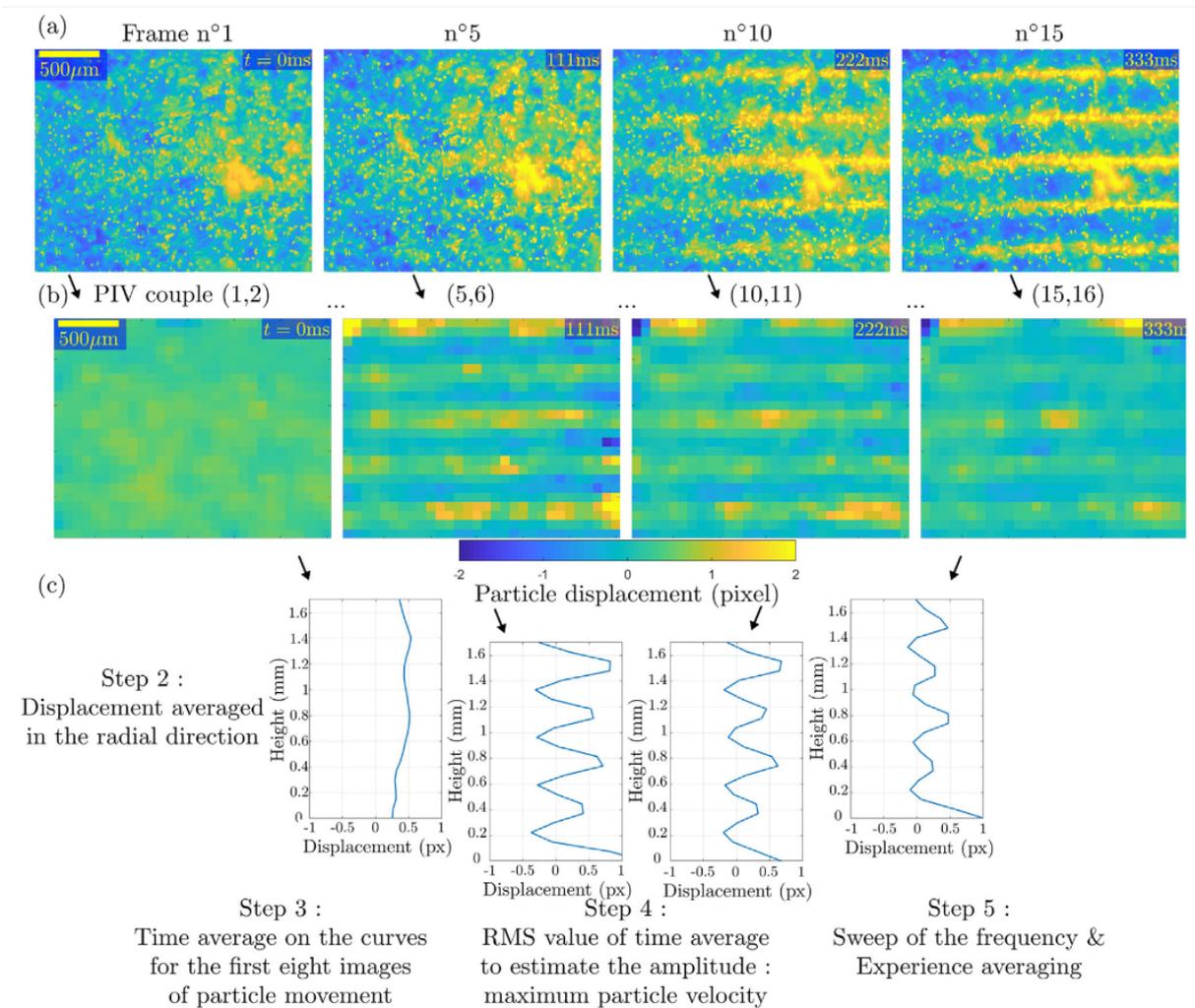
Une fois les enregistrements effectués, une méthode par PIV, ou par tracking selon la concentration de particules définie, est utilisée sur les images. La PIV est une technique généralement utilisée pour mesurer des champs de vitesse à partir de traceurs. Elle est couramment utilisée en mécanique des fluides pour mesurer les mouvements de fluides. En effet, si les traceurs sont suffisamment petits, ils vont suivre les déplacements des éléments de fluides.

Le principe consiste à calculer la corrélation croisée sur une paire d'images entre deux instants successifs [Willert et al., 2007]. Chaque paire d'images est découpée en plusieurs fenêtres d'interrogation permettant le calcul d'un vecteur vitesse local. Cette méthode estime le déplacement relatif du motif compris dans la fenêtre d'interrogation. Nous avons utilisé l'application PIVlab sur *MATLAB*, développé par Thielicke [Thielicke, 2014] [Thielicke and Stamhuis, 2014].

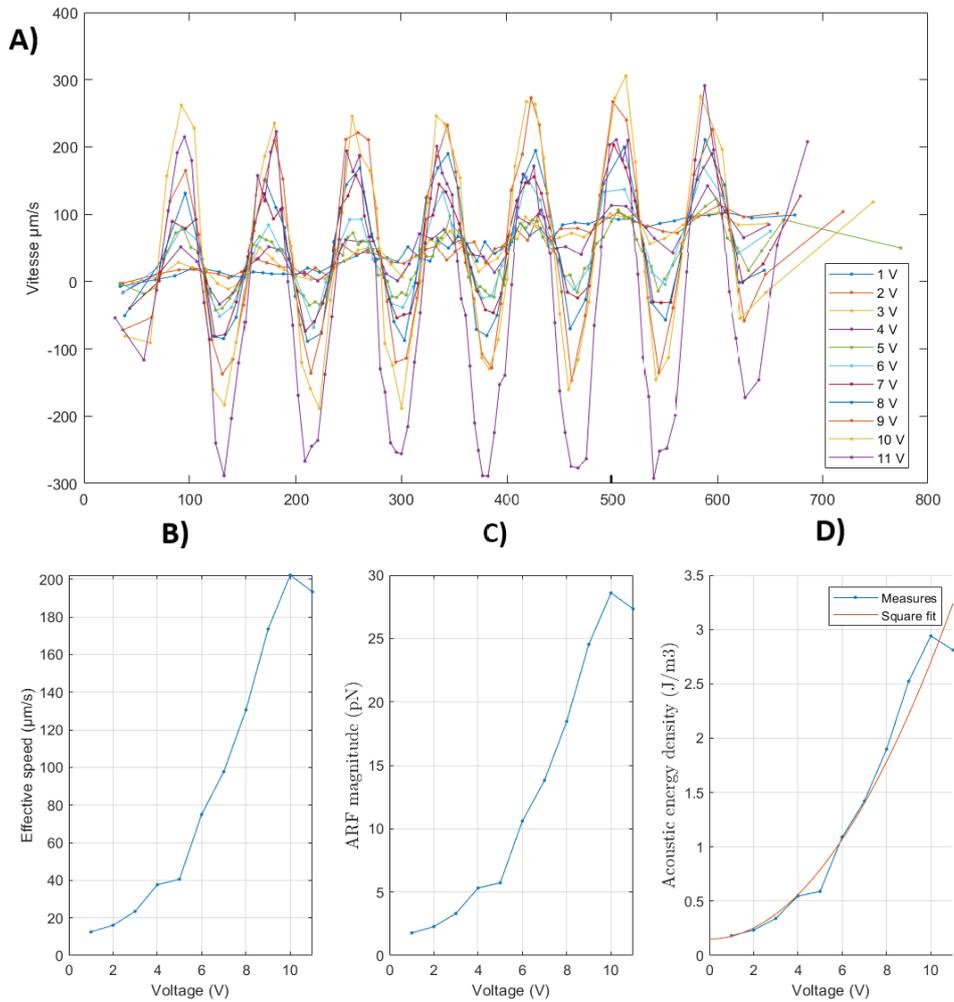
A partir des films de focalisation des particules vers les nœuds acoustiques, nous extrayons la carte des vitesses via PIVlab comme illustré figure 3.11. Nous avons utilisé une taille de fenêtre de 64 pixels pour la première passe. La deuxième passe a utilisé une fenêtre de 32 pixels. Dans les deux cas, nous avons utilisé un recouvrement de 50% pour augmenter la résolution spatiale. Aucun seuil d'intensité ou pré-traitement n'a été appliqué aux images brutes. En effet, nous cherchons à extraire un profil axial, et non pas un champ 2D instantané de bonne qualité. Un profil sinusoïdal est obtenu en moyennant le champ selon la direction transversale.

Les mesures effectuées nous donnent accès aux vitesses de focalisation acoustique verticales au sein des puces. Avec la détermination des maxima de vitesse des particules dans l'axe vertical  $z$ , nous pouvons déduire le profil de l'ARF axiale et l'énergie acoustique en fonction de l'amplitude comme présentée figure 3.12. On voit que pour des amplitudes faibles, il est difficile de pouvoir correctement estimer la vitesse de focalisation. Les billes subissent une ARF trop faible et ont, par conséquent, une faible vitesse.

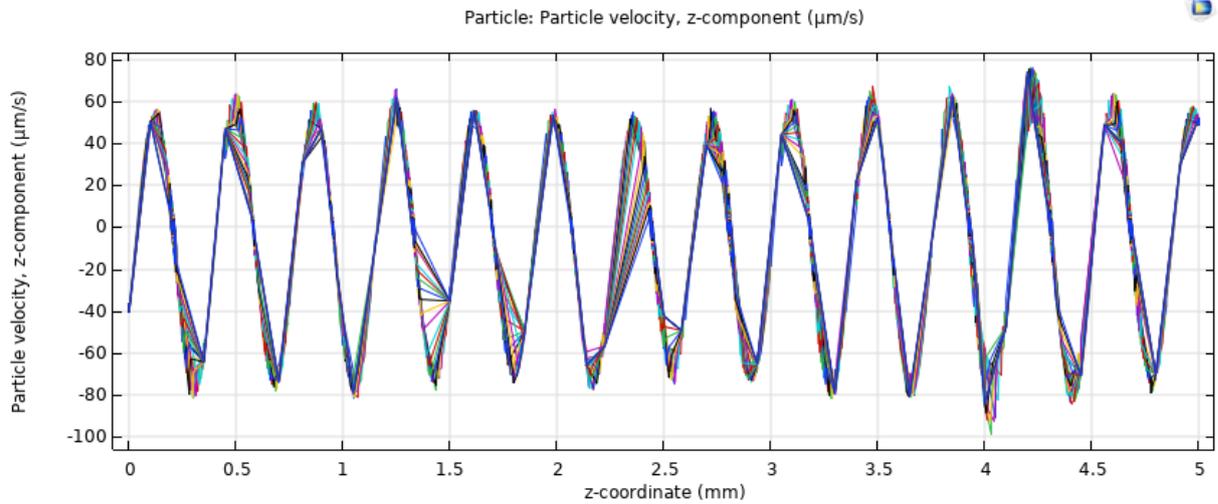
Les hypothèses et les conditions de mesures nous permettent d'identifier le profil des vitesses pour les voltages compris entre 3 et 11 volts. Nous voyons sur ces courbes les nœuds et ventres de pression. Un nœud est observé lorsque la vitesse des billes passe d'une valeur positive à négative (les billes se dirigent vers le zéro), tandis qu'un ventre



**Figure 3.11** Mesure des vitesses de focalisation de billes de polystyrènes par PIV (a) Images en niveaux de gris et en vue latérale d'une puce multi-noeuds au cours d'une focalisation à 45 fps, 7 V et 2 MHz. (b) Résultats PIV après traitement des images avec PIVlab. (c) Étapes de post-traitement des champs de vitesse : les champs PIV sont moyennés spatialement le long de la direction transversale, ce qui conduit à un profil vertical de la vitesse axiale à partir duquel l'amplitude de la vitesse est dérivée. La dernière étape consiste à faire varier la fréquence et/ou l'amplitude acoustique pour évaluer l'évolution de la vitesse des particules en fonction de l'onde acoustique émise. Issu de [Jeger-Madiot et al., 2022]



**Figure 3.12 Mesures de vitesses de focalisation axiale** **A)** Superposition des vitesses de focalisation axiales pour des billes de polystyrène de  $15 \mu\text{m}$  de diamètre par méthode PIV pour une tension appliquée au transducteur de 1 à 11 Vpp. **B)** Vitesses efficaces de focalisation axiale en fonction du voltage. **C)** Amplitude de l'ARF axiale en fonction du voltage. **D)** Energie acoustique moyenne mesurée avec son fit selon une loi proportionnelle au carré du voltage en fonction du voltage.



**Figure 3.13 Vitesses de focalisation des particules par simulation** Valeurs des vitesses de focalisation axiale de particules simulées via le modèle COMSOL.

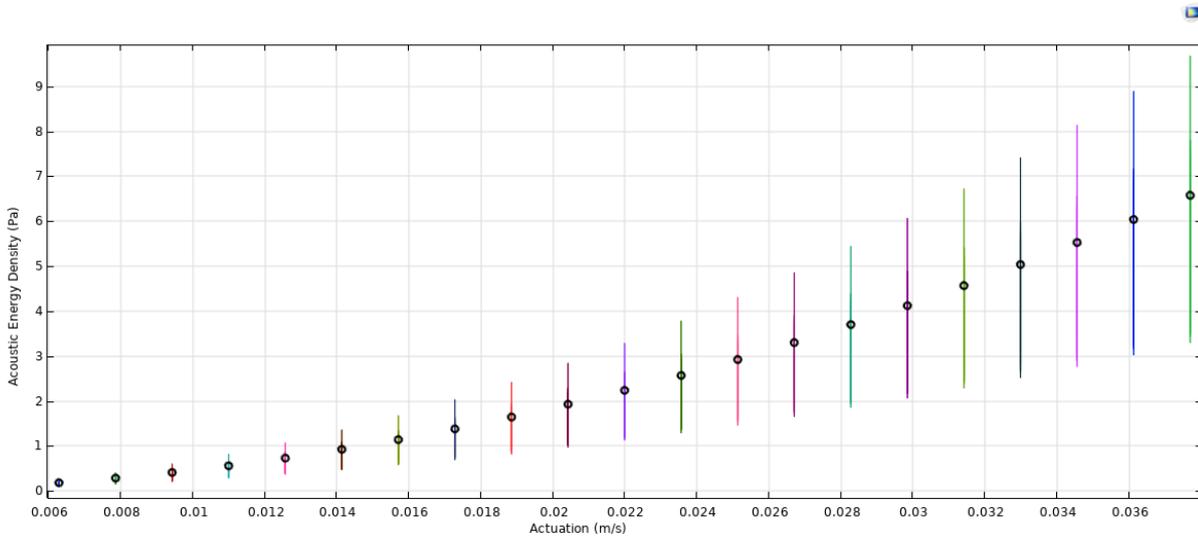
correspond au passage négatif à positif (les billes s'écartent du zéro). Comme le montre la figure 3.13, nous observons un profil des vitesses de particules similaires entre numérique et expérimental. Il est possible d'ajuster la valeur l'amplitude de l'onde acoustique (condition de vitesse du transducteur) afin de faire concorder le modèle et les mesures expérimentales. Avec la valeur typique de  $v_{in} = \omega\delta$  que nous avons prise initialement pour ce modèle, nous obtenons des vitesses de l'ordre de 50  $\mu\text{m/s}$ . Les valeurs expérimentales vont 20  $\mu\text{m/s}$  à 200  $\mu\text{m/s}$ . La valeur initiale est donc tout à fait pertinente et correspond à une tension de 4 V pour ce système.

Comme attendu, plus on augmente l'amplitude de l'onde acoustique et plus la vitesse de focalisation des particules augmente comme le montre les graphiques de la figure 3.12 A) et B). Il a été démontré dans la littérature qu'il existe une relation linéaire entre la tension crête à crête  $U_{pp}$  appliquée au transducteur piézoélectrique et l'amplitude de la pression acoustique  $p_a$  générée par celui-ci [Dual and Möller, 2012, Bruus, 2012b]. En utilisant la propriété définie au chapitre 1 avec l'équation 1.7, on peut écrire la relation suivante :

$$F_{ax} \propto E_{ac} \propto p_a^2 \propto U_{pp}^2 \quad (3.6)$$

Les graphiques B) à D) de la figure 3.12 résument les différentes valeurs pour la vitesse efficace de focalisation des particules ( $v_{eff} = \frac{v_a}{\sqrt{2}}$  avec  $v_a$  l'amplitude de la vitesse et  $v_{eff}$  la vitesse efficace), l'amplitude de l'ARF axiale et l'énergie acoustique moyenne pour différents voltages. On peut voir la relation de proportionnalité entre le voltage au carré et l'énergie acoustique décrite par l'équation 3.6 dans cette figure. On obtient des résultats similaires avec le modèle COMSOL comme le montre la figure 3.14.

Cette méthode de caractérisation pour ces puces multi-noeuds nous permet de déterminer l'énergie acoustique présente dans ce système. Nous pouvons également déterminer la force et la vitesse d'agrégation des particules, mais ces dernières varient selon la taille et



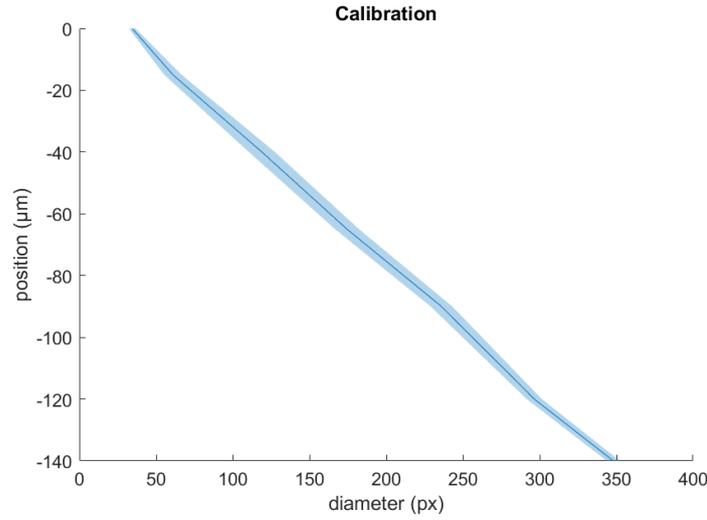
**Figure 3.14 Simulation COMSOL de l'énergie acoustique maximale et minimale pour différentes actuations du transducteur** Simulation pour les valeurs  $h_{PDMS} = 2000 \mu m$ ,  $h_w = 5000 \mu m$  et  $f = 2 MHz$ . Les valeurs sont proportionnelles à l'actuation ( $v_{in}$ ) au carré comme le montre les cercles noirs calculés avec l'expression suivante  $E_{circle} = (\frac{v_{in}}{0,0147})^2$

les propriétés acoustiques de ces particules. Avec les particules de polystyrène de  $15 \mu m$  de diamètre, les valeurs obtenues sont d'environ  $50 \mu m/s$  à  $5 V$  et d'environ  $200 \mu m/s$  à  $10 V$  pour la vitesse effective. On rappelle que  $v_p = v_{eff} \sqrt{2}$ . On rappelle également que la force et la vitesse sont linéairement dépendantes du volume de la particule, donc  $F_{ax} \propto v_p \propto d_p^3$ . Pour finir sur les rappels, la force et les vitesses décrites ici correspondent aux maxima de l'ARF et des vitesses qui sont dégressives jusqu'au noeud de pression (voir figure 3.8). Afin de vérifier l'hypothèse de départ, nous pouvons comparer la force mesurée à la flottabilité des billes de polystyrène précédemment calculée  $\vec{F}_{flot} = (\rho_p - \rho_0) V_p \vec{g} = 0,75 pN$ . On peut voir qu'à  $5 V$  l'ARF est environ égale à 10 fois la flottabilité des particules et qu'à  $10 V$ , c'est environ 40 fois. Négliger la flottabilité semblait donc raisonnable et n'impacte que peu les résultats.

### 3.2.2 Méthode de mesure par technique de défocalisation

Une autre méthode plus ancienne développée au sein de l'équipe repose sur la détection des anneaux d'Airy d'une particule. Elle s'appuie sur la technique de défocalisation pour mesurer la position de la particule [Adrian, 1986]. Elle a été développée au sein de notre équipe par Dron [Dron, 2011, Dron and Aider, 2012] puis utilisée et améliorée par Dumy [Dumy, 2019] et Bellebon [Bellebon et al., 2022].

La puce mono-noeud n'ayant pas d'accès optique latérale, elle ne permet pas une observation des particules de côté. Sa faible hauteur ( $1,5 mm$ ), sa forme et la méthode de production des puces rendent difficile la mise en place d'une surface lisse pour l'observation. Nous avons essayé diverses méthodes pour obtenir cet accès optique latéral, comme implémenter un miroir incliné à  $45^\circ$  à l'intérieur de la puce à l'instar de certains systèmes



**Figure 3.15 Calibration des anneaux d'Airy** Mesures de calibration des anneaux d'Airy pour deux billes de polystyrène de 20 µm de diamètre.

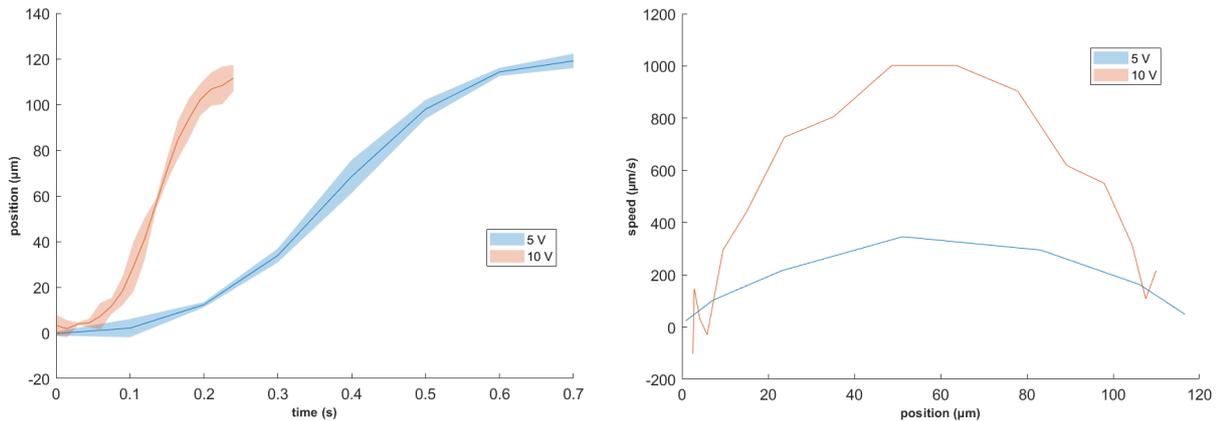
de la littérature [Galland et al., 2015, Beghin et al., 2022]. Cependant, nous n'avons pas obtenu de résultat probant jusqu'à maintenant.

Lorsque l'observation n'est possible que dans l'axe de propagation de l'onde, il est difficile de mesurer la position des particules. Un des moyens pour y parvenir est de s'appuyer sur les propriétés optiques des particules fluorescentes lorsqu'elles s'éloignent ou s'approche du plan focal. Cette méthode convient parfaitement à la mesure de l'énergie acoustique  $E_{ac}$  au sein de ces puces, leur accès optique se faisant par-dessous au travers de la lame de verre et donc dans l'axe du transducteur et de l'onde acoustique. Lorsqu'une particule est observée au plan focal d'un microscope, elle apparaît nette. Si cette particule s'éloigne de ce plan focal, alors elle devient floue et un anneau peut apparaître s'il s'agit d'une particule fluorescente. Le diamètre de cet anneau, appelé 'tâche d'Airy' ou 'anneau d'Airy', dépend de la position de la particule par rapport au plan focal. Il est possible de calibrer cette relation entre la taille de l'anneau et la position d'une particule de polystyrène de 20 µm de diamètre dans la figure 3.15 en mesurant la position avec le microscope.

A partir de cette calibration, nous pouvons remonter à la position selon l'axe  $z$  des particules lors de la focalisation (Fig. 3.16). La vitesse de focalisation des particules, notamment la vitesse maximale  $v_p$ , est déduite grâce à cette calibration et aux mesures lors de la remontée d'une particule sous acoustique. Cette vitesse permet de déterminer la force de radiation acoustique en utilisant la force de Stokes avec l'équation suivante :

$$F_{ax} = 3\pi \eta d_p v_p \quad (3.7)$$

avec  $\eta$  la viscosité dynamique de l'eau et  $d_p$  le diamètre de la particule. On déduit pour les voltages de 5 et 10 V les valeurs suivantes : une vitesse maximale de focalisation de 250 et 950 µm/s, une ARF de 50 et 180 pN ainsi qu'une densité d'énergie acoustique de 2 et 8 J/m<sup>3</sup> respectivement.



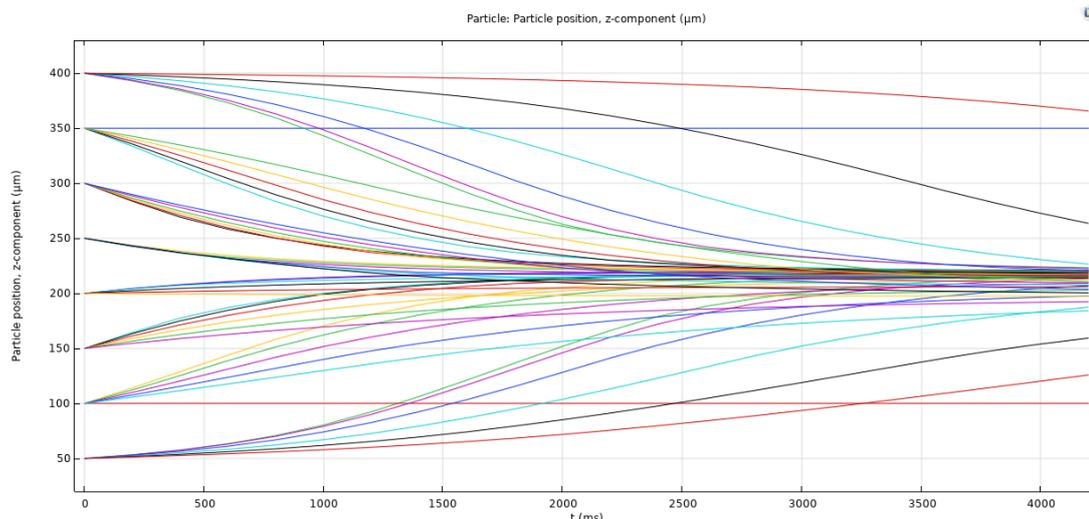
**Figure 3.16** Mesure de focalisation de particules à 2 voltages différents Positions déduites à partir de la calibration et de la mesure des anneaux d’Airy à différents instants de trois billes de polystyrène de 20 µm pour un voltage de 5 et de 10 V (à gauche). Vitesses des particules en fonction de leur position dans l’axe  $z$  déduites des moyennes du premier graphe (à droite).

Les courbes de positions suivent avec fidélité la description théorique de l’ARF. On peut voir sur la figure 3.17 la position au cours du temps de plusieurs particules simulées avec le modèle COMSOL. Sur cette figure, on peut observer que pour une même position initiale  $z$ , plusieurs courbes de positions sont générées. Nous avons en effet simulé l’agrégation de particules à différentes positions  $z$ , mais également à différentes positions  $x$  ce qui explique que plusieurs courbes sont issues d’une même position  $z$ . Comme le champ acoustique varie légèrement selon l’axe des  $x$ , on observe des vitesses d’agrégations différentes induisant des courbes de positions différentes. Retenons que les particules les plus proches du centre du transducteur sont celles se focalisant le plus rapidement.

Les expériences et les simulations montrent que le profil des positions lors de l’agrégation des particules est identique entre celles simulées numériquement et celles des expériences.

Cette méthode est plus fastidieuse que la précédente, car elle implique de mesurer la remontée d’une seule bille et ne donne qu’un seul point de mesure. Il faut donc réussir à isoler au sein de la zone d’agrégation une unique bille pour pouvoir la mesurer puis répéter ce processus pour mesurer plusieurs billes différentes afin de multiplier les valeurs. On voit que les vitesses mesurées dans une puce mono-noeud sont légèrement supérieures à celles mesurées dans une puce multi-noeuds. Il est probable que cette différence provienne d’une moins bonne condition de résonance ainsi que d’une augmentation des pertes acoustiques au sein de la puce multi-noeuds par rapport à la puce mono-noeud.

Grâce à ces deux méthodes permettant de mesurer les vitesses de particules, nous déterminons l’énergie acoustique au sein des puces pour un voltage donné via l’équation 3.5. Une fois l’énergie acoustique déterminée, il est possible de déterminer le facteur de contraste acoustique  $\phi$  de différentes particules aux propriétés acoustiques inconnues comme des cellules. C’est ce qui a été fait par Bellebon et al. avec différents types cellulaires



**Figure 3.17 Positions de particules issues du modèle COMSOL au cours de la focalisation** Chaque ligne représente la position en  $z$  au cours du temps simulée dans le modèle. Ce sont des billes de polystyrène de  $20\ \mu\text{m}$  espacées de  $50\ \mu\text{m}$  selon l'axe  $z$  et de  $100\ \mu\text{m}$  selon l'axe  $x$  au sein d'une puce mono-noeud donc de hauteur  $1500\ \mu\text{m}$ . L'axe  $x$  n'est pas visible sur ce schéma, mais ce décalage en  $x$  des particules explique pourquoi certaines billes se focalisent plus vite que d'autres en partant de la même position en  $z$ . Seul le premier noeud de pression est visualisé sur ce graphique.

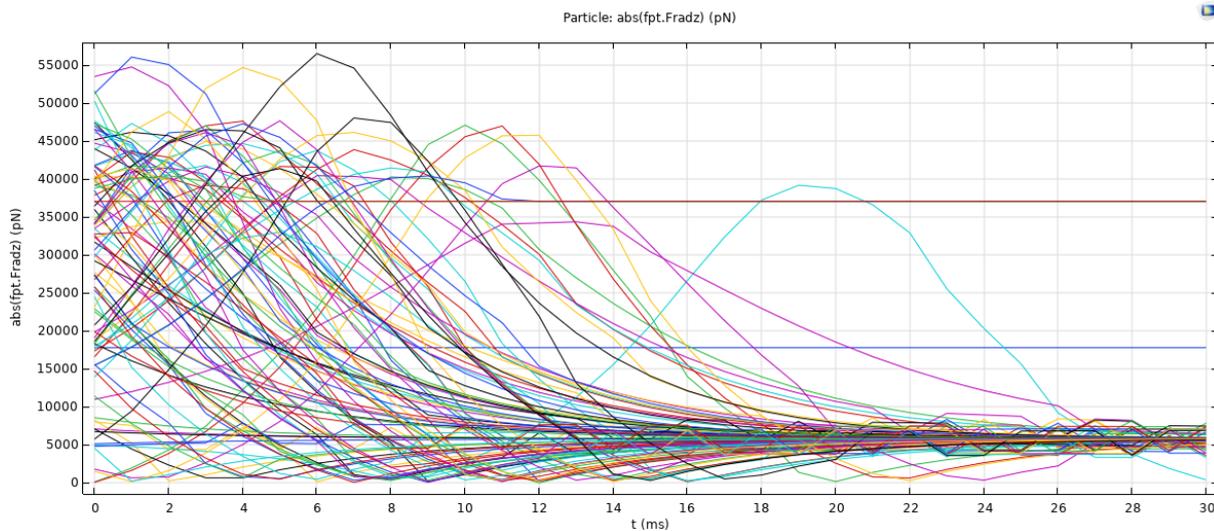
en utilisant cette seconde méthode [Bellebon et al., 2022, Bellebon, 2021]. Ils trouvent un contraste acoustique pour différentes cellules compris entre 0,1 et 0,3 ainsi qu'une densité d'environ  $1040\ \text{kg/m}^3$ .

En appliquant la même méthode de mesure présentée ici, nous trouvons une vitesse de sédimentation  $\approx 9\ \mu\text{m/s}$  et une vitesse de focalisation  $\approx 100\ \mu\text{m/s}$  pour cette lignée cellulaire de GB 6240. Ces mesures nous donnent une densité de  $\approx 1035\ \text{kg/m}^3$  et un contraste acoustique  $\Phi \approx 0,2$ . Comme nous le montrent les travaux de Bellebon [Bellebon, 2021], il est difficile de mesurer le facteur de contraste acoustique avec précision, de par la variation de taille, de densité et de propriétés acoustiques des cellules. Ces travaux montrent notamment que le facteur de contraste acoustique peut changer au fur et à mesure des passages.

### 3.2.3 Méthode de mesure par diminution de l'ARF

#### Principe de la méthode

La dernière méthode employée se base sur la compétition entre le poids des objets en lévitation et l'ARF. Elle permet la mesure des forces, notamment pour de grosses particules lorsque celles-ci sont à l'équilibre. L'idée de cette approche consiste à déterminer, entre autres, la valeur limite permettant d'équilibrer l'ARF et le poids de la particule. En pratique, nous diminuons, pas à pas, le voltage appliqué jusqu'à faire sédimenter l'objet en lévitation. Cela nous permet d'observer le changement de position dans l'axe  $z$  des



**Figure 3.18 Simulation de l'ARF au cours de la focalisation** On simule l'agrégation de particules dans un champ acoustique fixe au cours du temps. Lors de l'agrégation, la position de la particule va évoluer, de même que l'ARF que celle-ci subit. Nous représentons donc ici la valeur de l'ARF pour chaque particule de polystyrène de 300 µm de diamètre au cours du temps. On voit que l'ARF tend à s'équilibrer avec le poids des particules lorsque celles-ci atteignent leur position d'équilibre, à savoir environ 6000 pN.

particules comme des agrégats. On identifie le voltage critique permettant d'équilibrer le poids lorsque l'ARF n'est plus suffisante pour maintenir l'agrégat en lévitation.

### ARF à l'équilibre dans les simulations

Dans le modèle COMSOL, une particule ayant atteint sa position d'équilibre voit l'ARF qu'elle subit être équivalente à son poids comme le montre la figure 3.18. Dans cette simulation, le poids des particules est d'environ 6000 pN pour les particules de 300 µm de diamètre. On voit qu'au bout d'un certain temps, la force de radiation acoustique subie par chaque particule tend vers une valeur égale à celle de leur poids précédemment calculé. Une simulation similaire a été réalisée avec des particules de 20 µm de diamètre menant au même résultat (poids  $\approx 1,8$  pN).

### Mesures expérimentales sur des billes

Comme le montre l'équation 1.18 rappelé ici, l'ARF est nulle au noeud de pression et maximale à une distance  $\frac{\lambda}{8}$ . La force augmente donc si l'objet est déplacé d'une distance comprise entre 0 et  $\frac{\lambda}{8}$ . Dans l'hypothèse  $d_p \ll \lambda$ , le bilan des forces lorsque la particule est immobile s'écrit simplement :

$$\begin{aligned} \vec{F}_{flot} &= \vec{F}_{ac} \\ g \Delta\rho &= \Phi E_{ac} k \sin(2kz) \end{aligned} \tag{3.8}$$

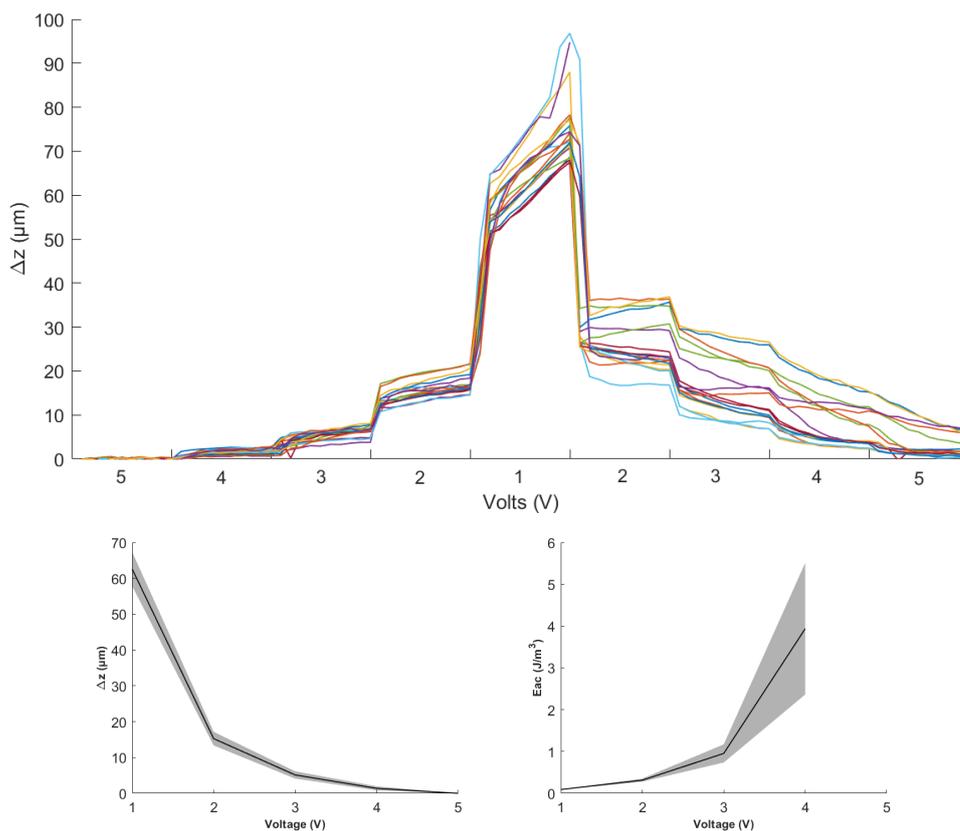
On peut alors en déduire l'ARF qui est égale au poids de la particule ainsi que l'expression de l'énergie acoustique :

$$E_{ac} = \frac{g \Delta\rho}{\Phi k \sin(2kz)} \quad (3.9)$$

La figure 3.19 illustre ce phénomène. Il s'agit de mesures de la distance au noeud de pression  $\Delta z$  de différents feuillets de billes de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre réalisées dans une puce multi-noeuds. Le voltage a été baissé de 1 Vpp toutes les 10 images (5 fps) en partant de 5 Vpp puis ré-augmenté lorsque l'on atteint 1 Vpp. On peut voir que les agrégats s'éloignent du noeud de pression lorsque l'on diminue le voltage. On remarque également que la diminution du voltage est très reproductible tandis que la remontée l'est beaucoup moins. On ne saisit pas encore bien l'origine de cette hystérésis, mais celle-ci intervient lorsque l'on dépasse le voltage critique. En effet, le voltage de 1 Vpp ne produit pas une ARF suffisante pour contre-balancer le poids des particules. Celles-ci sédimentent à une vitesse réduite. En effet, même si l'ARF est trop faible pour maintenir les particules en lévitation, elle est tout de même présente et ralentit leur chute. Cette sédimentation est visible sur la courbe lors du voltage 1 Vpp. Si l'ARF était suffisante, la courbe serait horizontale comme dans les autres cas. Il est possible de déterminer la vitesse de sédimentation avec la pente de la courbe sachant que chaque voltage est pris sur 10 images à une vitesse de 5 fps.

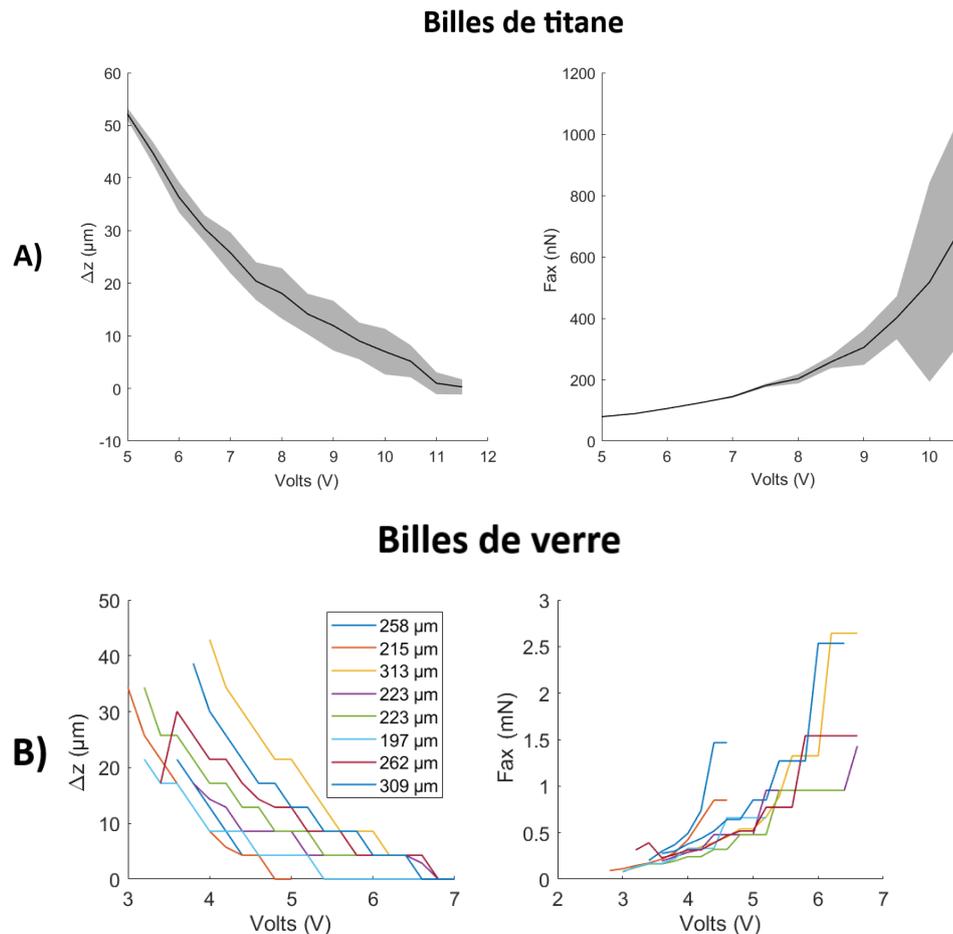
Le second graphique de cette figure montre la position moyenne des agrégats de particules en fonction du voltage et l'énergie acoustique équivalente calculée à partir de l'expression 3.9. Comme cette expression dépend d'un sinus, plus l'on est près du noeud de pression (donc proche de la position 0  $\mu\text{m}$  sur le graphique) et plus le sinus à d'importance. Sur le tracé de l'énergie acoustique, nous retrouvons la relation de proportionnalité  $E_{ac} \propto V_{pp}^2$  et nous retrouvons des valeurs proches de celles mesurées avec les précédentes techniques. Le choix des 5 V comme référence pour les cultures prend sens au regard de ces résultats, car à ce voltage, l'ARF est suffisante pour agréger les particules exactement au noeud de pression, facilitant leur immobilité. Elle est également suffisamment forte pour résister aux diverses perturbations que toutes cultures mises dans un incubateur commun subissent.

La densité des billes de polystyrène nous impose des mesures de force et d'énergie acoustique pour des bas voltages. En effet, plus l'objet observé est proche du noeud de pression et plus le sinus varie vite, ce qui se traduit par une perte de précision de la valeur estimée. Comme on peut le voir sur la figure 3.19, les mesures à 4 Vpp sont très peu précises et il nous est impossible de mesurer au-delà, car les billes de polystyrène atteignent le noeud de pression à 5 Vpp. Afin de pouvoir mesurer les forces sur des voltages plus importants, nous avons testé cette technique sur des billes plus grosses et plus denses. Pour cela, nous avons utilisé des billes de verre ( $\rho_{glass} \approx 2\rho_{ps}$ ) et des billes de titane ( $\rho_{Ti} \approx 4,5\rho_{ps}$ ) de diamètre respectif 250  $\mu\text{m}$  et 150  $\mu\text{m}$  environ. On peut voir sur la figure 3.20 qu'avec de telles billes, il est possible de mesurer différentes positions d'équilibre pour des voltages plus élevés. L'inconvénient d'utiliser de plus grosses billes



**Figure 3.19 Mesures de la position de billes de polystyrène en fonction du voltage**

Le graphique du haut montre les positions d'un feuillet de billes de polystyrène de  $20\ \mu\text{m}$  de diamètre au cours du temps lors d'une descente en voltage suivi d'une remontée en voltage. Pour chaque voltage, 10 images sont prises à une fréquence de 5 fps. Le graphique du bas montre les valeurs de positions et d'énergie acoustique pour les différents voltages au cours de la descente en voltage.

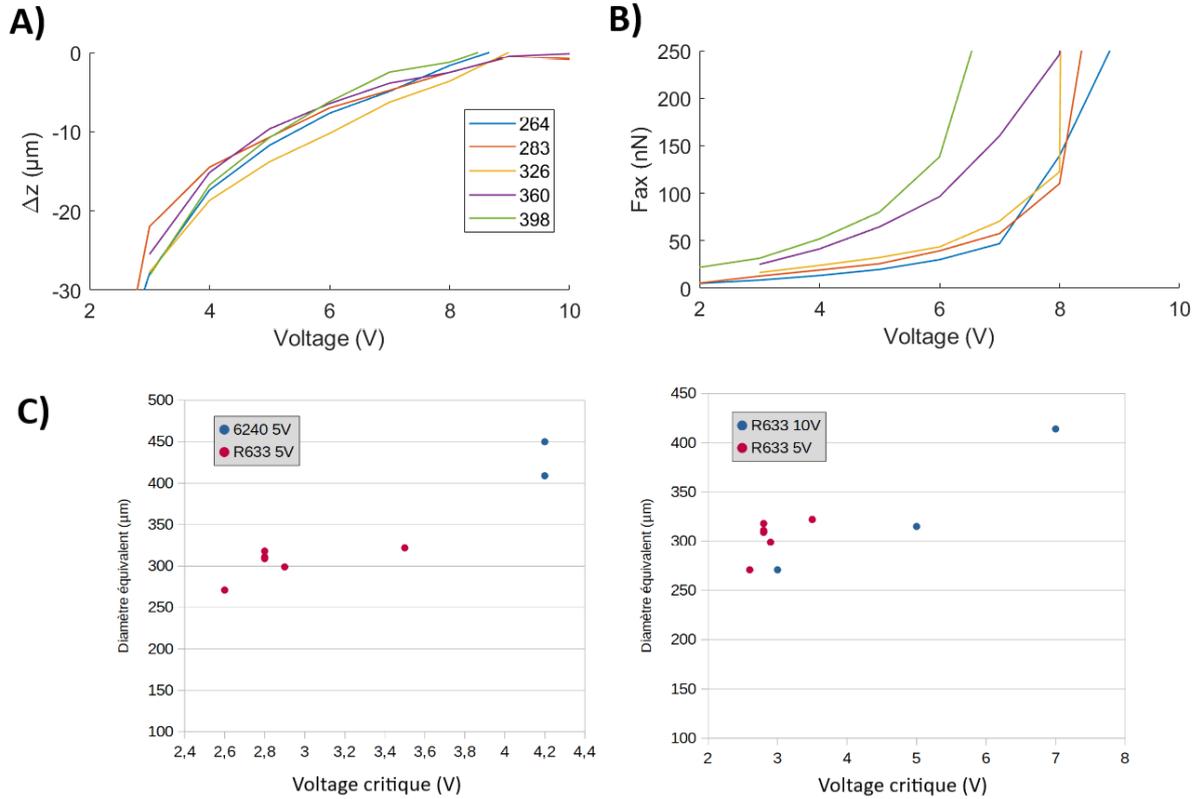


**Figure 3.20** Mesures de positions de billes de titanes puis de billes de verre en fonction du voltage Graphiques de la distance au noeud de pression (à gauche) et de l'ARF axiale déduite des  $\Delta z$  (à droite). **A)** Mesures faites sur des billes de titanes de même diamètre (150  $\mu\text{m}$ ). **B)** Mesures avec des billes de verres ayant des diamètres très inhomogènes (voir légende) ce qui rend les courbes non comparables les unes avec les autres.

est que l'hypothèse de Rayleigh n'est plus respectée ( $R_p \ll \lambda$ ). C'est pourquoi nous traçons non plus l'énergie acoustique, mais directement la force de radiation acoustique. En utilisant cette hypothèse et en appliquant le même modèle, on trouve des énergies acoustiques comprises 2,5 et 16,5  $\text{J}/\text{m}^3$  pour les billes de titanes entre 5 et 10 Vpp, et des énergies comprises entre 1 et 6  $\text{J}/\text{m}^3$  pour les billes de verre entre 3 et 6 Vpp. On reste donc proche des valeurs précédemment trouvées.

### Mesures expérimentales sur des sphéroïdes

De la même manière que pour les billes, il est possible de faire ce type de mesure avec des sphéroïdes. C'est ce que nous avons fait à la fin de cultures de cellules 6240 (3 jours à 10 Vpp et 2 MHz) sur le graphique **A)** de la figure 3.21. Ce graphique illustre notamment l'impossibilité de cultiver des agrégats de taille  $\approx 300 \mu\text{m}$  à des voltages inférieurs à 4 Vpp dans ce système. Le graphique **B)** montre l'ARF axiale calculée à partir des  $\Delta z$  en

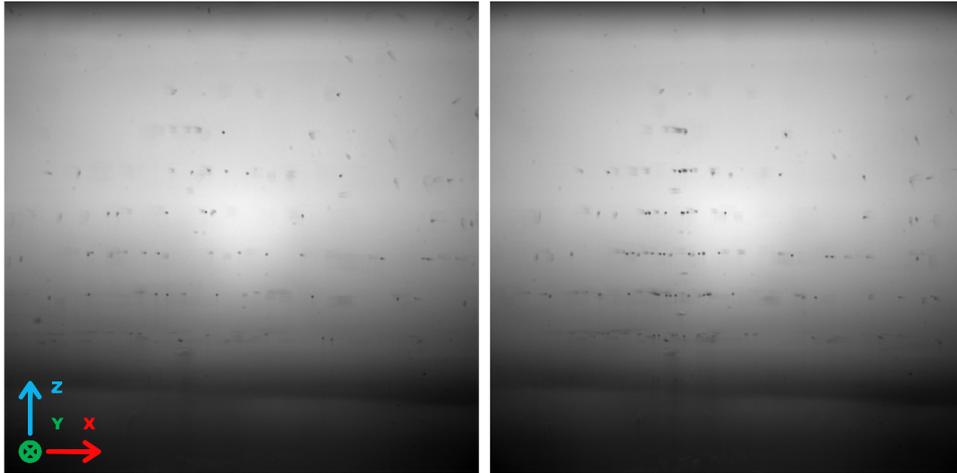


**Figure 3.21 Mesures de positions sur sphéroïdes de GB** **A)** Mesures de  $\Delta z$  pour des sphéroïdes 6240 cultivés 3 jours à 10 Vpp. Le balayage en voltage a été effectué à la fin de la culture. **B)** Valeurs de l'ARF axiale déduite des  $\Delta z$ . **C)** Graphiques des voltages critiques pour différents agrégats par rapport à leur diamètre équivalent.

considérant la valeur de densité trouvée pour les cellules 6240 ( $\approx 1035 \text{ kg/m}^3$ ). De ce graphe, on peut déduire qu'à voltage 5 Vpp, la valeur de la force acoustique s'appliquant au sphéroïde correspond à  $\approx 5$  fois la valeur de son poids. Si l'on considère que  $F_{ax} \propto U_{pp}^2$ , on peut déduire que la force acoustique s'appliquant au sphéroïde à 10 Vpp serait  $\approx 20$  fois la valeur de son poids.

Les graphiques en **C)** représentent le voltage critique  $V_c$  pour différents agrégats. Lorsque l'on diminue le voltage en fin de culture, le voltage critique correspond à celui pour lequel l'agrégat tombe du piège acoustique. On note qu'à une taille semblable, les agrégats cultivés à 10 Vpp semblent tomber plus facilement que ceux cultivés à 5 Vpp.

Ces résultats montrent que le plan de lévitation n'est pas le plan du noeud de pression comme l'ont discuté Dumy et al. [Dumy et al., 2020] dans les expériences en microgravité. Le plan de lévitation dépend de l'équilibre entre la force acoustique et le poids de l'objet en lévitation. On remarque qu'il existe une force (ou voltage) à partir de laquelle on n'observe plus de modification de la position des agrégats lorsque l'on continue de l'augmenter. On considère qu'au-delà de ce voltage, l'objet est positionné au noeud de pression. Dans notre



**Figure 3.22 Images de l'agrégation latérale de billes de polystyrène** Images servant au tracking de billes de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre agrégées à 5 Vpp et 2 MHz. Ces images sont espacées de  $\approx 5,5$  s et prises avec une caméra PCO Panda.

cas, nous ne détectons pas de différence de position sur les agrégats de GB au-delà de 8 à 9 Vpp.

### 3.3 Force de radiation acoustique transversale

L'autre composante de l'ARF à caractériser est la composante radiale décrite dans le chapitre 1. Afin de la mesurer, nous avons procédé à du suivi de particules afin d'obtenir leur vitesse. Le suivi de particules (tracking) est une méthode de détection des particules puis de suivi de ces particules au travers des différentes images. Pour la puce mono-noeud, un mapping 2D complet sur le plan de lévitation pourra être fait avec grâce à l'observation axiale de l'agrégation. La puce multi-noeuds sera, elle, caractérisée via une observation latérale et donc seulement selon une seule dimension.

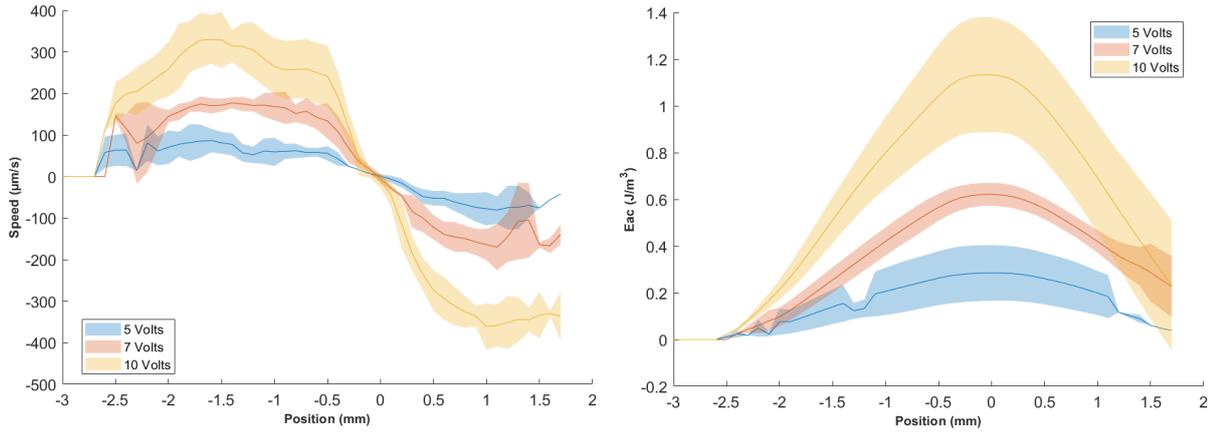
#### 3.3.1 Méthodes de tracking

##### Tracking par observation latérale

Des mesures réalisées avec une caméra *PCO* et des puces multi-noeuds (Fig. 3.22) ont été analysées sur le logiciel *FIJI*. La figure 3.23 montre des mesures de vitesses transversales pour des particules de 20  $\mu\text{m}$  allant de 100  $\mu\text{m/s}$  à 300  $\mu\text{m/s}$  pour un voltage de 5 à 10 Vpp respectivement. Ces vitesses nous donnent une information sur le gradient d'énergie acoustique  $\nabla E_{ac}$  vu dans l'équation 1.24.

$$\vec{F}_T = 3V_p \frac{\tilde{\rho} - 1}{2\tilde{\rho} + 1} \vec{\nabla} E_{ac} \quad (3.10)$$

Le bilan des forces sur ces particules projetées dans l'axe du noeud de pression s'écrit :



**Figure 3.23 Mesures de vitesses transversales à différents voltages** Des billes de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été suivies à 5, 7 et 10 Vpp. A gauche, on retrouve la mesure de ces vitesses et à droite, le profil du champ d'énergie acoustique équivalent. La valeur du champ ici n'est pas représentative, c'est le gradient de ce champ qui caractérise l'ARF transversale et donc la vitesse des particules.

$\rho V_p a = F_{ax} + F_{Sto}$  avec  $a$  l'accélération. La figure 3.23 montre que la vitesse est nulle au niveau du centre comme attendu. En effet, les particules s'agrègent vers le centre, leur vitesse s'annule en cette position d'équilibre. La vitesse augmente ensuite rapidement jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  du centre, puis demeure relativement constante jusqu'à chuter aux alentours de 2500  $\mu\text{m}$ . Cette distance correspond au rayon du transducteur utilisé.

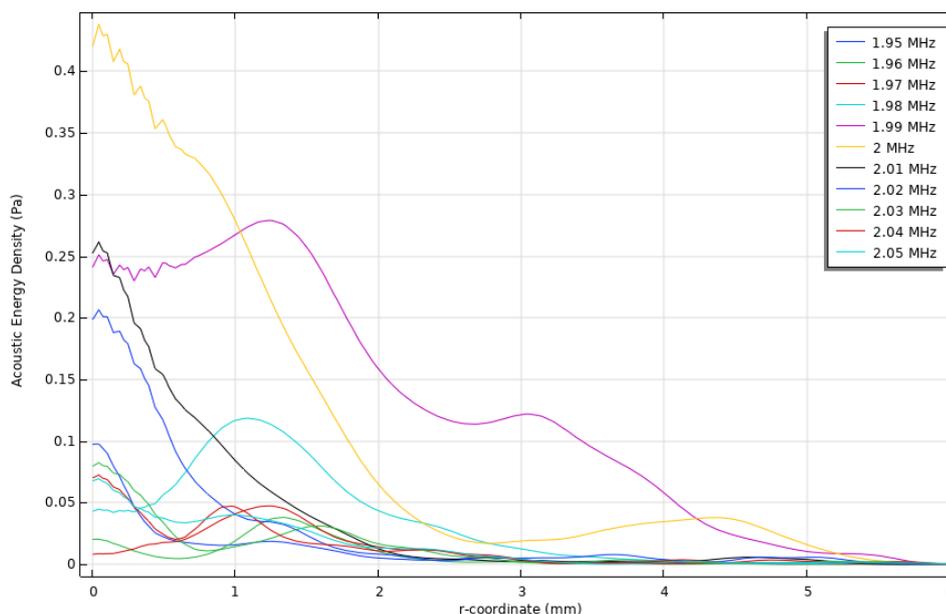
Afin de simplifier le bilan des forces, on peut considérer l'accélération négligeable, en particulier dans la zone 2500 - 500  $\mu\text{m}$  autour du centre. Ce faisant, il devient possible d'estimer le profil transversal de l'énergie acoustique  $E_{ac}$  avec l'expression :

$$\nabla E_{ac} = \frac{\pi \eta d_p (2\tilde{\rho} + 1)}{V_p (\tilde{\rho} - 1)} v_p \quad (3.11)$$

En calculant l'intégrale des vitesses, on peut donc retrouver le profil d'énergie acoustique. Il est représenté sur la droite de la figure 3.23 à une constante près (due à l'intégration). On peut voir que les particules migrent bien vers le maximum d'énergie acoustique comme attendu. On retrouve des profils très similaires avec les simulations COMSOL comme le montre la figure 3.24. Les mesures expérimentales et les simulations numériques nous donnent un gradient d'énergie acoustique proche de  $\frac{\partial E_{ac}}{\partial r} \approx 1 \frac{\text{J}/\text{m}^3}{\text{mm}}$  (1 Pa/mm) pour la zone située entre 2500 et 500  $\mu\text{m}$ .

### Tracking par observation axiale

Pour la puce mono-noeud, les mesures sont réalisées à travers la lame de verre, ce qui permet une vue plane de l'agrégation des particules. Il est possible de faire la même chose pour la puce multi-noeud, mais nous n'aurions accès qu'au premier noeud et il est préférable d'avoir l'information de la vitesse sur chaque plan de lévitation que sur un seul. Par ailleurs, nous n'observons pas de différences significatives sur l'agrégation entre



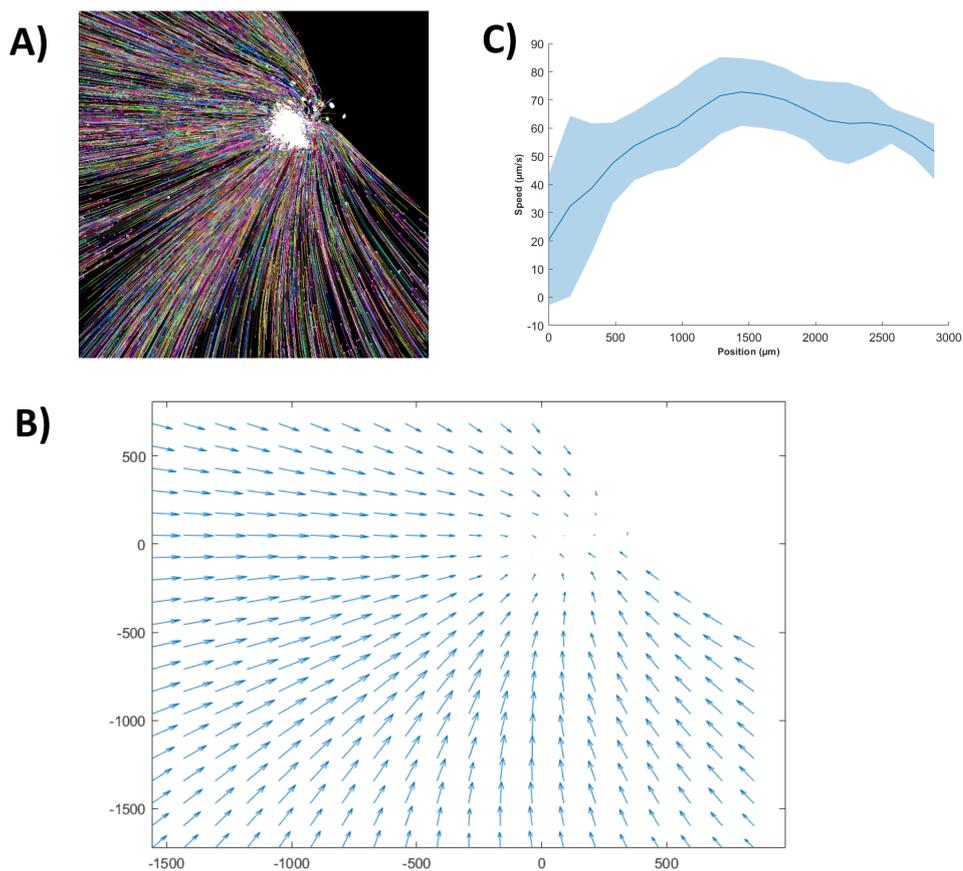
**Figure 3.24 Simulation de l'énergie acoustique dans le plan du noeud de pression**  
Évolution du profil radial d'énergie acoustique pour différentes fréquences dans un plan situé à  $\frac{\lambda}{4}$ . Selon la fréquence, il existe un maximum au centre du faisceau ou bien décalé sous la forme d'un anneau. La fréquence optimale ici est 2 MHz.

les différents noeuds de pression dans une puce multi-noeuds. La figure 3.25 montre les résultats pour des billes de polystyrènes de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre à 7 Vpp. L'asymétrie pour la provenance des billes dans le **A)** provient de l'injection et non du champ acoustique. On voit que le profil des vitesses représenté en **D)** possède la même répartition à celui identifié dans les puces multi-noeuds.

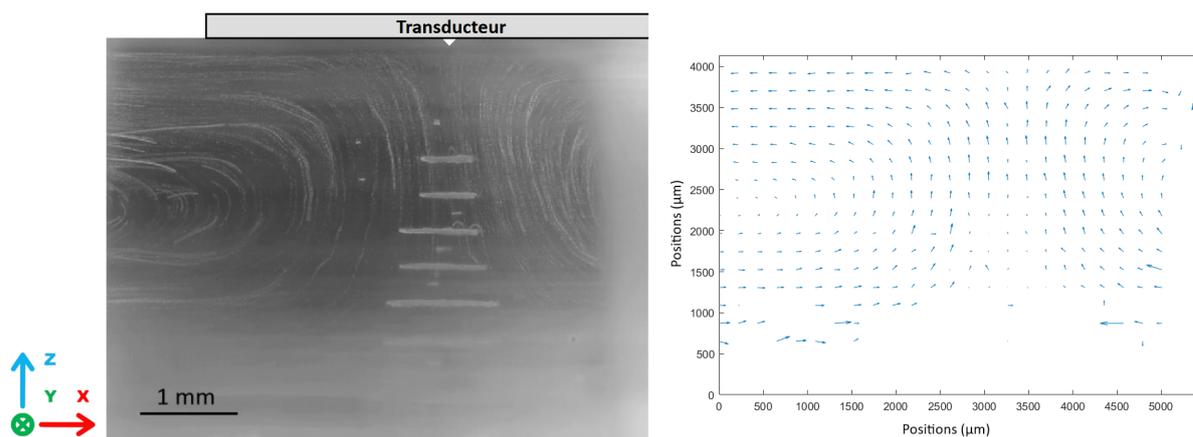
Les observations nous montrent que l'ARF transversale est 2 à 10 fois inférieure à l'ARF axiale dans ce système. Cette composante est fortement dépendante du transducteur utilisé et de la propagation des ondes. Le transducteur utilisé est fourni par *Signal Processing*. Ce transducteur possède un profil particulier qui favorise la composante transversale et donc l'agrégation. On retrouve dans la littérature [Woodside et al., 1997, Tuziuti et al., 1999] que la force de radiation acoustique transversale est 100 fois inférieure à celle de l'ARF axiale. On peut noter quelques différences de protocoles qui pourraient expliquer ces différences : les expériences réalisées ici utilisent un transducteur différent et moins large, des particules de taille plus petite ( $<100 \mu\text{m}$ ), une fréquence légèrement plus élevée ( $>1,75 \text{ MHz}$ ) et possèdent une paroi supérieure en PDMS comparativement à l'étude de Tuziuti et al.

### 3.3.2 Caractérisation du streaming acoustique

Un autre facteur important au sein des puces est le streaming acoustique. Ce streaming crée un courant constant au sein de ces puces qui peut altérer l'agrégation de particules



**Figure 3.25 Mesures de vitesses transversales en vue de dessous** Des billes de polystyrène de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été suivies dans le plan du noeud de pression pour un voltage de 7 Vpp. **A)** Tracé du suivi de particules réalisé sur *FIJI* via Trackmate. **B)** Tracé des vecteurs vitesse moyens pour chaque région de l'image. **C)** Projection sur une symétrie par rotation des mesures de vitesses.



**Figure 3.26** Visualisation et mesures de la vitesse de streaming dans une puce multi-noeuds. Projection des maxima d'intensité temporels d'un film de R633 à 5V dans une puce multi-noeuds à une fréquence de 2,00 MHz (à gauche). Carte des vitesses mesurées par suivi de particules (à droite).

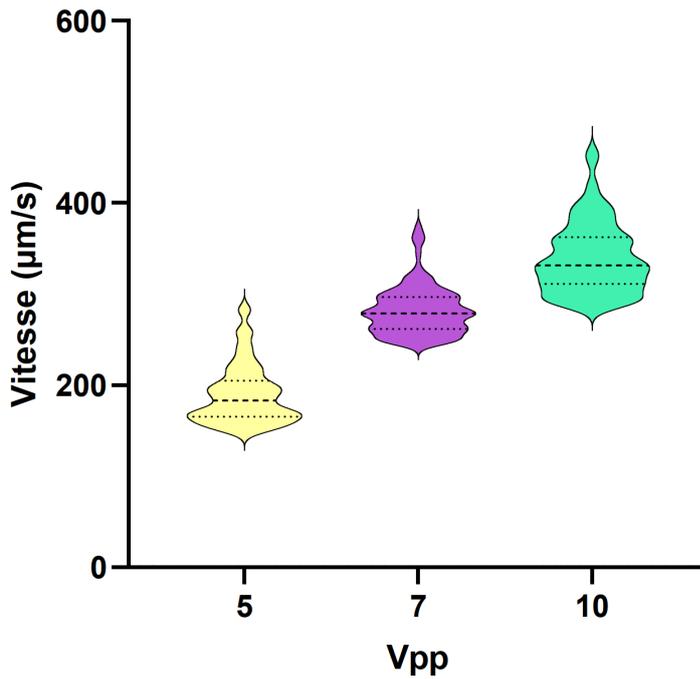
(particulièrement les petites), créer une force de cisaillement sur les agrégats et altérer les mesures expérimentales.

Afin de le mesurer, nous avons suivi des cellules R633 dans une puce multi-noeuds à différents voltages pour une fréquence de 2,00 MHz afin de mesurer leur vitesse lorsqu'elles sont librement entraînées par le streaming. Comme le montre la figure 3.26, le streaming augmente avec le voltage imposé, et donc avec l'énergie acoustique. Des streamings similaires ont été observés dans des systèmes proches de celui-ci [Green et al., 2016].

Dans un premier temps, on observe sur les images que le streaming est présent autour de la zone d'agrégation, mais pas à l'intérieur de celle-ci. Les mesures de vitesse au niveau de la zone d'agrégation sont les vitesses de particules se trouvant derrière ou devant les agrégats comme le montre l'image en projection des maxima temporels. En comparant les images issues de ces expériences, on peut voir un vortex plus ou moins fin au niveau de la bordure du transducteur. Il semble notamment plus resserré à 10 Vpp qu'à 7 ou 5.

On observe ensuite une différence de vitesse selon les voltages utilisés comme illustré figure 3.27. On mesure des vitesses aux alentours de 200  $\mu\text{m/s}$  à 5 Vpp contre des vitesses de 350 à 400  $\mu\text{m/s}$  à 10 Vpp. Ces vitesses sont importantes et du même ordre de grandeur que la vitesse de focalisation acoustique axiale. Heureusement, le streaming agit avec un temps de retard par rapport à l'ARF car il lui faut atteindre le régime permanent, tandis que l'ARF agit de façon quasi instantanée. L'agrégation se fait donc normalement, comme le montre la présence d'agrégats dans les différentes images de ce manuscrit. De plus, le streaming n'est pas, ou peu, présent au niveau de la zone d'agrégation. Les agrégats sont beaucoup plus gros que de simples cellules, ce qui fait que, même dans le régime permanent du streaming, l'agrégation et le maintien des agrégats en lévitation sont possibles. Le flux généré par le streaming permet également un brassage, ralentissant la sédimentation et favorisant l'homogénéisation du milieu.

La capacité des champs acoustiques à générer des écoulements réguliers dans les fluides

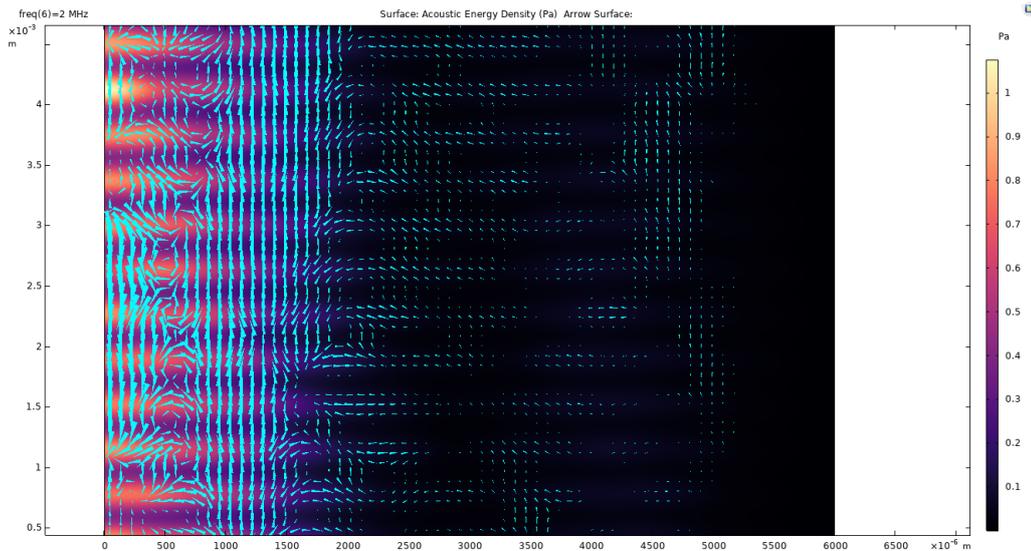


**Figure 3.27** Représentation des valeurs de streaming mesurées pour différents voltages. Affichage des vitesses de streaming mesurées sur des cellules R633 à différents voltages et à 2 MHz. Les traits correspondent à la moyenne et aux écarts-types.

est souvent représentée par un terme de force supplémentaire dans les équations de Navier-Stokes pour un écoulement visqueux incompressible. Pour une onde acoustique plane se propageant dans la direction  $-z$ , cette force peut être exprimée comme [Moudjed et al., 2014, Moudjed et al., 2015] :

$$\vec{F}_{st} = \frac{-2\alpha_0}{c_0} I_{ac} \vec{z} \quad (3.12)$$

avec  $I_{ac} = pv = \frac{p^2}{\rho_0 c_0}$  l'intensité acoustique,  $c_0$  la célérité de l'onde acoustique dans le milieu et  $\alpha_0$  le coefficient d'atténuation acoustique en pression du milieu (par exemple  $\alpha_0 = 0,1 \text{ m}^{-1}$  pour l'eau à  $20^\circ\text{C}$ ). Afin de faire une modélisation simpliste du streaming dans la simulation, nous avons implémenté dans le modèle COMSOL l'expression 3.12 que l'on trace dans la figure 3.28 via son vecteur force associé. On retrouve dans cette figure le courant ascendant en bordure de la zone d'agrégation ainsi qu'un courant transversal poussant vers le bord de la puce. On peut donc déduire le mouvement rotatif du fluide.



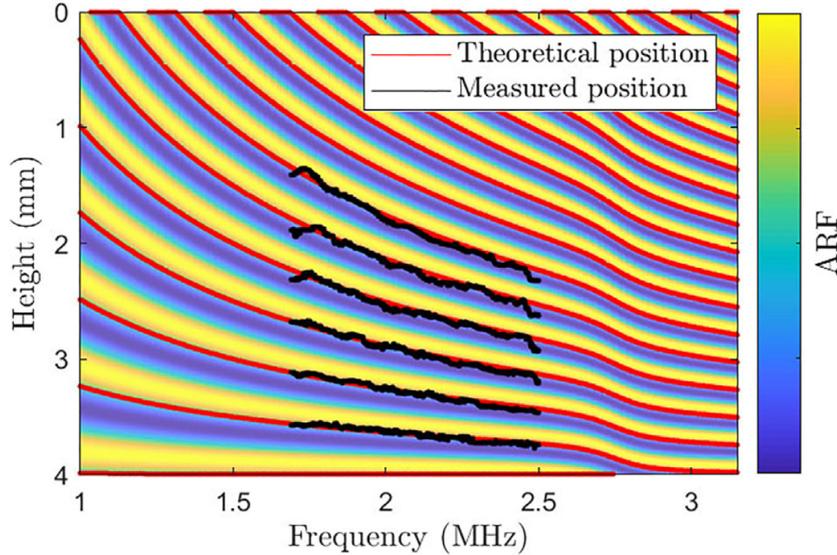
**Figure 3.28 Représentation de la force entraînant le streaming** On voit que le streaming est essentiellement orienté selon l'axe  $z$  sous le transducteur et qu'il est principalement orienté selon l'axe  $x$  autre part. On peut voir un courant principal qui remonte en bordure du transducteur et qui est légèrement dévié vers l'extérieur de la puce dans l'axe  $x$ . La combinaison de ces deux forces provoque la naissance d'un tourbillon.

## 3.4 Caractérisation de la distance inter-noeud, application biologique pour le contrôle de la fusion de sphéroïdes

Maintenant que nous avons à notre disposition des mesures des forces radiales et axiales définies ainsi qu'une simulation fidèle aux observations, il reste à étudier le streaming généré par l'acoustique ainsi qu'à évoquer la distance inter-noeuds afin de finaliser la caractérisation de ce système.

### 3.4.1 Distance inter-noeuds

Nous avons déterminé précédemment la fréquence de résonance du système. Celle-ci dépend de différents paramètres comme l'épaisseur du PDMS ou la hauteur de la cavité. Cette fréquence représente la fréquence optimale permettant l'obtention d'un maximum d'énergie au sein de la puce acoustofluidique. Hors de la résonance, on observe une chute rapide de cette énergie et donc de l'ARF. Avec les transducteurs utilisables sur une large bande de fréquences, il est possible de contrôler la position des noeuds de pression ainsi que la distance entre eux via la modulation de la fréquence acoustique. Le changement de position axial du plan de lévitation a été montré via différents principes. Hill l'a montré en modifiant les propriétés des parois autour de la chambre comme leur épaisseur ou leur matériau, modifiant ainsi les propriétés de l'onde [Hill, 2003], Haake [Haake, 2004] montre également ce changement de position en se servant de deux transducteurs disposés

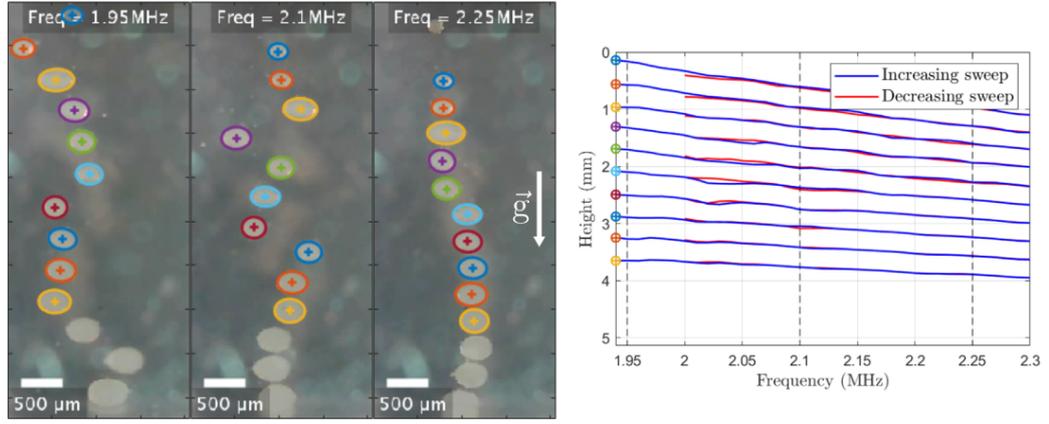


**Figure 3.29 Positions théoriques et expérimentales des noeuds de pression en fonction de la fréquence** Positions axiales théoriques et expérimentales des noeuds de pression lors d’une augmentation de la fréquence acoustique, respectivement tracées en rouge et en noir. La couleur de fond représente la force de radiation acoustique axiale normalisée entre -1 et 1 pour chaque fréquence. Issu de [Jeger-Madiot et al., 2022].

de chaque côté de son microcanal et en modifiant la phase ou la magnitude d’un des deux transducteurs. Courtney et al. obtiennent un contrôle fin grâce à un changement de phase [Courtney et al., 2010]. Plus récemment, il a été montré qu’une fréquence n’étant pas à la résonance théorique de la chambre permettait tout de même une agrégation, mais à une position différente [Glynn-Jones et al., 2010]. Glynn-Jones et al. montrent donc qu’en modifiant la hauteur d’une cavité sans changer la fréquence, on peut contrôler la position du noeud de pression. Dron et al. montrent par la suite qu’un changement de fréquence permet également d’obtenir un déplacement des noeuds de pression au sein d’une cavité [Dron and Aider, 2013]. Ce changement en fréquence est dynamique et permet diverses applications, notamment en tri ou en reconcentration cellulaire [Bellebon, 2021].

Au sein des chambres acoustofluidiques, la théorie 1D prédit que les noeuds sont espacés entre eux d’une distance  $\frac{\lambda}{2} = \frac{c_0}{2f} \approx 375 \mu\text{m}$  avec une fréquence de 2 MHz. La condition limite au niveau de la lame de verre implique un ventre de pression (et donc un noeud de vitesse), ce qui implique que le noeud le plus bas se situe à une distance  $\frac{\lambda}{4} = \frac{c}{4f} \approx 188 \mu\text{m}$  de la lame de verre.

Comme le montrent les figures 3.29 et 3.30, les puces acoustofluidiques multi-noeuds nous permettent d’observer facilement le phénomène, de le caractériser et de le contrôler. Une modulation en fréquence nous permet donc de déplacer finement les noeuds de pression dans l’axe de propagation. Il faut cependant noter que la position des noeuds n’est pas linéairement dépendante de la fréquence. Elle est fonction de la fréquence et de sa position axiale. Dans l’expérience illustrée figure 3.29, nous trouvons, pour des agrégats de billes de polystyrène, une amplitude de déplacement axiale d’environ  $920 \mu\text{m}$  entre les



**Figure 3.30 Positions théoriques et expérimentales des noeuds de pression en fonction de la fréquence** Visualisation de sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuses en lévitation acoustique. Chaque sphéroïde est identifié et peut ensuite être suivi. La variation de leurs positions pour trois fréquences acoustiques différentes est visible sur les trois clichés. Une variation de la fréquence acoustique permet un contrôle fin de la position des sphéroïdes ainsi que de la distance qui les sépare. Ce contrôle est illustré pour une fréquence croissante entre 1,94 et 2,30 MHz (lignes bleues), puis une fréquence décroissante entre 2,30 et 2,00 MHz (lignes rouges). Issu de [Jeger-Madiot et al., 2022].

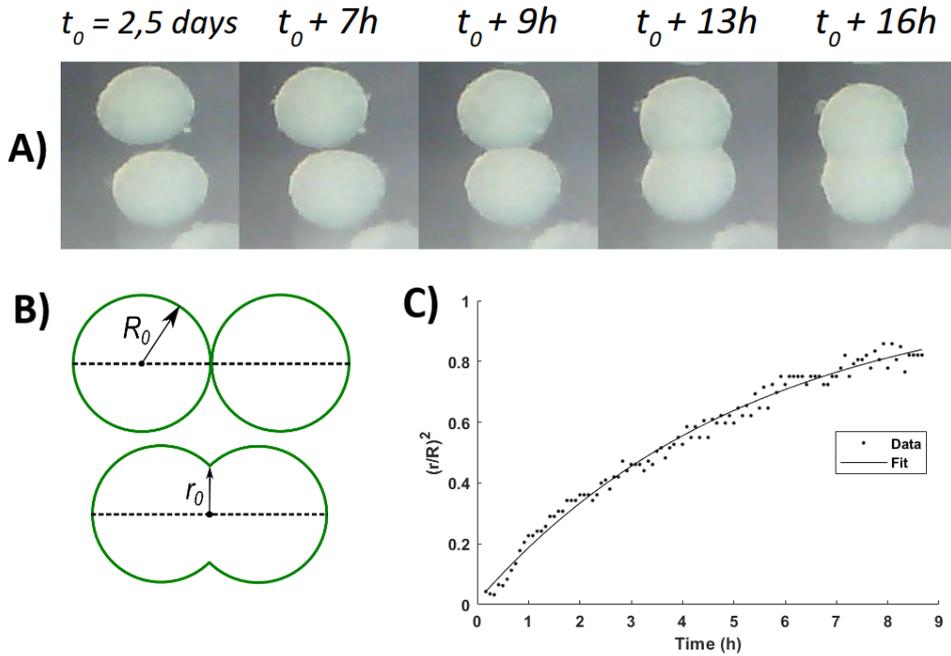
fréquences 1,70 et 2,50 MHz pour le noeud supérieur et d'environ 170  $\mu\text{m}$  pour le noeud inférieur. Cette figure illustre une excellente correspondance entre les positions décrites par le modèle théorique 1D et les observations expérimentales. On peut déterminer la position de chaque noeud par rapport à la lame de verre avec la relation  $Z_n = \frac{2n-1}{4} \lambda$  où  $n$  est le numéro du noeud. On peut également déterminer le déplacement d'un noeud en fonction du saut de fréquence et de sa position avec la relation  $\Delta Z_n = \frac{(2n-1)c}{4} \left( \frac{f_2 - f_1}{f_2 f_1} \right)$ .

### 3.4.2 Fusion de sphéroïdes

De la même manière que pour des agrégats de billes, les sphéroïdes cellulaires peuvent être déplacés selon l'axe de propagation  $z$  avec une variation de la fréquence acoustique comme illustré figure 3.30 pour une variation de fréquence de 1,94 MHz à 2,30 MHz. Lorsque la hauteur des sphéroïdes approche la taille critique de la demi-longueur d'onde  $\frac{\lambda}{2}$ , les sphéroïdes peuvent se toucher et ainsi fusionner comme illustré dans la figure 3.31. On peut moduler cette taille critique avec une modulation en fréquence en rapprochant les sphéroïdes les uns des autres de façon contrôlée. On peut analyser cette fusion avec un modèle de gouttes liquides visqueuses utilisé notamment par Kosheleva et al. pour la fusion de sphéroïdes [Kosheleva et al., 2020]. Ce modèle prédit que le rayon de la jonction normalisé au carré va suivre une fonction exponentielle amortie :

$$\left( \frac{r_0}{R_0} \right)^2 = A(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (3.13)$$

Comme on peut le voir figure 3.31, le modèle correspond très bien aux observations.



**Figure 3.31 Fusion de deux agrégats de cellules 6240 en lévitation** **A)** Après plusieurs jours de culture, la croissance des agrégats a provoqué spontanément leur fusion. Le même phénomène est possible en rapprochant les agrégats via une modification de la fréquence acoustique comme décrit dans [Jeger-Madiot et al., 2022]. **B)** Schéma utilisé pour le modèle. Issu de [Kosheleva et al., 2020]. **C)** Mesure du rayon de la jonction et la courbe du modèle théorique ajustée aux valeurs.

Ce modèle précise que  $\tau = AR_0 \frac{\eta}{\gamma}$  avec  $\eta$  la viscosité et  $\gamma$  la tension de surface, le ratio  $\frac{\gamma}{\tau}$  correspondant à la vitesse visco-capillaire. L'ordre de grandeur de cette vitesse dans l'étude de Kosheleva et al. est de 3 à 10  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Nous trouvons ici les valeurs  $A \approx 1$  et  $\tau \approx 5\text{h}20$  avec des agrégats de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre ( $R_0 \approx 200 \mu\text{m}$ ). On obtient alors une vitesse visco-capillaire de  $\frac{\gamma}{\eta} \approx 6 \mu\text{m}/\text{h}$  qui correspond aux vitesses déterminées dans cette étude.

### 3.5 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les chambres de culture acoustiques. Nous avons pu mesurer les vitesses et les forces de radiation acoustiques associées s'exerçant sur différentes tailles de billes. En connaissant le contraste acoustique  $\Phi$  et le diamètre de ces billes, nous avons également pu remonter à la densité d'énergie acoustique moyenne. Nous trouvons une densité d'énergie acoustique de  $\approx 0,8 \text{ J.m}^{-3}$  à 5 Vpp et  $\approx 3 \text{ J.m}^{-3}$  à 10 Vpp dans les puces multi-noeuds. On trouve des valeurs légèrement supérieures pour la densité d'énergie acoustique au sein des puces mono-noeuds avec  $\approx 2$  et  $8 \text{ J.m}^{-3}$  à 5 et 10 Vpp respectivement. Cette différence peut s'expliquer par la paroi supérieure en PDMS des puces qui est un peu plus épaisse sur les puces multi-noeuds. Cette épaisseur vient

du démoulage des puces, la hauteur des puces multi-noeuds rend cette étape plus délicate et une épaisseur de  $\approx 2$  mm permet d'éviter de déchirer le PDMS lors du démoulage tandis que les puces mono-noeuds peuvent être démoulées avec une épaisseur très fine ( $\leq 1$  mm). Ces résultats ont également pu être observés avec le modèle COMSOL des puces. Les résultats issus du modèle COMSOL sont fidèles aux observations et résultats expérimentaux. D'autres paramètres importants comme la vitesse du streaming ( $\approx 300$   $\mu\text{m/s}$ ) ont également été caractérisés. Avec ces caractérisations, nous sommes en mesure de déterminer le facteur de contraste acoustique de nos cellules ( $\Phi \approx 0,2$ ) et de calculer l'ARF exercée sur elles ( $\approx 1,5$  et  $5,8$  pN à  $5$  et  $10$  Vpp respectivement dans une puce multi-noeuds et pour une cellule de  $13$   $\mu\text{m}$  de diamètre dont la flottabilité vaut  $0,4$  pN).

Une des principales hypothèses utilisées dans ce chapitre est l'absence d'accélération des particules. Cette hypothèse est forte même si nous avons justifié son utilisation. De manière générale, l'application d'une méthode de Runge-Kutta pourrait permettre de prendre en compte l'accélération des particules.

La vitesse du streaming au sein des chambres est loin d'être négligeable en régime permanent. On voit notamment pourquoi, dès lors que le streaming atteint sa vitesse finale, les particules comme les cellules ne sont plus dirigées par l'ARF transversale, mais par le streaming en dehors de la zone d'agrégation ou la vitesse de streaming est très faible. Notre ébauche de modélisation de ce streaming semble correspondre aux observations, mais afin de l'améliorer, une étude simulant les mouvements fluides pourrait être ajoutée à ce modèle et utiliser la force précédemment calculée. Le modèle nous donnerait ainsi une vitesse de streaming ainsi qu'un temps caractéristique pour atteindre le régime permanent qu'il serait bon de confronter expérimentalement. Des études ont étudié l'impact d'un flux sur les cellules. Follain et al. [Follain et al., 2018] ont notamment estimé qu'il existe un flux idéal ( $\approx 500$   $\mu\text{m/s}$ ) pour les cellules tumorales circulantes qui leur permettraient à la fois une adhésion stable et une extravasation au travers des vaisseaux sanguins. Une étude de l'impact du streaming sur les agrégats en lévitation semble donc nécessaire afin d'améliorer la compréhension du comportement des cellules dans ce système.

Nous avons pu voir que la vitesse des particules, l'ARF et la densité d'énergie acoustique augmentent proportionnellement au carré du voltage. Dans ce manuscrit, nous avons utilisé exclusivement un seul type de transducteur, le *TR0205SS* de chez *Signal Processing*, mais nous avons pu observer que les mesures de vitesses varient légèrement entre deux transducteurs de même référence. De plus, pour de grosses particules dont la taille n'est plus négligeable devant la longueur d'onde comme des billes de diamètre  $\approx 300$   $\mu\text{m}$ , le modèle de Yosioka utilisé en grande majorité ici n'est plus valable, c'est notamment pour cette raison que l'énergie acoustique n'était pas calculée lors de mesures avec de gros objets. Baresch et al. [Baresch et al., 2013] ont pu calculer la force de radiation acoustique sur une sphère élastique sans faire d'hypothèse sur sa taille. Ils ont notamment observé que des pics de résonance apparaissaient sur l'ARF de la sphère à partir d'un rayon  $R \approx \lambda/5$ , ce qui, dans notre cas, correspond à un diamètre de  $300$   $\mu\text{m}$  et correspond donc à la taille des agrégats cellulaire. Il serait donc intéressant de faire des mesures de forces acoustiques sur une large gamme de taille et de comparer les résultats avec une prédiction se basant

sur le modèle de Baresch et al.

Enfin, les études sur des particules de grandes tailles montrent que le noeud de pression n'est pas toujours équivalent au plan de lévitation. En mesurant la position du plan de lévitation par rapport au voltage utilisé et au poids des objets, nous sommes en mesure de déterminer la composante selon l'axe  $z$  de l'ARF. Néanmoins, ces mesures ne nous permettent pas de connaître les contraintes mécaniques que subissent les agrégats. Une petite particule située au-dessus du noeud de pression subit deux forces dirigées vers le bas ( $-\vec{e}_z$ ) : la gravité et l'ARF. A l'inverse, une particule située au-dessous du noeud de pression subit également deux forces, mais de sens contraire : la gravité dirigée vers le bas ( $-\vec{e}_z$ ) et l'ARF dirigée vers le haut ( $+\vec{e}_z$ ). Lorsqu'un objet en lévitation est situé de part et d'autre du noeud de pression, l'ARF axiale possède donc deux composantes :  $\vec{F}_{ax} = (F_+ - F_-)\vec{e}_z$ . Ce sont ces composantes, l'une dirigée vers le haut ( $F_+ \cdot \vec{e}_z$ ) et l'autre dirigée vers le bas ( $-F_- \cdot \vec{e}_z$ ), qui exerce une compression sur l'objet en lévitation. Mishra et al. ont pu déformer des globules rouges avec cet effet [Mishra et al., 2014]. Ce sont ces forces qui permettent d'exercer une contrainte mécanique aux sphéroïdes. Pour les objets de grandes tailles, nous n'avons étudié, dans cette partie, que la résultante de l'ARF qui permet la lévitation. Afin de connaître les contraintes subies par les agrégats, il est nécessaire d'étudier ces deux composantes. De plus, nous avons montré au chapitre précédent que les agrégats de GB croissent au cours de la culture, donc leur taille évolue au cours du temps. La force de radiation acoustique s'appliquant à ces objets doit donc évoluer aussi. Il serait intéressant d'étudier les contraintes que subissent des agrégats au volume identique, mais à la forme différente.

# Chapitre 4

## Impact de l'ARF sur les sphéroïdes de GB

### Sommaire

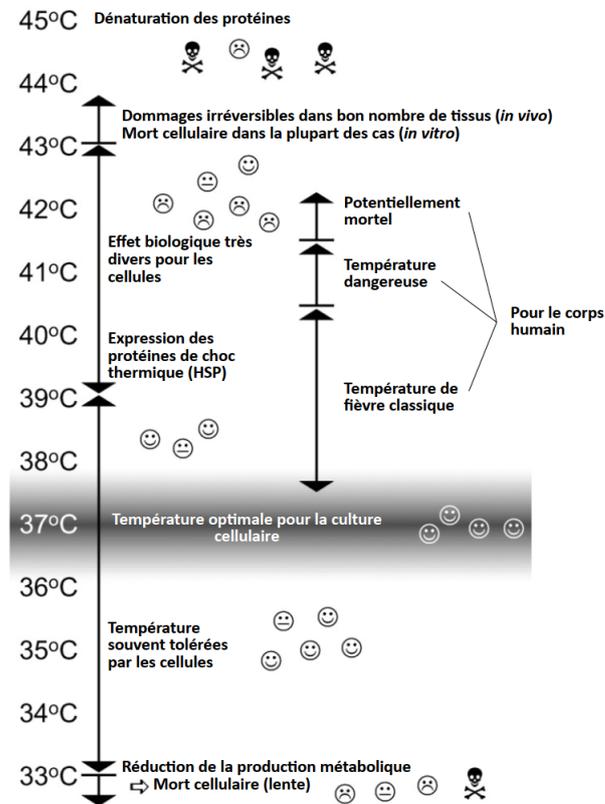
---

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.1 Ajustement thermique en fonction du voltage . . . . .</b>                                      | <b>126</b> |
| 4.1.1 Mesure de température dans le bioréacteur . . . . .   | 127        |
| 4.1.2 Modification de la température de l'incubateur . . . . .  | 130        |
| <b>4.2 Impact de l'augmentation d'ARF sur la formation et la croissance des sphéroïdes . . . . .</b>  | <b>132</b> |
| <b>4.3 Impact de l'augmentation d'ARF sur la densité et la prolifération des sphéroïdes . . . . .</b> | <b>135</b> |
| 4.3.1 Analyse quantitative des marquages DAPI et Ki67 . . . . .                                       | 135        |
| <b>4.4 Compression transitoire des sphéroïdes par l'ARF . . . . .</b>                                 | <b>140</b> |
| <b>4.5 Description des contraintes mécaniques appliquées aux sphéroïdes . . . . .</b>                 | <b>141</b> |
| 4.5.1 Régime de diffusion de Rayleigh . . . . .   | 141        |
| 4.5.2 Pression acoustique exercée sur les sphéroïdes . . . . .  | 143        |
| <b>4.6 Discussion . . . . .</b>   | <b>143</b> |

---

Dans les précédents chapitres, nous avons montré la fonctionnalité du bioréacteur acoustique à faible voltage ainsi que sa capacité à pouvoir complexifier le modèle simple du sphéroïde avec le modèle d'infiltration par des cellules immunitaires. Nous avons ensuite caractérisé de nombreuses propriétés acoustiques et fluidiques de ce système comme la densité d'énergie acoustique ou le streaming. Un des buts initiaux de ce système est l'étude des contraintes mécaniques appliquées aux sphéroïdes via l'utilisation d'ondes acoustiques. L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier l'impact d'une augmentation de la force de radiation acoustique sur les sphéroïdes en culture. Afin de réaliser cette étude, nous verrons d'abord qu'augmenter la force de radiation acoustique implique une augmentation de la température au sein des puces qu'il est nécessaire de contrebalancer. Après l'ajustement de cette température, nous verrons l'impact de l'ARF sur la croissance et la prolifération, notamment au travers de marquages immunohistochimiques.

## 4.1 Ajustement thermique en fonction du voltage



**Figure 4.1** **Température et cellules** Aperçu de différents effets biologiques observés chez l'homme et pour les cellules de mammifères. Issu de [Wiklund, 2012]

En culture cellulaire, un bon asservissement de la température, du pH ou encore de l'humidité est nécessaire afin de conserver une bonne viabilité des cellules. Comme montré figure 4.1, les cellules supportent mal des températures éloignées de 37°C, particulièrement celles au-dessus de 37°C. De façon courante, cet asservissement est contrôlé par un incubateur qui régule la température et le taux de dioxyde de carbone à 37°C et 5% respectivement avec une forte humidité gérée par un bac d'eau liquide s'évaporant. Nous avons prévu de mettre les puces à l'intérieur de tels incubateurs, permettant un équilibre naturel en température et un équilibre en pH à travers le PDMS. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, aucun problème de viabilité n'avait été observé à 5 Vpp. Il existe des systèmes utilisant les ondes acoustiques comme moyens de chauffage [Wang et al., 2021b]. Ces systèmes parviennent à atteindre des augmentations de température de 80°C avec de bonnes optimisations. Nous avons cependant estimé qu'à priori, dans cette configuration (2 MHz, 5-10 V<sub>pp</sub>), une augmentation de l'amplitude des ondes acoustiques n'aurait pas d'impact significatif sur la température au sein du système. Dans une série d'expériences préliminaires visant à étudier l'impact de la culture de GB au long cours en lévitation à 10 Vpp sur la morphologie des sphéroïdes, nous avons observé que les sphéroïdes se struc-

turaient en sphéroïdes aplatis, phénomène associé à une forte mortalité des GB. Nous avons initialement estimé que l'origine était un phénomène de compression, mais nous avons sous-estimé le régime de températures dans ce bioréacteur.

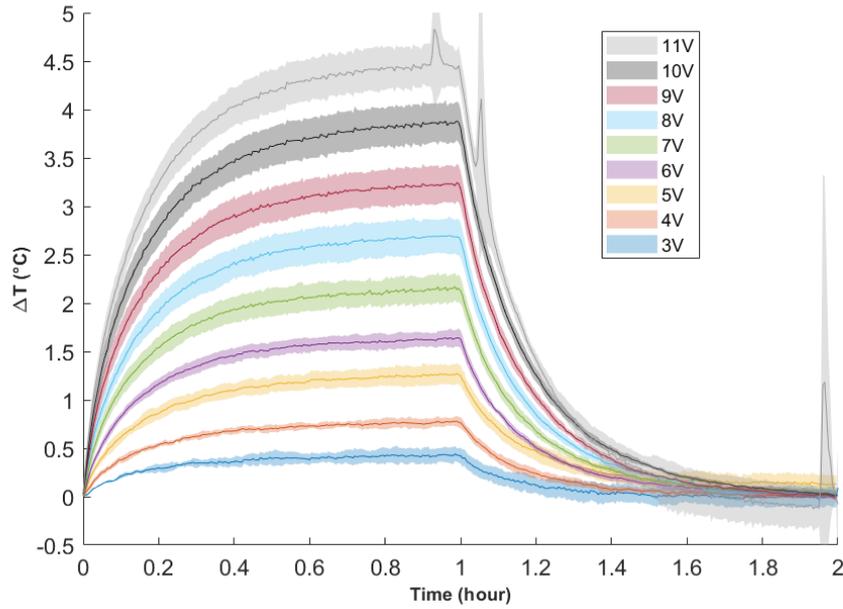
En effet, indépendamment de l'élévation potentielle de température liée à la propagation de l'onde dans le milieu (à priori minimal dans cette configuration), le transducteur lui-même peut monter également en température et ainsi diffuser sa chaleur dans le système. Prenons en exemple les systèmes d'imagerie par ultrasons, les normes internationales de sécurité définissent une limite de 43°C pour un transducteur couplé à un objet de test imitant un tissu approprié (ISS 61000-2-37) et ce afin d'éviter des brûlures de la peau ou des désagréments pour le patient. Dans des applications similaires à la nôtre, l'augmentation de température induite par le transducteur dépend nécessairement de l'énergie fournie, mais également de la fréquence [Spicci and Cati, 2012]. Les augmentations peuvent atteindre les 5°C comme mentionné dans la littérature [Vanherberghen et al., 2010b].

### 4.1.1 Mesure de température dans le bioréacteur

Afin de caractériser l'augmentation de température au sein des chambres, nous avons placé des thermocouples à différents endroits de la puce, l'un au niveau de la zone de lévitation, l'autre à une extrémité (outlet) et un troisième à l'extérieur mesurant la température de l'incubateur. Nous avons installé la puce dans un incubateur dans la même configuration que lors d'une culture avec les thermocouples en place. La figure 4.2 représente la mesure de température au niveau de la zone de lévitation lorsque la puce est placée dans un incubateur équilibré à 37°C. On observe une augmentation de l'ordre de 4°C pour une culture à 10 Vpp et une augmentation d'environ 1°C pour une culture à 5 Vpp. Une très légère différence entre la mesure au niveau de la zone de lévitation et la mesure au niveau de l'outlet est observée grâce aux autres thermocouples, mais reste négligeable. La température de l'outlet tout en étant légèrement inférieure à celle de la zone de lévitation, possède la même dynamique de croissance. On explique l'égalité des températures et des dynamiques de croissance entre ces deux endroits par la présence du streaming qui a tendance à homogénéiser non seulement le milieu comme décrit précédemment, mais également la température. La très légère différence en température s'explique par l'interface milieu-air à l'air libre au niveau de l'outlet qui a tendance à refroidir cette zone comparativement à la zone de lévitation. En effet, lors de ses expériences, aucun cache-puits n'a été placé au niveau de l'inlet ou de l'outlet, car les câbles des thermocouples devaient passer par ces endroits.

Ces mesures nous permettent de documenter l'augmentation de température de la puce, mais ne nous permettent pas de définir l'origine de cette augmentation. Afin de savoir si elle est principalement due à un effet Joule du transducteur ou une dissipation thermique de l'énergie acoustique, nous avons réalisé deux mesures différentes.

La première est la mesure de la température du transducteur à sa surface représentée figure 4.3. On voit nettement que la température du transducteur augmente avec le voltage



**Figure 4.2 Évolution de la température du milieu en fonction du temps pour différents voltages** Les mesures de température ont été réalisées dans une puce multi-noeuds remplie d'eau placée dans un incubateur équilibré à 37°C. Le thermocouple est placé au niveau de la zone de lévitation, sous le transducteur. Les valeurs sont moyennées sur 4 fréquences différentes : de 2,00 à 2,03 MHz.

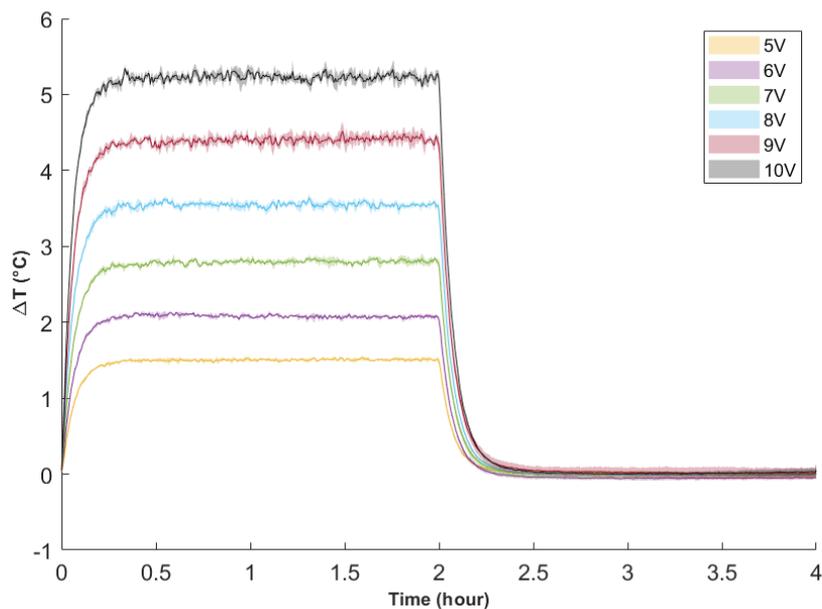
et que celle-ci est supérieure à celle mesurée dans la puce avec +1,5°C à 5 Vpp et +5°C à 10 Vpp. Cela donne une différence de 0,5°C et 1°C à 5°C et 10 Vpp respectivement par rapport à la température de la puce.

La seconde expérience a été effectuée dans une puce de haute dimension (6 cm) spécialement conçue pour ces tests. On vient mesurer la température à différentes hauteurs afin de voir si celle-ci est homogène ou possède un gradient. Comme on peut le voir sur la figure 4.4, celle-ci diminue lorsque l'on s'éloigne du transducteur. A 1 cm de distance, on retrouve environ les valeurs des mesures à l'intérieur des puces. Au-delà, l'augmentation est beaucoup moins forte. On note toutefois que l'augmentation n'est jamais nulle, même loin du transducteur.

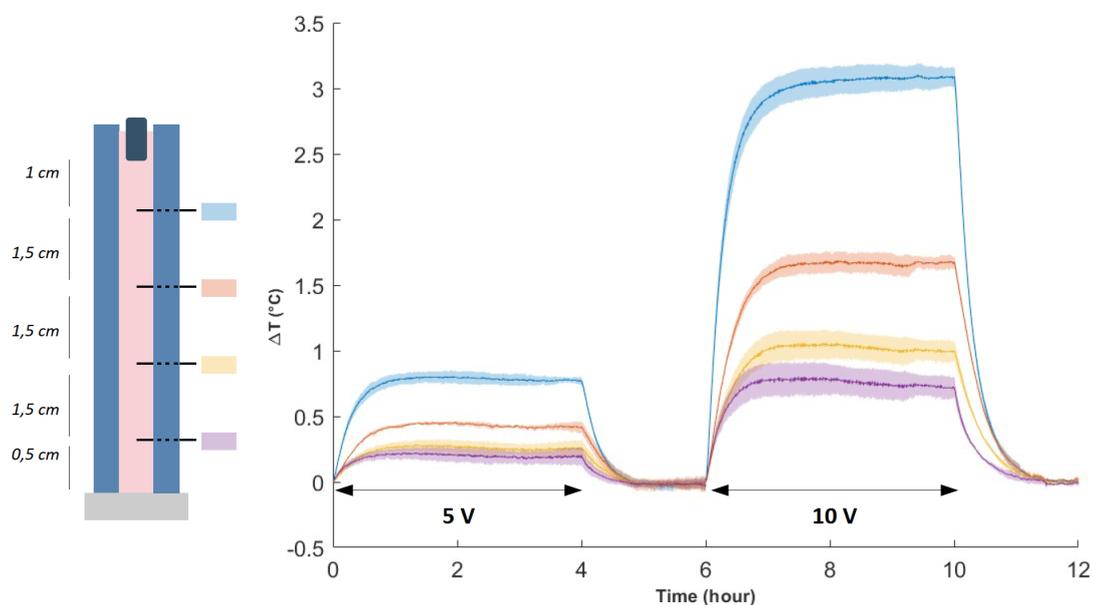
Toutes ces courbes correspondent à un système d'ordre 1 régi par l'équation 4.1 qui possède deux paramètres :

$$T = A(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (4.1)$$

avec  $A$  la valeur de l'échelon et  $\tau$  la constante de temps de la réponse. En ajustant les paramètres de ce modèle aux courbes expérimentales, nous pouvons déterminer les valeurs de  $A$  et de  $\tau$ . Nous obtenons une valeur de  $\tau$  relativement constante et qui semble indépendante du voltage. Sa moyenne et son écart-type valent  $\tau \approx 9 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ . L'amplitude  $A$  dépend évidemment du voltage. En la comparant à une loi puissance, on trouve  $A = \frac{U^{1.7}}{12}$  où  $U$  est le voltage. On est donc proche de l'effet Joule qui donne l'énergie dis-



**Figure 4.3** Évolution de la température du transducteur en fonction du temps pour différents voltages Mesures de température du transducteur réalisées dans un incubateur équilibré à 37°C à 2 MHz et pour différents voltages.



**Figure 4.4** Évolution de la température du milieu en fonction du temps pour différentes profondeurs Mesure de température dans une puce remplie d'eau conçue spécifiquement pour avoir une hauteur de 6 cm entre le transducteur et le réflecteur.

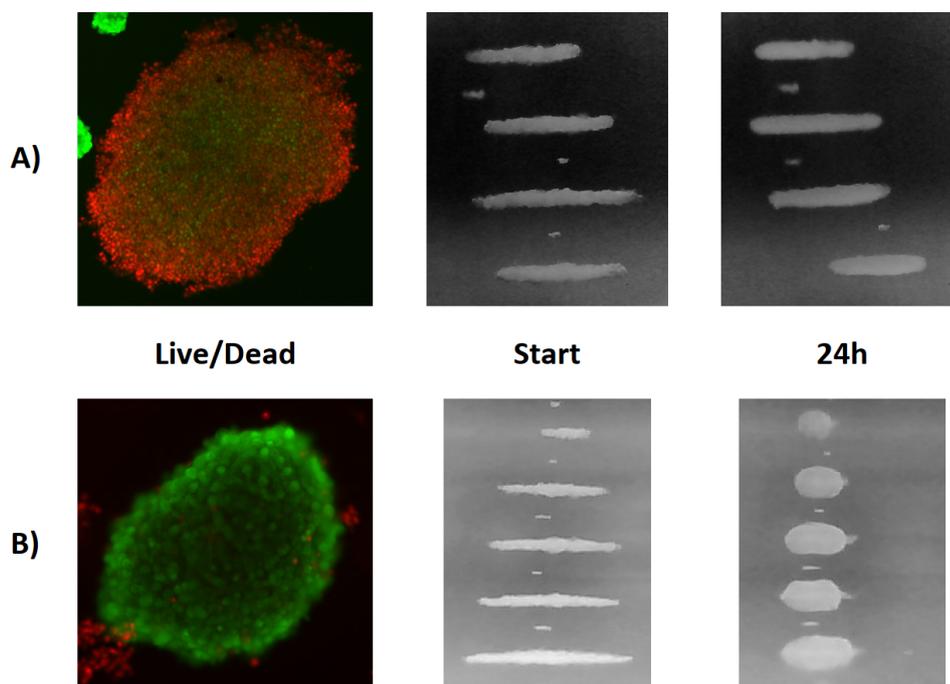
sipée sous forme de chaleur entre deux instants  $t_1$  et  $t_2$  avec  $Q = P \cdot \Delta t$ . En considérant le transducteur comme un dipôle vérifiant la loi d'Ohm, on peut écrire  $P = \frac{U^2}{R}$  avec  $U$  la tension. On aurait donc la formule  $Q \propto U^{1.7} \approx U^2$ .

### 4.1.2 Modification de la température de l'incubateur

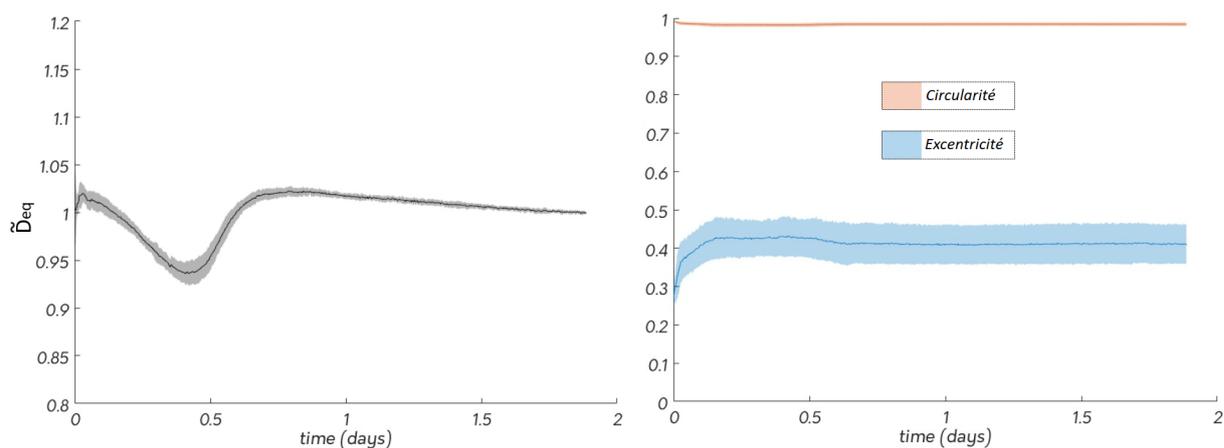
Les mesures nous permettent donc d'affirmer que la majorité de l'augmentation de température provient du transducteur packagé et que cette augmentation est de l'ordre de 1°C à 5 Vpp et de 4°C à 10 Vpp au sein de la puce acoustofluidique grâce à une courbe de calibration assez bien définie. Afin de pouvoir tout de même réaliser des cultures à 10 Vpp, nous avons choisi l'option la plus simple afin de pallier l'augmentation de cette température. Nous avons réduit la température de l'incubateur d'une valeur égale aux mesures. Les mesures de viabilité que nous avons réalisées dans le chapitre 2 montraient une excellente survie malgré une absence d'asservissement en température. On peut donc conclure que la viabilité des cellules n'était pas impactée par une augmentation de l'ordre de 1°C dans ce système. Cependant, par souci de précision et de validité des résultats, nous avons réalisé à nouveau les cultures à 5 Vpp avec un incubateur ajusté à 36°C pour les résultats sur la taille et la forme des sphéroïdes que l'on peut voir au chapitre 2 ainsi que dans le chapitre présent.

Les cultures à 10 Vpp présentées dans ce chapitre ont toutes été effectuées avec un incubateur ajusté à 33°C sauf mention contraire. On peut voir sur la figure 4.5 le résultat d'un marquage Live/Dead sur deux sphéroïdes cultivés à 10 Vpp avec ou sans ajustement de température. On observe nettement la forte diminution de viabilité sans l'ajustement de température avec un agrégat principalement marqué en rouge et donc principalement composé de cellules mortes. On note que les cellules vivantes observables sont situées plutôt au centre de celui-ci (marquage vert dans la partie centrale des sphéroïdes). L'agrégat avec ajustement de température est, quant à lui, entièrement marqué en vert, montrant une excellente viabilité, avec quelques cellules mortes marquées en rouge issu de la corolle cellulaire. Dans cette même figure, on peut également observer que les cellules restent en feuillets dans le cas d'une incubation à 37°C (41°C réels), contrairement au cas d'une incubation à 33°C (37°C réels).

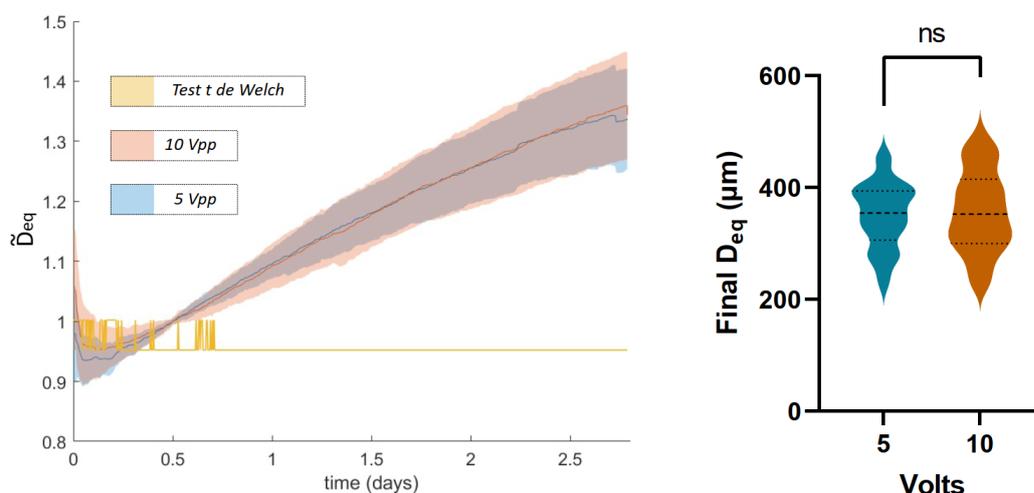
La figure 4.6 représente la taille des sphéroïdes non ajustés en température au cours du temps. On voit qu'un début de dynamique s'est tout de même produit. Sur le suivi live, on peut voir que l'agrégat se compacte puis se dilate avant de rester immobile. L'excentricité qui reste constante à  $\approx 1$  montre que l'agrégat conserve tout du long une forme linéaire. La circularité montre une légère reconfiguration au début avant de se stabiliser.



**Figure 4.5** Marquage Live/Dead et images de culture à 10 Vpp avec et sans ajustement de température **A)** Marquage Live/Dead et images d'une culture à 10 Vpp à son lancement et après 24h avec un incubateur réglé à 37°C. **B)** Marquage Live/Dead et images d'une culture à 10 Vpp à son lancement et après 24h avec un incubateur réglé à 33°C.



**Figure 4.6** Courbes de taille et forme d'agrégats 10 Vpp sans ajustement de température Le graphique de gauche représente la taille de l'agrégat normalisé par rapport à la valeur finale. Le graphique de droite représente l'excentricité et la circularité.



**Figure 4.7** Comparaison de la taille des sphéroïdes 10 Vpp et 5 Vpp pour les cellules 6240 Le graphique de gauche représente la taille normalisée à 12h des sphéroïdes 5 Vpp et 10 Vpp. Le test t de Welch a été réalisé en chaque point et représenté par la courbe jaune. Les courbes sont significativement différentes à 5% si le test vaut 1, s'il vaut moins c'est que les moyennes ne sont pas différenciables. Le graphique de droite représente le diamètre final des sphéroïdes lorsque l'on arrête l'expérience. Le test statistique des tailles finales est un t-test.

## 4.2 Impact de l'augmentation d'ARF sur la formation et la croissance des sphéroïdes

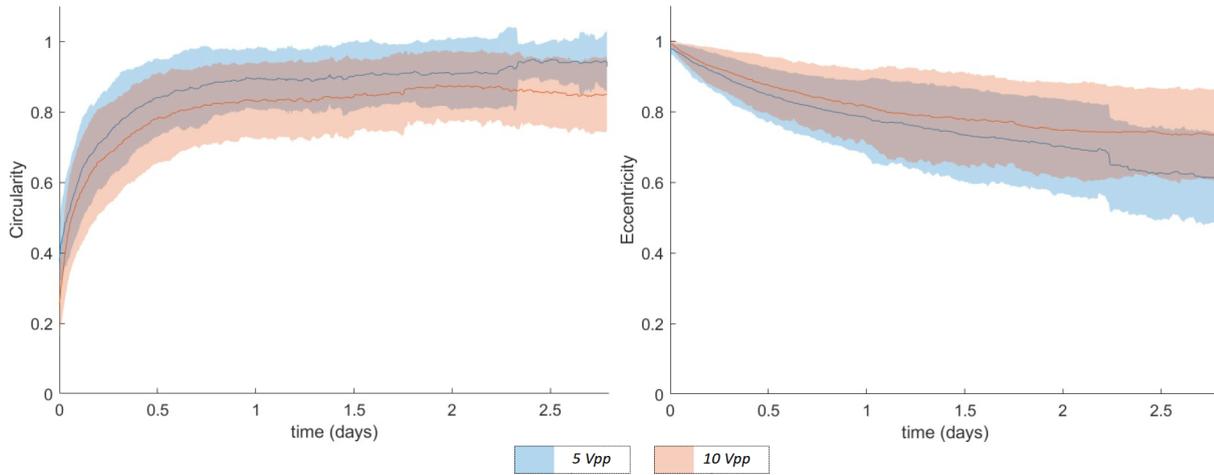
Afin d'étudier l'impact de la force acoustique, nous avons réalisé des cultures à deux voltages différents, 5 Vpp et 10 Vpp. On rappelle que cette différence de voltage correspond à une ARF 4 fois plus forte comme discuté dans le chapitre 3 pour les cellules. On procède de la même manière que pour les cultures à 5 Vpp du chapitre 2, à savoir une injection de 100 000 cellules dans 50  $\mu$ L de milieu (une concentration à l'injection de 2 M de cellules par mL) au sein des puces multi-noeuds. L'amplitude de l'ARF initiale jouant un rôle dans le nombre de cellules capturées aux noeuds, l'agrégation initiale des cellules se fait à 7 Vpp puis une fois dans l'incubateur, le voltage est changé pour correspondre à celui choisi (5 ou 10v). Les incubateurs sont préalablement placés à 36°C ou 33°C en fonction du voltage prévu. Hormis la force de radiation acoustique qui est volontairement augmentée, nous avons fait en sorte que les autres paramètres soient constants. L'agrégation se fait avec le même voltage, il y a donc peu de biais sur le nombre de cellules agrégées dans les noeuds de pression, car la majeure partie des cellules ont soit sédimentées, soit été agrégées. On a vu, grâce à la partie précédente, que la température compensée est d'environ 37°C pour les deux cultures. On ne peut néanmoins pas contrôler le streaming dans le système actuel qui, lui, est plus important à 10 Vpp qu'à 5 Vpp comme décrits dans le chapitre 2. Des techniques, notamment décrites dans le chapitre 1, sont envisagées pour le réduire.

La figure 4.7 montre qu'il n'y a pas de différence au niveau de la taille du sphéroïde au cours du temps ni sur leur taille moyenne finale pour les cellules 6240. On aurait pu

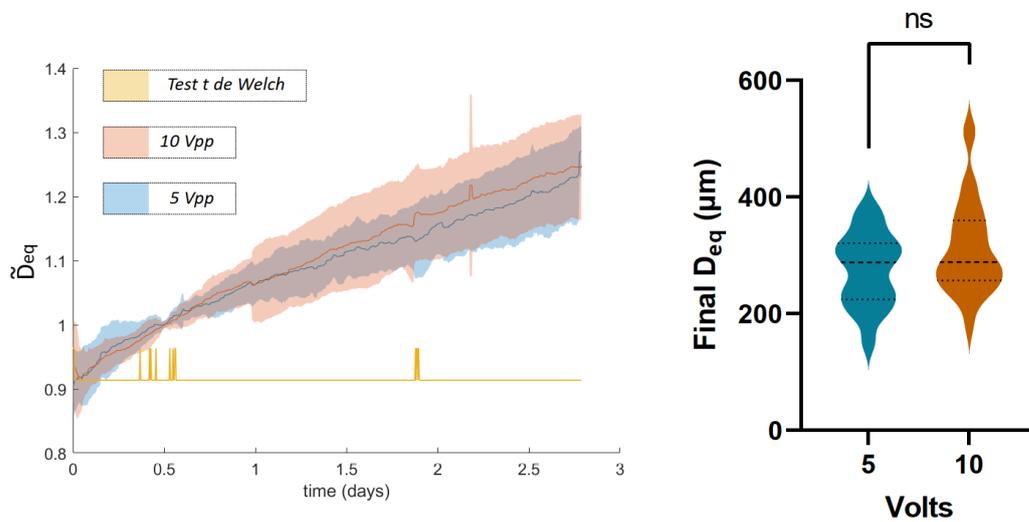
s'attendre à observer une taille finale plus faible à 10 Vpp du fait de la compression plus importante, mais aucune différence n'est visible de manière globale. En comparaison, en appliquant un stress osmotique avec des molécules de Dextran, Montel et al. [Montel et al., 2011] observent une modification relativement importante du volume normalisé de leurs sphéroïdes entre ceux non compressés et ceux compressés à 500 Pa, effet qui met plusieurs jours (3 jours ou plus) à se mettre en place. Dans ces expériences conduites à 10 Vpp, on observe cependant un nombre de sphéroïdes ayant un diamètre  $> 400 \mu\text{m}$  plus importants. Cela s'explique notamment par le fait l'ARF qu'à 10 Vpp, il est plus facile pour un gros agrégat de rester en lévitation qu'à 5 Vpp. Lors de culture, il arrive que certains sphéroïdes deviennent trop gros pour que l'ARF puisse continuer à les faire léviter, que leur position devienne instable ou que des vibrations ou des chocs à l'intérieur de l'incubateur les fassent tomber. Il est heureusement facile de discriminer ceux tombés de ceux qui sont restés en lévitation lorsque cela arrive. D'une part, le retour vidéo nous aide à savoir si des sphéroïdes sont tombés ou non, et à estimer leur forme et taille. De plus, lorsqu'un agrégat tombe en cours de lévitation, on observe que certaines de ces cellules vont commencer à adhérer à la lame de verre puis à migrer à sa surface. Ce phénomène est plus prononcé pour les sphéroïdes de cellules R633 que pour les sphéroïdes de cellules 6240, mais reste facilement observable. On peut donc visuellement les reconnaître.

La figure 4.8 nous montre les paramètres de circularité et d'excentricité pour deux voltages différents. Ils sont, eux aussi, très similaires avec des dynamiques comparables entre les deux voltages. On observe cependant une légère différence en moyenne entre eux-ci. La circularité à 10 Vpp est inférieure à celle à 5 Vpp, à 2,5 jours, on mesure  $\approx 0,95$  et  $\approx 0,85$  pour les moyennes respectivement. Visuellement, on observe une forme légèrement plus aplatie des sphéroïdes 10 Vpp. Ils ont cependant le même diamètre équivalent comme le décrit la figure 4.7 car ils compensent leur manque de hauteur en largeur. L'écart-type reste néanmoins important et cette différence visuelle n'est observable que sur les sphéroïdes du bas, plus volumineux que ceux du haut. L'excentricité va dans le même sens que la circularité, en affichant les sphéroïdes 10 Vpp légèrement plus linéaires que ceux à 5 Vpp. On ne note cependant pas de différence significative comme on a pu l'observer lors de la comparaison de la dynamique de croissance des lignées R633 et 6240 à 5 Vpp (Chap 2).

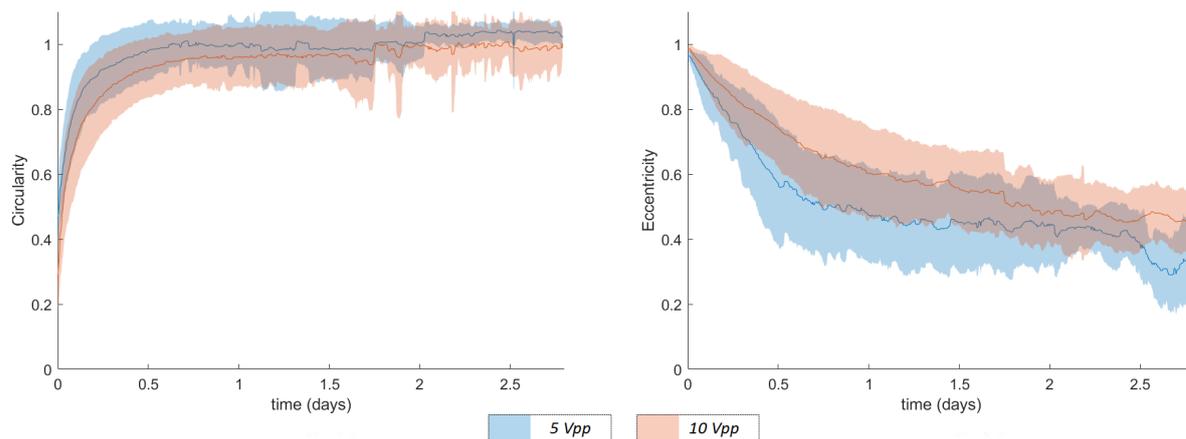
Nous avons ensuite effectué les mêmes expériences (croissance à 5 Vpp vs 10 Vpp) avec la seconde lignée cellulaire R633. On retrouve des résultats similaires avec cette seconde lignée comme le montre les figures 4.9 et 4.10. Les résultats sont plus prononcés pour les R633, particulièrement au niveau de l'excentricité où la différence est nette. On voit qu'à 10 Vpp les sphéroïdes de cellules R633 se rapprochent du comportement des sphéroïdes de 6240. Sous une ARF importante, les cellules s'auto-organisent moins vite et sont moins sphériques qu'à pression acoustique plus faible. On retrouve notamment des sphéroïdes 10 Vpp plus allongés, à la manière d'un ovoïde, que pour les sphéroïdes 5 Vpp, particulièrement avec les cellules R633 où leur forme sphérique à 5 Vpp était très prononcée. Ceci suggère que l'auto-organisation des cellules R633 est modifiée lorsque l'ARF augmente



**Figure 4.8** Comparaison de la forme des sphéroïdes 10 Vpp et 5 Vpp pour les cellules 6240 Le graphique de gauche représente la circularité et celui de droite représente l'excentricité des sphéroïdes 5 Vpp et 10 Vpp au cours du temps.



**Figure 4.9** Comparaison de la taille des sphéroïdes 10 Vpp et 5 Vpp pour les cellules R633 Le graphique de gauche représente la taille normalisée à 12h des sphéroïdes 5 Vpp et 10 Vpp. Le test t de Welch a été réalisé en chaque point et représenté par la courbe jaune. Les courbes sont significativement différentes à 5% si le test vaut 1, s'il vaut moins c'est que les moyennes ne sont pas différenciables. Le graphique de droite représente le diamètre final des sphéroïdes lorsque l'on arrête l'expérience. Le test statistique des tailles finales est un t-test.



**Figure 4.10** Comparaison de la forme des sphéroïdes 10 Vpp et 5 Vpp pour les cellules R633 Le graphique de gauche représente la circularité et celui de droite représente l'excentricité des sphéroïdes 5 Vpp et 10 Vpp au cours du temps.

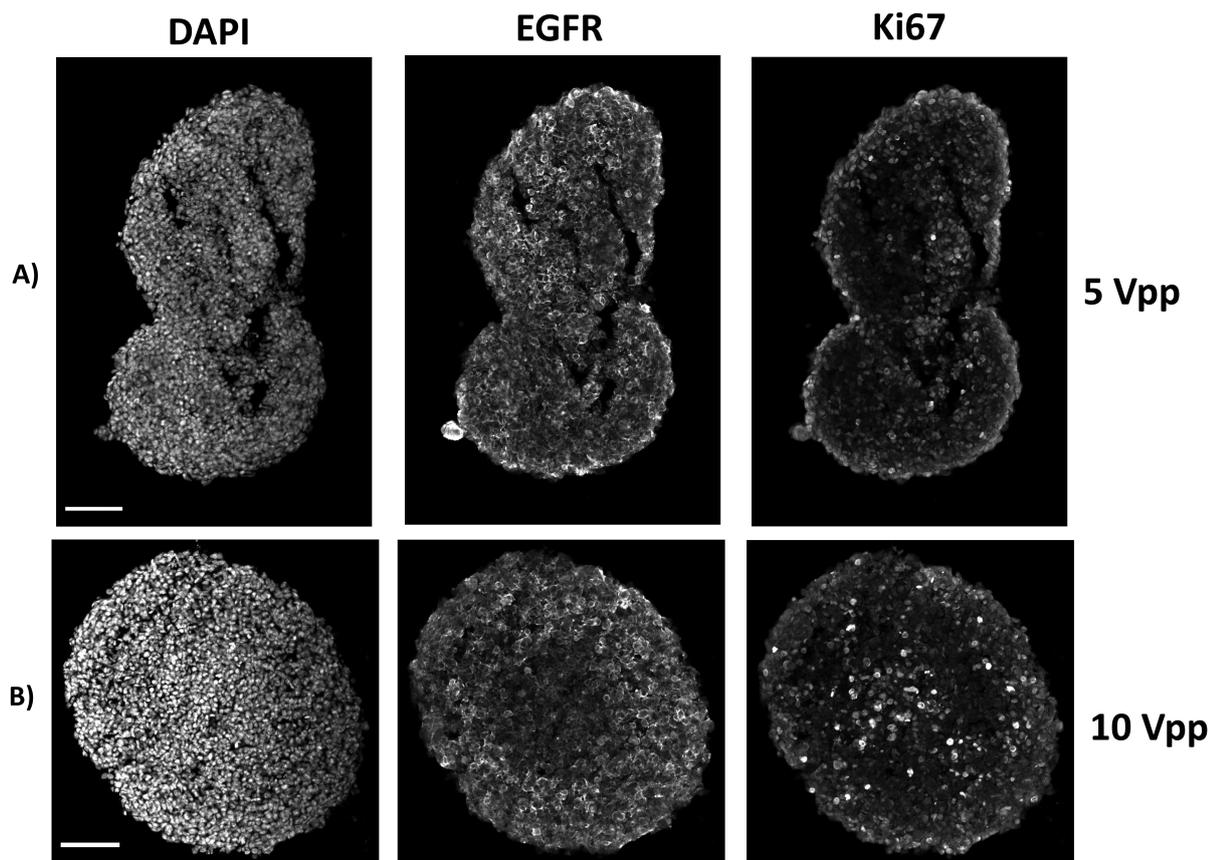
## 4.3 Impact de l'augmentation d'ARF sur la densité et la prolifération des sphéroïdes

Afin d'étudier plus en détail l'impact de la variation d'ARF sur les sphéroïdes cultivés à 10 Vpp et à 5 Vpp, nous avons mis en place un protocole de fixation, congélation, et coupe par cryo-microtome des sphéroïdes afin de procéder à un marquage immunocytochimique des cellules présentes à l'intérieur des sphéroïdes (protocole détaillé dans le chapitre 5 matériels et méthodes).

### 4.3.1 Analyse quantitative des marquages DAPI et Ki67

Afin d'étudier la répartition et le nombre des cellules présents dans les sphéroïdes ainsi que leur index de prolifération, nous avons décidé de marquer les coupes histologiques avec le marqueur nucléaire classique DAPI ainsi que le marqueur prolifératif Ki67.

Le marquage DAPI est une technique couramment utilisée en biologie cellulaire pour visualiser les noyaux des cellules. DAPI est une sonde organique fluorescente qui se lie spécifiquement à l'ADN présent dans les noyaux cellulaires et produisant une fluorescence bleu intense sous une lumière ultraviolette. Ce marquage permet de distinguer facilement les noyaux des cellules, ce qui est notamment utile pour une segmentation automatique. Le marqueur Ki67 est un antigène nucléaire qui est utilisé pour évaluer l'activité proliférative des cellules dans les tissus. Il est exprimé pendant toutes les phases actives du cycle cellulaire, mais est absent des cellules en phase G0 de repos. Ainsi, l'immunomarquage de Ki67 permet de détecter les cellules en division active dans les tissus. La détection du marqueur Ki67 peut être réalisée par différents moyens, tels que l'utilisation de chromogènes qui produisent une coloration brune ou rouge-brun, ou l'utilisation de fluorophores qui produisent une fluorescence sous une lumière appropriée. Dans notre cas, nous utiliserons



**Figure 4.11 Images de fluorescence de coupes de sphéroïdes 6240 à 5 et 10 Vpp cultivés durant 3 jours** Images de fluorescences des noyaux cellulaires (DAPI), des membranes cellulaires (EGFR) et de la prolifération (Ki67), de gauche à droite respectivement. **A)** Deux sphéroïdes superposés de cellules 6240 cultivés à 5 Vpp durant 3 jours. **B)** Sphéroïde de cellules 6240 cultivé à 10 Vpp durant 3 jours. Scalebar = 100  $\mu$ m.

des fluorophores. Enfin, les cellules ont été aussi marquées avec un anticorps dirigé contre le récepteur à l'EGF (EGFR), présent à la membrane plasmique des GB.

On peut voir sur la figure 4.11 des coupes "centrales" (équateur des sphéroïdes) de sphéroïdes immunomarquées issus de culture à 5 Vpp et 10 Vpp. L'analyse numérique des coupes, décrite dans le chapitre 5 (matériels et méthodes), nous permet d'obtenir des régions d'intérêts (ROI) définies et classées en  $\frac{R}{R_0}$  donc en fonction de leur éloignement par rapport au centre de la coupe du sphéroïde et un seuil de positivité pour le marquage Ki67 est défini. La figure 4.12 montre les résultats issus de l'analyse des marquages DAPI et Ki67 d'une coupe de cellules 6240 cultivées 3 jours à 10 Vpp. Le choix de segmenter le  $\frac{R}{R_0}$  en 10 régions distinctes est actuellement arbitraire. On peut voir sur cette coupe que les cellules en prolifération sont essentiellement situées en bordure et au centre de la coupe. Parmi les graphes de la figure 4.12 C), le second nous montre que les cellules en prolifération sont globalement situées en bordure, car la moyenne des  $\frac{R}{R_0}$  est plus élevée pour les cellules Ki67 positives que pour toutes les cellules confondues. La forme en 'U' du dernier graphe (Fig. 4.12 D), troisième graphe) nous montre que les cellules

en prolifération sont principalement situées dans les 0-30% et les 70-100% du rayon du sphéroïde. L'orientation des DAPI nécessite une analyse quantitative de leur orientation, mais on peut voir que leur rayon est très homogène partout dans l'agrégat.

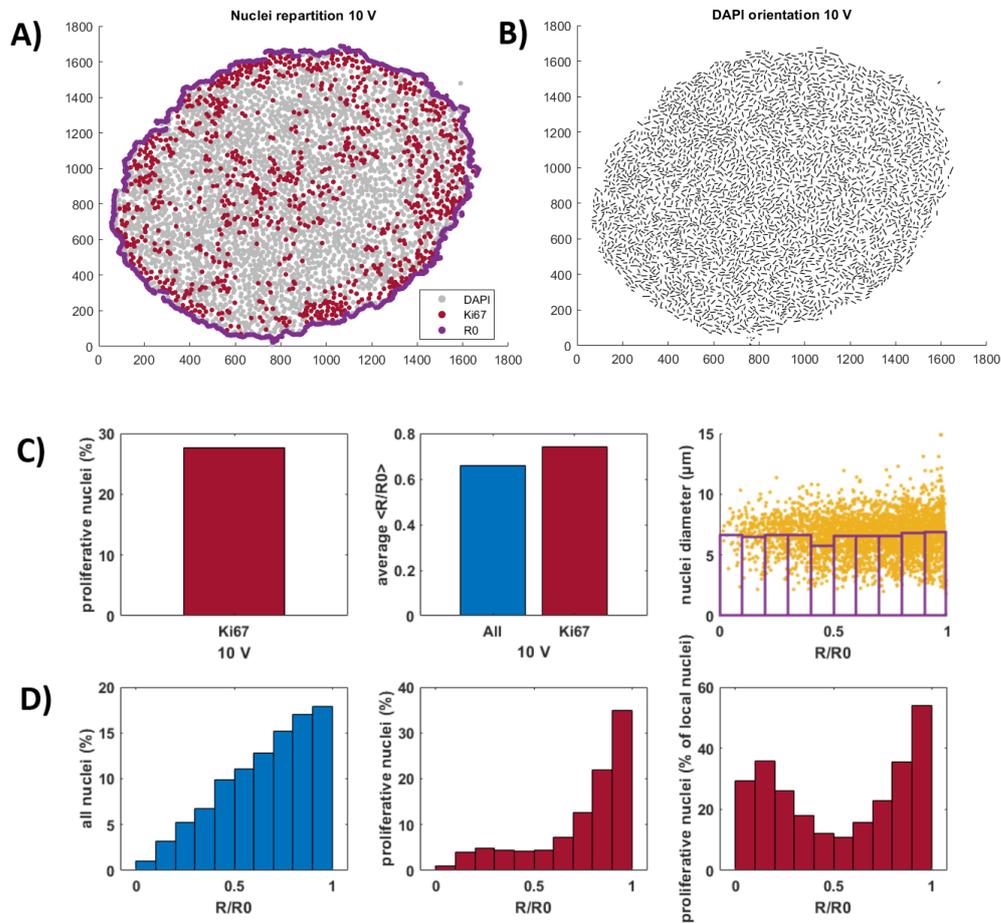
Avec cette méthode et ces analyses, nous sommes capables d'estimer le pourcentage de cellules en prolifération, leur répartition en  $\frac{R}{R_0}$  et la densité de cellules dans l'agrégat. Les figures 4.13 et 4.15 montrent les premiers résultats obtenus sur les sphéroïdes cultivés à 5 Vpp et à 10 Vpp. Ces résultats sont issus de 3 coupes de sphéroïdes provenant de trois expériences indépendantes ( $N = 3$ ).

On peut voir une différence significative de prolifération entre les sphéroïdes cultivés à 5 et 10 Vpp sur les résultats de coupes à 3 jours, les cellules 6240 cultivées sous ARF forte présentant un index de prolifération supérieur. En revanche, après 6 jours de culture, cet effet n'est plus retrouvé puisque les cellules 6240 présentent un index de prolifération similaire.

La baisse de prolifération que l'on semble observer entre les sphéroïdes 10 Vpp cultivés 3 ou 6 jours pourrait s'expliquer par le fait que nous n'avons pas renouvelé le milieu de culture au-cours des 6j de culture, ce qui a pu provoquer un appauvrissement du milieu en nutriments. Alternativement, une compaction du sphéroïde, induite par l'augmentation de l'ARF, pourrait atteindre un seuil critique et induire une réduction de la prolifération cellulaire. L'analyse de la répartition des noyaux cellulaires dans le sphéroïde montre, en effet, un écart de densité entre les sphéroïdes 5 et 10 Vpp et cet écart semble se maintenir après 6 jours de culture. Malgré une absence de significativité des tests statistiques, ces résultats semblent dessiner une tendance de la force acoustique à augmenter la densité des cellules au sein du sphéroïde.

L'analyse de la répartition des cellules en cours de prolifération (estimée à l'aide du  $\frac{R}{R_0}$  moyen pour les cellules Ki67 positives) présente une tendance similaire. En effet, on observe une tendance à plus de cellules en prolifération à l'intérieur des sphéroïdes à 10 Vpp qu'à 5 Vpp. Cet écart est par ailleurs conservé entre les résultats à 3 et 6 jours. Afin de mieux représenter les données sur la région de prolifération, nous avons moyenné, pour chacune des conditions, le dernier graphe de la figure 4.12 D). On peut voir figure 4.14 que la répartition des cellules 6240 en prolifération semble plus homogène dans les sphéroïdes cultivés à 10 Vpp que ceux cultivés à 5 Vpp. On observe également que les sphéroïdes à 5 Vpp prolifèrent plutôt en périphérie à 3 jours comme à 6 jours. Les sphéroïdes à 10 Vpp, en revanche, semblent proliférer autant en bordure qu'au centre. On note une tendance des sphéroïdes 10 Vpp à 3 jours à posséder une prolifération en forme de "U", indiquant une prolifération majoritaire au centre et sur les bords. Ceux à 10 Vpp et 6 jours semblent avoir une prolifération homogène. Ces répartitions pourraient être reliées à la densité afin d'expliquer la prolifération.

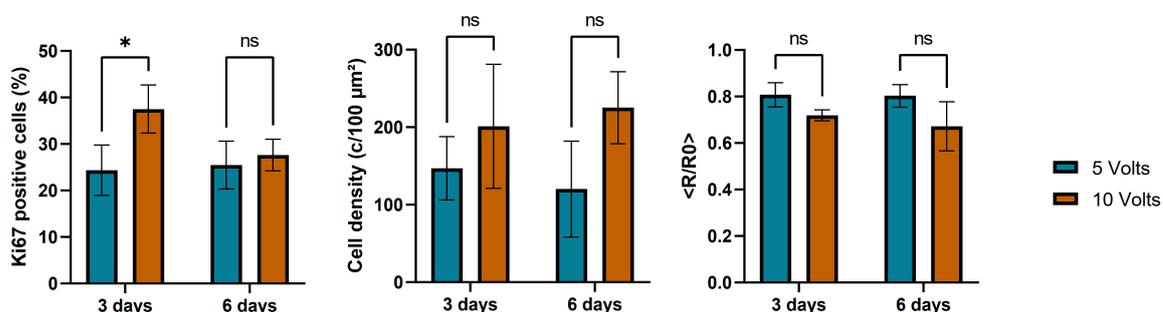
On retrouve des résultats similaires avec la seconde lignée cellulaire R633 avec les résultats 3 jours représentés figure 4.15. Alors que les résultats des sphéroïdes 6240 ont tous au minimum 3 expériences indépendantes analysées, les résultats de la lignée R633 sont encore préliminaires avec un  $N = 3$  à 5 Vpp et, pour le moment, une seule expérience d'analysée à 10 Vpp ( $N = 1$ ).



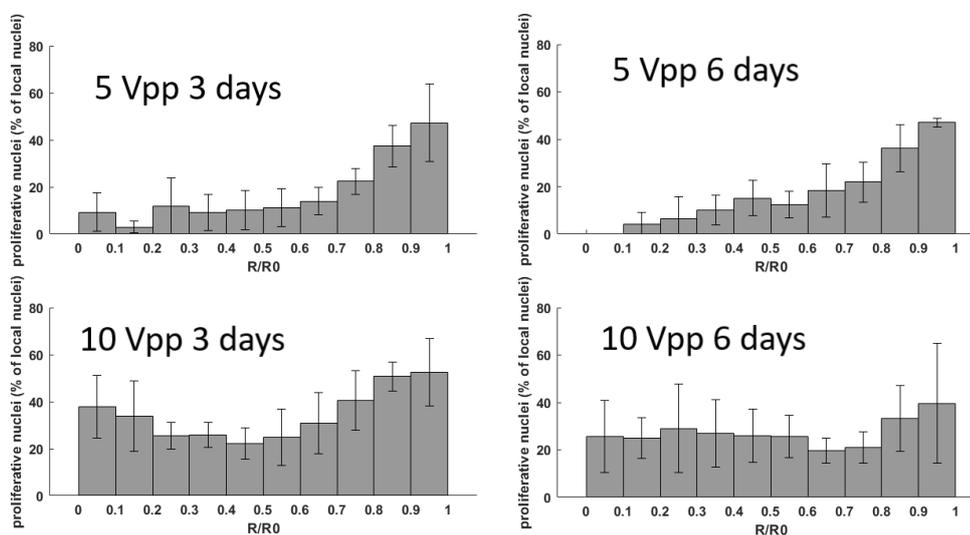
**Figure 4.12 Résultats de l'analyse d'une coupe d'agrégat 6240 à 10 Vpp et 3 jours**

**A)** Affichage des cellules détectées comme Ki67 positive et négative ainsi que les R0. **B)** Représentation de l'axe principal pour chaque ROI détectées. **C)** Graphes représentant le pourcentage de cellules Ki67 positives, le  $\frac{R}{R_0}$  moyen pour toutes les cellules et pour celles Ki67 positives et la taille des ROI détectées avec leur moyenne triée en  $\frac{R}{R_0}$  respectivement. **D)** Répartition en  $\frac{R}{R_0}$  de toutes les cellules, des cellules Ki67 positives et enfin des cellules Ki67 positives normalisées par le nombre de cellules dans chaque zone (le 3e graphe correspond donc au second graphe normalisé par le premier).

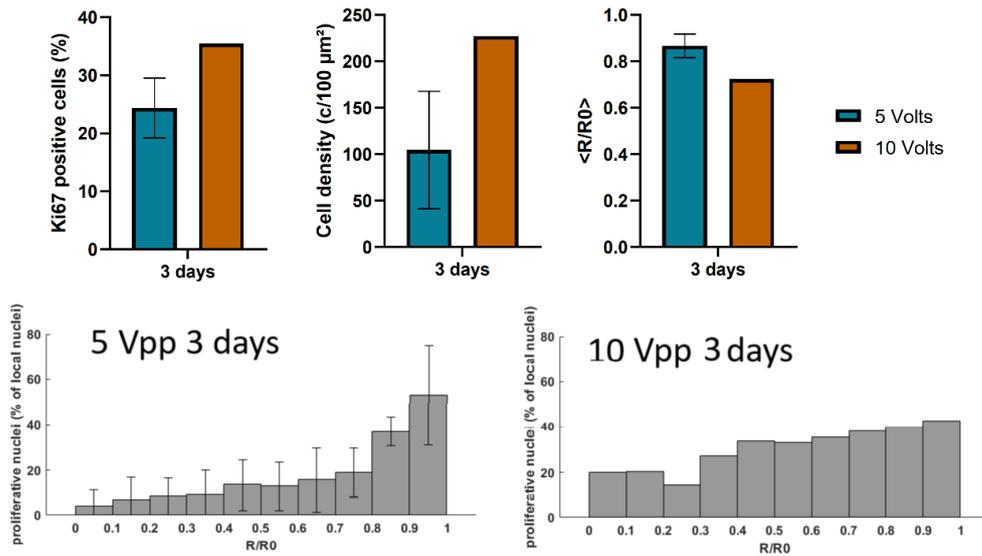
### 4.3. Impact de l'augmentation d'ARF sur la densité et la prolifération des sphéroïdes



**Figure 4.13 Résultats de l'analyse Ki67 pour les cellules 6240 à 3 et 6 jours** De gauche à droite : pourcentage de cellules Ki67 positives, densité de cellules dans l'agrégat et  $\frac{R}{R_0}$  moyen des cellules Ki67 positives respectivement. Les tests statistiques réalisés sont des tests two-way ANOVA.



**Figure 4.14 Répartition des cellules 6240 Ki67 positives en  $\frac{R}{R_0}$**  Répartition en  $\frac{R}{R_0}$  des cellules Ki67 positives normalisées par le nombre de cellules dans chaque zone. Résultats issus des sphéroïdes de cellules 6240.



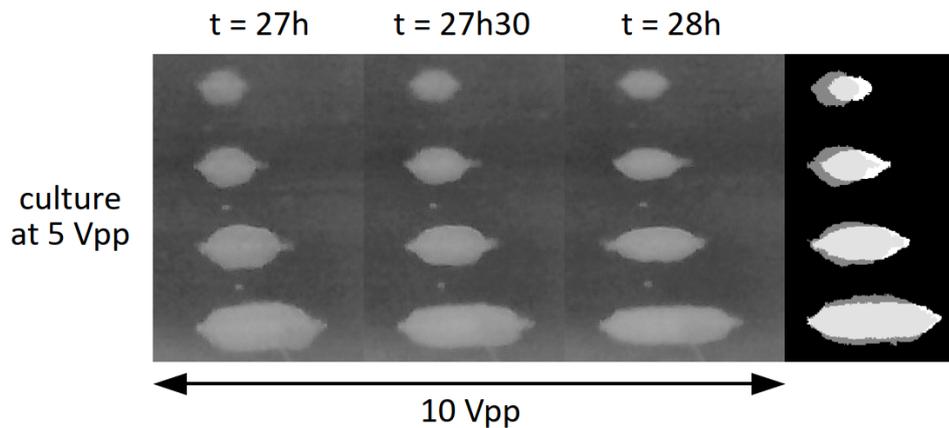
**Figure 4.15 Résultats de l'analyse Ki67 pour les cellules R633 à 3 jours** Les graphes correspondent, dans l'ordre de lecture, au pourcentage de cellules Ki67 positives, à la densité de cellules dans l'agrégat, au  $\frac{R}{R_0}$  moyen des cellules Ki67 positives, et à la répartition pour les deux voltages en  $\frac{R}{R_0}$  des cellules Ki67 positives normalisées par le nombre de cellules dans chaque zone respectivement.

Nous sommes encore en train d'analyser les données et d'augmenter le nombre d'expériences afin d'augmenter la significativité de ces résultats. Nous analysons également l'orientation des noyaux afin de voir si une organisation spatiale se détache des coupes.

## 4.4 Compression transitoire des sphéroïdes par l'ARF

Une autre approche que nous avons voulu expérimenter est de cultiver les sphéroïdes tout d'abord à 5 Vpp puis de changer le voltage à 10 Vpp après un certain temps. Nous souhaitons ainsi reproduire une compression des sphéroïdes et voir une modification de leur forme dépendante de l'acoustique. Nous sommes parvenues à observer une modification de forme des sphéroïdes comme illustré figure 4.16. La déformation observée est principalement présente dans l'axe de propagation de l'onde acoustique et donc dans l'axe de l'ARF axiale qui est la principale force acoustique. On peut estimer que cette déformation est probablement due à l'augmentation de l'amplitude de l'onde acoustique. Il faut cependant vérifier que cette déformation n'est pas due à une augmentation brutale de la température comme nous l'avons décrit au début de ce chapitre. Nous avons essayé de réduire l'effet de la température en sortant les cultures à température ambiante. Comme indiqué figure 4.1, une température inférieure à 37°C est préférable à une température supérieure.

Au total, les résultats obtenus à l'heure actuelle et portant sur la prolifération et la morphologie des sphéroïdes de GB de patient montre que l'augmentation de l'ARF d'un



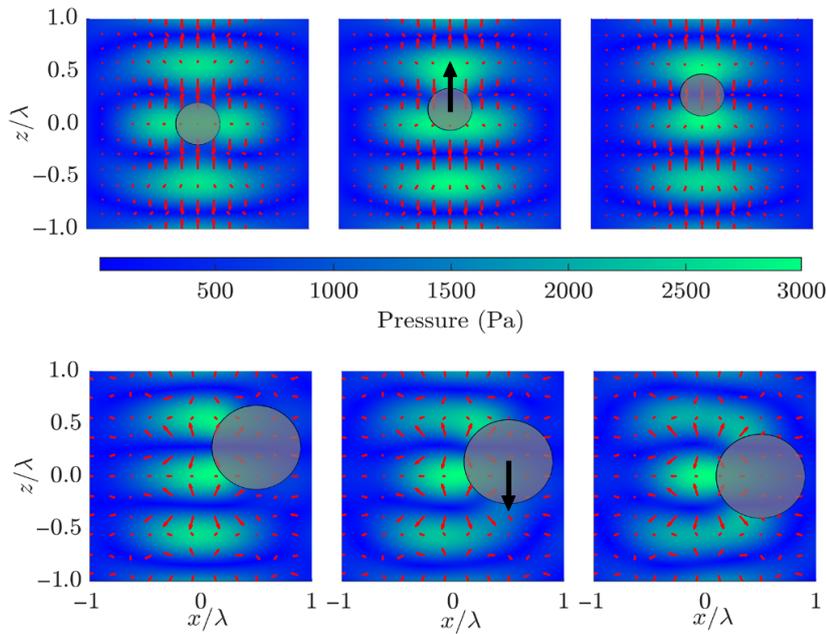
**Figure 4.16 Compression à 10 Vpp de sphéroïdes 6240 cultivés à 5 Vpp** Les sphéroïdes 6240 ont d'abord été cultivés 1 jour à 5 Vpp dans un incubateur à 36°C. Les cultures ont ensuite été sorties et placées à température ambiante, puis l'acoustique a été augmentée à 10 Vpp pendant une heure. La dernière image représente la modification de forme des sphéroïdes comprimés par acoustique. On trouve ici, moyenné sur ces 4 sphéroïdes, 22% de réduction de l'aire totale, 28% de réduction sur la hauteur et 1% de réduction sur la largeur.

facteur 4 provoque une augmentation de la prolifération des GB de patients. Cet effet, qui est perdu à 6 jours de culture, semble associé à une augmentation de la densité des sphéroïdes et une "translocation" des zones de prolifération de l'extérieur vers l'intérieur des sphéroïdes. Ces résultats restent à conforter par des expériences supplémentaires dont l'acquisition a été ralentie par le fait que les cultures 5 et 10 Vpp doivent être conduites dans des incubateurs à température compensée pour chaque voltage. Ils étayaient cependant la notion que des pressions relativement basses exerceraient une action positive sur la prolifération des cellules tumorales. Si quelques éléments de la littérature semblent aller dans ce sens, l'amplitude des contraintes mécaniques exercées par l'ARF sur des sphéroïdes cellulaires, qui lévitent hors de la limite de Rayleigh, demeure inconnue. Ceci empêche une comparaison directe avec les données de la littérature obtenues dans d'autres paradigmes expérimentaux (compression osmotique, hydrogel, magnétique, mécanique...).

## 4.5 Description des contraintes mécaniques appliquées aux sphéroïdes

### 4.5.1 Régime de diffusion de Rayleigh

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, nous pouvons mesurer la force de radiation acoustique s'exerçant sur de petits objets et en déduire la densité d'énergie acoustique au sein du système. Cependant, l'expression de cette force repose sur une forte hypothèse, le régime de diffusion de Rayleigh. Ce régime correspond à  $r_p \ll \lambda$  avec  $r_p$  le rayon de l'objet et  $\lambda$  la longueur d'onde. On rappelle que nous travaillons à une



**Figure 4.17 Forces acoustiques agissant sur une particule à l'intérieur d'un lévitateur concentrique symétrique à axe unique** Le fond représente l'amplitude de la pression acoustique, les flèches rouges correspondent au champ de force acoustique pour des particules de diamètre  $0,4\lambda$  pour les graphes du haut et de diamètre  $0,82\lambda$  pour ceux du bas. Colonne de gauche : les particules sont dans une position d'équilibre instable. Leur centre est situé au niveau d'un noeud de pression. Colonne centrale : les particules ne sont pas dans une position d'équilibre, la résultante des forces est représentée par les flèches noires (les flèches ne sont pas à l'échelle). Colonne de droite : les particules sont dans une position d'équilibre stable. Leur centre est situé au niveau d'un ventre de pression. Issu de [Ospina et al., 2022]

fréquence d'environ 2 MHz dans un milieu principalement aqueux, la longueur d'onde est donc d'environ  $\lambda \approx 750 \mu\text{m}$ . Dans le cas de sphéroïdes, l'hypothèse n'est pas vérifiée, car  $r_s \approx 150 \mu\text{m}$ . Comme évoqué au chapitre 1, Baresch et al. [Baresch et al., 2013] ont pu calculer la force de radiation acoustique pour une sphère élastique sans poser d'hypothèse sur son rayon. Les résultats qu'ils obtiennent sont loin d'être aussi simples que la formule de Yosioka et Kawasima mais leur permettent de voir apparaître des phénomènes de résonance. Le premier, notamment, est observé pour  $r_p \approx \frac{\lambda}{5}$  qui, dans notre cas, correspond à  $r_p \approx 150 \mu\text{m}$ . Ce second modèle, complexe, est également difficilement applicable, dans notre cas, car les sphéroïdes cellulaires sont des objets complexes dont les propriétés acoustiques comme élastiques ne sont pas homogènes et/ou facilement mesurables afin d'être injectés dans les équations de ce modèle.

En plus du calcul théorique explicite, Ospina et al. [Ospina et al., 2022] ont également montré un phénomène intéressant se produisant à partir d'une certaine taille de bille. Ils ont montré qu'une bille s'agrègeant au noeud de pression lorsque celle-ci respecte l'hypothèse  $r_p \ll \lambda$  s'agrègera sur un ventre de pression à partir d'une taille critique comme le montre la figure 4.17. La grande taille de la bille fait qu'elle ne voit plus un,

mais deux noeuds et/ou ventres de pression. S'ensuit un équilibre entre ces deux noeuds de pression qui fait qu'elle se positionne entre eux. Elle est alors centrée sur un ventre de pression. De ce phénomène, ils déduisent que l'amplitude de la force peut être maximale ou nulle pour certaines tailles spécifiques.

### 4.5.2 Pression acoustique exercée sur les sphéroïdes

Nous avons vu que la taille des sphéroïdes rend l'approximation de force obtenue sur les particules de petite taille impossible. Mais malgré cela, nous avons montré que nous pouvions mesurer la résultante de la force de radiation acoustique s'exerçant sur eux en diminuant le voltage et en comparant les objets à leur propre poids. C'est une première étape, mais afin de comprendre les phénomènes observés sur les cultures à voltage constant, ou ceux intervenant sur les cultures passant de 5 à 10 Vpp, il faut connaître la force de compression exercée sur les sphéroïdes à différents voltages. Différentes études dans la littérature ont été menées en ce sens sur des objets respectant le régime de diffusion de Rayleigh : déformation de vésicules lipidiques [Silva et al., 2019], de globules rouges [Mishra et al., 2014] ou encore simulation de la déformation d'une goutte [Liang and Marzo, 2019]. Dans le cadre de cette hypothèse, on peut déduire la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de l'objet aux extrémités axiales (aussi appelés pôles) [Mishra et al., 2014] :

$$\Delta P = \frac{1}{2}(\rho_{ext} - \rho_{int})\langle v^2 \rangle + \frac{1}{2}(\beta_{ext} - \beta_{int})\langle p^2 \rangle \quad (4.2)$$

avec  $X_{ext}$  et  $X_{int}$  le paramètre  $X$  associés à l'extérieur et l'intérieur de l'objet respectivement, ainsi que  $\rho$  la densité,  $\beta$  la compressibilité,  $v$  la vitesse acoustique et  $p$  la pression acoustique. De la même façon, on peut déterminer cette différence de pression sur le plan du noeud de pression avec l'expression [Mishra et al., 2014] :

$$\Delta P = -\frac{1}{2}\rho_{ext}\langle v_{ext}^2 \rangle + \frac{1}{2}\rho_{int}\langle v_{int}^2 \rangle \quad (4.3)$$

Dans le but de mesurer les forces de compression sur les sphéroïdes, nous avons tenté de trouver des objets de taille similaire à celle des sphéroïdes, soient environ 300  $\mu\text{m}$  de diamètre, déformables avec la force de radiation acoustique. Nous avons essayé de déformer des billes possédant un module d'Young très bas comme des billes de PAA possédant un module d'Young de 1 kPa. Nous n'avons pas encore réussi à les déformer malgré l'amplification de la force acoustique jusqu'à 20 Vpp sur les transducteurs. L'étude formelle de la déformation de grosses billes (diamètre  $\approx$  300  $\mu\text{m}$ ) d'hydrogels de faible module d'Young (ex : Matrigel) restant à documenter.

## 4.6 Discussion

Le système de culture acoustique que nous avons développé permet de contrôler la force acoustique appliquée au piège acoustique et ainsi d'étudier l'impact de l'augmentation de

l'ARF sur la dynamique de croissance de sphéroïdes GB formés à partir de lignée cellulaire de patients.

D'un point de vue méthodologique, l'un des principaux écueils que nous avons rencontrés a été l'élévation de température liée au chauffage du corps du transducteur, diffusant sa chaleur au milieu de culture. Cette augmentation de température, bien que compensée, par la culture dans des incubateurs séparés, reste un frein à l'utilisation à haut débit de ce système. On nommera comme exemple l'actuelle difficulté sur la compression des sphéroïdes. Lors du passage transitoire de 5 à 10 Vpp, on observe un impact sur la déformation du sphéroïde, mais comme les incubateurs ne s'équilibrent pas aussi vite en température que la puce, il est difficile de savoir si cette déformation est due au changement de température ou à la force acoustique. Dans le contexte de mon travail, nous avons fait des essais de changement de voltage à température ambiante pour limiter la montée en température, mais cela n'est pas encore suffisant pour avoir une reproductibilité correcte. A l'heure actuelle, nous savons que le transducteur est la principale source de chaleur. On peut cependant imaginer faire un modèle de diffusion au travers des différents milieux afin de pouvoir étudier la part de température liée à l'acoustique. Il serait aussi utile afin de prédire les augmentations de température pour des voltages encore plus élevés. Une optique d'amélioration de ce système serait d'asservir un incubateur pour qu'il suive la température à l'intérieur d'une puce contrôle afin de pouvoir facilement modifier l'intensité acoustique. Dans ce contexte, les petits incubateurs de platine de microscope présentent l'avantage d'avoir une inertie thermique bien inférieure à celle des incubateurs conventionnels. Enfin, un refroidissement du transducteur par écoulement de liquides ou par effet Peltier pourrait également représenter une piste afin de résoudre définitivement ce problème.

Malgré cet écueil qui a ralenti l'avancée de cette partie de mon travail, nous avons pu réaliser un certain nombre d'expériences visant à étudier l'impact entre une culture à 5 ou à 10 Vpp sur les paramètres de croissance des GB. Concernant les paramètres physiques, les mesures de dynamique de croissance des sphéroïdes s'appuient sur l'estimation d'un diamètre équivalent moyen. Une amélioration de ce paramètre serait d'utiliser le théorème de Guldin qui permet de déterminer un volume par révolution d'un élément de surface autour d'un axe. On aurait ainsi  $V = \pi(S_1 \cdot r_{G_1} + S_2 \cdot r_{G_2})$  avec  $S_n$  l'aire de la demi-surface et  $r_{G_n}$  le rayon entre le centre de masse de la demi-surface  $S_n$  et l'axe de symétrie du sphéroïde.

L'expérience de compression de sphéroïdes avec une culture débutant à 5 Vpp et passant à 10 Vpp après un certain temps est intéressante afin de voir l'impact de la force de radiation acoustique sur la morphologie des sphéroïdes. En plus d'observer la dynamique de déformation, il est possible d'étudier l'impact temporel d'un tel stress, en limitant le temps d'exposition à des hautes températures. Idéalement, si le stress mécanique était suffisamment important, il serait possible d'envisager l'étude de l'impact de forces acoustiques bien supérieures à celles que nous avons étudiées, et ainsi modéliser des phénomènes comme le trauma crânien, via l'utilisation de sphéroïde de cellules neuronales. Il sera toutefois nécessaire de bien caractériser et mesurer les contraintes mécaniques subies dans un

contexte ou les modèles théoriques des forces appliquées aux gros objets (hors limite de Rayleigh) ne sont pas totalement adéquats. Il conviendra donc de poursuivre les tests de déformation de microparticules déformables ayant la taille des sphéroïdes cellulaires que nous avons manipulés. Entre autres, nous projetons de déformer des billes de matrigel au module d'Young très bas. Lorsque nous aurons trouvé un objet que ce système sera en mesure de déformer, il faudra alors poser le cadre théorique pour l'étude de la déformation, comme l'on fait, par exemple, Silva et al. [Silva et al., 2019] pour la déformation de vésicules. Il faudra idéalement ne pas s'appuyer sur l'hypothèse du régime de Rayleigh  $R \ll \lambda$ , et donc certainement utiliser le modèle développé par Baresch et al. [Baresch et al., 2013].

Malgré cela, nous avons réussi à entamer l'étude de l'effet d'une culture au long cours (plusieurs jours) à différentes amplitudes de l'ARF sur la réorganisation de 2 lignées de GB ayant des propriétés distinctes. Les premiers résultats montrent que l'augmentation de l'amplitude de l'onde acoustique semble impacter directement les sphéroïdes en lévitation en augmentant leur prolifération ainsi que leur densité. La répartition des cellules en proliférations semble également impactée, avec des cellules situées plus vers l'intérieur du sphéroïde à forte amplitude acoustique. La majorité de la littérature portant sur la description de l'impact des forces mécaniques sur la prolifération des cellules tumorales documente l'impact de fortes contraintes mécaniques (rigidité ou pression osmotique  $> \text{kPa}$  par exemple). Ces études tendent à montrer que des contraintes mécaniques  $> \text{kPa}$  provoquent une diminution de la prolifération des cellules. Nos prémices de résultats contrastent donc avec ces tendances. De façon intéressante, des résultats similaires aux nôtres ont été reportés concernant les changements de la densité de sphéroïdes sous pression osmotique [Delarue et al., 2014a], mais aussi concernant l'impact de compression magnétique de plus faible amplitude (force volumique de  $70 \text{ kN/m}^3$  qui équivaut à une compression de  $\approx 100 \text{ Pa}$ ) sur l'augmentation de la prolifération [Mary et al., 2022] à l'aide de techniques de compression actives. Ces données suggèrent que des pressions modérées, probablement dans la gamme de pression des tissus biologiques normaux (ex : cerveau dont la rigidité est notablement faible), favorisent la prolifération des cellules tumorales.

L'augmentation du voltage à  $10 \text{ Vpp}$ , provoque également un changement de répartition des cellules en cours de prolifération, de la périphérie vers le coeur des sphéroïdes. S'il est tentant de spéculer que cela pourrait être corrélé à l'augmentation de densité cellulaire, et donc de pression, à l'intérieur des sphéroïdes, on ne peut pas exclure d'autres phénomènes. En particulier, les ondes acoustiques, le streaming et les forces de Bjerknes associées ont été décrits comme augmentant la pénétration de nanoparticules dans des sphéroïdes [Rasouli et al., 2023]. Il est donc concevable que, dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la force de compression acoustique majeure la pénétration d'éléments du milieu de culture (nutriments) à l'intérieur des sphéroïdes de GB, ce qui pourrait expliquer la raison pour laquelle les cellules centrales du sphéroïde ont une prolifération supérieure à haut voltage.

En sus des marquages de viabilité et de DAPI et Ki67 permettant de documenter le nombre et la prolifération des cellules, nous avons tenté d'évaluer si la culture en lévitation

acoustique était associée à une mortalité "active" des cellules. Pour ce faire, quelques expériences pilotes ont été conduites afin de détecter des signes d'apoptose cellulaire. Les caspases étant des protéases à acide cystéine-aspartique, elles jouent un rôle central dans l'exécution de l'apoptose cellulaire. Nous n'avons cependant pas réussi à observer d'immunofluorescence pour le marquage de Caspase3 clivée dans les GB en lévitation, confortant ainsi le fait qu'aux pressions étudiées les ondes ultrasonores aux longs cours ne sont pas délétères pour la culture de cellules de mammifères.

Les mutations du récepteur EGFR, récepteur membranaire tyrosine kinase, sont fréquentes dans les glioblastomes [Caldieri et al., 2018]. De nombreuses preuves montrent que l'EGFR est surexprimé dans la plupart des glioblastomes primaires et dans certains glioblastomes secondaires. De plus, sa surexpression semble caractéristique des phénotypes de glioblastomes les plus agressifs [An et al., 2018]. EGFR est très exprimé dans les deux lignées cellulaires que nous avons étudiées. L'EGFR est soumis à une dynamique importante d'endocytose et export membranaire remanié pendant les processus de migration cellulaire, mais aussi lors de la variation de la rigidité environnementale des GB [Umesh et al., 2014, Basilico et al., 2022]. Afin de voir si l'augmentation de pression acoustique provoquait un remaniement de la localisation de l'EGFR membranaire, nous avons réalisé des marquages membranaires des récepteurs EGFR sur les coupes de GB cultivés à 5 et 10 Vpp. Nous n'avons, pour le moment, pas observé visuellement de différences majeures (sur l'ensemble du sphéroïde) entre les sphéroïdes cultivés à 5 Vpp et ceux cultivés à 10 Vpp. Cependant, dans la mesure où d'une part, les sphéroïdes subissent l'ARF de façon asymétrique selon l'axe radial de lévitation et que, d'autre part, les remaniements de la localisation de l'EGFR s'effectuent au niveau de micro-domaines membranaires des cellules, l'analyse n'est pas aisée. Nous continuons, cependant, les analyses afin de tenter d'établir une cartographie des morphologies cellulaires à plus fort grossissement. Il serait également intéressant de poursuivre l'analyse immunohistochimique sur coupe, notamment via d'autres marqueurs révélant l'état des GB après augmentation des forces acoustiques. Par exemple, l'étude des complexes de molécules d'adhésions, notamment les Connexines tels que Cx43, mais aussi des effecteurs sous membranaires tels que les complexes kinases de types FAK ou mécanorécepteurs (PIEZO) permettraient d'étayer la description des effets de la force acoustique sur les GB. Cependant, une des limitations de cette technique est l'impossibilité actuelle de savoir, lorsqu'ils sont coupés par cryomicrotome, où se situaient les "pôles" des sphéroïdes soumis à l'ARF asymétrique.

Dans ce contexte, au cours de ce travail, afin de pouvoir imager les sphéroïdes sans avoir à le découper au cryostat, nous avons essayé divers protocoles de transparisation. Les techniques de microscopie optique seules ne permettent pas l'observation interne de sphéroïdes au-delà de 50  $\mu\text{m}$  en raison de la faible profondeur de pénétration des photons. Il existe des techniques chimiques permettant de contourner ce problème en transparisant l'agrégat. Ces techniques sont de plus en plus développées et utilisées [Susaki and Ueda, 2016] et reposent principalement sur l'homogénéisation des indices optiques. Parmi les techniques que nous avons utilisées, c'est celle à l'Ubasm [Chen et al., 2017] qui a été la plus prometteuse sur les sphéroïdes, suivi par celle au glycérol [Williams et al., 2019, Nürnberg

[et al., 2020](#)]. La transparisation des sphéroïdes continue d'être explorée au sein de l'équipe afin de pouvoir obtenir une information spatiale complète. Nos protocoles actuels ne nous permettent pas de connaître l'orientation du champ acoustique par rapport aux coupes histologiques. Une vision 3D complète pourrait permettre de trouver cette orientation et voir si l'anisotropie du champ acoustique a un impact sur les sphéroïdes. Une autre technique pour imager le sphéroïde serait d'utiliser des méthodes de tomographie optique (OCT pour Optical Coherence Tomography) [[Apelian et al., 2016](#)]. Via des traceurs non assimilables par les cellules, placés à l'intérieur du sphéroïde, il serait possible de suivre les reconfigurations et les contraintes mécaniques subies par les cellules.



# Chapitre 5

## Matériels et Méthodes

### Sommaire

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>5.1 Dispositifs de culture acoustofluidiques</b> | <b>149</b> |
| 5.1.1 Conception des différentes pièces             | 149        |
| 5.1.2 Puces en PDMS                                 | 150        |
| 5.1.3 Génération des ondes acoustiques              | 151        |
| 5.1.4 Mesures de température                        | 151        |
| <b>5.2 Culture cellulaire</b>                       | <b>152</b> |
| 5.2.1 Culture de glioblastomes et BV2               | 152        |
| 5.2.2 Culture en lévitation acoustique              | 152        |
| 5.2.3 Analyse au bleu Trypan                        | 152        |
| 5.2.4 Fixation, congélation et cryosections         | 153        |
| 5.2.5 Immunohistochimie                             | 153        |
| <b>5.3 Analyses d'images</b>                        | <b>154</b> |
| 5.3.1 Images en vue latérale                        | 154        |
| 5.3.2 Traitement d'images en vue latérale           | 154        |
| 5.3.3 Image de fluorescence sur coupe               | 155        |
| <b>5.4 Autres méthodes</b>                          | <b>157</b> |
| 5.4.1 Analyses statistiques                         | 157        |

---

## 5.1 Dispositifs de culture acoustofluidiques

### 5.1.1 Conception des différentes pièces

Des modèles 3D des chambres et des supports ont été conçus avec *Autodesk Inventor*. La réalisation des pièces en plexiglas est faite par découpe laser. Le modèle 3D de la pièce concernée est projeté sur un plan 2D puis exporté vers *Adobe Illustrator*. Via ce logiciel, on positionne la pièce à découper et on communique avec la découpeuse laser

(50W Laser CO2 *Epilog Helix*). Une plaque de plexiglas d'épaisseur choisie est placée dans la découpeuse laser puis découpée. La découpe se fait classiquement à puissance maximale (100%) en adaptant la vitesse de coupe à l'épaisseur de plexiglas.

Le moule des puces multi-noeuds est réalisé en deux découpes successives au cutter laser. Une première découpe rectangulaire d'épaisseur 5 mm est réalisée dans une plaque de plexiglas de 8 mm d'épaisseur. Cette barre est ensuite pivotée à 90° afin d'utiliser les surfaces supérieure et inférieure qui sont lisses et polies de la plaque de plexiglas originelle comme zone d'accès optique latéral pour la puce multi-noeuds. On découpe la forme désirée de la puce multi-noeuds dans cette barre également au cutter laser. Il faut faire attention à ce que le laser n'altère pas l'état de surface au niveau des accès optiques. Pour cela, on peut notamment laisser le film protecteur du plexiglas lors de la découpe. Les surfaces supérieures et inférieures du moule en plexiglas sont limées afin de supprimer les irrégularités macroscopiques de la découpe laser.

Pour le moule des puces mono-noeud, c'est une plaque de plexiglas d'épaisseur 1,5 mm qui est utilisée et une seule découpe est nécessaire. Afin de limiter les traces d'à-coups au niveau de la découpe, la vitesse de la découpeuse laser peut être grandement réduite, mais il faudra également réduire sa puissance en conséquence.

Une fois les chambres réalisées en plexiglas, elles sont collées à la superglue au fond d'une boîte en plastique rectangulaire et laissée reposée un jour à température ambiante (RT). Ce moule est réutilisable un grand nombre de fois tant que le plexiglas reste bien collé et les surfaces d'accès optiques bien lisses. Par précaution, la première puce en PDMS réalisée avec ce moule n'est pas utilisée pour de la culture. Cette précaution permet d'éviter les éventuelles traces de colles pouvant être retrouvées dans le PDMS et qui pourraient altérer une culture réalisée avec cette première puce.

Pour les impressions 3D, les modèles sont exportés au format STL, slicés avec le logiciel *Insight* puis imprimés sur une imprimante 3D (Fortus 250mc, *Stratasys*). Les pièces sont ensuite placées dans un bain de soude afin de dissoudre l'impression dite de support.

### 5.1.2 Puces en PDMS

Du PDMS *Sylgard 184* de *Dow Corning* est préparée pour être moulé dans les moules en plexiglas. Il se compose de deux parties, une base en silicium et un agent de durcissement. Ces deux parties sont mélangées avec un ratio masse/masse (w/w) de 90% pour la base et de 10% pour l'agent. Elles sont mélangées afin d'obtenir un PDMS homogène. Ce PDMS est dégazé dans une chambre à vide jusqu'à ce qu'aucune bulle ne soit visible en surface (de l'air est régulièrement injecté dans la chambre à vide afin d'éviter que le PDMS ne déborde de son récipient). L'étape de dégazage durent  $\approx 30$  min, mais ce temps dépend fortement de la masse de PDMS à dégazer. Le PDMS dégazé est ensuite étalé dans un moule en plexiglas jusqu'à la hauteur désirée, souvent entre 1 et 3 mm au-dessus du moule en plexiglas. Une fois le PDMS dégazé et coulé, le moule est placé 3h dans un four à 70°C (à RT, le PDMS mettrait environ 2 jours à durcir). Une fois sortis du four, les moules sont gardés pleins jusqu'à leur utilisation.

Pour faire la puce, le PDMS est démoulé en prenant garde à ne pas abîmer les surfaces d'accès optiques. Il est ensuite découpé au scalpel afin de lui donner une dimension légèrement plus petite qu'une lamelle de verre (25 × 75 mm). On réalise ensuite les deux ouvertures par punchage. Pour une perfusion en flux, des réservoirs de 1,5 mm de diamètre (inlet et outlet) sont percés afin d'être utilisés avec des tuyaux de même diamètre connectés à un pousse-seringue. Pour une manipulation des milieux avec une pipette, la même ouverture de diamètre 1,5 mm est effectuée en inlet, tandis qu'une ouverture de 3 mm de diamètre est effectuée en outlet. Ces étapes n'étant pas faites dans une salle blanche, les poussières présentes sur les surfaces du PDMS sont éliminées à l'aide de scotch puis le bloc de PDMS est déposé sur la plaque du plasma. Les lamelles de verre, qui seront collées au PDMS, sont nettoyées à l'isopropanol et déposées sur cette même plaque. Après le cycle de plasma à oxygène (*Diener Electronic* : puissance 100%, 0,6 mBar), le bloc de PDMS est collé à la lamelle de verre puis rempli d'eau distillée. Les puces terminées sont stérilisées au minimum 30 min aux UV puis utilisées dans l'heure qui suit pour une culture en lévitation.

### 5.1.3 Génération des ondes acoustiques

Les transducteurs utilisés sont les TR0205SS provenant de chez *Signal Processing*. Ils sont alimentés via un Handyscope HS5 du fabricant néerlandais *TiePie* pour la culture comme pour les caractérisations. Le logiciel *Multi-Channel Software* version 1.45 fourni par *TiePie* permet de paramétrer le générateur. Certaines cultures ont également été alimentées via un générateur 72-3555 du fabricant *TENMA*. Les transducteurs sont alimentés via ces générateurs dans la gamme de fréquences 1,9 à 2,1 MHz et la gamme de voltage 0 à 12 Vpp. Une culture cellulaire classique se fera par exemple à 2 MHz et 5 Vpp. Afin d'augmenter la puissance fournie au transducteur au-delà de 12 Vpp, le générateur Handyscope est couplé à un amplificateur (*National Instruments*, PXI-1033).

### 5.1.4 Mesures de température

Nous avons conçu un système de mesure avec une carte *Arduino* (UNO Rév. 3), des thermocouples type K (*RS PRO*, MB-ISK-S10-1000-MP-I) de 1 mm de diamètre pour une longueur de câble de 1 m et un shield permettant d'utiliser ces thermocouples (*Analog Devices*, CN0391). La console *Arduino* nous donne, à chaque mesure définie par un pas de temps, la valeur des thermocouples. Ces données sont copiées dans un fichier texte et traitées sous *Matlab* (R2022a). Afin d'afficher le delta de température, une plage de données stable est choisie comme référence et est moyennée afin de servir de référentiel. Une puce de 60 mm de haut a été conçue spécialement pour l'expérience de température. Elle est composée de 2 pièces de PDMS qui ont été "soudées" ensemble avec du PDMS, avec les thermocouples insérés à l'interface. Ces deux pièces de PDMS ont été produites de manière analogue aux autres puces.

## 5.2 Culture cellulaire

### 5.2.1 Culture de glioblastomes et BV2

Nous avons utilisé une lignée primaire de glioblastome mise au point par l'équipe *plasticité gliale* de l'IBPS dirigée par Hervé Chneiweiss et Marie-Pierre Junier. Les cellules dérivées de patients (Patient Derived Cells (PDC)) 6240 et R633 ont été obtenues à partir d'échantillons de biopsies neurochirurgicales de GB primaires. La culture de ces cellules est décrite dans [El-Habr et al., 2017].

Des cellules BV2 ont été cultivées afin de créer un modèle d'infiltration de sphéroïde tumoral par des cellules immunitaires. Elles ont été cultivées dans des flasques T75 avec un milieu à base de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, *ThermoFisher*, 31966 021) et comprenant 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, *GE Healthcare*).

### 5.2.2 Culture en lévitation acoustique

La puce et son support sont installés sous hotte ou PSM afin de limiter la contamination. Une fois assemblé, l'eau contenue dans les puces est remplacée par du milieu de culture décrit dans [El-Habr et al., 2017] contenant des facteurs de croissance. Le transducteur est mis en marche à 7 Vpp et 2 MHz puis les cellules sont injectées (50  $\mu\text{L}$  à une concentration de  $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) et plusieurs aller-retours sont effectués afin d'homogénéiser la densité de cellules dans la zone de lévitation. On équilibre le niveau de milieu dans la puce afin que cela ne déborde pas et on place les cache-puits qui ont été également stérilisés à l'UV comme les puces acoustofluidiques. Une fois les cache-puits posés, la mise au point des caméras est ajustée. On peut ajouter, si nécessaire, d'un morceau de silicium juste derrière la puce afin d'avoir un meilleur contraste sur les images. Le système peut ensuite être délicatement placé à l'intérieur de l'incubateur préalablement ajusté à la bonne température. Enfin, le voltage peut maintenant être ajusté si nécessaire (5 Vpp ou 10 Vpp par exemple). Deux câbles (ceux du microscope numérique et du transducteur) devront sortir de cet incubateur pour chaque système mis à l'intérieur. Ces câbles ayant un diamètre relativement fin, ils ne perturbent pas l'équilibre de l'incubateur tant qu'ils ne sont pas présents en trop grand nombre.

Le suivi en temps réel par microscope à fluorescence inversé (*Zeiss*) est réalisé avec un incubateur de platine (*TOKAI HIT*) permettant la régulation en  $\text{CO}_2$  et en température du système.

### 5.2.3 Analyse au bleu Trypan

Après avoir enlevé la paroi supérieure des puces acoustofluidiques, les cellules lévitées et non-lévitées sont collectés séparément puis centrifugées à 3 000 rotations par minute (RPM) pendant 1 min. Le milieu est retiré et 50  $\mu\text{L}$  d'accutase (*Gibco*, StemPro Accutase) est ajouté pour dissocier les cellules avec 10 allers-retours. Elles sont ensuite placées à 37°C pendant 5 minutes puis 50  $\mu\text{L}$  de bleu trypan (*Invitrogen*, Trypan Blue stain 0,4%, *Thermo*

*Fisher Scientific*) est ajouté. Après 3 min à RT, 10  $\mu$ L sont injectés dans une lame spéciale afin de compter les cellules avec un compteur automatique (*Invitrogen Countess*).

#### 5.2.4 Fixation, congélation et cryosections

A la fin de la culture, l'acoustique est coupée et les agrégats sédimentent. La puce est démontée du support puis la paroi supérieure de PDMS est délicatement découpée et retirée à l'aide d'un scalpel. Les agrégats sont récupérés à l'aide d'une pipette P1000. Pour moins stresser les agrégats, il est possible d'élargir l'entrée du cône de pipette en coupant celui-ci au scalpel. Une fois récupérés, les agrégats sont fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA, *Electron Microscopy Science*) pendant 15 minutes puis placés en solution de sucrose à 15% (*Sigma*) et de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, *Thermo Fisher*) jusqu'à sédimentation. Ils sont enfin placés en solution de PBS à 30% de sucrose à 4°C jusqu'à leur utilisation (il faut attendre qu'ils aient sédimenté avant de les utiliser).

Afin de congeler les agrégats, nous utilisons un moule en silicone (dimension 10  $\times$  5  $\times$  3 mm) que l'on remplit préalablement de milieu d'enrobage à température de coupe optimale pour les échantillons de tissus congelés (OCT). On vient pipeter les agrégats avec une P200, dont on a préalablement coupé le cône afin de l'élargir. Une fois les agrégats dans le cône de pipette, on attend que ceux-ci sédimentent jusqu'à se retrouver à l'intérieur du ménisque formé par le liquide en sortie du cône. On vient alors déposer le ménisque, qui contient les agrégats, sur l'OCT sans appliquer de pression avec la pipette afin de minimiser la dépose de sucrose. En effet, le sucrose se découpe mal avec un cryostat et peut créer des trous, endommageant les agrégats. Une fois à l'intérieur de l'OCT, l'agrégat sédimente et se retrouve sur la face inférieure du moule en silicone, facilitant son repérage lors de la découpe. En plus de sa position, l'OCT utilisé est violet, ce qui facilite la détection à l'oeil nu d'un agrégat de  $\approx$  300  $\mu$ m de diamètre congelé à l'intérieur. On découpe au microtome (*Leica Biosystems*) l'OCT et les agrégats avec une épaisseur de coupe de 25  $\mu$ m. On vient déposer ces coupes sur une lame superfrost qui seront conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

#### 5.2.5 Immunohistochimie

La perméabilisation des cryosections est effectuée avec une solution de PBS à 1% de sérum d'albumine bovin (BSA, *Sigma*) et 0,2% de Triton (*Sigma*, X100) pendant 5 minutes à température ambiante. La saturation est ensuite faite avec une solution de PBS à 10% de BSA pendant 1 heure à RT. Les anticorps primaires sont dilués dans une solution PBS à 5% de BSA et placés pendant une nuit à 4°C. L'anticorps Ki67 (*Agilent*, M7240) a été utilisé pour colorer la prolifération cellulaire à une concentration de 1/1000. L'anticorps couplé EGFR (*BioLegend*, Alexa Fluor 488) est utilisé pour marquer la membrane cellulaire à 1/500. Afin d'éviter un marquage croisé entre EGFR et Ki67, une étape supplémentaire d'incubation des anticorps est effectuée. La phalloïdine (*ThermoFischer*) a été utilisée pour marquer les filaments d'actines à 1/500. L'anticorps ED1 (*Sigma*) a été

utilisé pour marquer les cellules BV2 à 1/500. L'anticorps Caspase-3 clivé (*Santa Cruz Biotech*) a été utilisé pour marquer les cellules apoptotiques. Des anticorps secondaires couplés aux protéines Alexa Fluor 488, 555 ou 633 (*ThermoFisher*) ont été utilisés à 1/500 et incubés 2 heures à RT. Les lames ont été lavées au moins 3 fois entre chaque étape avec une solution de PBS.

## 5.3 Analyses d'images

### 5.3.1 Images en vue latérale

Lors des cultures, une image est prise toutes les 5 minutes afin de suivre la croissance des sphéroïdes. L'image est prise avec un microscope numérique USB (*Dino-Lite*, AM2111) possédant une résolution de  $640 \times 480$  pixels. Ce microscope est relié à un ordinateur utilisant le logiciel *DinoCapture* version 2.0 fourni par *Dino-Lite*. A la fin de la culture, une image est également prise après l'arrêt des ondes acoustiques afin d'obtenir une image du fond. Un meilleur modèle de *Dino-Lite* a été utilisé pour les analyses PIV, le tout est détaillé dans la partie *Materials and Methods* de l'article [Jeger-Madiot et al., 2022]. Les vidéos de tracking de particules ont été faites avec une caméra sCMOS (*PCO*, Panda Back Illuminated) via le logiciel *Camware* couplé à des objectifs 5X et 10X (*Olympus*). L'illumination était faite avec une source de lumière blanche ou une source LED (*CoolLed*, pE-4000-F-SYS-ZZ).

### 5.3.2 Traitement d'images en vue latérale

Les images prises sont analysées avec le logiciel *FIJI* [Schindelin et al., 2012]. Le tracking des particules est réalisé avec le plugin **Trackmate** sur les images préalablement converties en 8 bits [Tinevez et al., 2017, Ershov et al., 2022]. Les données de tracking générées par **Trackmate** sont sauvegardées au format **xml**. L'analyse et l'affichage des résultats sont réalisés avec le logiciel *Matlab*. **Trackmate** a été principalement utilisé avec le détecteur en **LoG** (Laplacian of Gaussian) ou en **thresholding** (seuil d'intensité). L'intensité du seuil ou la taille des objets estimée sont déterminés visuellement par l'utilisateur. Le tracker utilisé est principalement l'**Advanced Kalman** ou le **Nearest-Neighbor** (plus proche voisin). Les paramètres du tracker sont estimés par l'utilisateur en observant le déplacement d'une particule entre 2 images.

Pour l'analyse de la taille des sphéroïdes, tout est réalisé directement avec le logiciel *Matlab* (R2022a). L'image de background prise en fin de culture est soustraite à chaque autre image. Toutes les images sont converties en niveaux de gris via la fonction **rgb2gray**. L'image en cours de traitement est réduite à la zone d'intérêts, afin d'accélérer le traitement, puis binarisé avec la fonction **imbinarize**, les petits objets sont enlevés via la fonction **bwareaopen** avec un critère égal à 10 et les vides sont comblés avec la fonction **imfill**. Lorsque la détection est difficile, les fonctions **imsharpen** et **imgaussfilt** peuvent être utilisées dans cet ordre afin d'améliorer la détection de la frontière avec

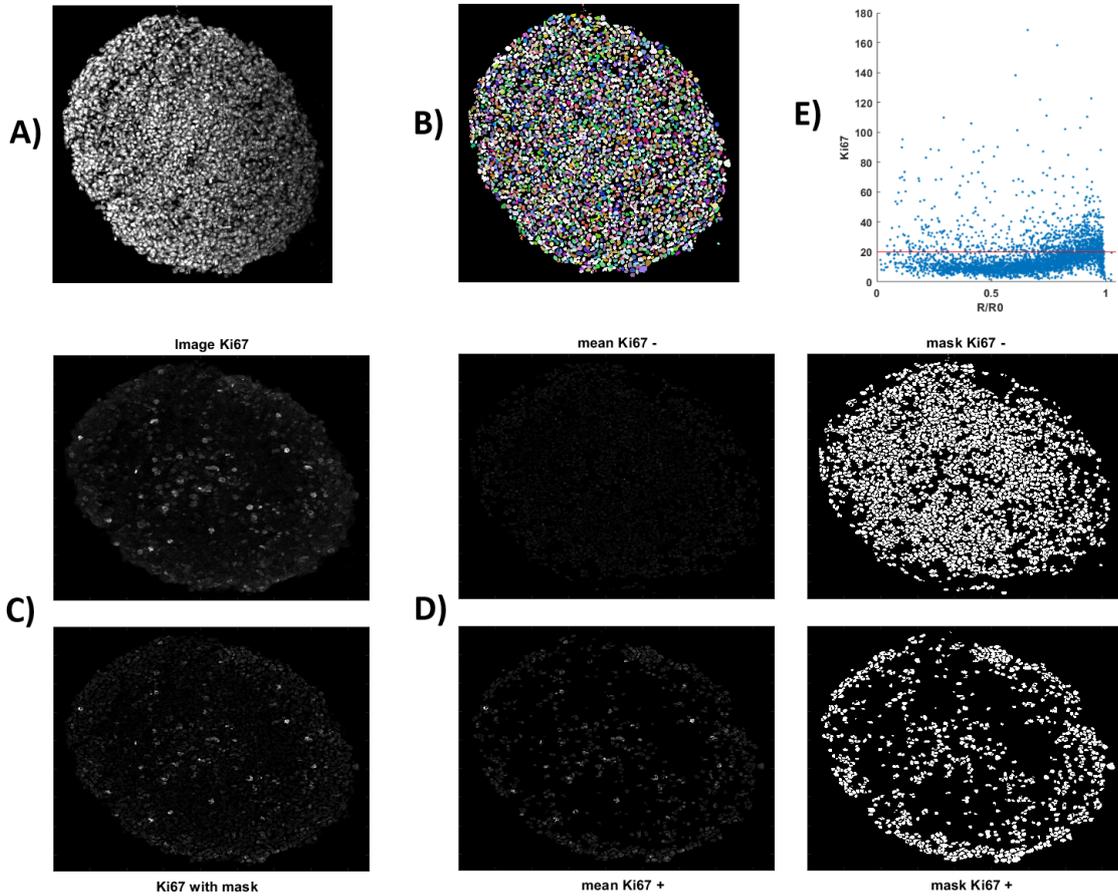
**imbinarize.** La fonction **regionprops** est utilisée sur l'image binarisée afin d'obtenir les différents paramètres avec les options suivantes : 'Area', 'Centroid', 'BoundingBox', 'Circularity', 'Eccentricity', 'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', 'Orientation', 'EquivalentDiameter', 'Image'. Si plusieurs objets sont détectés par la fonction **regionprops**, on ne garde que celui ayant la plus grande aire. Afin de vérifier le bon déroulement de la détection, une vidéo est créée avec les différentes images ainsi qu'avec le contour détecté. Cette vidéo permet donc de voir visuellement si la détection a fonctionné correctement. La PIV est réalisée avec le logiciel *Matlab* via l'utilisation de l'application PIVlab [Thielicke and Sonntag, 2021]. Les détails complets peuvent être trouvés dans la partie *Materials and Methods* de cette publication [Jeger-Madiot et al., 2022].

### 5.3.3 Image de fluorescence sur coupe

Les premières images ont été prises avec un Axio-observer Z1 (*Zeiss*), des objectifs 5X et 20X (*Zeiss*) et une caméra CCD accompagnée du logiciel *Metamorph* (*Hamamatsu*, ORCA-Flash 4, Coolsnap HQ2, *Roper Scientific*). Les images, en vue d'effectuer les analyses sur le marquage Ki67, ont été obtenues avec un microscope confocal utilisant le logiciel *Zen* (*Zeiss LSM 980 Inverted*, Confocal laser scanning microscopy, Airyscan 2, Fluorescence-Lifetime Imaging module, laser diodes from 405 nm to 639 nm, Colibri 7 LED light source, *Zeiss ZEN Blue 3*)

Pour analyser numériquement les images de fluorescence, nous utilisons le logiciel *FIJI* [Schindelin et al., 2012] avec le plugin StarDist [Schmidt et al., 2018] afin de segmenter les cellules grâce au marquage DAPI et ainsi créer une ROI (région d'intérêt) pour chaque cellule comme montrée figure 5.1. On sauvegarde cette segmentation en image sous format *tif* afin de pouvoir l'importer sur *Matlab*. De cette segmentation, nous pouvons définir le centre de chaque ROI, et de ces centres de ROI, nous pouvons déterminer le centre de la coupe. Nous allons ensuite définir l'éloignement au centre des cellules en  $\frac{R}{R_0}$ .  $R$  est défini comme la distance entre le centre de la ROI d'une cellule et le centre de l'agrégat.  $R_0$  est défini comme la distance entre le centre et le bord de l'agrégat, le bord étant trouvé en prolongeant le segment formé par le centre de l'agrégat et le centre de la ROI. Il peut arriver, avec cette méthode, de trouver des ROI avec un  $\frac{R}{R_0} > 1$ , mais dans ce cas, nous les considérerons égaux à 1.

Il nous reste à définir le critère numérique de positivité pour le marqueur Ki67 associé à chaque ROI. Nous avons décidé d'utiliser la moyenne du marquage Ki67 sur chaque ROI et de le comparer à un seuil défini par l'utilisateur. En affichant les images de fluorescence Ki67 contenant uniquement les ROI positive d'un côté et négative de l'autre, l'utilisateur est en mesure de définir visuellement ce seuil pour chaque image comme illustré figure 5.1. La densité est déterminée en divisant le nombre de ROI détectées par  $\pi\langle R_0 \rangle^2$ . Il est possible de déterminer également l'orientation des ROI en les assimilant à des ellipses et en regardant l'orientation de leur axe principal.



**Figure 5.1 Traitement d'images et définition du seuil pour le comptage des cellules Ki67 positives sur une coupe d'agrégat 10 Vpp après 3 jours de culture** **A)** Image du marquage des noyaux cellulaires (DAPI) **B)** Extraction à partir de l'image DAPI des ROI via Stardist **C)** Images du marquage Ki67. L'image du haut est l'image exacte, l'image du bas n'affiche que les pixels présents dans une ROI. On observe une légère diminution d'information. Celle-ci est inévitable, mais permet toujours d'identifier visuellement les zones avec ou sans Ki67. **D)** Images issues de la détermination visuelle du seuil par l'utilisateur. Les images du haut correspondant aux ROI ont une intensité moyenne inférieure au seuil. Les images du bas sont celles ayant une intensité moyenne supérieure au seuil. Les images de gauche affichent l'intensité de Ki67 dans les ROI concernées et celle de droite affiche uniquement les ROI concernées. **E)** Graphique de l'intensité moyenne des ROI en fonction de leur  $\frac{R}{R_0}$ . La ligne rouge représente le seuil utilisé. Les images **C)** et **D)** sont produites via *Matlab* et sont visuellement déformées par rapport aux 'vraies' images visibles en **A)**.

## 5.4 Autres méthodes

### 5.4.1 Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec *GraphPad Prism* version 6. Pour toutes les données confondues, y compris celles générées par *Prism*, ce sont systématiquement la moyenne et l'écart-type qui sont représentés. La signification statistique a été évaluée à l'aide de tests ANOVA 2way ou de t-test non apparié avec correction de Welsh.



# Conclusion générale

La biophysique offre de plus en plus de solutions aux études biologiques, en particulier sur les études de contraintes mécaniques cellulaires et tissulaires ou pour la formation de modèles d'études complexes. La lévitation acoustique, notamment, ouvre de nouvelles possibilités. Elle permet la formation d'agrégat sans aucun contact solide, permet de structurer spatialement des agrégats avec différents types cellulaires ou permet d'appliquer des forces de radiation acoustique aux sphéroïdes en lévitation.

La majeure partie de ce travail de thèse a consisté à développer et optimiser un système de culture de sphéroïdes cellulaire en lévitation acoustique pour entreprendre des expériences au long cours. Deux micro-systèmes distincts, complémentaires, ont été développés : une puce conçue pour former un unique agrégat, compatible avec les systèmes d'imagerie inversés et dans lesquels les écoulements fluidiques sont optimisés pour permettre un contrôle fin du micro-environnement fluide des sphéroïdes en lévitation. Un second dispositif a été conçu pour permettre la culture de multiples agrégats en parallèle et qui sont observables latéralement grâce à l'adjonction d'un mini-microscope numérique intégré au support de culture. Nous avons caractérisé les propriétés acoustiques de nos bioréacteurs et montré qu'il était possible de cultiver pendant plusieurs jours des sphéroïdes cellulaires. Dans une première étude, en manipulant les paramètres acoustiques, nous avons pu montrer qu'il était possible de contrôler la fusion de deux sphéroïdes en cours de lévitation. Grâce à une très étroite collaboration avec l'équipe des Drs Chneiweiss et Junier, dans une deuxième étude, en manipulant les paramètres fluidiques, nous avons montré qu'il était possible de complexifier la nature des sphéroïdes en lévitation en contrôlant l'ajout de cellules immunitaires à la surface des sphéroïdes de glioblastomes. La dernière partie de mon travail de thèse ayant consisté à entamer l'étude de l'effet de variations de contraintes mécaniques provoquées par la force de radiation acoustique sur l'auto-organisation de deux lignées de sphéroïdes de glioblastomes.

Les systèmes de culture en lévitation acoustique sont à présent aboutis, caractérisés et ont été utilisés sur de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, neuronales et épithéliales). La viabilité des cellules et sphéroïdes lévités a été démontré jusqu'à une semaine sans renouvellement du milieu de culture, bien que l'utilisation de ces puces en flux continu ait été anticipée afin de le renouveler. Le panel d'applications possibles pour ces systèmes est très large. Nous avons montré qu'il est possible de former des agrégats concentriques, de faire fusionner des sphéroïdes, d'observer des différences d'auto-organisation en sphéroïde, de réaliser un modèle d'infiltration ou de modifier les contraintes mécaniques au

sein de ces systèmes. Ils ont également prouvé leur efficacité et leur praticité lors de campagne de vols paraboliques via, entre autres, l'étude des rythmes calciques de sphéroïdes neuronaux en lévitation. Ces systèmes continuent d'être utilisés au sein des différentes équipes, notamment pour des projets de doctorats. Néanmoins, les forces de radiation acoustique appliquées aux sphéroïdes sont asymétriques, sans contact et dépendent de la taille des objets en lévitation. Il est donc nécessaire, pour la suite de ce type d'étude, de quantifier et caractériser la force de radiation acoustique appliquée en tout point d'un sphéroïde en fonction de sa taille et de sa forme. Cette quantification permettra une meilleure comparaison entre ce type de système et ceux présents dans la littérature.

Au cours du développement tumoral, il est maintenant reconnu que les contraintes présentes dans le micro-environnement tumoral favorisent le développement de la tumeur. Que ce soit à l'échelle de la cellule ou du tissu, les contraintes impactent leur développement et leurs organisations. Nous avons observé, au travers de nos expériences, que les contraintes provoquaient une augmentation de la prolifération et de la densité des sphéroïdes de glioblastomes. De nombreuses autres études montrent une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses lors de contraintes mécaniques différentes et plus importantes. Il doit donc être possible de déterminer un seuil d'amplitude acoustique à partir duquel la prolifération des sphéroïdes diminue. Les études menées sur les cultures en lévitation acoustique vont permettre de générer de nouveaux modèles biologiques et, à terme, permettre d'accroître les connaissances sur le lien entre contrainte mécanique et comportement biologique.

# Annexe A

## Listes des paramètres

| Eau                       |                |             |                      |
|---------------------------|----------------|-------------|----------------------|
| Paramètre                 | Valeur         | Unités      | Référence            |
| Densité                   | 997            | $kg.m^{-3}$ | [ ]                  |
| Célérité                  | 1498           | $m/s$       | [ ]                  |
| Coefficient d'atténuation | $0.0253 * f^2$ | $Np/m$      | [Zhang et al., 2016] |

$f$  est la fréquence en MHz pour le coefficient d'atténuation de l'eau à RT.

| PDMS (10 :1) |        |             |                     |
|--------------|--------|-------------|---------------------|
| Paramètre    | Valeur | Unités      | Référence           |
| Densité      | 1030   | $kg.m^{-3}$ | [Xu et al., 2020]   |
| Célérité     | 1030   | $m/s$       | [Xu et al., 2020]   |
| Atténuation  | 5,75   | $dB/cm$     | [Tsou et al., 2008] |

| Huile d'olive (37°C)      |        |             |                      |
|---------------------------|--------|-------------|----------------------|
| Paramètre                 | Valeur | Unités      | Référence            |
| Densité                   | 913    | $kg.m^{-3}$ | [Liang et al., 2018] |
| Célérité                  | 1450   | $m/s$       | [Liang et al., 2018] |
| Coefficient d'atténuation | 0,4    | $dB/cm$     | [Zhang et al., 2016] |

| Lame de verre |        |             |                   |
|---------------|--------|-------------|-------------------|
| Paramètre     | Valeur | Unités      | Référence         |
| Densité       | 2200   | $kg.m^{-3}$ | [Selfridge, 1985] |
| Célérité      | 5900   | $m/s$       | [Selfridge, 1985] |

| Air       |        |             |           |
|-----------|--------|-------------|-----------|
| Paramètre | Valeur | Unités      | Référence |
| Densité   | 1,2    | $kg.m^{-3}$ | /         |
| Célérité  | 340    | $m/s$       | /         |

| Paramètres des particules |                            |                            |                   |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| Matériaux                 | Densité<br>( $kg.m^{-3}$ ) | Célérité<br>( $m.s^{-1}$ ) | Référence         |
| Polystyrène<br>(PS)       | 1040                       | 2320                       | [Selfridge, 1985] |
| Titane                    | 4480                       | 6100                       | [Selfridge, 1985] |
| Verre                     | 2200                       | 5900                       | [Selfridge, 1985] |

# Bibliographie

- [Acerbi et al., 2015] Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y., Liphardt, J., Hwang, E., and Weaver, V. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ecm stiffening and immune cell infiltration. *Integrative Biology*, 7(10) :1120–1134.
- [Ackermann et al., 2021] Ackermann, J., Amar, M. B., and Joanny, J.-F. (2021). Multi-cellular aggregates, a model for living matter. *Physics Reports*, 927 :1–29.
- [Adrian, 1986] Adrian, R. J. (1986). Image shifting technique to resolve directional ambiguity in double-pulsed velocimetry. *Applied optics*, 25(21) :3855–3858.
- [Alessandri et al., 2013] Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kießling, T. R., Fetler, L., Rico, F., Scheuring, S., Lamaze, C., Simon, A., et al. (2013). Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37) :14843–14848.
- [Alric et al., 2022] Alric, B., Formosa-Dague, C., Dague, E., Holt, L. J., and Delarue, M. (2022). Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nature Physics*, 18(4) :411–416.
- [An et al., 2018] An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q.-W., and Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor and egfrviii in glioblastoma : signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12) :1561–1575.
- [Ao et al., 2021] Ao, Z., Cai, H., Wu, Z., Ott, J., Wang, H., Mackie, K., and Guo, F. (2021). Controllable fusion of human brain organoids using acoustofluidics. *Lab on a Chip*, 21(4) :688–699.
- [Aoun et al., 2019] Aoun, L., Larnier, S., Weiss, P., Cazales, M., Herbulot, A., Ducommun, B., Vieu, C., and Lobjois, V. (2019). Measure and characterization of the forces exerted by growing multicellular spheroids using microdevice arrays. *Plos one*, 14(5) :e0217227.
- [Apelian et al., 2016] Apelian, C., Harms, F., Thouvenin, O., and Boccara, A. C. (2016). Dynamic full field optical coherence tomography : subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis. *Biomedical optics express*, 7(4) :1511–1524.
- [Apfel, 1988] Apfel, R. E. (1988). Acoustically induced square law forces and some speculations about gravitation. *American Journal of Physics*, 56(8) :726–729.

- [Arjoca et al., 2022] Arjoca, S., Robu, A., Neagu, M., and Neagu, A. (2022). Mathematical and computational models in spheroid-based biofabrication. *Acta Biomaterialia*.
- [Ashkin, 1970] Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4) :156.
- [Ashkin et al., 1986] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., and Chu, S. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5) :288–290.
- [Augustsson et al., 2011] Augustsson, P., Barnkob, R., Wereley, S. T., Bruus, H., and Laurell, T. (2011). Automated and temperature-controlled micro-piv measurements enabling long-term-stable microchannel acoustophoresis characterization. *Lab on a Chip*, 11(24) :4152–4164.
- [Bach and Bruus, 2020] Bach, J. S. and Bruus, H. (2020). Suppression of acoustic streaming in shape-optimized channels. *Physical Review Letters*, 124(21) :214501.
- [Bangasser et al., 2017] Bangasser, B. L., Shamsan, G. A., Chan, C. E., Opoku, K. N., Tüzel, E., Schlichtmann, B. W., Kasim, J. A., Fuller, B.J., McCullough, B. R., Rosenfeld, S. S., et al. (2017). Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nature communications*, 8(1) :15313.
- [Baresch et al., 2013] Baresch, D., Thomas, J.-L., and Marchiano, R. (2013). Three-dimensional acoustic radiation force on an arbitrarily located elastic sphere. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133(1) :25–36.
- [Baresch et al., 2016] Baresch, D., Thomas, J.-L., and Marchiano, R. (2016). Observation of a single-beam gradient force acoustical trap for elastic particles : acoustical tweezers. *Physical review letters*, 116(2) :024301.
- [Basan et al., 2009] Basan, M., Risler, T., Joanny, J.-F., Sastre-Garau, X., and Prost, J. (2009). Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP journal*, 3(4) :265–272.
- [Basilico et al., 2022] Basilico, B., Palamà, I. E., D’Amone, S., Lauro, C., Rosito, M., Grieco, M., Ratano, P., Cordella, F., Sanchini, C., Di Angelantonio, S., et al. (2022). Substrate stiffness effect on molecular crosstalk of epithelial-mesenchymal transition mediators of human glioblastoma cells. *Frontiers in Oncology*, 12.
- [Baudoin and Thomas, 2020] Baudoin, M. and Thomas, J.-L. (2020). Acoustic tweezers for particle and fluid micromanipulation. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 52 :205–234.
- [Baudoin et al., 2020] Baudoin, M., Thomas, J.-L., Sahely, R. A., Gerbedoen, J.-C., Gong, Z., Sivery, A., Matar, O. B., Smagin, N., Favreau, P., and Vlandas, A. (2020). Spatially selective manipulation of cells with single-beam acoustical tweezers. *Nature Communications*, 11(1) :4244.
- [Bazir, 2020] Bazir, A. (2020). *Etude des propriétés mécaniques de sphéroïdes multicellulaires tumoraux à l’aide d’ondes acoustiques*. PhD thesis, Lyon.

- [Beghin et al., 2022] Beghin, A., Greci, G., Sahni, G., Guo, S., Rajendiran, H., Delaire, T., Mohamad Raffi, S. B., Blanc, D., de Mets, R., Ong, H. T., et al. (2022). Automated high-speed 3d imaging of organoid cultures with multi-scale phenotypic quantification. *Nature Methods*, 19(7) :881–892.
- [Bellebon, 2021] Bellebon, L. (2021). Manipulation de cellules souches par force de radiation acoustique pour la fabrication de tissus biologiques et développement d’une méthode de tri cellulaire. *PhD thesis, Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, ESPCI Paris, -(-) :-*.
- [Bellebon et al., 2022] Bellebon, L., Sugier, H. R., Larghero, J., Peltzer, J., Martinaud, C., Hoyos, M., and Aider, J.-L. (2022). Characterization of mesenchymal stromal cells physical properties using acoustic radiation force. *Frontiers in Physics*, page 715.
- [Bercoff et al., 2004] Bercoff, J., Pernot, M., Tanter, M., and Fink, M. (2004). Monitoring thermally-induced lesions with supersonic shear imaging. *Ultrasonic imaging*, 26(2) :71–84.
- [Bjerknes, 1909] Bjerknes, V. (1909). *Die Kraftfelder*, volume 28. F. Vieweg.
- [Blackmore et al., 2019] Blackmore, J., Shrivastava, S., Sallet, J., Butler, C. R., and Cleveland, R. O. (2019). Ultrasound neuromodulation : a review of results, mechanisms and safety. *Ultrasound in medicine & biology*, 45(7) :1509–1536.
- [Bogéas et al., 2018] Bogéas, A., Morvan-Dubois, G., El-Habr, E. A., Lejeune, F.-X., Defrance, M., Narayanan, A., Kuranda, K., Burel-Vandenbos, F., Sayd, S., Delaunay, V., et al. (2018). Changes in chromatin state reveal arnt2 at a node of a tumorigenic transcription factor signature driving glioblastoma cell aggressiveness. *Acta neuropathologica*, 135 :267–283.
- [Böhm et al., 2000] Böhm, H., Anthony, P., Davey, M., Briarty, L., Power, J., Lowe, K., Benes, E., and Gröschl, M. (2000). Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonic fields of different energy density and wave type. *Ultrasonics*, 38(1-8) :629–632.
- [Boluriaan and Morris, 2003] Boluriaan, S. and Morris, P. J. (2003). Acoustic streaming : from rayleigh to today. *International Journal of aeroacoustics*, 2(3) :255–292.
- [Boot et al., 2023] Boot, R. C., Roscani, A., van Buren, L., Maity, S., Koenderink, G. H., and Boukany, P. E. (2023). High-throughput mechanophenotyping of multicellular spheroids using a microfluidic micropipette aspiration chip. *Lab on a Chip*.
- [Bouyer et al., 2016] Bouyer, C., Chen, P., Güven, S., Demirtaş, T. T., Nieland, T. J., Padilla, F., and Demirci, U. (2016). A bio-acoustic levitational (bal) assembly method for engineering of multilayered, 3d brain-like constructs, using human embryonic stem cell derived neuro-progenitors. *Advanced materials*, 28(1) :161–167.
- [Bowden et al., 1998] Bowden, N., Brittain, S., Evans, A. G., Hutchinson, J. W., and Whitesides, G. M. (1998). Spontaneous formation of ordered structures in thin films of metals supported on an elastomeric polymer. *nature*, 393(6681) :146–149.

- [Brillouin, 1926] Brillouin, L. (1926). Remarques sur la mécanique ondulatoire. *J. phys. radium*, 7(12) :353–368.
- [Broekman et al., 2018] Broekman, M. L., Maas, S. L., Abels, E. R., Mempel, T. R., Krichevsky, A. M., and Breakefield, X. O. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nature Reviews Neurology*, 14(8) :482–495.
- [Brugger et al., 2018] Brugger, M. S., Grunden, S., Doyle, A., Theogarajan, L., Wixforth, A., and Westerhausen, C. (2018). Orchestrating cells on a chip : Employing surface acoustic waves towards the formation of neural networks. *Physical Review E*, 98(1) :012411.
- [Bruus, 2012a] Bruus, H. (2012a). Acoustofluidics 2 : Perturbation theory and ultrasound resonance modes. *Lab on a Chip*, 12(1) :20–28.
- [Bruus, 2012b] Bruus, H. (2012b). Acoustofluidics 7 : The acoustic radiation force on small particles. *Lab on a Chip*, 12(6) :1014–1021.
- [Budday et al., 2020] Budday, S., Ovaert, T. C., Holzapfel, G. A., Steinmann, P., and Kuhl, E. (2020). Fifty shades of brain : a review on the mechanical testing and modeling of brain tissue. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 27 :1187–1230.
- [Butcher et al., 2009] Butcher, D. T., Alliston, T., and Weaver, V. M. (2009). A tense situation : forcing tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 9(2) :108–122.
- [Caldieri et al., 2018] Caldieri, G., Malabarba, M. G., Di Fiore, P. P., and Sigismund, S. (2018). Egfr trafficking in physiology and cancer. *Endocytosis and Signaling*, pages 235–272.
- [Carlsson et al., 1983] Carlsson, J., Nilsson, K., Westermark, B., Ponten, J., Sundström, C., Larsson, E., Bergh, J., Pählman, S., Busch, C., and Collins, V. (1983). Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *International journal of cancer*, 31(5) :523–533.
- [Carver et al., 2014] Carver, K., Ming, X., and Juliano, R. L. (2014). Multicellular tumor spheroids as a model for assessing delivery of oligonucleotides in three dimensions. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3 :e153.
- [Castro and Hoyos, 2016] Castro, L. A. and Hoyos, M. (2016). Determination of the secondary Bjerknes force in acoustic resonators on ground and in microgravity conditions. *Microgravity Science and Technology*, 28 :11–18.
- [Chao and Engelward, 2020] Chao, C. and Engelward, B. P. (2020). Spheroidchip : patterned agarose microwell compartments harboring hepg2 spheroids are compatible with genotoxicity testing. *ACS biomaterials science & engineering*, 6(4) :2427–2439.
- [Chen, 2008] Chen, C. S. (2008). Mechanotransduction—a field pulling together? *Journal of cell science*, 121(20) :3285–3292.
- [Chen et al., 2016] Chen, K., Wu, M., Guo, F., Li, P., Chan, C. Y., Mao, Z., Li, S., Ren, L., Zhang, R., and Huang, T. J. (2016). Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3d acoustic tweezers. *Lab on a Chip*, 16(14) :2636–2643.

- [Chen et al., 2017] Chen, L., Li, G., Li, Y., Li, Y., Zhu, H., Tang, L., French, P., McGinty, J., and Ruan, S. (2017). Ubasm : An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging. *Scientific reports*, 7(1) :1–11.
- [Chen et al., 2018a] Chen, W., Zebaze, L. N., Dong, J., Chezeau, L., Inquimbert, P., Hugel, S., Niu, S., Bihel, F., Boutant, E., Real, E., et al. (2018a). Wnk1 kinase and its partners akt, sgk1 and nbc-family na<sup>+</sup>/hco<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporters are potential therapeutic targets for glioblastoma stem-like cells linked to bisacodyl signaling. *Oncotarget*, 9(43) :27197.
- [Chen et al., 2018b] Chen, X., Wanggou, S., Bodalia, A., Zhu, M., Dong, W., Fan, J. J., Yin, W. C., Min, H.-K., Hu, M., Draghici, D., et al. (2018b). A feedforward mechanism mediated by mechanosensitive ion channel piezo1 and tissue mechanics promotes glioma aggression. *Neuron*, 100(4) :799–815.
- [Cheng et al., 2009] Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K., and Munn, L. L. (2009). Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS one*, 4(2) :e4632.
- [Ciasca et al., 2016] Ciasca, G., Sassun, T. E., Minelli, E., Antonelli, M., Papi, M., Santoro, A., Giangaspero, F., Delfini, R., and De Spirito, M. (2016). Nano-mechanical signature of brain tumours. *Nanoscale*, 8(47) :19629–19643.
- [Coluccio et al., 2019] Coluccio, M. L., Perozziello, G., Malara, N., Parrotta, E., Zhang, P., Gentile, F., Limongi, T., Raj, P. M., Cuda, G., Candeloro, P., et al. (2019). Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectronic Engineering*, 208 :14–28.
- [Coste et al., 2010] Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330(6000) :55–60.
- [Courtney et al., 2010] Courtney, C. R., Ong, C.-K., Drinkwater, B., Wilcox, P., Demore, C., Cochran, S., Glynn-Jones, P., and Hill, M. (2010). Manipulation of microparticles using phase-controllable ultrasonic standing waves. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 128(4) :EL195–EL199.
- [Couture et al., 2018] Couture, O., Hingot, V., Heiles, B., Muleki-Seya, P., and Tanter, M. (2018). Ultrasound localization microscopy and super-resolution : A state of the art. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 65(8) :1304–1320.
- [Crum, 1975] Crum, L. A. (1975). Bjerknes forces on bubbles in a stationary sound field. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 57(6) :1363–1370.
- [de Souza, 2018] de Souza, N. (2018). Organoids. *Nature Methods*, 15(1) :23–23.
- [Debruyne et al., 2022] Debruyne, A. C., Okkelman, I. A., and Dmitriev, R. I. (2022). Balance between the cell viability and death in 3d. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Elsevier.

- [Debruyne et al., 2018] Debruyne, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Fareh, M., Almairac, F., Virolle, V., Figarella-Branger, D., Baeza-Kallee, N., Lagadec, P., Paquis, P., et al. (2018). Dock4 promotes loss of proliferation in glioblastoma progenitor cells through nuclear beta-catenin accumulation and subsequent mir-302-367 cluster expression. *Oncogene*, 37(2) :241–254.
- [Delarue et al., 2014a] Delarue, M., Joanny, J.-F., Jülicher, F., and Prost, J. (2014a). Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface focus*, 4(6) :20140033.
- [Delarue et al., 2014b] Delarue, M., Montel, F., Vignjevic, D., Prost, J., Joanny, J.-F., and Cappello, G. (2014b). Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical journal*, 107(8) :1821–1828.
- [Delarue et al., 2017] Delarue, M., Poterewicz, G., Hoxha, O., Choi, J., Yoo, W., Kayser, J., Holt, L., and Hallatschek, O. (2017). Scwisch network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51) :13465–13470.
- [Dertinger and Hülser, 1984] Dertinger, H. and Hülser, D. F. (1984). *Intercellular communication in spheroids*. Springer.
- [Desmaison et al., 2013] Desmaison, A., Frongia, C., Grenier, K., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2013). Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PloS one*, 8(12) :e80447.
- [Desmaison et al., 2018] Desmaison, A., Guillaume, L., Triclin, S., Weiss, P., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2018). Impact of physical confinement on nuclei geometry and cell division dynamics in 3d spheroids. *Scientific reports*, 8(1) :1–8.
- [Doinikov, 1994] Doinikov, A. A. (1994). Acoustic radiation pressure on a rigid sphere in a viscous fluid. *Proceedings of the Royal Society*, 447(1931) :A447447–466.
- [Dron, 2011] Dron, O. (2011). Acoustic manipulation of micro-particles. application to micro-piv measurements. -.
- [Dron and Aider, 2012] Dron, O. and Aider, J.-L. (2012). Acoustic energy measurement for a standing acoustic wave in a micro-channel. *Europhysics Letters*, 97(4) :44011.
- [Dron and Aider, 2013] Dron, O. and Aider, J.-L. (2013). Varying the agglomeration position of particles in a micro-channel using acoustic radiation force beyond the resonance condition. *Ultrasonics*, 53(7) :1280–1287.
- [Dual et al., 2012] Dual, J., Hahn, P., Leibacher, I., Möller, D., and Schwarz, T. (2012). Acoustofluidics 6 : Experimental characterization of ultrasonic particle manipulation devices. *Lab on a Chip*, 12(5) :852–862.
- [Dual and Möller, 2012] Dual, J. and Möller, D. (2012). Acoustofluidics 4 : Piezoelectricity and application in the excitation of acoustic fields for ultrasonic particle manipulation. *Lab on a Chip*, 12(3) :506–514.
- [Dumy, 2019] Dumy, G. (2019). Nanorods self-propulsion and optic ejection of particles in acoustic levitation. -.

- [Dumy et al., 2020] Dumy, G., Jeger-Madiot, N., Benoit-Gonin, X., Mallouk, T. E., Hoyos, M., and Aider, J.-L. (2020). Acoustic manipulation of dense nanorods in microgravity. *Microgravity Science and Technology*, 32 :1159–1174.
- [Dundar et al., 2020] Dundar, B., Markwell, S. M., Sharma, N. V., Olson, C. L., Mukherjee, S., and Brat, D. J. (2020). Methods for in vitro modeling of glioma invasion : Choosing tools to meet the need. *Glia*, 68(11) :2173–2191.
- [Eckart, 1948] Eckart, C. (1948). Vortices and streams caused by sound waves. *Physical Review*, 73(1) :68–76.
- [El-Ali et al., 2006] El-Ali, J., Sorger, P. K., and Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442(7101) :403–411.
- [El-Habr et al., 2017] El-Habr, E. A., Dubois, L. G., Burel-Vandenbos, F., Bogeas, A., Lipecka, J., Turchi, L., Lejeune, F.-X., Coehlo, P. L. C., Yamaki, T., Wittmann, B. M., et al. (2017). A driver role for gaba metabolism in controlling stem and proliferative cell state through ghb production in glioma. *Acta neuropathologica*, 133 :645–660.
- [Errico et al., 2015] Errico, C., Pierre, J., Pezet, S., Desailly, Y., Lenkei, Z., Couture, O., and Tanter, M. (2015). Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*, 527(7579) :499–502.
- [Ershov et al., 2022] Ershov, D., Phan, M.-S., Pylvänäinen, J. W., Rigaud, S. U., Le Blanc, L., Charles-Orszag, A., Conway, J. R., Laine, R. F., Roy, N. H., Bonazzi, D., et al. (2022). Trackmate 7 : integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nature methods*, 19(7) :829–832.
- [Estes et al., 2004] Estes, B. T., Gimble, J. M., and Guilak, F. (2004). Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Current topics in developmental biology*, 60 :91–126.
- [Evans et al., 2004] Evans, S. M., Judy, K. D., Dunphy, I., Jenkins, W. T., Nelson, P. T., Collins, R., Wileyto, E. P., Jenkins, K., Hahn, S. M., Stevens, C. W., et al. (2004). Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and ef5 binding. *Cancer research*, 64(5) :1886–1892.
- [Fletcher, 1992] Fletcher, N. H. (1992). *Acoustic systems in biology*. Oxford University Press.
- [Folds and Loggins, 1977] Folds, D. and Loggins, C. (1977). Transmission and reflection of ultrasonic waves in layered media. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 62(5) :1102–1109.
- [Folkman and Hochberg, 1973] Folkman, J. and Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine*, 138(4) :745–753.
- [Follain et al., 2018] Follain, G., Osmani, N., Azevedo, A. S., Allio, G., Mercier, L., Karremann, M. A., Solecki, G., Leòn, M. J. G., Lefebvre, O., Fekonja, N., et al. (2018). Hemodynamic forces tune the arrest, adhesion, and extravasation of circulating tumor cells. *Developmental cell*, 45(1) :33–52.

- [Forgacs et al., 1998] Forgacs, G., Foty, R. A., Shafrir, Y., and Steinberg, M. S. (1998). Viscoelastic properties of living embryonic tissues : a quantitative study. *Biophysical journal*, 74(5) :2227–2234.
- [Foty, 2011] Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3d spheroids. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 51.
- [Foty et al., 1994] Foty, R. A., Forgacs, G., Pflieger, C. M., and Steinberg, M. S. (1994). Liquid properties of embryonic tissues : measurement of interfacial tensions. *Physical review letters*, 72(14) :2298.
- [Foty et al., 1996] Foty, R. A., Pflieger, C. M., Forgacs, G., and Steinberg, M. S. (1996). Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development*, 122(5) :1611–1620.
- [Foty and Steinberg, 2005] Foty, R. A. and Steinberg, M. S. (2005). The differential adhesion hypothesis : a direct evaluation. *Developmental biology*, 278(1) :255–263.
- [Fouad and Aanei, 2017] Fouad, Y. A. and Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5) :1016.
- [Franke et al., 2009] Franke, T., Abate, A. R., Weitz, D. A., and Wixforth, A. (2009). Surface acoustic wave (saw) directed droplet flow in microfluidics for pdms devices. *Lab on a Chip*, 9(18) :2625–2627.
- [Freeman and Hoffman, 1986] Freeman, A. E. and Hoffman, R. M. (1986). In vivo-like growth of human tumors in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(8) :2694–2698.
- [French, 1992] French, A. (1992). Mechanotransduction. *Annual review of physiology*, 54(1) :135–152.
- [Gale et al., 2016] Gale, B. K., Eddings, M. A., Sundberg, S. O., Hatch, A., Kim, J., Ho, T., and Karazi, S. (2016). Low-cost mems technologies. -.
- [Galland et al., 2015] Galland, R., Greci, G., Aravind, A., Viasnoff, V., Studer, V., and Sibarita, J.-B. (2015). 3d high-and super-resolution imaging using single-objective spim. *Nature methods*, 12(7) :641–644.
- [Garcia-Sabaté et al., 2014] Garcia-Sabaté, A., Castro, A., Hoyos, M., and González-Cinca, R. (2014). Experimental study on inter-particle acoustic forces. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(3) :1056–1063.
- [Garvin et al., 2011] Garvin, K. A., Dalecki, D., and Hocking, D. C. (2011). Vascularization of three-dimensional collagen hydrogels using ultrasound standing wave fields. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(11) :1853–1864.
- [Giobbe et al., 2019] Giobbe, G. G., Crowley, C., Luni, C., Campinoti, S., Khedr, M., Kretzschmar, K., De Santis, M. M., Zambaiti, E., Michielin, F., Meran, L., et al. (2019). Extracellular matrix hydrogel derived from decellularized tissues enables endodermal organoid culture. *Nature communications*, 10(1) :5658.

- [Glynne-Jones et al., 2010] Glynne-Jones, P., Boltryk, R. J., Harris, N. R., Cranny, A. W., and Hill, M. (2010). Mode-switching : A new technique for electronically varying the agglomeration position in an acoustic particle manipulator. *Ultrasonics*, 50(1) :68–75.
- [Goering and Dual, 2022] Goering, C. and Dual, J. (2022). Measuring the effects of a pulsed excitation on the buildup of acoustic streaming and the acoustic radiation force utilizing an optical tweezer. *Physical Review E*, 105(5) :055103.
- [Gonzalez-Rodriguez et al., 2012] Gonzalez-Rodriguez, D., Guevorkian, K., Douezan, S., and Brochard-Wyart, F. (2012). Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science*, 338(6109) :910–917.
- [Gordon et al., 2021] Gordon, A., Yoon, S.-J., Tran, S. S., Makinson, C. D., Park, J. Y., Andersen, J., Valencia, A. M., Horvath, S., Xiao, X., Huguenard, J. R., et al. (2021). Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nature neuroscience*, 24(3) :331–342.
- [Gor’kov, 1962] Gor’kov, L. P. (1962). On the forces acting on a small particle in an acoustic field in an ideal fluid. *Soviet Physics-Doklady*, 6(9) :773–775.
- [Gould et al., 1992] Gould, R. K., Coakley, W. T., and Grundy, M. A. (1992). Upper sound pressure limits on particle concentration in fields of ultrasonic standing-wave at megahertz frequencies. *Ultrasonics*, 30(4) :239–244.
- [Green et al., 2016] Green, A., Marshall, J. S., Ma, D., and Wu, J. (2016). Acoustic streaming and thermal instability of flow generated by ultrasound in a cylindrical container. *Physics of Fluids*, 28(10) :104105.
- [Guevorkian and Maître, 2017] Guevorkian, K. and Maître, J.-L. (2017). Micropipette aspiration : A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. In *Methods in cell biology*, volume 139, pages 187–201. Elsevier.
- [Haake, 2004] Haake, A. (2004). Micromanipulation of small particles with ultrasound. *PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich*, (-) :-.
- [Hamilton et al., 2003] Hamilton, M. F., Ilinskii, Y. A., and Zabolotskaya, E. A. (2003). Acoustic streaming generated by standing waves in two-dimensional channels of arbitrary width. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113(1) :153–160.
- [Harvey, 1929] Harvey, E. N. (1929). The effect of high frequency sound waves on heart muscle and other irritable tissues. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 91(1) :284–290.
- [Helmlinger et al., 1997] Helmlinger, G., Netti, P. A., Lichtenbeld, H. C., Melder, R. J., and Jain, R. K. (1997). Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology*, 15(8) :778–783.
- [Hill, 2003] Hill, M. (2003). The selection of layer thicknesses to control acoustic radiation force profiles in layered resonators. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 114(5) :2654.
- [Hill et al., 2002] Hill, M., Shen, Y., and Hawkes, J. J. (2002). Modelling of layered resonators for ultrasonic separation. *Ultrasonics*, 40(1-8) :385–392.

- [Hirschhaeuser et al., 2010] Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids : an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*, 148(1) :3–15.
- [Hoyos and Castro, 2013] Hoyos, M. and Castro, A. (2013). Controlling the acoustic streaming by pulsed ultrasounds. *Ultrasonics*, 53(1) :70–76.
- [Hubert et al., 2016] Hubert, C. G., Rivera, M., Spangler, L. C., Wu, Q., Mack, S. C., Prager, B. C., Couce, M., McLendon, R. E., Sloan, A. E., and Rich, J. N. (2016). A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivobrain cancer stem cell organoids. *Cancer research*, 76(8) :2465–2477.
- [Hultström et al., 2007] Hultström, J., Manneberg, O., Dopf, K., Hertz, H. M., Brismar, H., and Wiklund, M. (2007). Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing-wave ultrasound in a microfluidic chip. *Ultrasound in medicine & biology*, 33(1) :145–151.
- [Ibsen et al., 2015] Ibsen, S., Tong, A., Schutt, C., Esener, S., and Chalasani, S. H. (2015). Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in caenorhabditis elegans. *Nature communications*, 6(1) :8264.
- [Im et al., 2023] Im, G.-B., Kim, Y.-J., Lee, T. I., and Bhang, S. H. (2023). Subaqueous free-standing 3d cell culture system for ultrafast cell compaction, mechano-inductive immune control, and improving therapeutic angiogenesis. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(2) :e10438.
- [Jaalouk and Lammerding, 2009] Jaalouk, D. E. and Lammerding, J. (2009). Mechano-transduction gone awry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1) :63–73.
- [Jabbari et al., 2015] Jabbari, E., Sarvestani, S. K., Daneshian, L., and Moeinzadeh, S. (2015). Optimum 3d matrix stiffness for maintenance of cancer stem cells is dependent on tissue origin of cancer cells. *PloS one*, 10(7) :e0132377.
- [Jacob et al., 2020] Jacob, F., Salinas, R. D., Zhang, D. Y., Nguyen, P. T., Schnoll, J. G., Wong, S. Z. H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., et al. (2020). A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter-and intra-tumoral heterogeneity. *Cell*, 180(1) :188–204.
- [Jakab et al., 2008] Jakab, K., Damon, B., Marga, F., Doaga, O., Mironov, V., Kosztin, I., Markwald, R., and Forgacs, G. (2008). Relating cell and tissue mechanics : implications and applications. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(9) :2438–2449.
- [Janssen et al., 2022] Janssen, A. F., Breusegem, S. Y., and Larrieu, D. (2022). Current methods and pipelines for image-based quantitation of nuclear shape and nuclear envelope abnormalities. *Cells*, 11(3) :347.
- [Jeger-Madiot et al., 2021] Jeger-Madiot, N., Arakelian, L., Setterblad, N., Bruneval, P., Hoyos, M., Larghero, J., and Aider, J.-L. (2021). Self-organization and culture of mesenchymal stem cell spheroids in acoustic levitation. *Scientific reports*, 11(1) :8355.

- [Jeger-Madiot et al., 2022] Jeger-Madiot, N., Mousset, X., Dupuis, C., Rabiet, L., Hoyos, M., Peyrin, J.-M., and Aider, J.-L. (2022). Controlling the force and the position of acoustic traps with a tunable acoustofluidic chip : Application to spheroid manipulations. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 151(6) :4165–4179.
- [Jensen and Yong, 2020] Jensen, C. and Yong, T. (2020). Is it time to start transitioning from 2d to 3d cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(-) :33.
- [Johnson and Feke, 1995] Johnson, D. A. and Feke, D. L. (1995). Methodology for fractionating suspended particles using ultrasonic standing wave and divided flow fields. *Separations Technology*, 5(4) :251–258.
- [Johnson et al., 2007] Johnson, K. R., Leight, J. L., and Weaver, V. M. (2007). Demystifying the effects of a three-dimensional microenvironment in tissue morphogenesis. *Methods in cell biology*, 83 :547–583.
- [Jubelin et al., 2022] Jubelin, C., Muñoz-Garcia, J., Griscom, L., Cochonneau, D., Ollivier, E., Heymann, M.-F., Vallette, F. M., Oliver, L., and Heymann, D. (2022). Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell & Bioscience*, 12(1) :155.
- [Justice et al., 2009] Justice, B. A., Badr, N. A., and Felder, R. A. (2009). 3d cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug discovery today*, 14(1-2) :102–107.
- [Kang et al., 2021] Kang, S.-M., Kim, D., Lee, J.-H., Takayama, S., and Park, J. Y. (2021). Engineered microsystems for spheroid and organoid studies. *Advanced health-care materials*, 10(2) :2001284.
- [Karlsen et al., 2016] Karlsen, J. T., Augustsson, P., and Bruus, H. (2016). Acoustic force density acting on inhomogeneous fluids in acoustic fields. *Physical review letters*, 117(11) :114504.
- [Karzbrun et al., 2021] Karzbrun, E., Khankhel, A. H., Megale, H. C., Glasauer, S. M., Wyle, Y., Britton, G., Warmflash, A., Kosik, K. S., Siggia, E. D., Shraiman, B. I., et al. (2021). Human neural tube morphogenesis in vitro by geometric constraints. *Nature*, 599(7884) :268–272.
- [Karzbrun et al., 2018] Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Cohen, S. R., Hanna, J. H., and Reiner, O. (2018). Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding. *Nature physics*, 14(5) :515–522.
- [Khokhlova et al., 2015] Khokhlova, V. A., Fowlkes, J. B., Roberts, W. W., Schade, G. R., Xu, Z., Khokhlova, T. D., Hall, T. L., Maxwell, A. D., Wang, Y.-N., and Cain, C. A. (2015). Histotripsy methods in mechanical disintegration of tissue : Towards clinical applications. *International journal of hyperthermia*, 31(2) :145–162.
- [Kim et al., 2020] Kim, J., Koo, B.-K., and Knoblich, J. A. (2020). Human organoids : model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10) :571–584.
- [Kim et al., 2013] Kim, J. A., Choi, J.-H., Kim, M., Rhee, W. J., Son, B., Jung, H.-K., and Park, T. H. (2013). High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*, 34(34) :8555–8563.

- [King, 1934] King, L. V. (1934). On the acoustic radiation pressure on spheres. *Proceedings of the Royal Society of London*, 147(-) :212–240.
- [Kinsler et al., 2000] Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B., and Sanders, J. V. (2000). *Fundamentals of acoustics*. John Wiley & Sons.
- [Knight and Przyborski, 2015] Knight, E. and Przyborski, S. (2015). Advances in 3d cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*, 227(6) :746–756.
- [Kosheleva et al., 2020] Kosheleva, N. V., Efremov, Y. M., Shavkuta, B. S., Zurina, I. M., Zhang, D., Zhang, Y., Minaev, N. V., Gorkun, A. A., Wei, S., Shpichka, A. I., et al. (2020). Cell spheroid fusion : beyond liquid drops model. *Scientific reports*, 10(1) :1–15.
- [Krieger et al., 2020] Krieger, T. G., Tirier, S. M., Park, J., Jechow, K., Eisemann, T., Peterziel, H., Angel, P., Eils, R., and Conrad, C. (2020). Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. *Neuro-oncology*, 22(8) :1138–1149.
- [Kuroki et al., 1998] Kuroki, S., Endo, K., Maeda, S., Chong, D. P., and Duffy, P. (1998). Analysis of x-ray photoelectron spectra of silicon-based polymers by density-functional calculations using model molecules. *Polymer journal*, 30(2) :142–148.
- [Kuznetsova et al., 2009] Kuznetsova, L. A., Bazou, D., Edwards, G. O., and Coakley, W. T. (2009). Multiple three-dimensional mammalian cell aggregates formed away from solid substrata in ultrasound standing waves. *Biotechnology progress*, 25(3) :834–841.
- [Kuznetsova and Coakley, 2007] Kuznetsova, L. A. and Coakley, W. T. (2007). Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8) :1567–1577.
- [LaBarbera et al., 2012] LaBarbera, D. V., Reid, B. G., and Yoo, B. H. (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 7(9) :819–830.
- [Lancaster et al., 2013] Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., and Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467) :373–379.
- [Landau and Lifshitz, 2006] Landau, L. D. and Lifshitz, E. M. (2006). Fluid mechanics. *Course of Theoretical Physics*, 6(2) :–.
- [Lee et al., 2023] Lee, S.-Y., Koo, I.-S., Hwang, H. J., and Lee, D. W. (2023). In vitro three-dimensional (3d) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery*.
- [Leipzig and Shoichet, 2009] Leipzig, N. D. and Shoichet, M. S. (2009). The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials*, 30(36) :6867–6878.

- [Lenshof et al., 2012] Lenshof, A., Magnusson, C., and Laurell, T. (2012). Acoustofluidics 8 : Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems. *Lab on a Chip*, 12(7) :1210–1223.
- [Levayer, 2020] Levayer, R. (2020). Solid stress, competition for space and cancer : The opposing roles of mechanical cell competition in tumour initiation and growth. In *Seminars in cancer biology*, volume 63, pages 69–80. Elsevier.
- [Levental et al., 2009] Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Wenginger, W., et al. (2009). Matrix cross-linking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5) :891–906.
- [Liang and Marzo, 2019] Liang, M. A. B. and Marzo, A. (2019). Numerical and experimental investigation of the stability of a drop in a single-axis acoustic levitator. *Physics of Fluids*, 31(11) :117101.
- [Liang et al., 2018] Liang, S., Lashkari, B., Choi, S. S. S., Ntziachristos, V., and Mandelis, A. (2018). The application of frequency-domain photoacoustics to temperature-dependent measurements of the grüneisen parameter in lipids. *Photoacoustics*, 11 :56–64.
- [Lighthill, 1978] Lighthill, J. (1978). Acoustic streaming. *Journal of Sound and Vibration*, 63(3) :391–418.
- [Lin and Chang, 2008] Lin, R.-Z. and Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal : Healthcare Nutrition Technology*, 3(9-10) :1172–1184.
- [Liu et al., 2007] Liu, J., Kuznetsova, L. A., Edwards, G. O., Xu, J., Ma, M., Purcell, W. M., Jackson, S. K., and Coakley, W. T. (2007). Functional three-dimensional hepg2 aggregate cultures generated from an ultrasound trap : Comparison with hepg2 spheroids. *Journal of cellular biochemistry*, 102(5) :1180–1189.
- [Liu et al., 2022] Liu, T., Choi, M. H., Zhu, J., Zhu, T., Yang, J., Li, N., Chen, Z., Xian, Q., Hou, X., He, D., et al. (2022). Sonogenetics : Recent advances and future directions. *Brain Stimulation*.
- [Loong et al., 2020] Loong, H. H., Wong, A. M., Chan, D. T., Cheung, M. S., Chow, C., Ding, X., Chan, A. K., Johnston, P. A., Lau, J. Y., Poon, W. S., et al. (2020). Patient-derived tumor organoid predicts drugs response in glioblastoma : A step forward in personalized cancer therapy? *Journal of Clinical Neuroscience*, 78 :400–402.
- [Louis et al., 2007] Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 who classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114 :97–109.
- [Louis et al., 2021] Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H., Pfister, S. M., Reifenberger, G., et al. (2021). The 2021 who classification of tumors of the central nervous system : a summary. *Neuro-oncology*, 23(8) :1231–1251.

- [Lv et al., 2017] Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., and Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture : A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology letters*, 14(6) :6999–7010.
- [Macé et al., 2011] Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., and Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature methods*, 8(8) :662–664.
- [Madsen et al., 1983] Madsen, E. L., Sathoff, H. J., and Zagzebski, J. A. (1983). Ultrasonic shear wave properties of soft tissues and tissuelike materials. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 74(5) :1346–1355.
- [Maheu et al., 1988] Maheu, B., Gouesbet, G., and Gréhan, G. (1988). A concise presentation of the generalized lorenz-mie theory for arbitrary location of the scatterer in an arbitrary incident profile. *Journal of optics*, 19(2) :59.
- [Mahoney and Csimá, 1982] Mahoney, L. and Csimá, A. (1982). Efficiency of palpation in clinical detection of breast cancer. *Canadian Medical Association Journal*, / (127) :729–730.
- [Makamba et al., 2003] Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N., and Hahn, J. H. (2003). Surface modification of poly (dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis*, 24(21) :3607–3619.
- [Mary et al., 2022] Mary, G., Malgras, B., Perez, J. E., Nagle, I., Luciani, N., Pimpie, C., Asnacios, A., Pocard, M., Reffay, M., and Wilhelm, C. (2022). Magnetic compression of tumor spheroids increases cell proliferation in vitro and cancer progression in vivo. *Cancers*, 14(2) :366.
- [McDonald and Whitesides, 2002] McDonald, J. C. and Whitesides, G. M. (2002). Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of chemical research*, 35(7) :491–499.
- [Mendez and Janmey, 2012] Mendez, M. G. and Janmey, P. A. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(5) :728–732.
- [Mishra et al., 2014] Mishra, P., Hill, M., and Glynne-Jones, P. (2014). Deformation of red blood cells using acoustic radiation forces. *Biomicrofluidics*, 8(3) :034109.
- [Montel et al., 2011] Montel, F., Delarue, M., Elgeti, J., Malaquin, L., Basan, M., Risler, T., Cabane, B., Vignjevic, D., Prost, J., Cappello, G., et al. (2011). Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Physical review letters*, 107(18) :188102.
- [Moudjed et al., 2014] Moudjed, B., Botton, V., Henry, D., Ben Hadid, H., and Garandet, J.-P. (2014). Scaling and dimensional analysis of acoustic streaming jets. *Physics of Fluids*, 26(9) :093602.
- [Moudjed et al., 2015] Moudjed, B., Botton, V., Henry, D., Millet, S., Garandet, J.-P., and Hadid, H. B. (2015). Near-field acoustic streaming jet. *Physical Review E*, 91(3) :033011.
- [Muhitch et al., 2000] Muhitch, J. W., O’Connor, K. C., Blake, D. A., Lacks, D. J., Rosenzweig, N., and Spaulding, G. F. (2000). Characterization of aggregation and protein

- expression of bovine corneal endothelial cells as microcarrier cultures in a rotating-wall vessel. *Cytotechnology*, 32 :253–263.
- [Muller and Bruus, 2015] Muller, P. B. and Bruus, H. (2015). Theoretical study of time-dependent, ultrasound-induced acoustic streaming in microchannels. *Physical Review E*, 92(6) :063018.
- [Nath and Devi, 2016] Nath, S. and Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research : Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics*, 163 :94–108.
- [Ng et al., 2019] Ng, S., Tan, W. J., Pek, M. M. X., Tan, M.-H., and Kurisawa, M. (2019). Mechanically and chemically defined hydrogel matrices for patient-derived colorectal tumor organoid culture. *Biomaterials*, 219 :119400.
- [Ni et al., 2019] Ni, Z., Yin, C., Xu, G., Xie, L., Huang, J., Liu, S., Tu, J., Guo, X., and Zhang, D. (2019). Modelling of saw-pdms acoustofluidics : Physical fields and particle motions influenced by different descriptions of the pdms domain. *Lab on a Chip*, 19(16) :2728–2740.
- [Nürnberg et al., 2020] Nürnberg, E., Vitacolonna, M., Klicks, J., Von Molitor, E., Casetti, T., Keller, F., Bruch, R., Ertongur-Fauth, T., Riedel, K., Scholz, P., et al. (2020). Routine optical clearing of 3d-cell cultures : simplicity forward. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7 :20.
- [Nyborg, 1958] Nyborg, W. L. (1958). Acoustic streaming near a boundary. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 30(4) :329–339.
- [Ohlin et al., 2011] Ohlin, M., Christakou, A. E., Frisk, T., Önfelt, B., and Wiklund, M. (2011). Controlling acoustic streaming in a multi-well microplate for improving live cell assays. In *Proceedings of the 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life, Sciences (MicroTAS 2011), Seattle, WA, USA*, pages 2–6.
- [Ohlin et al., 2013] Ohlin, M., Christakou, A. E., Frisk, T., Önfelt, B., and Wiklund, M. (2013). Influence of acoustic streaming on ultrasonic particle manipulation in a 100-well ring-transducer microplate. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 23(3) :035008.
- [Olofsson et al., 2020] Olofsson, K., Hammarström, B., and Wiklund, M. (2020). Acoustic separation of living and dead cells using high density medium. *Lab on a chip*, 20(11) :1981–1990.
- [Ospina et al., 2022] Ospina, J. F. P., Contreras, V., Estrada-Morales, J., Baresch, D., Ealo, J. L., and Volke-Sepúlveda, K. (2022). Particle-size effect in airborne standing-wave acoustic levitation : Trapping particles at pressure antinodes. *Physical Review Applied*, 18(3) :034026.
- [Ostrom et al., 2021] Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Cbtrus statistical report : primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2014–2018. *Neuro-oncology*, 23(Supplement\_3) :iii1–iii105.

- [Ota et al., 2010] Ota, H., Yamamoto, R., Deguchi, K., Tanaka, Y., Kazoe, Y., Sato, Y., and Miki, N. (2010). Three-dimensional spheroid-forming lab-on-a-chip using micro-rotational flow. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 147(1) :359–365.
- [Ottino and Wiggins, 2004] Ottino, J. M. and Wiggins, S. (2004). Introduction : mixing in microfluidics.
- [Oyen, 2014] Oyen, M. (2014). Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews*, 59(1) :44–59.
- [Park et al., 2020] Park, D., Lee, J., Chung, J. J., Jung, Y., and Kim, S. H. (2020). Integrating organs-on-chips : multiplexing, scaling, vascularization, and innervation. *Trends in biotechnology*, 38(1) :99–112.
- [Peng et al., 2018] Peng, W., Datta, P., Wu, Y., Dey, M., Ayan, B., Dababneh, A., and Ozbolat, I. T. (2018). Challenges in bio-fabrication of organoid cultures. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3 : Stem Cells, Bio-materials and Tissue Engineering*, pages 53–71.
- [Perez et al., 2020] Perez, J. E., Nagle, I., and Wilhelm, C. (2020). Magnetic molding of tumor spheroids : emerging model for cancer screening. *Biofabrication*, 13(1) :015018.
- [Pine et al., 2020] Pine, A. R., Cirigliano, S. M., Nicholson, J. G., Hu, Y., Linkous, A., Miyaguchi, K., Edwards, L., Singhania, R., Schwartz, T. H., Ramakrishna, R., et al. (2020). Tumor microenvironment is critical for the maintenance of cellular states found in primary glioblastomas characterizing human gbm models with scRNA-seq. *Cancer discovery*, 10(7) :964–979.
- [Qiu et al., 2019] Qiu, Z., Guo, J., Kala, S., Zhu, J., Xian, Q., Qiu, W., Li, G., Zhu, T., Meng, L., Zhang, R., et al. (2019). The mechanosensitive ion channel piezo1 significantly mediates in vitro ultrasonic stimulation of neurons. *iScience*, 21 :448–457.
- [Qu et al., 2020] Qu, S., Hu, T., Qiu, O., Su, Y., Gu, J., and Xia, Z. (2020). Effect of piezo1 overexpression on peritumoral brain edema in glioblastomas. *American Journal of Neuroradiology*, 41(8) :1423–1429.
- [Rabut et al., 2020] Rabut, C., Ferrier, J., Bertolo, A., Osmanski, B., Mousset, X., Pezet, S., Deffieux, T., Lenkei, Z., and Tanter, M. (2020). Pharmaco-fus : Quantification of pharmacologically-induced dynamic changes in brain perfusion and connectivity by functional ultrasound imaging in awake mice. *Neuroimage*, 222 :117231.
- [Ranft et al., 2010] Ranft, J., Basan, M., Elgeti, J., Joanny, J.-F., Prost, J., and Jülicher, F. (2010). Fluidization of tissues by cell division and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(49) :20863–20868.
- [Rangarajan and Zaman, 2008] Rangarajan, R. and Zaman, M. H. (2008). Modeling cell migration in 3d : status and challenges. *Cell adhesion & migration*, 2(2) :106–109.
- [Rape et al., 2014] Rape, A., Ananthanarayanan, B., and Kumar, S. (2014). Engineering strategies to mimic the glioblastoma microenvironment. *Advanced drug delivery reviews*, 79 :172–183.

- [Rasouli et al., 2023] Rasouli, R., Paun, R. A., and Tabrizian, M. (2023). Sonoprinting nanoparticles on cellular spheroids via surface acoustic waves for enhanced nanotherapeutics delivery. *Lab on a Chip*.
- [Rayleigh, 1883] Rayleigh, L. (1883). On the circulation of air observed in kundt’s tubes, and on some allied acoustical problems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 175(-) :1–21.
- [Regehr et al., 2009] Regehr, K. J., Domenech, M., Koepsel, J. T., Carver, K. C., Ellison-Zelski, S. J., Murphy, W. L., Schuler, L. A., Alarid, E. T., and Beebe, D. J. (2009). Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab on a Chip*, 9(15) :2132–2139.
- [Rizzuti et al., 2020] Rizzuti, I. F., Mascheroni, P., Arcucci, S., Ben-Mériem, Z., Prunet, A., Barentin, C., Rivière, C., Delanoë-Ayari, H., Hatzikirou, H., Guillermet-Guibert, J., et al. (2020). Mechanical control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *Physical Review Letters*, 125(12) :128103.
- [Rodriguez et al., 2013] Rodriguez, M. L., McGarry, P. J., and Sniadecki, N. J. (2013). Review on cell mechanics : experimental and modeling approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65(6).
- [Salari et al., 2020] Salari, A., Appak-Baskoy, S., Ezzo, M., Hinz, B., Kolios, M. C., and Tsai, S. S. (2020). Dancing with the cells : acoustic microflows generated by oscillating cells. *Small*, 16(9) :1903788.
- [Sart et al., 2017] Sart, S., Tomasi, R. F.-X., Amselem, G., and Baroud, C. N. (2017). Multiscale cytometry and regulation of 3d cell cultures on a chip. *Nature communications*, 8(1) :469.
- [Sato and Clevers, 2015] Sato, T. and Clevers, H. (2015). Snapshot : growing organoids from stem cells. *Cell*, 161(7) :1700–1700.
- [Saurty-Seerunghen et al., 2022] Saurty-Seerunghen, M. S., Daubon, T., Bellenger, L., Delaunay, V., Castro, G., Guyon, J., Rezk, A., Fabrega, S., Idbaih, A., Almairac, F., et al. (2022). Glioblastoma cell motility depends on enhanced oxidative stress coupled with mobilization of a sulfurtransferase. *Cell Death & Disease*, 13(10) :913.
- [Schindelin et al., 2012] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7) :676–682.
- [Schlichting, 1932] Schlichting, H. (1932). Berechnung ebener periodischer grenzschichtstromungen. *Phys. z.*, 33 :327–335.
- [Schmidt et al., 2018] Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., and Myers, G. (2018). Cell detection with star-convex polygons. In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention–MICCAI 2018 : 21st International Conference, Granada, Spain, September 16-20, 2018, Proceedings, Part II 11*, pages 265–273. Springer.

- [Scott and Huang, 2022] Scott, G. and Huang, Y. (2022). Engineering cerebral folding in brain organoids. *Neural Regeneration Research*, 17(11) :2420.
- [Seano et al., 2019] Seano, G., Nia, H. T., Emblem, K. E., Datta, M., Ren, J., Krishnan, S., Kloepper, J., Pinho, M. C., Ho, W. W., Ghosh, M., et al. (2019). Solid stress in brain tumours causes neuronal loss and neurological dysfunction and can be reversed by lithium. *Nature biomedical engineering*, 3(3) :230–245.
- [Selfridge, 1985] Selfridge, A. (1985). Approximate material properties in isotropic materials. *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*, 32(3) :381–94.
- [Settnes and Bruus, 2012] Settnes, M. and Bruus, H. (2012). Forces acting on a small particle in an acoustical field in a viscous fluid. *Physical Review E*, 85(1) :016327.
- [Shang et al., 2021] Shang, M., Lim, S. B., Jiang, K., Yap, Y. S., Khoo, B. L., Han, J., and Lim, C. T. (2021). Microfluidic studies of hydrostatic pressure-enhanced doxorubicin resistance in human breast cancer cells. *Lab on a Chip*, 21(4) :746–754.
- [Sherar et al., 1987] Sherar, M., Noss, M., and Foster, F. (1987). Ultrasound backscatter microscopy images the internal structure of living tumour spheroids. *Nature*, 330(6147) :493–495.
- [Sherr, 1996] Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293) :1672–1677.
- [Silva et al., 2019] Silva, G. T., Tian, L., Franklin, A., Wang, X., Han, X., Mann, S., and Drinkwater, B. W. (2019). Acoustic deformation for the extraction of mechanical properties of lipid vesicle populations. *Physical Review E*, 99(6) :063002.
- [Spicci and Cati, 2012] Spicci, L. and Cati, M. (2012). Thermal analysis of a piezo-disk ultrasound probe. -.
- [Squires and Quake, 2005] Squires, T. M. and Quake, S. R. (2005). Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3) :977-1026.
- [Steinberg, 1963] Steinberg, M. S. (1963). Reconstruction of tissues by dissociated cells : some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science*, 141(3579) :401–408.
- [Stirbat et al., 2013] Stirbat, T. V., Mgharbel, A., Bodennec, S., Ferri, K., Mertani, H. C., Rieu, J.-P., and Delanoë-Ayari, H. (2013). Fine tuning of tissues’ viscosity and surface tension through contractility suggests a new role for  $\alpha$ -catenin. *PloS one*, 8(2) :e52554.
- [Subramaniam and Sethuraman, 2014] Subramaniam, A. and Sethuraman, S. (2014). Biomedical applications of nondegradable polymers. -, pages 301–308.
- [Susaki and Ueda, 2016] Susaki, E. A. and Ueda, H. R. (2016). Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution : toward organism-level systems biology in mammals. *Cell chemical biology*, 23(1) :137–157.
- [Sutherland et al., 1970] Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A., and Kruuv, J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 18(5) :491–495.

- [Tait et al., 2019] Tait, A., Glynne-Jones, P., Hill, A. R., Smart, D. E., Blume, C., Hammarstrom, B., Fisher, A. L., Grossel, M. C., Swindle, E. J., Hill, M., et al. (2019). Engineering multi-layered tissue constructs using acoustic levitation. *Scientific Reports*, 9(1) :9789.
- [Tambe et al., 2011] Tambe, D. T., Corey Hardin, C., Angelini, T. E., Rajendran, K., Park, C. Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E. H., Zaman, M. H., Butler, J. P., Weitz, D. A., et al. (2011). Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nature materials*, 10(6) :469–475.
- [Thielicke, 2014] Thielicke, W. (2014). The flapping flight of birds : Analysis and application. *Rijksuniversiteit Groningen*.
- [Thielicke and Sonntag, 2021] Thielicke, W. and Sonntag, R. (2021). Particle image velocimetry for matlab : Accuracy and enhanced algorithms in pivlab. *Journal of Open Research Software*, 9(1).
- [Thielicke and Stamhuis, 2014] Thielicke, W. and Stamhuis, E. (2014). Pivlab—towards user-friendly, affordable and accurate digital particle image velocimetry in matlab. *Journal of open research software*, 2(1).
- [Tien et al., 2012] Tien, J., Truslow, J. G., and Nelson, C. M. (2012). Modulation of invasive phenotype by interstitial pressure-driven convection in aggregates of human breast cancer cells. -.
- [Tinevez et al., 2017] Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., and Eliceiri, K. W. (2017). Trackmate : An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115 :80–90.
- [Treat et al., 2009] Treat, X., Wasserman, M. R., Angelini, T. E., Millet, E., Weitz, D. A., Butler, J. P., and Fredberg, J. J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nature physics*, 5(6) :426–430.
- [Trujillo et al., 2019] Trujillo, C. A., Gao, R., Negraes, P. D., Gu, J., Buchanan, J., Preissl, S., Wang, A., Wu, W., Haddad, G. G., Chaim, I. A., et al. (2019). Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell stem cell*, 25(4) :558–569.
- [Tsou et al., 2008] Tsou, J. K., Liu, J., Barakat, A. I., and Insana, M. F. (2008). Role of ultrasonic shear rate estimation errors in assessing inflammatory response and vascular risk. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(6) :963–972.
- [Tuziuti et al., 1999] Tuziuti, T., Kozuka, T., and Mitome, H. (1999). Measurement of distribution of acoustic radiation force perpendicular to sound beam axis. *Japanese journal of applied physics*, 38(5S) :3297.
- [Tyler et al., 2018] Tyler, W. J., Lani, S. W., and Hwang, G. M. (2018). Ultrasonic modulation of neural circuit activity. *Current opinion in neurobiology*, 50 :222–231.

- [Ulrich et al., 2009] Ulrich, T. A., de Juan Pardo, E. M., and Kumar, S. (2009). The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer research*, 69(10) :4167–4174.
- [Umesh et al., 2014] Umesh, V., Rape, A. D., Ulrich, T. A., and Kumar, S. (2014). Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PloS one*, 9(7) :e101771.
- [Valon and Levayer, 2019] Valon, L. and Levayer, R. (2019). Dying under pressure : cellular characterisation and in vivo functions of cell death induced by compaction. *Biology of the Cell*, 111(3) :51–66.
- [Van Meer et al., 2017] Van Meer, B., de Vries, H., Firth, K., van Weerd, J., Tertoolen, L., Karperien, H., Jonkheijm, P., Denning, C., IJzerman, A., and Mummery, C. (2017). Small molecule absorption by pdms in the context of drug response bioassays. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(2) :323–328.
- [Van Zundert et al., 2020] Van Zundert, I., Fortuni, B., and Rocha, S. (2020). From 2d to 3d cancer cell models—the enigmas of drug delivery research. *Nanomaterials*, 10(11) :2236.
- [Vanherberghen et al., 2010a] Vanherberghen, B., Manneberg, O., Christakou, A., Frisk, T., Ohlin, M., Hertz, H. M., Önfelt, B., and Wiklund, M. (2010a). Ultrasound-controlled cell aggregation in a multi-well chip. *Lab on a Chip*, 10(20) :2727–2732.
- [Vanherberghen et al., 2010b] Vanherberghen, B., Manneberg, O., Christakou, A., Frisk, T., Ohlin, M., Hertz, H. M., Önfelt, B., and Wiklund, M. (2010b). Ultrasound-controlled cell aggregation in a multi-well chip. *Lab on a Chip*, 10(20) :2727–2732.
- [Vinci et al., 2012] Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., Eccles, S. A., et al. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*, 10(1) :1–21.
- [Vogel and Sheetz, 2006] Vogel, V. and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4) :265–75.
- [Voutouri et al., 2014] Voutouri, C., Mpekris, F., Papageorgis, P., Odysseos, A. D., and Stylianopoulos, T. (2014). Role of constitutive behavior and tumor-host mechanical interactions in the state of stress and growth of solid tumors. *PloS one*, 9(8) :e104717.
- [Wang et al., 2021a] Wang, C., Sinha, S., Jiang, X., Murphy, L., Fitch, S., Wilson, C., Grant, G., and Yang, F. (2021a). Matrix stiffness modulates patient-derived glioblastoma cell fates in three-dimensional hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, 27(5-6) :390–401.
- [Wang, 2017] Wang, N. (2017). Review of cellular mechanotransduction. *Journal of physics D : Applied physics*, 50(23) :233002.
- [Wang et al., 2020] Wang, S., Meng, W., Ren, Z., Li, B., Zhu, T., Chen, H., Wang, Z., He, B., Zhao, D., and Jiang, H. (2020). Ultrasonic neuromodulation and sonogenetics : a new era for neural modulation. *Frontiers in physiology*, 11 :787.

- [Wang et al., 2021b] Wang, Y., Zhang, Q., Tao, R., Chen, D., Xie, J., Torun, H., Dodd, L. E., Luo, J., Fu, C., Vernon, J., et al. (2021b). A rapid and controllable acoustothermal microheater using thin film surface acoustic waves. *Sensors and Actuators A : Physical*, 318 :112508.
- [Weiser et al., 1984] Weiser, M., Apfel, R., and Neppiras, E. (1984). Interparticle forces on red cells in a standing wave field. *Acta Acustica united with Acustica*, 56(2) :114–119.
- [Whitworth and Coakley, 1992] Whitworth, G. and Coakley, W. (1992). Particle column formation in a stationary ultrasonic field. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 91(1) :79–85.
- [Wiklund, 2012] Wiklund, M. (2012). Acoustofluidics 12 : Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators. *Lab on a Chip*, 12(11) :2018.
- [Wiklund et al., 2012] Wiklund, M., Green, R., and Ohlin, M. (2012). Acoustofluidics 14 : Applications of acoustic streaming in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 12(14) :2438–2451.
- [Wiklund et al., 2004] Wiklund, M., Toivonen, J., Tirri, M., Hänninen, P., and Hertz, H. M. (2004). Ultrasonic enrichment of microspheres for ultrasensitive biomedical analysis in confocal laser-scanning fluorescence detection. *Journal of applied physics*, 96(2) :1242–1248.
- [Willert et al., 2007] Willert, C., Wereley, S. T., and Kompenhans, J. (2007). Particle image velocimetry : a practical guide.
- [Williams et al., 2019] Williams, M. P. I., Rigon, M., Straka, T., Hörner, S. J., Thiel, M., Gretz, N., Hafner, M., Reischl, M., and Rudolf, R. (2019). A novel optical tissue clearing protocol for mouse skeletal muscle to visualize endplates in their tissue context. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13 :49.
- [Woodside et al., 1997] Woodside, S. M., Bowen, B. D., and Piret, J. M. (1997). Measurement of ultrasonic forces for particle–liquid separations. *AIChE journal*, 43(7) :1727–1736.
- [Wu et al., 2016] Wu, J., Goyal, R., and Grandl, J. (2016). Localized force application reveals mechanically sensitive domains of piezo1. *Nature communications*, 7(1) :12939.
- [Wu et al., 2021] Wu, Z., Chen, B., Wu, Y., Xia, Y., Chen, H., Gong, Z., Hu, H., Ding, Z., and Guo, S. (2021). Scaffold-free generation of heterotypic cell spheroids using acoustofluidics. *Lab on a Chip*, 21(18) :3498–3508.
- [Wullkopf et al., 2018] Wullkopf, L., West, A.-K. V., Leijnse, N., Cox, T. R., Madsen, C. D., Oddershede, L. B., and Erler, J. T. (2018). Cancer cells’ ability to mechanically adjust to extracellular matrix stiffness correlates with their invasive potential. *Molecular biology of the cell*, 29(20) :2378–2385.
- [Xu et al., 2020] Xu, G., Ni, Z., Chen, X., Tu, J., Guo, X., Bruus, H., and Zhang, D. (2020). Acoustic characterization of polydimethylsiloxane for microscale acoustofluidics. *Physical Review Applied*, 13(5) :054069.

- [Yang et al., 2012] Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H., and Wang, X. (2012). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Experimental cell research*, 318(19) :2417–2426.
- [Yasuda, 2000] Yasuda, K. (2000). Non-destructive, non-contact handling method for biomaterials in micro-chamber by ultrasound. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 64(1-3) :128–135.
- [Yoo et al., 2022] Yoo, S., Mittelstein, D. R., Hurt, R. C., Lacroix, J., and Shapiro, M. G. (2022). Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification. *Nature communications*, 13(1) :493.
- [Yosioka and Kawasima, 1955] Yosioka, K. and Kawasima, Y. (1955). Acoustic radiation pressure on a compressible sphere. *Acustica*, 5(3) :167–173.
- [Zhang et al., 2016] Zhang, S., Jeong, H., Cho, S., and Li, X. (2016). Measurement of attenuation coefficients of the fundamental and second harmonic waves in water. -, 1706(1) :060011.
- [Zheng et al., 2022] Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Q., Jiang, D., Tu, J., Zhang, D., and Duan, H. (2022). Ultrasonic methods for brain imaging : Techniques and implications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 69(11) :3526–3537.
- [Zhou et al., 2010] Zhou, J., Ellis, A. V., and Voelcker, N. H. (2010). Recent developments in pdms surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis*, 31(1) :2–16.
- [Zhou et al., 2020] Zhou, W., Liu, X., van Wijnbergen, J. W. M., Yuan, L., Liu, Y., Zhang, C., and Jia, W. (2020). Identification of piezo1 as a potential prognostic marker in gliomas. *Scientific reports*, 10(1) :1–14.
- [Zhu et al., 2023] Zhu, Y., Zhang, X., Sun, L., Wang, Y., and Zhao, Y. (2023). Engineering human brain assembloids by microfluidics. *Advanced Materials*, page 2210083.

# Résumé

Au cours de l'organogenèse, les contraintes mécaniques sont nécessaires pour guider la morphogenèse des tissus et assurer leur fonctionnement normal. Au cours du développement tumoral, elles jouent également un rôle dans la progression de la maladie. Parmi les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte, le glioblastome est la plus agressive. Il touche majoritairement les personnes de plus de 50 ans pour un pronostic sombre malgré les avancées thérapeutiques. Les tumeurs de glioblastome se développent dans un environnement mécaniquement complexe, comprenant des forces de compression, de tension et de cisaillement exercées sur les cellules tumorales par le micro-environnement cérébral. Ces contraintes peuvent, par exemple, favoriser la division et l'invasion cellulaires ou affecter la réponse aux traitements tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie. Comprendre comment ces contraintes mécaniques affectent les tumeurs de glioblastome pourrait permettre d'améliorer la compréhension de ces tumeurs et de leur micro-environnement en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer.

Les modèles tissulaires permettent des études *in vitro*, indispensable dans la recherche contre le cancer. Le sphéroïde, qui résulte de l'auto-organisation de cellules en sphère, est considéré comme un bon modèle notamment en cancérologie où il est utilisé pour étudier le développement tumoral. A l'aide d'une onde acoustique stationnaire, il est possible de faire léviter des objets d'une taille comprise entre  $\mu\text{m}$  et  $\text{mm}$ . En plus de la lévitation, il est possible de modifier le champ de contraintes mécaniques généré par acoustique et s'appliquant à l'objet en lévitation, rendant possible la structuration de l'objet et l'étude de l'impact des contraintes mécaniques appliquées. Ce travail de thèse a donc consisté à mettre au point une technique de culture cellulaire en lévitation acoustique, puis de l'appliquer à des sphéroïdes formés à partir de lignées cellulaires de glioblastomes issus de patients.

Ce travail de recherche a débuté par la mise en place d'un nouveau système de culture long-terme, suivi par la démonstration de la viabilité des cellules après une semaine de culture en lévitation. Une preuve de concept de structuration de sphéroïde permise par ce système de culture est réalisée en modélisant l'infiltration de cellules immunitaires de type macrophage dans un sphéroïde tumoral de glioblastome. Le bioréacteur acoustique a ensuite été caractérisé par des mesures de vélocimétrie et de suivi de particules. Un modèle numérique, correspondant aux mesures expérimentales, a également été développé. L'importance des paramètres acoustiques et des possibilités qu'ils apportent en termes de manipulation et de structuration est explicitée. Pour finir, le début d'une étude sur

l'impact des contraintes mécaniques sur la prolifération et la densité de sphéroïdes de glioblastomes en lévitation est détaillé.

En conclusion, cette thèse montre que la lévitation acoustique est une méthode prometteuse pour l'étude de la formation de sphéroïdes cellulaires, en particulier des sphéroïdes de glioblastomes, ainsi que pour comprendre l'impact des contraintes mécaniques sur leur développement. Il a été montré, au travers de ce travail de thèse, que ce système peut cultiver des cellules jusqu'à 6 jours sans renouveler le milieu. Les expériences d'augmentation des contraintes mécaniques exercées sur les sphéroïdes de glioblastomes semblent montrer une augmentation de leur prolifération et de leur densité, ce qui souligne l'importance de l'environnement mécanique pour le développement tumoral. Ce nouveau système offre un large panel d'applications, d'autant que plusieurs types de sphéroïdes cellulaires ont été générés avec ce système (sphéroïdes neuronaux, tumoraux et épithéliaux). Parmi les applications possibles, l'infiltration de tumoroïdes cérébraux par des macrophages a notamment été démontrée.

# Abstract

During organogenesis, mechanical stresses are necessary to guide tissue morphogenesis and ensure normal function. During tumor development, they also play a role in disease progression. Among the most common brain tumors in adults, glioblastoma is the most aggressive. It mainly affects people over 50 years of age and has a poor prognosis despite therapeutic advances. Glioblastoma tumors develop in a mechanically complex environment, including compression, tension and shear forces exerted on the tumor cells by the brain microenvironment. These constraints can, for example, promote cell division and invasion or affect the response to treatments such as radiotherapy or chemotherapy. Understanding how these mechanical stresses affect glioblastoma tumors could lead to a better understanding of these tumors and their microenvironment in order to develop new therapeutic strategies to fight cancer.

Tissue models allow *in vitro* studies, which are essential in cancer research. The spheroid, which results from the self-organization of cells into a sphere, is considered a good model, especially in cancer research where it is used to study tumor development. With the help of a standing acoustic wave, it is possible to levitate objects with a size between  $\mu\text{m}$  and  $\text{mm}$ . In addition to levitation, it is possible to modify the mechanical stress field generated by acoustics and applied to the levitated object, making it possible to structure the object and to study the impact of the applied mechanical stresses. This thesis work consisted in developing a cell culture technique in acoustic levitation, then applying it to spheroids formed from glioblastoma cell lines from patients.

This research work began with the implementation of a new long-term culture system followed by the demonstration of cell viability after one week of levitation culture. A proof of concept of spheroid structuring allowed by this culture system was achieved by modeling the infiltration of macrophage-like immune cells into a glioblastoma tumor spheroid. The acoustic bioreactor was then characterized by particle image velocimetry and particle tracking measurements. A numerical model, corresponding to the experimental measurements, was also developed. The importance of the acoustic parameters and the possibilities they bring in terms of manipulation and structuring are explained. Finally, the beginning of a study on the impact of mechanical constraints on the proliferation and density of levitated glioblastoma spheroids is detailed.

In conclusion, this thesis shows that acoustic levitation is a promising method to study the formation of cell spheroids, in particular glioblastoma spheroids, and to understand the impact of mechanical constraints on their development. It has been shown, through this

thesis work, that this system can grow cells up to 6 days without renewing the medium. Experiments with increasing mechanical stress on glioblastoma spheroids seem to show an increase in their proliferation and density, which underlines the importance of the mechanical environment for tumor development. This new system offers a wide range of applications, especially since several types of cellular spheroids have been generated with this system (neuronal, tumor and epithelial spheroids). Among the possible applications, the infiltration of brain tumoroids by macrophages has been demonstrated.