

Table des matières

Résumé	3
Abstract	3
1 Présentation de l’IMFT	4
2 Introduction	5
3 Micro-circulation: écoulements de globules rouges et méthodes expérimentales	8
3.1 Ecoulements sanguins dans la micro-circulation	8
3.2 Propriétés des écoulements de globules rouges	9
3.2.1 Profil de vitesse et de l’hématocrite	9
3.2.2 Effets Fahraeus	9
3.2.3 Séparation de phase	10
3.3 Un point de départ pour le dispositif expérimental	11
3.4 La lithographie molle ou “soft lithography”	12
3.4.1 Le PDMS	13
3.4.2 Fabrications des micro-canaux	13
3.5 Différentes techniques de mesures	15
3.5.1 Techniques de mesures par corrélation spatiale	15
3.5.2 Technique de mesure par corrélation temporelle	16
3.5.3 Mesure de l’hématocrite	17
4 Dispositif expérimental	19
4.1 Connectiques, matériels, problèmes et solutions envisagés	19
4.2 Les suspensions utilisées	21
4.2.1 Suspensions de latex	21
4.2.2 Suspensions de globules rouges	22
4.3 Visualisations : microscope et caméra CCD	23
5 Résultats et discussion	24
5.1 Ecoulements de globules rouges	24
5.1.1 Protocole retenu pour les globules rouges	24
5.1.2 Visualisations	25
5.2 Mesure et stabilité du débit	26

5.2.1	Particle Tracking Velocimetry	27
5.2.2	DualSlit	32
5.2.3	Comparaison succincte entre la PIV et la DualSlit.	35
6	Conclusion	37
	Bibliographie	38
	Annexe 1: Plan des micro-canaux et schéma des masques	40
	Annexe 2: DualSlit, modèle simplifié	42

Résumé

Le transport d'oxygène et de nutriments vers les tissus vivants et l'évacuation des déchets métaboliques sont essentiellement déterminés par la dynamique des écoulements sanguins dans la microcirculation. Le sang est une suspension concentrée de globules rouges dans un liquide newtonien, le plasma. Comme les globules rouges ont une taille comparable à celle des vaisseaux sanguins de la micro-circulation, les effets dynamiques liés à leur présence (déformation, interactions hydrodynamiques) sont importants et induisent des comportements rhéologiques complexes. En particulier, aux bifurcations micro-vasculaires divergentes, les globules rouges et le plasma peuvent se distribuer de façon non proportionnelle entre les deux branches filles, l'une d'elles recevant une fraction volumique de globules rouges (appelée hématoците) plus élevée que celle de la branche d'entrée, et l'autre une fraction plus faible. Cet effet, connu sous le nom d'effet de séparation de phase, induit une très grande hétérogénéité de l'hématoците dans les réseaux micro-vasculaires ainsi qu'un couplage entre l'architecture du réseau et la dynamique de l'écoulement à l'échelle du réseau.

L'objectif de l'équipe de recherche où a été effectué ce travail est d'étudier cet effet *in vitro* à l'aide de dispositifs micro-fluidiques modélisant les bifurcations micro-vasculaires et de suspensions de globules rouges à hématoците contrôlé. Ce rapport présentera le dispositif expérimental mis en oeuvre, recensera les techniques expérimentales envisageables pour la mesure en ligne du débit et de l'hématoците, puis décrira l'adaptation de certaines de ces techniques et les résultats obtenus.

Abstract

Oxygen and nutrient delivery to living tissues, as well as metabolic waste removal, are essentially determined by blood flow dynamics in microvascular networks. Blood is a suspension of red blood cells at high concentration in a newtonian aqueous solution, called plasma. Because of the red blood cells large concentration and important size relative to the vessels dimensions, the dynamical effects due to their presence (deformation, hydrodynamic interactions) are important in microvascular flows and induce complex rheological behaviors. In particular, at diverging microvascular bifurcations, red blood cells and plasma may be distributed non-proportionally between the daughter vessels, one receiving a higher red blood cells volumic fraction than the feeding vessel, and the other receiving a lower one. This effect, known as the phase separation effect, induces a tremendous heterogeneity of the haematocrit from vessel to vessel in microvascular networks and a coupling between microvascular architecture and blood flow dynamics.

The goal of the research team where this work has been done is to study the phase separation effect *in vitro*, using micro-channel devices mimicking microvascular bifurcations and red blood cells suspensions of controlled haematocrit. The aim of the present report is to describe the experimental set-up implemented, to count the possible experimental techniques for the on line measurement of the flow rate and the haematocrit, and then to describe the adaptation of some of these techniques and the results obtained.

Chapitre 1

Présentation de l'IMFT

L'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse est un laboratoire de recherche public placé sous la double tutelle universitaire de l'Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université Paul Sabatier et sous la tutelle du Centre National de la Recherche Scientifique. Fondé en 1918, il est aujourd'hui un des tous premiers laboratoires de recherche en mécanique des fluides d'Europe. Les écoulements turbulents, les instabilités hydrodynamiques et les milieux hétérogènes poreux et diphasiques sont les axes principaux de recherche de ce laboratoire qui s'efforce de maintenir de fortes interactions entre la recherche expérimentale, la simulation numérique et la modélisation. Les secteurs d'applications de ces recherches sont multiples : énergie et transport, procédés, environnement, santé...

L'IMFT est divisé en six groupes de recherche : EEC (Ecoulements Et Combustion), EMC2 (Ecoulements Monophasiques Transitionnels et Turbulents), HYDROECO (HYDROlogie de surface et ECOhydraulique), INTERFACE (Ecoulements Diphasiques), OTE (Ondes, Turbulence et Environnement) et enfin le groupe GEMP (Groupe d'Etude sur les Milieux Poreux), au sein duquel a été effectué ce travail.

Le groupe GEMP développe différents thèmes de recherches :

- bio-mécanique,
- transport et adhésion de particules, filtration,
- micro-hydrodynamique entre deux surfaces solides,
- transferts de chaleur et de masse, milieux réactifs,
- transferts avec changement de phase,
- milieux naturels : milieux poreux hétérogènes à grande échelle,
- méthodes numériques pour les milieux hétérogènes,
- instabilités thermo-hydrodynamiques...

L'IMFT comprend :

- 59 chercheurs et enseignants-chercheurs,
- 39 ingénieurs, techniciens et administratifs,
- et 90 doctorants et post-doctorants.

La coopération internationale y est développée. Elle s'y manifeste sous diverses formes : accueil de chercheurs étrangers, cycles de conférences où des chercheurs étrangers font part de l'avancée de leurs travaux, organisations de congrès internationaux...

Chapitre 2

Introduction

Le réseau sanguin de chaque individu permet de transporter l'oxygène et les nutriments vers les organes et les tissus qui les consomment. Cette consommation entraîne la production de déchets métaboliques qui doivent impérativement être évacués. Les échanges entre les tissus et le système sanguin se font dans leur grande majorité au niveau du réseau micro-vasculaire. C'est pourquoi l'alimentation en oxygène et en nutriments ou encore l'évacuation des déchets métaboliques sont essentiellement déterminés par la dynamique des écoulements sanguins dans ce réseau dont le diamètre des vaisseaux est compris entre $4 \mu\text{m}$ et $100 \mu\text{m}$. Il faut savoir qu'à ces échelles, le sang ne peut être considéré comme un liquide monophasique. En effet, il doit être au minimum appréhendé comme une suspension concentrée de globules rouges circulant dans un liquide newtonien, le plasma. La fraction volumique des globules rouges, aussi appelée hématocrite, vaut entre 40 et 45 %, ce qui correspond à 4 à 6 millions de globules rouges par mm^3 de sang.

Les globules rouges sains se présentent sous la forme de disques biconcaves qui ont un diamètre d'environ 8 micromètres et une épaisseur d'environ 2 micromètres, voir figure 2.1. Les globules rouges contiennent l'hémoglobine, transporteur de l'oxygène dans le sang, et jouent donc un rôle essentiel dans la fonction d'échange de la microcirculation. Le sang contient également des globules blancs et des plaquettes qui jouent un rôle dans la défense immunitaire et dans la coagulation sanguine. Ils sont beaucoup moins nombreux que les globules rouges (4 à $8 \cdot 10^3$ globules blancs par mm^3 et $1,5$ à $3 \cdot 10^5$ plaquettes par mm^3).

Le plasma est une solution aqueuse newtonienne contenant des sels minéraux, des sucres et des protéines.



FIG. 2.1
Globules rouges.

La particularité du réseau micro-vasculaire est que la taille des vaisseaux qui le constituent est très proche de celle des globules rouges. Comme la concentration de ces derniers est en outre élevée, les effets dynamiques dus à la présence des globules rouges sont importants et induisent des comportements rhéologiques complexes [11]. En effet, le sang a des propriétés mécaniques particulières et un certain nombre d'effets remarquables sont à observer. En particulier, aux bifurcations micro-vasculaires divergentes, les globules rouges

et le plasma peuvent se distribuer de façon non proportionnelle entre les deux branches filles, l'une d'elles recevant une fraction volumique de globules rouges plus élevée que celle de la branche d'entrée, et l'autre une fraction plus faible. Cet effet, connu sous le nom d'effet de séparation de phase, induit une très grande hétérogénéité de l'hématocrite dans les réseaux micro-vasculaires ainsi qu'un couplage entre l'architecture du réseau et la dynamique de l'écoulement à l'échelle du réseau.

Afin de bien comprendre la relation qu'il y a entre la distribution de l'hématocrite et la géométrie du réseau, une description quantitative de l'effet de séparation de phase est nécessaire et un grand nombre d'études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont déjà été faites dans le passé (voir références dans [9]).

Les expérimentations *in vitro* n'ont pour le moment pas permis, à cause de limitations techniques, d'explorer le comportement des suspensions de globules rouges dans des canaux de la taille des plus petits vaisseaux de la microcirculation, les capillaires (4 à 10 μm de diamètre). De plus, les expériences macroscopiques, conçues en respectant le principe de similitude d'échelle, ne peuvent modéliser les comportements rhéologiques spécifiques des globules rouges (viscoélasticité de la membrane, déformabilité à volume et surface constante...).

Par contre, des expériences quantitatives réalisées *in vivo* ont permis de définir les paramètres pertinents pour la description de l'effet de séparation de phase : rapport entre la taille du vaisseau d'alimentation et la taille des globules rouges, rapports des diamètres des branches filles et de la branche d'alimentation, proportion du sang entrant dans chacune des branches filles et hématocrite de débit (cf définition paragraphe 3.2.2) dans la branche d'entrée. Ces expériences ont aussi permis de proposer une loi phénoménologique qui permet de décrire l'effet de séparation de phase en fonction de ces paramètres [9].

Cependant, le domaine de validité de cette description phénoménologique n'est pas explicité par les auteurs et pour certaines valeurs des paramètres, les résultats obtenus sont aberrants.

Un des objectifs à long terme de l'équipe "biomécanique" du GEMP est donc de clarifier cette description phénoménologique, en particulier dans le cas de micro-bifurcations asymétriques dont le diamètre est compris entre 4 et 20 μm , et pour lesquelles il y a en entrée un hématocrite élevé. Or, la mesure et le contrôle de l'écoulement lors d'une expérience réalisée *in vivo* sont de véritables difficultés. En effet, il est extrêmement difficile de contrôler et mesurer simultanément les différentes variables sans induire de réactions physiologiques du réseau micro-vasculaire étudié, par exemple une modification des diamètres de vaisseaux pour maintenir des débits conformes aux besoins métaboliques. La mesure et le contrôle de l'écoulement sont pourtant nécessaires à la détermination des paramètres permettant la description de l'écoulement. Parce que les techniques de microfluidique ont progressé, l'étude se fera *in vitro* et utilisera des micro-canaux en essayant de reproduire au mieux les bifurcations micro vasculaires. Cette étude devra permettre un contrôle rigoureux des conditions expérimentales ainsi que des mesures quantitatives des différents paramètres de l'écoulement. Pour les régimes envisagés (faibles débits, petits canaux, concentration en globules rouges élevées), cela représente un véritable défi.

C'est dans ce cadre que le stage de master effectué doit permettre :

- la mise au point d'un protocole permettant un contrôle rigoureux des conditions expérimentales et l'acquisition vidéo d'écoulements de suspensions de globules rouges dans différents micro-canaux,
- le recensement des techniques de mesures du débit et de l'hématocrite,
- l'adaptation et l'implémentation de certaines d'entre elles pour leur utilisation sur des séries d'images,
- l'analyse et la discussion des résultats obtenus par ces méthodes.

Après une synthèse bibliographique résumant les caractéristiques principales des écoulements sanguins dans la microcirculation, nous ferons une description du dispositif expérimental, de la connectique au système d'acquisition en passant par l'élaboration des micro-canaux, puis nous discuterons les résultats obtenus avant de conclure.

Chapitre 3

Micro-circulation: écoulements de globules rouges et méthodes expérimentales

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique résumant les caractéristiques principales des écoulements sanguins dans la microcirculation, les propriétés spécifiques des écoulements de suspensions de globules rouges puis les méthodes expérimentales permettant l'étude *in vitro* de telles suspensions. Tout d'abord, les techniques de micro-fabrication permettant la réalisation de micro-bifurcations seront présentées. Puis les techniques de mesures, développées par les communautés de la micro-fluidique et par les physiologistes de la micro-circulation, seront recensées.

3.1 Ecoulements sanguins dans la micro-circulation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la micro-circulation est définie par l'échelle des vaisseaux sanguins qui la constituent, typiquement inférieure à $100\ \mu\text{m}$. Du point de vue de la dynamique de l'écoulement, ces faibles dimensions se traduisent par des nombres de Reynolds et de Womersley négligeables, ce qui signifie:

- d'une part, que les forces visqueuses sont très nettement prépondérantes par rapport aux forces d'inertie et qu'elles seules contrebalancent la force motrice, c'est à dire le gradient de pression imposé par la pompe cardiaque,
- d'autre part, que les effets de la pulsation de l'écoulement deviennent négligeables et que cet écoulement peut être considéré comme permanent.

La complexité des écoulements sanguins dans la micro-circulation provient donc essentiellement des propriétés spécifiques des écoulements de globules rouges dans de vaisseaux de petite taille sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement, et de la complexité de l'architecture des réseaux micro-vasculaires. Toutes les études anatomiques (études *post-mortem* ou par microscopie intra-vitale) ont montré que l'architecture des réseaux micro-vasculaires est le plus souvent tridimensionnelle et anisotrope, avec un très grand rapport surface sur volume pour favoriser les échanges. Les ordres de grandeurs suivants,

obtenus dans le réseau micro-circulatoire du cerveau humain [[1]], sont significatifs : le réseau micro-vasculaire occupe uniquement 2.5 % du volume de la matière grise, avec une longueur cumulée de vaisseaux de l'ordre de 500 mm/mm^3 et un rapport surface sur volume de $5 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$.

Par ailleurs, ces réseaux micro-vasculaires se caractérisent par une très grande hétérogénéité de la distribution des diamètres et longueurs des différents vaisseaux ainsi que de leur connectivité. Cette hétérogénéité architecturale s'accompagne d'une grande hétérogénéité des variables hémodynamiques, comme la vitesse et l'hématocrite, même dans des vaisseaux morphologiquement semblables. Ce couplage entre hétérogénéité architecturale et dynamique peut s'expliquer au moins en partie par les propriétés des écoulements de globules rouges dans des vaisseaux de petites tailles.

3.2 Propriétés des écoulements de globules rouges

3.2.1 Profil de vitesse et de l'hématocrite

Dans l'écoulement d'une suspension de globules rouges, la vitesse de translation et de rotation des globules est modifiée près de l'interface fluide-paroi, ce qui introduit une composante radiale (dans le sens paroi-axe) à la vitesse des globules. Il en résulte une migration des globules rouges situées près de la paroi vers la partie centrale du vaisseau, d'autant plus importante que la suspension est diluée [2]. De plus, on sait que pour un vaisseau de petite taille ($< 100 \mu\text{m}$), le profil de vitesse de l'écoulement est plus aplati dans la région centrale que le profil parabolique de l'écoulement de Poiseuille correspondant. La surface de la zone d'aplatissement dépend essentiellement de la concentration en globules rouges, du débit et du diamètre du tube. Ces trois paramètres conditionnent la répartition radiale de la concentration en globules rouges. L'existence de ce profil radial de la concentration en globules rouges a deux conséquences sur l'hématocrite : l'effet Fahraeus et l'effet de séparation de phase.

3.2.2 Effets Fahraeus

Dans un tube de diamètre donné, les vitesses varient de zéro près de la paroi à une valeur maximale au centre. Comme les globules rouges migrent vers le centre du vaisseau, leur vitesse moyenne (V_{GR}) est plus grande que la vitesse moyenne du sang (V_S). Cela induit une réduction du temps de transit des globules rouges et une baisse de la concentration relative en globules rouges dans ce vaisseau [9].

Pour un vaisseau donné, il est donc nécessaire de distinguer :

- l'hématocrite de tube (H_T), qui est la concentration volumique de globules rouges dans ce vaisseau à un instant donné,

$$H_T = \frac{\text{Volume des globules rouges}}{\text{Volume total du tube}},$$

- l'hématocrite de débit (H_D), qui est le rapport entre le débit volumique de globules rouges et le débit volumique sanguin total,

$$H_D = \frac{\text{Debit des globules rouges}}{\text{Debit du sang}}.$$

L'effet Fahraeus peut alors être décrit par l'équation suivante:

$$\frac{H_T}{H_D} = \frac{t_{GR}}{t_S} = \frac{V_S}{V_{GR}} < 1,$$

où t_{GR} et t_S sont les temps de transit moyens des globules rouges et du sang et V_{GR} et V_S leurs vitesses moyennes.

3.2.3 Séparation de phase

Aux niveaux des branches filles d'une bifurcation micro-vasculaire divergente, les globules rouges et le plasma peuvent se distribuer de façon non proportionnelle entre les deux branches, l'une d'elles recevant une fraction volumique de globules rouges plus élevée que celle de la branche d'entrée, et l'autre une fraction plus faible, voir figure 3.1. Cet effet, connu sous le nom d'effet de séparation de phase, induit une très grande hétérogénéité de l'hématocrite dans les réseaux micro-vasculaires.

Ce mécanisme n'est toujours pas clairement compris mais son évaluation est nécessaire pour la modélisation d'écoulements de globules rouges dans des réseaux micro-vasculaires. C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées sur ce sujet. En particulier, Pries et al. ont réalisé une étude *in vitro* chez le rat, et analysé 65 bifurcations artériolaires [9]. Cette étude a permis de déterminer les paramètres pertinents pour la description de l'effet de séparation de phase. Ces paramètres sont les suivants : la proportion du débit sanguin entrant dans la branche fille α (FQ_S^α), le rapport des diamètres des deux branches filles α et β (D_α/D_β), l'hématocrite de débit dans la branche d'entrée (H_d) et le rapport du diamètre de la branche mère sur le diamètre des globules rouges (D_{mere}/D_{GR}). Au contraire, l'étude montre une indépendance de l'effet de séparation de phase vis à vis de l'angle des bifurcations, de leur orientation dans l'espace et de la distance entre deux bifurcations successives.

Les principaux résultats de cette étude sont présentés sur la figure 3.2, tirée de l'article de Pries et al. 1996 ([11]). La figure centrale représente les hématocrites dans les deux branches filles divisés par l'hématocrite dans la branche mère, en fonction du débit de sang dans chacune des branches filles normalisé par le débit total (Relative hematocrit *vs* Fractional blood flow). La figure de droite indique la fraction du débit de globules rouges dans une branche fille donnée (FQ_{GR}) en fonction du débit de sang normalisé qui la traverse (FQ_S)(fractional RBC flow *vs* fractional blood flow) .

C'est à partir de ces résultats qu'une loi phénoménologique reliant la fraction du débit de globules rouges (FQ_{GR}) à la fraction du débit de sang (FQ_S) est proposée. Pour une fraction du débit de sang (FQ_S) supérieure à un seuil X_0 et inférieure à $X_0 - 1$, on a:

$$FQ_{GR}^\alpha = \frac{1}{1 + e^{-(A+B \logit(\frac{FQ_S^\alpha - X_0}{1-2X_0}))}} \text{ et } FQ_{GR}^\beta = 1 - FQ_{GR}^\alpha$$

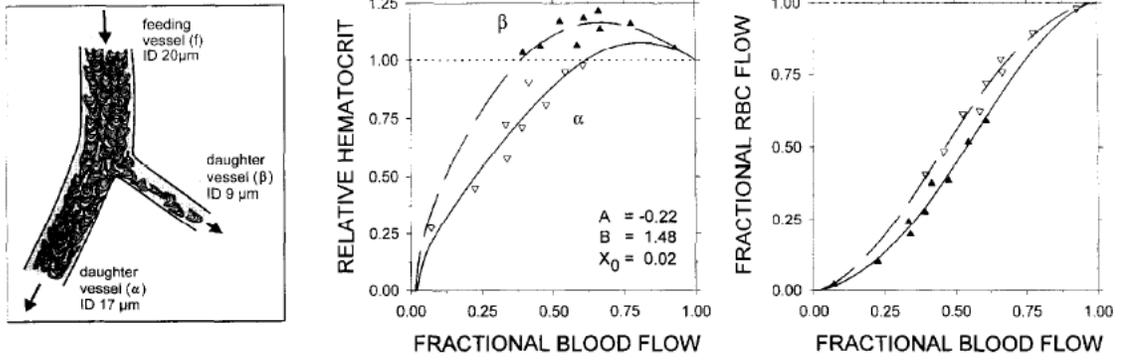


FIG. 3.1 – *Extraits des résultats de Pries et al. 1996 [11]. A gauche: Schéma d'une bifurcation micro-vasculaire. Au milieu: hématurite de chaque branche filles (daughters vessels, α et β) par rapport à celui de la branche mère (feeding vessel) en fonction de la proportion du débit entrant. A droite: débit fractionnaire des globules rouges pour chaque branche fille en fonction de la proportion de débit entrant. Symboles: pour la branche fille α triangles vides, pour la branche fille β , triangles pleins.*

avec le seuil (X_0), l'asymétrie (A) et la forme sigmoïdale (B) définis par les régressions linéaires suivantes :

$$A = \frac{-6.96 \ln\left(\frac{D_\alpha}{D_\beta}\right)}{D_f},$$

$$B = 1 + \frac{6.98(1 - H_d)}{D_{mere}},$$

$$X_0 = \frac{0.4}{D_{mere}},$$

où D_α, D_β, D_f sont les diamètres des différentes branches. A titre d'exemple, on notera que pour une répartition égale du débit entre les deux branches filles, l'hématocrite est toujours plus élevé dans la plus petite des branches filles. De même, dans le cas où les branches filles ont le même diamètre, l'hématocrite est plus élevé dans la branche fille recevant la plus grande proportion du débit.

Bien que cette description phénoménologique soit le résultat de nombreuses expériences réalisées *in vivo*, son domaine de validité n'est pas explicité par les auteurs et pour certains régimes, en particulier pour des hématurites d'entrée élevés et des micro-canaux de petites tailles, les résultats obtenus avec cette description sont aberrants.

3.3 Un point de départ pour le dispositif expérimental

A notre connaissance, l'unique dispositif expérimental permettant l'étude *in vitro* de l'écoulement d'une suspension de globules rouges, au niveau de bifurcations de micro-canaux et pour des tailles équivalentes à celles de vaisseaux capillaires humains, a été

développé par Shevkoplyas *et al.* 2003 ([12]).

En utilisant une technologie spécifique, la lithographie molle, ils ont réalisé un réseau plan de 34 micro-canaux d'une profondeur constante de $5.4 \mu\text{m}$ et d'une largeur allant de 6 à $63 \mu\text{m}$. Dans ce réseau qui ne possède qu'une entrée et qu'une sortie, l'écoulement est généré par la gravité. Ce dispositif ne permet donc pas de contrôler le débit dans chaque segment car ce dernier est le résultat de l'interaction entre l'architecture du réseau et les propriétés rhéologiques de la suspension. Des techniques de mesures *in situ* auraient donc été nécessaires pour interpréter les résultats de façon quantitative. De plus, il est à noter que les micro-canaux réalisés par cette équipe sont des canaux à section rectangulaire avec un rapport hauteur sur largeur petit, si bien que la faible hauteur des canaux est la dimension caractéristique de l'écoulement. Le point important est qu'en dépit de cette différence fondamentale par rapport aux études effectuées *in vivo*, les formes observées des globules restent similaires. Il semble que ce type de réseau pourrait permettre l'étude de l'effet de séparation de phase.

3.4 La lithographie molle ou “soft lithography”

Les micro-canaux utilisés au cours du stage ont été réalisés en PDMS, au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS CNRS), avec le concours de Monique Dilhan et de David Bourrier, suivant une méthode adaptée de celle utilisée par Shevkoplyas *et al.*. Cependant, pour répondre à nos objectifs qui sont le contrôle du débit et de l'hématocrite dans des bifurcations divergentes asymétriques et de profondeurs variables suivant les branches, le choix s'est porté sur des bifurcations uniques composées de trois branches de différentes profondeurs. L'architecture du réseau a été conçue au sein du groupe GEMP de l'IMFT (les détails de cette architecture sont fournis en Annexe 1: Plan des microcanaux et masques).

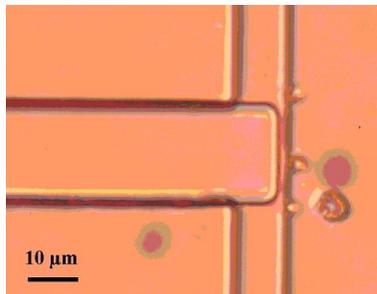


FIG. 3.2 – Photographie d'une microbifurcation en PDMS.

Une photographie d'une micro-bifurcation est donnée en figure 3.2. Cette photographie est centrée uniquement sur la micro-bifurcation mais l'architecture de nos canaux est légèrement plus complexe, puisque chaque canal est relié en amont (respectivement en aval) à un canal d'alimentation (respectivement de drainage) de largeur plus importante ($10 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ou $20 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$).

3.4.1 Le PDMS

Le PDMS ou polydiméthylsiloxane, est un polymère inorganique formé d'une chaîne silicium-oxygène (...-Si-O-Si-O-Si-O-...). Différents groupes organiques peuvent être utilisés pour relier entre elles plusieurs de ces chaînes -Si-O-. Le type le plus courant est le polydiméthylsiloxane linéaire ou PDMS.

Une caractéristique du PDMS est qu'il se comporte comme un milieu poreux. En effet, il existe un phénomène de pervaporation [3] qui devient non négligeable à l'échelle de nos canaux, le rapport volume/surface du canal étant faible.

3.4.2 Fabrications des micro-canaux

Les micro-canaux sont réalisés par l'assemblage de deux disques de PDMS. Ces deux disques sont obtenus par moulage. L'un a été coulé sur un moule ayant la structure du réseau désiré préalablement gravée en positif et l'autre sur un moule parfaitement lisse.

Fabrication de la partie positive du moule

Pour la réalisation des micro-canaux en positif sur le moule, la technique utilisée est la lithographie molle [5]. Cette technique bien connue a été adaptée par le LAAS pour pouvoir obtenir différentes profondeurs de canaux en utilisant autant de photo-masques verre-chrome que nécessaires. Pour chaque niveau de profondeur un photo-masque verre-chrome doit être utilisé. Dans le cas particulier représenté par la figure 3.2, la micro-bifurcation est constituée d'un canal de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, et à droite, de deux canaux de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Pour la réalisation de cette bifurcation, deux modèles de photo-masques sont donc nécessaires. Le positif, qui servira ultérieurement de moule au PDMS, est produit par l'utilisation successive de ces deux photo-masques sur une résine photosensible (SU8).

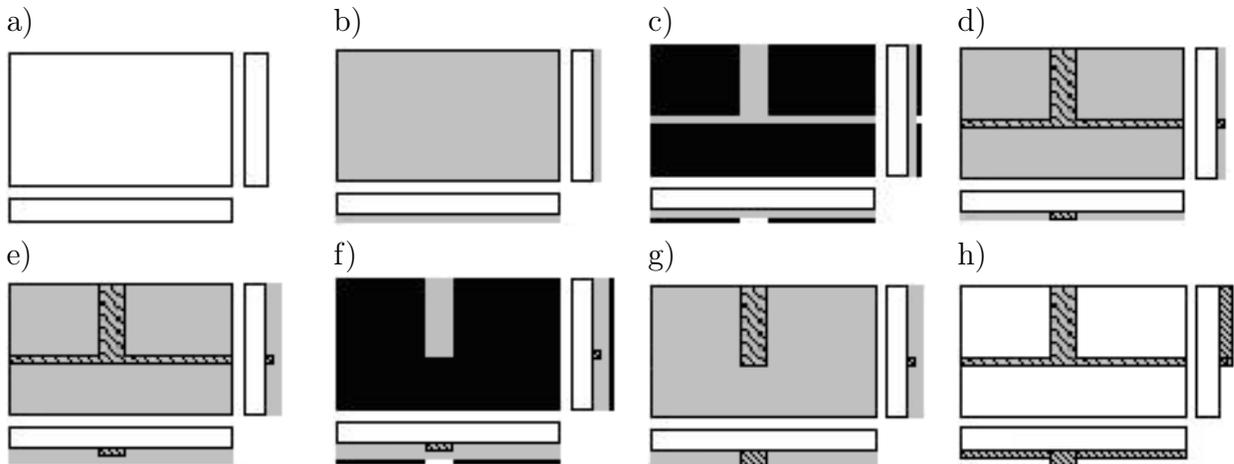


FIG. 3.3 – Les différentes étapes pour la fabrication du moule. Chaque figure représente les vues de face, de dessus et de gauche du moule. Le support de silicium est représenté en blanc, la résine photosensible en gris, les parties hachurées représentant les zones insolées, et les masques sont en noir.

La fabrication de la partie positive du moule est réalisée par lithographie. On commence avec un support en silicium vierge (Fig 3.3a). Le support est recouvert d'une couche de résine de $10\ \mu\text{m}$ (Fig 3.3b) puis un premier masque, sur lequel a été imprimé l'ensemble des canaux, est appliqué sur cette résine (Fig 3.3c). Le tout est insolé, ce qui a pour effet de transformer la résine qui devient alors insensible au traitement chimique qui interviendra à la fin. La partie hachurée de la figure 3.3d représente la zone insolée. L'ensemble est de nouveau recouvert d'une couche de résine de $10\ \mu\text{m}$ (Fig 3.3e) puis recouvert d'un second masque sur lequel seul les canaux les plus profonds sont imprimés (Fig 3.3f), avant insolation. Le résultat de cette seconde insolation est représenté sur la figure 3.3g. Une fois les différentes couches effectuées, l'ensemble est soumis à un traitement qui détruit la résine non insolée, aboutissant au résultat attendu (Fig 3.3h).

Moulage et collage des deux disques

Cette étape est relativement simple. En effet, en partant du produit de base (PDMS liquide, SYLGARD® 184 Silicone Elastomer) et du durcisseur (SYLGARD® 184 Curing agent), il suffit de faire un mélange à 1 pour 10 en masse ou en volume, de dégazer le mélange sous vide, de le couler sur les moules puis de le faire cuire une heure à 65°C . On réalise ainsi deux parties, une où les canaux seront moulés et l'autre parfaitement plane qui sera collée sur la première. Mais avant le collage des deux parties, il reste à percer les trous qui permettent de relier la connectique et l'alimentation en fluide des canaux. Pour cela on utilise en guise d'emporte pièce une aiguille de seringue dont la pointe a été modifiée au préalable. Puis un nettoyage est effectué avec du ruban adhésif pour enlever les résidus de PDMS lors du perçage, juste avant le collage. Ce collage se fait par application des deux éléments l'un sur l'autre après traitement des surfaces dans un four à plasma (Plasma à oxygène à 200 Watts, exposition de 30 s).

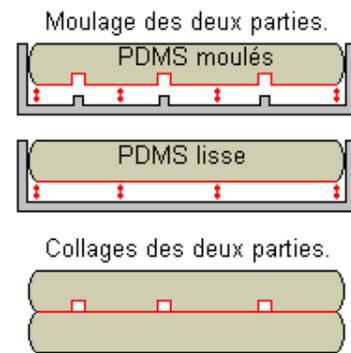


FIG. 3.4 – *Moulage et collage du PDMS.*

3.5 Différentes techniques de mesures

Les domaines de la micro-fluidique et de la recherche micro-vasculaire proposent différentes techniques de mesures des champs de vitesses, du débit et de l'hématocrite, les différentes données expérimentales auxquelles nous aimerions avoir accès dans notre étude. Nous allons succinctement présenter les quelques techniques expérimentales auxquelles nous nous sommes intéressés. Il faut noter qu'il s'agit de techniques optiques, non intrusives.

3.5.1 Techniques de mesures par corrélation spatiale

Les méthodes que nous allons présenter dans ce paragraphe sont la vélocimétrie par suivi de particules (P.T.V. : Particle Tracking Velocimetry) et la vélocimétrie par imagerie de particules (P.I.V. : Particle Image Velocimetry), bien connues en mécanique des fluides. Elles ont été développées pour permettre la mesure de champs de vitesses instantanées dans un écoulement de fluide monophasique. Pour cela, le fluide estensemencé par des petites particules qui jouent le rôle de traceurs.

Dans les deux cas, deux images bidimensionnelles successives de l'écoulement, séparées par un intervalle de temps Δt connu, sont enregistrées. L'évaluation, par traitement d'images, du champ de déplacement $\Delta \vec{x}$ des traceurs d'une image à l'autre permet de mesurer le champ de vitesse de ces traceurs, et donc du fluide, en utilisant la définition fondamentale de la vitesse :

$$\vec{u}(\vec{x}, t) = \frac{\Delta \vec{x}(\vec{x}, t)}{\Delta t}.$$

La PTV (Particle Tracking Velocimetry)

Dans cette méthode, le déplacement de chaque traceur est déterminé individuellement. Toute la difficulté consiste donc dans l'identification et l'appariement de chaque particule d'une image à l'autre. Le traitement d'images permet l'obtention d'un vecteur vitesse par traceur. Il est donc souvent nécessaire d'étudier plusieurs couples d'images et de faire une étude statistique sur les vecteurs vitesses instantanées obtenus.

La PIV (Particle Image Velocimetry)

Dans cette méthode, ce n'est pas le déplacement des traceurs individuels qui est déterminé mais le déplacement de groupes de traceurs. Le schéma du principe de cette méthode est présenté par la figure Fig: 3.5. La méthode consiste à subdiviser la zone de l'écoulement suivant un maillage prédéfini. Pour chaque point de la maille, on recherche le maximum de corrélations entre une région rectangulaire (boîte de corrélation) située sur la première image autour de ce point, et une région rectangulaire de même taille située sur la seconde image dans une boîte de recherche elle même centrée sur ce point. La boîte de recherche est de taille plus grande que celle des boîtes de corrélation. Un calcul itératif permet de déterminer la corrélation entre la boîte de corrélation 1 et toutes les sous boîtes de taille identique contenues dans la boîte de recherche, puis de déterminer la position de la boîte 2 correspondant à la valeur maximale de la corrélation. Le déplacement de l'ensemble de particules contenues dans la boîte 1 est donné par le décalage spatial entre ces deux

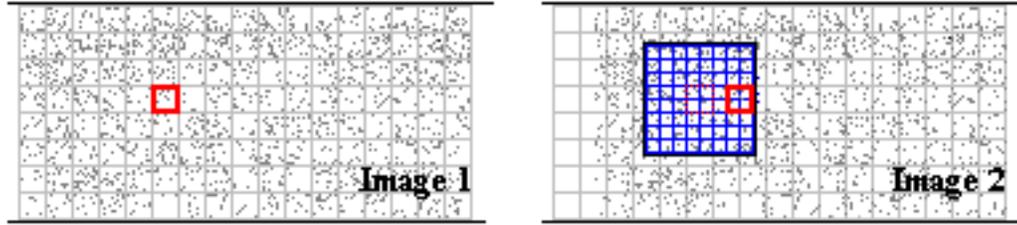


FIG. 3.5 – *Schéma de principe de la PIV. En rouge: les boites de corrélations. En noir, la boite de recherche. Les maillages sont en gris ou en bleu*

boîtes. Cette méthode aboutit donc après le traitement de tous les points du maillage, à un champ bidimensionnel de vecteurs vitesses, avec un nombre de vecteurs sur la largeur du canal déterminé par le maillage de la zone d’écoulement. Notons, que cette méthode n’est pas adaptée lorsqu’il y a de forts gradients de vitesse à l’échelle de la maille ce qui est le cas à proximité des parois : des algorithmes plus complexes de traitement des données sont alors nécessaires.

Adaptation à la micro-fluidique

En PTV et PIV, pour illuminer les traceurs, on utilise habituellement une nappe laser de faible épaisseur de l’ordre du millimètre. Ainsi, seules les particules présentes dans cette nappe sont visualisées. Puisque l’utilisation d’une nappe laser se révèle impossible pour des dispositifs de micro-fluidique, de dimensions inférieures au millimètre, ces techniques ont été adaptées : on parle alors de micro-PIV et micro-PTV. L’illumination se fait alors en volume et l’observation est faite au microscope optique avec des objectifs à faible profondeur de champ, ce qui permet de réaliser des “tranches” optiques (typiquement de 5 à 10 μm d’épaisseur). Cette détection “par tranche” est analogue à celle effectuée dans le plan de la nappe laser en PIV classique. Les algorithmes utilisés en micro-PIV sont semblables à ceux utilisés en PIV.

3.5.2 Technique de mesure par corrélation temporelle

Une approche alternative pour l’évaluation de la vitesse peut consister à utiliser une méthode de corrélation temporelle. Cette fois, au lieu de se placer à un instant donné et de rechercher localement les corrélations spatiales dans deux images successives de l’écoulement, on enregistre deux signaux temporels en deux points séparés d’une distance dl connue. La vitesse est estimée à partir du décalage temporel Γ permettant d’obtenir une corrélation maximale entre les deux signaux : $V_{exp} = dl/\Gamma$. Dans le cas des écoulements micro-vasculaires, une technique classique appelée DualSlit, repose sur la transillumination du vaisseau à étudier et sur l’utilisation de deux capteurs (photodiodes ou régions d’intérêt dans une image digitale) positionnés suivant l’axe du vaisseau et permettant d’enregistrer la modulation d’intensité lumineuse due au passage des globules rouges.

Dans cette méthode, chaque particule située dans le champ du capteur participe à

la modulation du signal et cela quelle que soit sa position dans l'épaisseur du canal observé. De ce fait, cette méthode est applicable pour une gamme de concentrations de suspensions plus importante que celle utilisable par la PTV. De plus, sa mise en oeuvre ne dépend pas du type de suspension utilisée. Nous pourrions donc l'utiliser aussi bien sur des suspensions de latex que sur des suspensions de globules rouges, et son domaine d'application semble plus en adéquation avec la gamme de concentration que nous souhaitons étudier. Cependant, il est nécessaire de bien comprendre ce que mesure la DualSlit.

D'après Wayland & Jonhson [16], la vitesse mesurée par cette technique, V_{ds} peut être reliée au champ de vitesse du fluide par la formule suivante :

$$V_{ds} = \frac{\int H(y,z) u(y,z)^2 dz}{\int H(y,z) u(y,z) dz}, \quad (3.1)$$

où $u(y,z)$ est la vitesse des particules (traceurs de l'écoulement de fluide), $H(y,z)$ la fonction qui donne la répartition spatiale des particules dans le canal, et où l'intégration se fait sur la hauteur du canal. Cette formule est correcte lorsque l'on considère la situation suivante : on mesure en un point donné, pendant une durée finie, la vitesse de chaque particule passant en ce point (par PTV par exemple), [7]. Durant la durée finie de la mesure, on détecte plus de particules rapides, d'où la pondération de la moyenne par la vitesse des particules (on parle alors de moyenne dynamique). Wayland & Jonhson ont sans doute cette idée en tête lorsqu'ils proposent l'équation précédente pour lier la vitesse mesurée par la Dual Slit à la vitesse du fluide. Mais, la raison pour laquelle la mesure par corrélation temporelle des deux signaux devrait aboutir au même type de moyenne dynamique n'est jamais explicitée dans la littérature. C'est pourquoi on présente en Annexe 2 un modèle extrêmement simplifié permettant d'étudier la relation entre V_{ds} , donnée par l'équation 3.1 et la vitesse déterminée expérimentalement par la DualSlit, V_{exp} .

3.5.3 Mesure de l'hématocrite

Habituellement, la mesure de l'hématocrite *in vivo* se fait par des techniques photométriques où l'on utilise l'atténuation de la lumière qui traverse le vaisseau. On comprend bien que si la répartition des particules est homogène, plus la concentration sera grande et plus la lumière sera atténuée. En effet, cette atténuation est directement liée à l'hématocrite, [8]. Cette méthode, bien que plus compliquée, se révèle plus précise que le comptage des particules une par une (ce qui, pour une suspension concentrée de globules rouges, nécessite le marquage d'un certain pourcentage de globules par des techniques de fluorescence par exemple).

Dans notre cas, les méthodes de photométrie nécessiteraient une procédure de calibration particulièrement complexe. C'est pourquoi nous comptons sur le fait qu'une méthode de comptage pourra se révéler suffisante car les dimensions du canal sont de l'ordre de la taille des globules rouges.

Notons que suivant la méthode utilisée pour évaluer l'hématocrite, on détermine l'hématocrite de tube, qui est le rapport du volume des globules rouges sur le volume du canal (en effectuant à un instant donné, une prise de vue puis le comptage des globules rouges dans tout le tube) ou l'hématocrite de débit (en s'intéressant au rapport du débit

de globules rouges qui passent en un point précis sur le débit de l'écoulement). En ce qui concerne la mesure de l'hématocrite, nous n'entrerons pas plus dans les détails, puisque ces méthodes n'ont pas été développées pendant le stage, par manque de temps.

Chapitre 4

Dispositif expérimental

Dans ce chapitre, nous présentons le dispositif expérimental utilisé pour ce travail et les protocoles mis au point pour la préparation des suspensions. Notons que les microcanaux utilisés avaient été conçus au préalable par l'équipe "biomécanique", en collaboration avec le LAAS. L'architecture retenue pour l'étude de l'effet de séparation de phase est la micro-bifurcation unique. En effet ayant comme objectif de clarifier la description phénoménologique de cet effet, il est souhaitable de contrôler le plus grand nombre possible de paramètres le régissant. Dans notre cas, l'idée est de connecter deux pompes en aspiration aux deux branches filles et d'alimenter la branche mère avec un hémocrite contrôlé. Les paramètres ainsi contrôlables sont le débit dans les deux branches filles et, par conservation de la masse, celui de la branche mère. L'utilisation de suspensions à hémocrites contrôlés doit permettre de connaître l'hémocrite dans la branche mère. Préalablement au travail de stage, quelques manipulations préliminaires avaient été faites pour vérifier la faisabilité de l'expérience, mais aucune mesure quantitative n'avait été développée.

4.1 Connectiques, matériels, problèmes et solutions envisagés

Le schéma du dispositif expérimental est donné en figure 4.1. Les éléments du circuit fluide et la connectiques sont les suivants :

- du tuyau semi rigide (PTFE tubing 1.2mm OD)
- des seringues de précision en verre (Hamilton Gastight $1\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $25\mu\text{l}$ or $100\mu\text{l}$)
- des embouts de seringue permettant l'adaptation du tuyau aux seringues,
- d'un réservoir pour les globules rouges (embout de pipette jetable de $10\mu\text{l}$)
- de deux pompes à seringue de précision (PHD 22/2000 Harvard Apparatus)
- des micro-canaux (micro-bifurcations ou canaux droits) moulés dans du PDMS (cf Annexe 1: plan et masques des micro-canaux.).
- de deux plaques de Plexiglas pour prendre en sandwich le PDMS. Une des deux plaques est percée pour permettre l'alimentation en fluide des micro-canaux. Leur serrage est réalisé par 4 pinces.

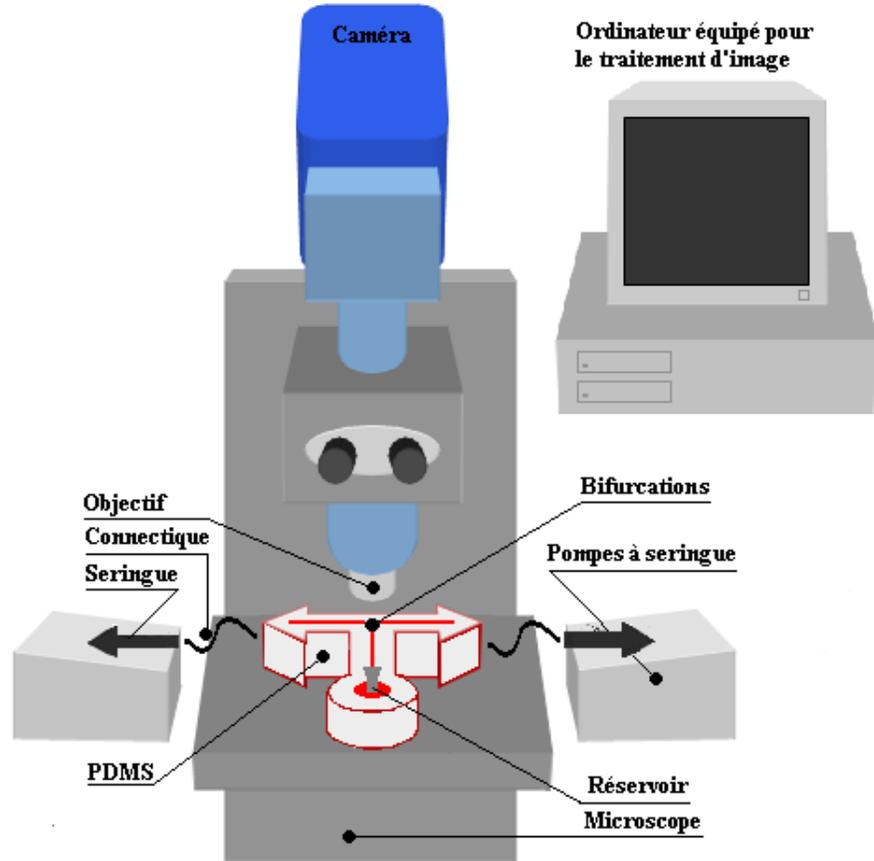


FIG. 4.1 – Schéma de principe du dispositif expérimental.

La connectique est artisanale. On utilise un tuyau semi-rigide. Deux embouts sont adaptés à chaque extrémité du tuyau. L'un permet le raccordement à la seringue tandis que l'autre permet de positionner le tuyau dans les trous du PDMS. Les difficultés les plus souvent rencontrées sont les fuites, les volumes morts et les bulles d'air. Ces événements sont problématiques car, étant donné les débits envisagés (de $0,005 \mu\text{l}/\text{min}$ à $1 \mu\text{l}/\text{min}$), il est très difficile de les détecter. Une bonne méthode de remplissage du système permet d'éviter les bulles d'air. Cependant, le problème des fuites, en particulier au niveau de la connexion tuyau-PDMS, reste important. Pour résoudre ce problème, on réalise un collage avec une colle de type néoprène (Bostik). Il reste alors la possibilité d'avoir un certain nombre de volumes morts pouvant retenir des bulles d'air. La solution est de faire circuler suffisamment longtemps le liquide dans le canal avant le collage afin que le liquide envahisse entièrement le canal. D'un côté du canal, on a donc la connectique reliant le PDMS à la pompe, et de l'autre le réservoir contenant la suspension. Ce réservoir est un embout de pipette jetable de $10 \mu\text{l}$.

Avant d'arriver à un protocole efficace, de nombreux essais ont été effectués. Dans un premier temps, des suspensions de latex ont été utilisées dans des tubes capillaires en verre, puis dans les canaux droits et les bifurcations réalisées dans du PDMS. C'est uniquement après ces différentes étapes que des suspensions de globules rouges ont été utilisées. Ces différents essais nous ont conduit par exemple à changer la densité du liquide dans les

solutions de latex, puisque les particules sédimentaient trop rapidement et entraînaient la formation de bouchons ; ou encore à nous interroger sur la possibilité d'une déformation du PDMS ou du tuyau, ce pourquoi nous avons remplacé le tuyau souple reliant initialement la seringue au PDMS par un tuyau semi rigide et enserré le PDMS entre deux plaques de Plexiglas.

4.2 Les suspensions utilisées

Deux sortes de suspensions ont été utilisées lors de nos expériences. Ainsi, avant de faire couler des GRs dans les micro-canaux, nous avons mis au point le protocole expérimental en utilisant des particules de latex.

4.2.1 Suspensions de latex

Les particules de latex utilisées (Interface Dynamics Corporation) sont conditionnées sous la forme de suspensions concentrées, les solutions mères. Dans notre cas, nous avons utilisé des particules de latex mono-disperses d'un diamètre de $2 \mu\text{m}$. La solution mère est une suspension de latex dans de l'eau (de concentration 8.3% v/v).

Pour limiter la sédimentation des particules, lors de nos expériences, nous avons choisi d'utiliser des solutions de densités les plus proches possibles de celle des particules de latex ($d=1.05$) : nous parlerons alors de solution en isodensité. Pour pouvoir obtenir des suspensions de différentes concentrations rapidement, nous avons préparé au préalable une solution d'eau et de glycérol (solution de base), la densité de cette solution devant simplement être légèrement plus grande que celle des particules de latex. Pour cela, nous avons ajouté du glycérol dans de l'eau en contrôlant uniquement la densité à l'aide d'un densimètre. La salle de travail étant régulée en température, la densité de la solution de base ($d=1.0624$) est stable.

Dans l'exemple qui suit nous allons expliciter la méthode permettant d'obtenir $1000 \mu\text{l}$ d'une suspension de latex en isodensité avec une concentration de latex de 0.1% (v/v) à partir d'une solution mère à 8.3% (v/v).

Pour cela, il faut mélanger ($1000 \times \frac{0.1}{8.3}$) = $12 \mu\text{l}$ de solution mère de latex à ($1000 \mu\text{l} - 12 \mu\text{l}$) = $988 \mu\text{l}$ d'un mélange solution de base/eau, de concentration $\frac{V_{base}}{V_{eau}}$ à déterminer pour obtenir l'isodensité. Sachant que les $12 \mu\text{l}$ de solution mère contiennent ($12 \times \frac{8.3}{100}$) = $1 \mu\text{l}$ de particules de latex et $11 \mu\text{l}$ d'eau, la densité du liquide suspendant sera déterminée par:

$$d_{\text{susp}} = \frac{d_{\text{Base}} V_{\text{Base}} + d_{\text{eau}} (11 + V_{\text{eau}})}{V_{\text{Base}} + 11 + V_{\text{eau}}},$$

avec $d_{\text{Base}} = 1.0624$ et $d_{\text{eau}} = 1$. Les volumes V_{Base} et V_{eau} sont déterminés par la résolution du système suivant:

$$\begin{aligned} d_{\text{susp}} &= d_{\text{latex}} = 1,05, \\ V_{\text{Base}} + V_{\text{eau}} &= 988 \mu\text{l}, \end{aligned}$$

soit $V_{\text{Base}}=800,5 \mu\text{l}$ et $V_{\text{eau}}=187,5 \mu\text{l}$.

Les suspensions de latex nous ont permis de mettre au point les techniques expérimentales et d’acquérir le savoir faire nécessaire au bon déroulement des expériences. L’utilisation de ces solutions en isodensité nous a permis de véritablement améliorer le protocole. En effet, les particules de latex ne sédimentant quasiment plus, les problèmes de bouchons liés à ce phénomène ont disparu et nous avons pu effectuer des expériences plus longues.

4.2.2 Suspensions de globules rouges

Les suspensions de globules rouges sont préparées au laboratoire, à partir d’échantillons (50 μl) de sang prélevés sur des volontaires sains. Ces prélèvements sont effectués à l’extrémité du doigt avec un auto-piqueur identique à ceux utilisés par les diabétiques. Pour la préparation des suspensions de globules rouges on utilise les milieux suivants, couramment utilisés en hématologie : le PBS, pour Phosphate Buffured Saline (9 mM de Na_2HPO_4 , 1.3 mM de NaH_2PO_4 , 140 mM de NaCl) et le GASP, pour Glucose Albumine Sodium Phosphate (PBS + 5,5 mM de glucose + 0,4 g/ml d’albumine de sérum bovin (BSA)). Le sang au contact de l’air commence à coaguler, c’est pourquoi il est dilué, immédiatement après prélèvement, dans une solution formée de PBS auquel on ajoute un anticoagulant à 1.5mg/ml. Cet anticoagulant est l’EDTA (acide éthylènediaminotétracétique sel disodique). Les globules rouges sont ensuite séparés de la suspension ainsi obtenue par centrifugation (1400 g pendant 6 minutes) puis remis en suspension dans une solution de “GASP”. L’étape de rinçage des globules rouges est répétée 3 fois, puis l’on prépare les solutions avec le taux d’hématocrite voulu, par dilution d’un volume connu de globules rouges dans un volume connu de GASP, avant de les stocker (4°C) pour une durée maximale de 48 heures avant utilisation.

Le prélèvement et la préparation des solutions est une étape délicate puisqu’une mauvaise préparation de ces solutions peut entraîner un changement de morphologie important des globules rouges qui sont très sensibles au phénomène d’osmose.

Ce phénomène tend à rétablir l’équilibre de la concentration en sels des deux côtés de la membrane des globules. En effet, cette membrane est perméable à l’eau mais ne permet pas le passage des sels. Par conséquent, si le déséquilibre est trop grand, les globules rouges se gonflent ou se flétrissent. Par exemple, sur la photo 4.2 (en haut) prise lors des premières expériences, on remarque que certains globules sont “gonflés” et forment des calottes hémisphériques. En effet lors des premières expériences, le liquide utilisé pour remplir le canal était de concentration légèrement plus faible en sel que celui dans lequel les globules rouges étaient suspendus. Le phénomène d’osmose a donc conduit aux gonflement des globules rouges. Inversement en bas, on peut observer des échinocytes (globule rouges flétris).

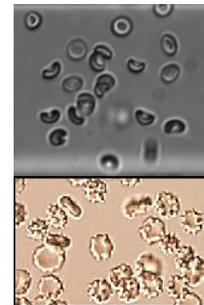


FIG. 4.2 – *Globules rouges, flétris (en bas) ou sous la forme de calotes hémisphériques (en haut)*

4.3 Visualisations : microscope et caméra CCD

Le système d'acquisition utilisé est composé d'un microscope Leica (DMRXA2) équipé de deux objectifs ($\times 10$ et $\times 20$) à longue distance de travail sur lequel est montée une caméra CCD (PCO Sensicam, avec un capteur de 1280×1024 pixels et un encodage du niveau de gris sur 12 bits). La fréquence d'acquisition est contrôlée par un générateur de signal. Pour les expériences réalisées avec la Sensicam, la fréquence maximale est de 20 Hz et la résolution spatiale avec l'objectif $\times 20$ est d'environ 3 pixels par micromètre. Pour certaines expériences, afin de pouvoir obtenir une fréquence d'acquisition de 200 Hz, nous avons utilisé une caméra rapide (PCO 1200HS) équipée d'un capteur de 1280×1024 pixels et délivrant un niveau de gris encodé sur 10 bits.



FIG. 4.3 – *Microscope Leica (DMRXA2)*

Chapitre 5

Résultats et discussion

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord le protocole retenu pour réaliser un écoulement d'une suspension de globules rouges dans des micro-bifurcations (§5.1). Puis, nous détaillerons la mise en œuvre dans notre cas expérimental des techniques de mesures présentées précédemment, ainsi que les résultats obtenus (§5.2).

5.1 Ecoulements de globules rouges

5.1.1 Protocole retenu pour les globules rouges

Comme nous l'avons déjà évoqué dans ce rapport, la mise en oeuvre des expériences avec les globules rouges demande un certain savoir faire. A près de nombreux essais, le protocole suivant, qui permet d'obtenir une répétitivité satisfaisante, a été mis au point :

1. nettoyage du PDMS avec du ruban adhésif,
2. mise en place de part et d'autre des deux plaques de Plexiglas,
3. remplissage avec la solution de GASP de la seringue, du tube et du canal. Ce remplissage permet de tapisser les parois avec la BSA et donc d'éviter que les globules rouges ne s'y collent par la suite.
4. collage de la connectique d'alimentation avec de la colle de type Néoprène,
5. injection à débit modéré ($1 \mu\text{L}/\text{min}$) du liquide dans le canal (pompe en mode injection),
6. arrêt de la pompe et de l'écoulement dans le canal,
7. mise en place du réservoir qui devra accueillir ultérieurement les globules rouges puis collage de celui-ci,
8. reprise de l'écoulement dans le canal, toujours en mode injection,
9. attente suffisante pour que le liquide envahisse bien les canaux (typiquement 10 à 15 min),
10. arrêt de la pompe,
11. aspiration avec une seringue du contenu du réservoir puis mise en place de la solution de globules rouges. Une grande précaution est prise pour ne pas introduire de bulle d'air,

12. passage de la pompe en mode aspiration, avec un débit plus faible (compris entre 0,05 et 0,005 $\mu\text{L}/\text{min}$),
13. début de l'aspiration et de l'observation des globules rouges dans le canal.
14. en fin d'expérience, nettoyage du canal en remplaçant la solution de globules rouges par du GASP puis par de l'eau.

Le fait de remplir au préalable l'ensemble avec du GASP permet de s'affranchir de l'utilisation de volumes importants de globules rouges. La plupart des expériences ont été effectuées sur des canaux droits ($100 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$). Cependant pour l'utilisation sur des bifurcations, le protocole ne change pas puisqu'on utilise deux seringues connectées aux branches filles et fonctionnant en aspiration.

5.1.2 Visualisations

Comme nous le montrent les images suivantes (voir figure 5.1), les globules rouges utilisés lors de nos expériences ont bien une forme biconcave typique de celle de globules rouges en bonne santé. Pour la gamme de débit utilisé, nous n'avons pas constaté d'adhérence des globules au niveau des parois ni d'écoulement en rouleaux (se dit lorsque les globules s'écoulent en file indienne agrégés les uns derrière les autres). Ceci peut s'expliquer par une concentration en protéine plus faible dans la suspension utilisée que dans les écoulements *in vivo*. Remarquons aussi que l'objectif utilisé pour l'acquisition des images permet une mise au point simultanée sur l'ensemble des globules quelle que soit leur position z dans le canal (voir figure 5.1a).

Sur le dispositif expérimental utilisé pour nos expériences, le débit est en principe imposé par la pompe. Or, il semble que la régularité du débit, pour différentes raisons, ne soit pas suffisante pour se passer de son évaluation. En effet, pour une consigne de débit fixe nous avons pu observer de façon visuelle de fortes fluctuations du débit, ce qui nous a amené à changer certains éléments du dispositif. Suite aux modifications et à l'amélioration du protocole, ces fluctuations visibles à l'oeil nu ont disparu. Mais, comme nous le verrons par la suite, la mesure du débit au cours du temps nous a montré que de faibles fluctuations subsistent malgré les améliorations apportées au dispositif. C'est pourquoi il est nécessaire de mesurer le débit.

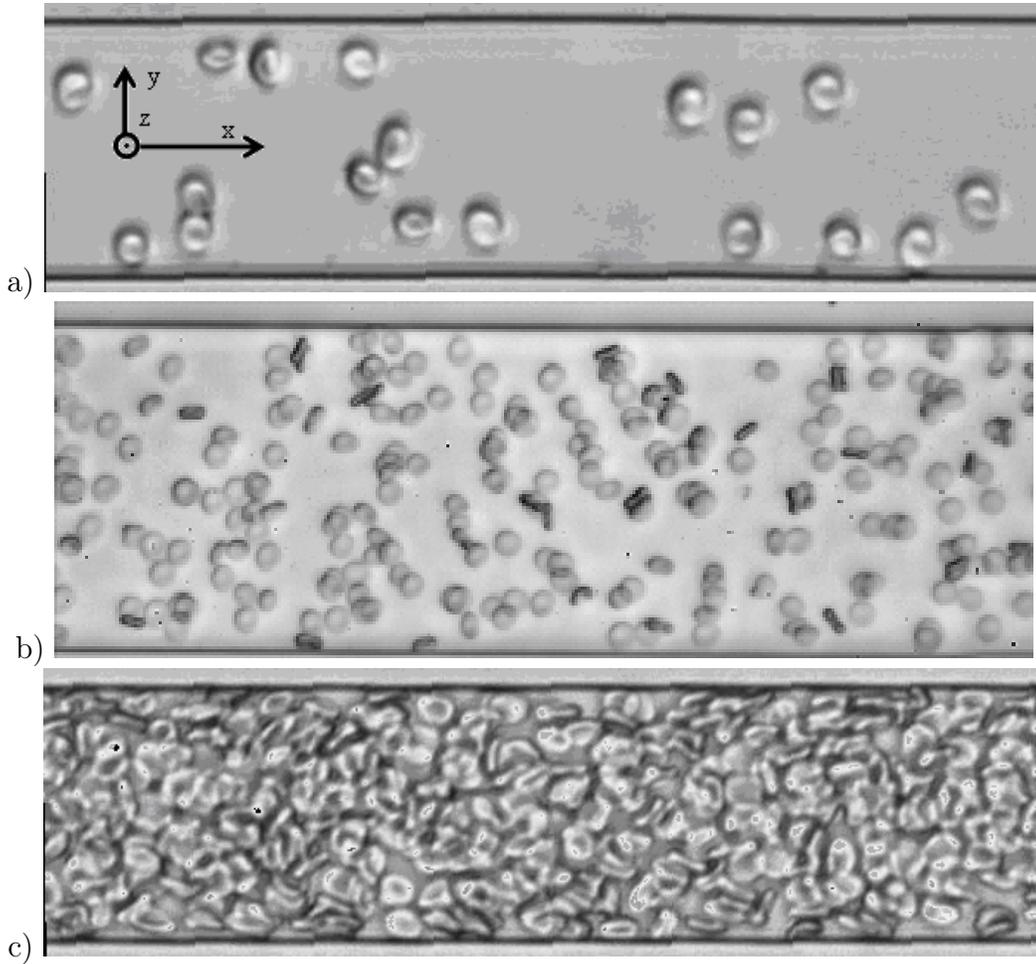


FIG. 5.1 – Images d'écoulements de globules rouges à différentes concentrations. a) Ecoulement dilué (1 % v/v) dans un canal de $10 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$. Objectif utilisé: $\times 20$. b) Ecoulement semi-dilué (10 % v/v) dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. Objectif utilisé: $\times 10$. c) Ecoulement à forte concentration (40 % v/v) dans un canal de $10 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$. Objectif utilisé: $\times 10$.

5.2 Mesure et stabilité du débit

Comme nous l'avons souligné dans les paragraphes précédents, la mesure *in situ* du débit du sang est délicate, en particulier dans les régimes qui nous intéressent (petits canaux et forte concentration). Cependant, la DualSlit devrait être en mesure de fournir des résultats valables concernant le contrôle de l'écoulement, en donnant des indications sur la stabilité temporelle du débit et l'évaluation de ce dernier à partir des connaissances du profil de vitesse et de la répartition spatiale des globules rouges.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer cette technique pour un cas spécifique où le profil de vitesse de l'écoulement est connu. Nous avons donc utilisé des suspensions de latex de faible concentration en isodensité. En effet, pour de telles concentrations, le profil de vitesses de l'écoulement n'est pas perturbé par la

présence des particules. De plus, pour la gamme de débits utilisés, le nombre de Reynolds est inférieur à 10^{-2} , ce qui nous permet d'utiliser les résultats théoriques de Patzek & Silin 2001 [6], qui donnent le champ de vitesse dans des canaux rectangulaires, à nombre de Reynolds nul. Par ailleurs, notons que le nombre de Reynolds particulaire est également d'ordre 10^{-2} .

Dans les paragraphes suivants, nous déterminerons le profil de vitesse et le débit en utilisant dans premier temps la PTV. Puis, nous comparerons les résultats de la PTV avec ceux de la DualSlit, dans les mêmes conditions expérimentales. Enfin, une comparaison succincte entre les résultats de la DualSlit et de la PIV sera présentée

5.2.1 Particle Tracking Velocimetry

Les suspensions de latex observées s'écoulent dans des micro-canaux de dimension trop petite pour envisager une étude de l'écoulement par tranches optiques dans la profondeur, comme cela est fait en micro-PTV. En effet, la profondeur de champs des objectifs équipant le microscope est du même ordre de grandeur que la profondeur de nos canaux. Par conséquent, toutes les particules en suspension s'écoulant dans le canal apparaissent nettes sur l'image.

Mise en œuvre de la technique

Pour fiabiliser le processus d'appariement des particules, nous avons effectué des enregistrements de séquences de triplets d'images (voir figure 5.2). Ainsi, pour chaque triplet, on trouve un ensemble de particules à trois positions différentes. Pour éviter de travailler sur les mêmes particules et afin d'avoir des résultats statistiques les plus représentatifs possibles, l'intervalle de temps entre chaque triplet d'images est suffisant pour permettre aux particules de sortir du champ d'acquisition. Typiquement, la fréquence d'acquisition des images est de 18 Hz et l'intervalle qui sépare deux triplets est compris entre 1 et 10 secondes, selon le débit imposé. La gamme de débits observés s'étend de $0,005 \mu\text{l}/\text{min}$ à $0,01 \mu\text{l}/\text{min}$. Le rôle de l'algorithme que nous avons mis au point est principalement de localiser les particules sur chacune des trois images du triplet puis de les identifier afin de retrouver le déplacement de chaque particule. L'appariement des particules est relativement simple dans notre cas, car l'écoulement est laminaire. Les particules s'écoulent donc parallèlement à l'axe du canal. Pour effectuer cet appariement, la position du centre de masse d'une particule de la seconde image d'un triplet est comparée avec celle de tous les centres de masses des particules des deux autres images. Les particules sont appariées si leurs centres de masses respectifs sont alignés avec l'axe du canal et si la distance parcourue entre le premier et le second couple d'images est identique. L'algorithme développé pendant le stage permet un appariement de plus de 95 % des particules détectées sur un triplet donné (on obtient typiquement entre 10 et 200 valeurs de vitesse par triplet selon la concentration de la suspension de latex, voir figure 5.2). On obtient ainsi un champ de vecteurs vitesses instantanées, avec un grand nombre de réalisations. C'est pourquoi un traitement statistique de ce champ est envisagé. La largeur du canal est "découpée" en tranche suivant la direction y , voir figure 5.1a, et tous les vecteurs vitesses présents dans

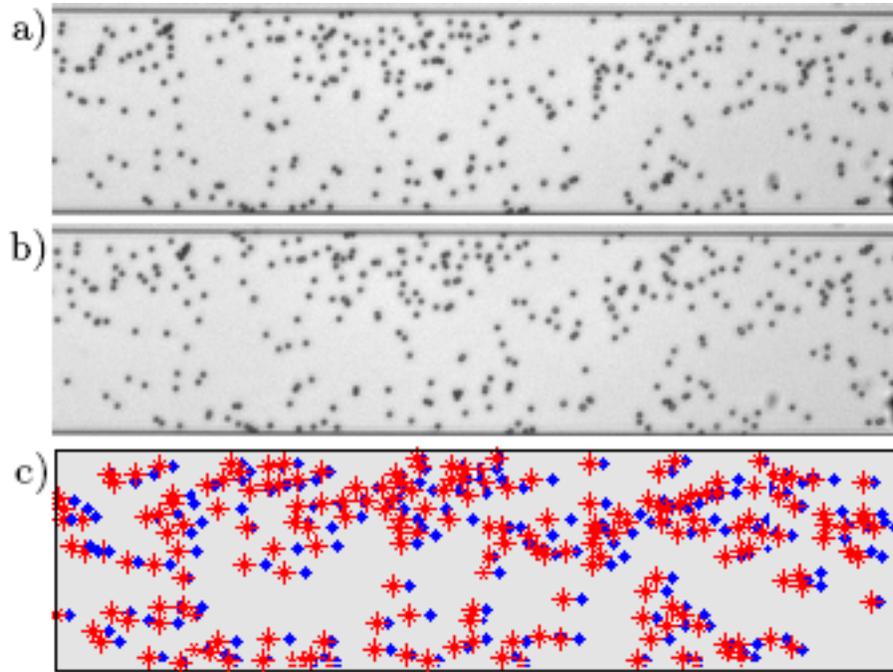


FIG. 5.2 – Images et résultat de l'appariement des particules sur un écoulement de suspension semi-diluée de latex, avec un débit de $0.005 \mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. a): Première image du triplet analysé. b) Troisième image de ce triplet. c) Résultat de l'appariement: en rouge (*) les particules appareillées de la première image avec celles en bleu (◇) de la troisième.

une tranche donnée sont considérés. Pour chaque tranche, on calcule la vitesse moyenne ainsi que la vitesse maximale (définie comme étant la valeur médiane des 10 plus grandes vitesses de la tranche considérée). On obtient ainsi des profils de vitesses moyennes et maximales, voir figure 5.3, que l'on peut comparer avec les profils théoriques correspondants.

Il est à noter que à proximité des parois, il y a une zone d'exclusion dont on devra tenir compte lors de la comparaison des résultats avec les profils théoriques. Cette zone d'exclusion, d'origine stérique, provient de la taille finie des billes de latex. Pour quantifier précisément cette zone d'exclusion, nous aurions pu utiliser la fonction de densité de probabilité des vitesses des particules. Nous avons fait ici l'hypothèse que la zone d'exclusion a une épaisseur de 1 microns, le rayon des particules de latex.

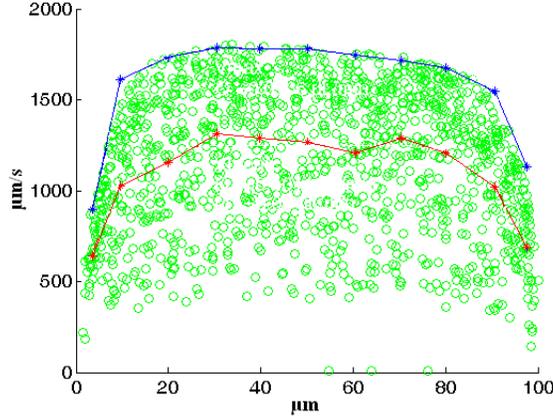


FIG. 5.3 – Analyse PTV pour une suspension de latex de concentration 0,05 % v/v, s’écoulant avec un débit de consigne de 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. En vert, chaque point donne la norme du vecteur vitesse d’une particule, en fonction de sa position dans le canal. La largeur du canal est “découpée” en tranches de $10 \mu\text{m}$ de large, pour chaque tranche, on calcule la vitesse moyenne ainsi que la vitesse maximale. Les profils de vitesses obtenus sont tracés en rouge pour le profil moyen, en bleu pour le profil des vitesses maximales.

Interprétation des résultats obtenus

D’après Patzek and Silin 2001 [6], pour un nombre de Reynolds nul, le profil de vitesse, dans un canal à section rectangulaire de dimension $2a \times 2b$, est donné par :

$$u(y,z) = \frac{Q}{32a^2b^2\tilde{g}} \left(b^2 - z^2 + \frac{32b^2}{\pi^3} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^{(n+1)} \cosh(\frac{1}{2b}(2n+1)\pi y) \cos(\frac{1}{2b}(2n+1)\pi z)}{(2n+1)^3 \cosh(\frac{1}{2b}(2n+1)\pi a)} \right) \quad (5.1)$$

où \tilde{g} est un facteur géométrique fonction de a/b . Le repère utilisé est celui indiqué sur la figure 5.1, l’écoulement se faisant suivant l’axe x .

Comme la PTV n’est pas capable de distinguer la position des particules dans l’épaisseur (axe z), nous comparerons le profil obtenu expérimentalement au profil de vitesse maximale, $u(y,z=0)$:

$$u(y,0) = \frac{Q}{32a^2b^2\tilde{g}} \left(b^2 + \frac{32b^2}{\pi^3} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^{(n+1)} \cosh(\frac{1}{2b}(2n+1)\pi y)}{(2n+1)^3 \cosh(\frac{1}{2b}(2n+1)\pi a)} \right), \quad (5.2)$$

ou bien au profil de vitesse théorique moyenné dans l’épaisseur, $u_e(y)$:

$$u_e(y) = \frac{1}{2b} \int_{-b+e}^{b-e} u(y,z) dz \quad (5.3)$$

où e est l'extension de la zone d'exclusion. Notons que le profil de vitesse maximale ne fait pas intervenir e . Les équations ci-dessus peuvent s'écrire :

$$V = Q \cdot \text{Fct}(y),$$

où la fonction Fct peut être calculée en utilisant le logiciel Maple. Différentes expressions de $\text{Fct}(y)$ peuvent être obtenues, selon que l'on considère le profil de vitesses maximales (éq 5.2) ou le profil de vitesses moyennes, une fois la valeur de e fixée (éq 5.3).

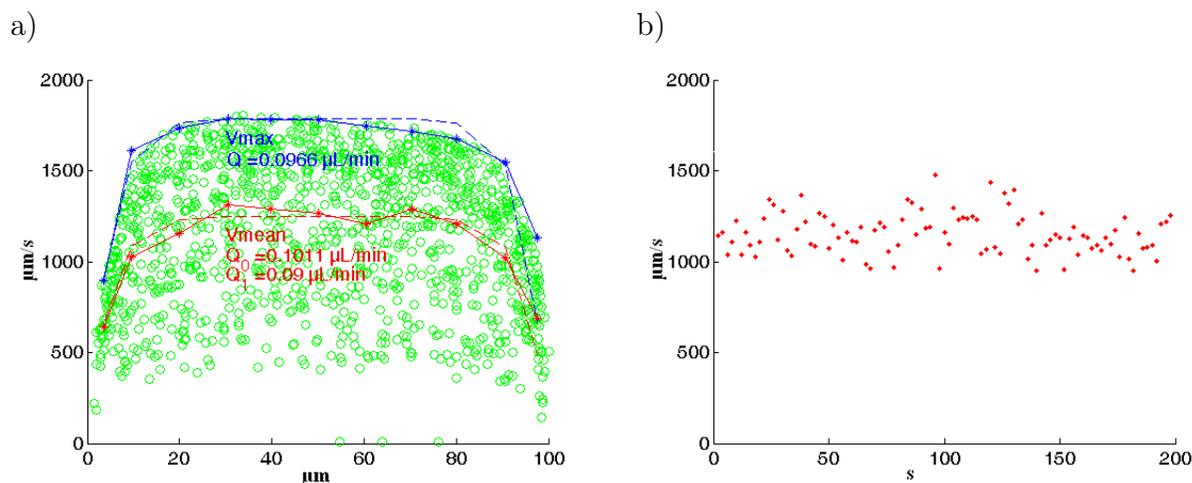


FIG. 5.4 – Analyse PTV pour une suspension de latex de concentration 0,05 % v/v, s'écoulant dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ avec un débit de consigne de $0,1 \mu\text{L}/\text{min}$. a) En vert, chaque point donne la norme du vecteur vitesse d'une particule, en fonction de sa position dans le canal. La gamme importante de valeurs de vitesses obtenues pour une position y donnée provient du fait que, comme les particules sont réparties de façon homogène sur la hauteur z du canal, des particules de vitesses différentes sont détectées à cette position. En trait rouge continu, le profil moyen de vitesse défini par les moyennes de chaque tranche de $10 \mu\text{m}$ effectuées dans la largeur y . En trait rouge discontinu, le profil théorique moyen "fité" pour les débits suivants : Q_0 , le débit obtenu lorsqu'on ne considère pas de zone d'exclusion des particules et Q_1 le débit obtenu pour une zone d'exclusion égale à un rayon de particule. En trait bleu continu, le profil des vitesses maximales obtenu en prenant pour chaque tranche la médiane des 10 plus grandes valeurs. Et en trait bleu discontinu, le profil théorique des vitesses maximales, voir éq. 5.2, "fité" pour le débit Q . b) Evolution temporelle des vitesses moyennes évaluées pour chaque triplet (typiquement la moyenne de la vitesse est effectuée sur 15 valeurs).

On peut ensuite utiliser le logiciel Matlab pour déterminer la valeur du débit Q pour laquelle les données expérimentales "fitent" au mieux les profils théoriques. Notons que si l'on utilise l'expression du profil de vitesses moyennes avec une valeur nulle pour e , on s'attend à trouver une valeur du débit Q_0 qui surestime la valeur réelle du débit (en effet, Fct est une fonction croissante avec e). La valeur ajustée du débit lorsque l'on considère une zone d'exclusion de $1 \mu\text{m}$ est notée Q_1 . Si l'on utilise l'expression du profil de vitesses

maximales, on s'attend à minimiser le débit obtenu, noté alors Q , car, vu la procédure de traitement des données choisie, la vitesse maximale estimée ne peut être qu'inférieure à la vitesse maximale réelle.

Un résultat typique de ces ajustement entre profils expérimentaux et théoriques est montré sur la figure 5.4a. Dans ce cas, les débits obtenus sont proches du débit de consigne, avec $Q < Q_{consigne} < Q_0$ comme attendu. Par ailleurs, on a tracé en figure 5.4b l'évolution au cours du temps de la vitesse moyenne, calculée pour chaque triplet (en considérant, l'ensemble des vecteurs vitesses, quelles que soient leurs positions y). Cette vitesse moyenne est stable, ce qui tend à montrer que le débit imposé ne fluctue pas.

Série:	Latex1	Latex3	Latex5	Latex7
Consigne de débit:	0.005	0.007	0.01	0.005
Q	0.0061	0.064	0.0090	0.0034
Q_0	0.0058	0.0082	0.0097	0.0049
Q_1	0.0051	0.0073	0.0086	0.0044

TAB. 5.1 – Débits de consigne et débits obtenus par PTV pour les quatres expériences servant à comparer la PTV à la DualSlit.

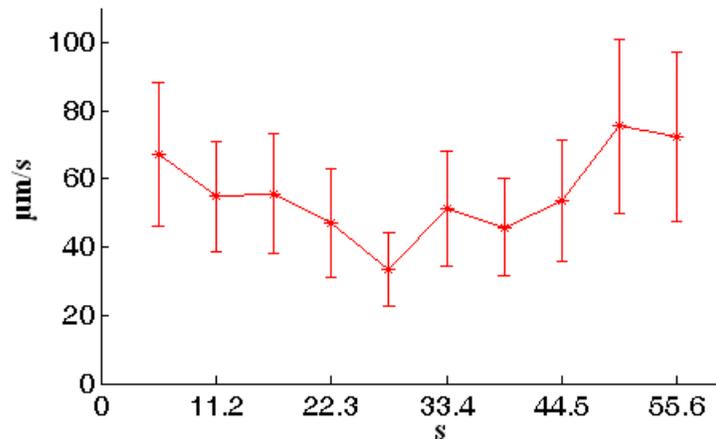


FIG. 5.5 – Série latex7: Variations de la vitesse moyenne (en rouge) au cours du temps et écarts types pour une suspension de latex de concentration 0,5 % v/v, s'écoulant avec un débit de consigne de 0,005 µl/min dans un canal de 15 µm × 100 µm.

Cette démarche a été réalisée sur plusieurs séries d'expériences, notamment celles permettant d'effectuer également des mesures par la technique de DualSlit. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.1. Dans tous les cas, les débits estimés par les différentes méthodes sont du même ordre de grandeur que le débit imposé. Cependant, la relation $Q < Q_{consigne} < Q_0$ n'est pas toujours vérifiée, probablement à cause de fluctuations du débit, mise en évidence dans certaines expériences par les variations de la vitesse moyenne, voir figure 5.5.

En conclusion, l'utilisation de la PTV permet de déterminer expérimentalement le débit imposé par la pompe, lorsque celui-ci est stable. La PTV, mise en œuvre avec des

particules de latex, constitue donc une méthode de référence pour l'évaluation du débit, qui peut permettre de valider d'autres techniques expérimentales.

5.2.2 DualSlit

Mise en œuvre

Comme nous l'avons déjà dit, nous souhaitons comparer les résultats obtenus par PTV à ceux obtenus avec une technique de DualSlit, afin de valider cette dernière. Nous pensons en effet que cette méthode sera la seule à même de fournir des résultats pour des suspensions concentrées en globules rouges. Certaines séquences d'images utilisées pour la PTV ont donc été traitées par une technique de DualSlit.

Les signaux à corrélérer temporellement sont les variations temporelles du niveau de gris moyen sur 2 régions d'intérêt de l'image (un exemple de deux signaux enregistrés est présenté sur la figure 5.6). L'avantage du traitement d'images est qu'il permet de faire varier facilement les nombreux paramètres intervenant dans la DualSlit, afin d'obtenir un coefficient de corrélation le meilleur possible. Ces paramètres sont notamment la taille et la distance entre les 2 régions d'intérêt dont on recueille le signal, et la durée de la séquence sélectionnée. Après de nombreux essais, nous avons finalement opté pour des boîtes de 20×35 pixels², espacées de 50 pixels. Les séquences traitées sont suffisamment longues pour permettre la convergence de la valeur du décalage temporel Γ entre les deux signaux, pour lequel la corrélation est maximale. Afin d'obtenir un profil de vitesse fonction de la position y dans le canal, l'algorithme déplace les deux zones d'intérêt sur toute la largeur de celui-ci. Ce décalage pixel par pixel permet une bonne résolution spatiale, et reste raisonnable en temps de calcul.

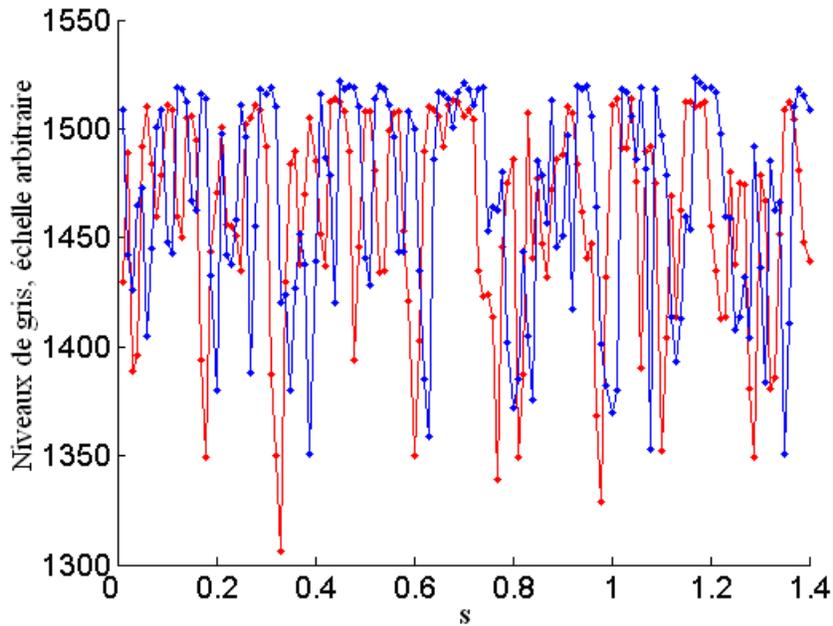


FIG. 5.6 – Exemple de signaux enregistrés au niveau de deux régions d’intérêt, traités par une technique de type DualSlit pour la suspension de latex concentration 0,05 % v/v, s’écoulant avec un débit de consigne de 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. En rouge le signal temporel enregistré par la première zone de corrélation et en bleu celui enregistré par la seconde.

Résultats

Nous avons pu ainsi comparer le profil de vitesse déterminé par la DualSlit et celui obtenu par PTV. Un résultat typique est présenté sur la figure 5.7. Qualitativement, les deux profils sont semblables.

Le profil expérimental obtenu par intercorrélation a été “fité” par la valeur du débit, en faisant l’hypothèse de la validité de l’équation 3.1 et qu’il n’y a pas de couches d’exclusion au niveau des parois (ce qui devrait aboutir à une surestimation de ce débit). Le débit ainsi obtenu (0,0088 $\mu\text{l}/\text{min}$), bien que légèrement inférieur, est du même ordre de grandeur que les débits Q et Q_0 mesurés par PTV pour la même séquence d’image (0,0090 et 0,0097 $\mu\text{l}/\text{min}$) et le débit de consigne (0,01 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Ainsi, il semblerait que la DualSlit, malgré les incertitudes quant à la vitesse qui est réellement mesurée par cette technique, voir §3.5.2, est à même de fournir des informations “physiques” pouvant caractériser l’écoulement puisque l’on retrouve une similitude avec les résultats de PTV, dont nous sommes “surs”.

Nous avons ensuite effectué d’autres expériences en utilisant des suspensions de globules rouges en forte concentration (jusqu’à 20 % v/v). Pour ces régimes, on peut à juste titre questionner la pertinence de l’utilisation de la DualSLit : premièrement parce que le processus de moyennage des vitesses dans l’épaisseur du canal, qui est probablement

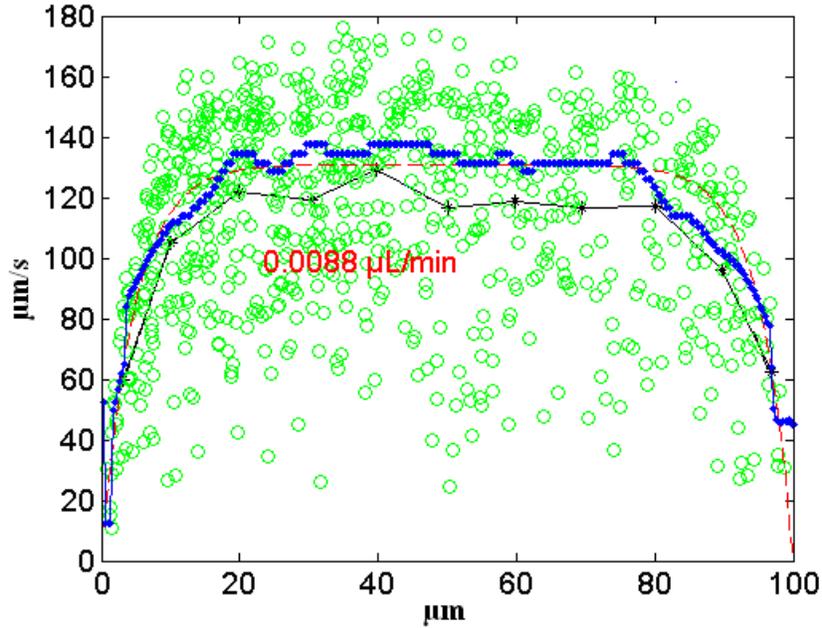


FIG. 5.7 – Comparaison des résultats de la DualSlit avec ceux de la PTV pour la suspension de latex concentration 0,5 % v/v, s’écoulant avec un débit de consigne de 0,01 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. En vert, chaque point donne la norme du vecteur vitesse d’une particule, en fonction de sa position dans le canal. En noir le profil moyen obtenu par PTV. En bleu, le profil de vitesse déterminé par la technique de DualSlit. Et trait rouge discontinu : le profil théorique “fité” pour un débit $Q = 0.0088 \mu\text{l}/\text{min}$.

imparfaitement décrit par l’équation 3.1, doit être important, en raison du fréquent recouvrement des globules rouges les uns par les autres dans les deux zones de corrélation. Deuxièmement parce que le profil de vitesse n’est pas connu, ce qui pose un problème pour relier la vitesse obtenue par intercorrélation au débit. Par contre, comme nous l’avons évoqué dans la bibliographie (§3.5), les autres méthodes de mesures classiques ne permettent pas d’étudier ce type de régime.

En particulier, pour une suspension d’hématocrite égale à 10%, la figure 5.8 (gauche) présente les deux signaux obtenus dans la première zone d’intérêt (en rouge) puis dans la seconde (en bleu). Il est possible de percevoir un décalage global de ces deux signaux. A droite, la courbe bleue donne le profil de vitesse V_{ds} déterminé par DualSlit. Nous avons ensuite fait l’hypothèse que le débit de consigne est fiable et stable. On peut donc tracer la vitesse moyenne dans le canal, définie comme étant le rapport du débit de consigne et de la section du canal (en rouge sur Fig :

En conclusion, ces résultats sont encourageants. En effet, les profils de vitesses obtenus par Dual Slit semblent contenir des informations physiques et une calibration de cette méthode en fonction du débit de consigne pourrait être envisagé dès que les problèmes de fluctuation du débit seront résolus.

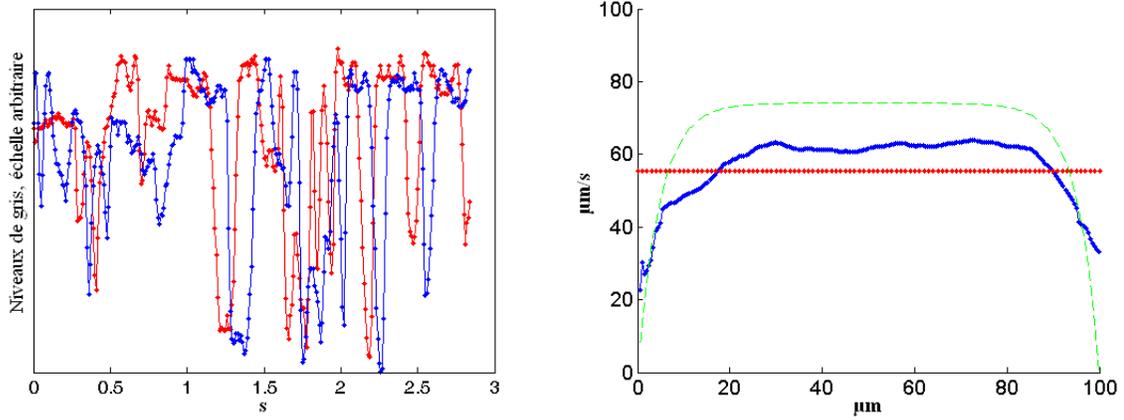


FIG. 5.8 – Résultat de DualSlit pour un écoulement d’une suspension de globules rouges de concentration $\tilde{10}\%$ v/v dans un canal de $15\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. A gauche: deux signaux obtenus dans la première zone d’intérêt (en rouge) puis dans la seconde (en bleu). A droite: la courbe bleue donne le profil de vitesse V_{ds} . La vitesse moyenne définie comme le rapport du débit par la section est en rouge, et en vert, on donne le profil de vitesse théorique moyenné sur l’épaisseur.

5.2.3 Comparaison succincte entre la PIV et la DualSlit.

Dans cette partie, nous présentons de manière succincte le résultat de mesures par PIV effectuées dans notre expérience. A forte concentration en globules rouges (pour des images types extraites des séquences traitées par PIV, voir la figure 5.1 b et c), il faut tout d’abord noter qu’un traitement d’images de type PIV va chercher des corrélations sur des “motifs” plutôt que sur des groupes de traceurs bien individualisés : on ne se trouve donc pas dans un domaine d’utilisation classique des algorithmes de PIV. Par ailleurs, le problème de la signification du champ de vitesse obtenu par PIV se pose également : mesure-t-on une vitesse moyennée dans l’épaisseur ou plutôt la vitesse des couches supérieures de globules, visibles sur l’image ? La PIV ne semble donc pas être une technique bien adaptée à notre cas expérimental. Néanmoins, nous l’avons testé rapidement sur quelques séquences d’images.

Pour traiter nos résultats, nous avons utilisé le logiciel PIVIS, développés à l’IMFT, en considérant une taille de boîte de corrélation de 16×16 pixels, ce qui correspond à peu près à la taille d’un globule rouge. Pour gagner en résolution spatiale, il est possible de définir une taille de “recouvrement des boîtes”. Nous avons choisi un recouvrement de 75 % ce qui donne un vecteur tous les quatre pixels. Une fois le champ bidimensionnel de vecteurs vitesses instantanées obtenu par PIVIS, nous calculons un profil de vitesse moyen, de manière analogue à celle utilisée pour le traitement par PTV (voir §5.2.1). La figure 5.9 donne tout d’abord le profil de vitesse obtenu par PIV pour une séquence typique, comparé à celui obtenu par DualSlit sur la même séquence. Le profil de vitesse obtenu par PIV donne des valeurs de vitesse légèrement inférieures à celles déterminées par la DualSlit (en bleu) et à la vitesse moyenne (en rouge), définie comme le rapport du débit de consigne sur la section du canal. Ainsi, la mesure par PIV permet d’obtenir des ordres de grandeur corrects. On peut penser que les globules rouges situés dans la partie

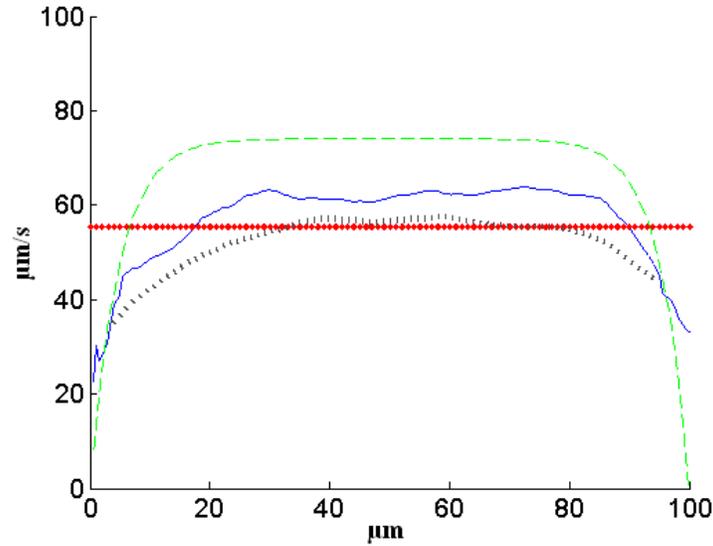


FIG. 5.9 – Résultats de la PIV. Sur ce graphique on a : en trait bleu continu, le profil de vitesse obtenu par DualSlit. En gris, le profil obtenu par PIV. En trait vert interrompu, le profil théorique calculé pour le débit de consigne. Et en rouge, la vitesse moyenne définie comme étant le rapport du débit par la section du canal.

supérieure du canal, moins rapides car proches de la paroi, sont ceux qui contribuent optiquement aux motifs détectés par PIV, ce qui expliquerait que la PIV sous-estime les vitesses.

En conclusion, à l'instar de la DualSlit, même si la PIV permet d'obtenir des profils de vitesse à l'allure correcte, et du bon ordre de grandeur, un problème d'interprétation des résultats subsiste. Cependant, on pense à l'avenir plutôt axer nos efforts sur la technique de DualSlit pour laquelle la modélisation du signal semble plus accessible.

Chapitre 6

Conclusion

Dans ce rapport, nous avons présenté un dispositif expérimental permettant d'étudier l'effet de séparation de phase *in vitro*, à l'aide de réseaux de micro-canaux modélisant les bifurcations microvasculaires et de suspensions de globules rouges à hématocrite contrôlé. A notre connaissance, grâce à l'utilisation de plusieurs photomasques utilisés successivement lors de sa fabrication par lithographie molle, ce dispositif est le premier dispositif permettant d'observer l'écoulement de globules rouges dans des micro-bifurcations asymétriques composées de canaux carrés.

Afin de pouvoir interpréter quantitativement les observations effectuées grâce à ce dispositif, il est nécessaire de disposer de techniques de mesures *in situ*, fiables, du débit et de l'hématocrite. Dans les régimes pertinents pour l'étude de l'effet de séparation de phase (suspensions concentrées de globules rouges dans des canaux de la taille des vaisseaux capillaires ou légèrement plus larges), c'est un véritable défi. A partir des savoirs faire issus de la microfluidique et de la recherche en physiologie de la microcirculation, le développement, encore inachevé, de telles techniques, a été présenté.

Pour réussir à progresser sur la mesure des débits et de l'hématocrite, il est maintenant indispensable d'améliorer la procédure de contrôle du débit. En effet, pour l'instant, la validation des résultats obtenus expérimentalement par comparaison au débit imposé par la pompe est souvent impossible : si les variations de débit sont significatives, les mesures par PTV ou DualSlit sont faussées. Il est alors également impossible de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus et d'estimer les incertitudes de mesure. Un meilleur contrôle du débit passe par l'amélioration du dispositif expérimental. En particulier, il nous faudra éliminer les particules solides contaminantes qui bouchent les microcanaux au niveau de la transition entre les canaux de distribution, relativement larges, et les parties carrées de la bifurcation. Ces occlusions, lorsqu'elle ne bloquent pas totalement l'écoulement, le rendent intermittent parce que les globules rouges, extrêmement déformables, se glissent à travers le passage résiduel, en l'obstruant périodiquement. Une modification de l'architecture des micro-canaux pourrait être envisagée pour piéger ces contaminants en amont.

Bibliographie

- [1] Cassot F., Lauwers F., Fouard C., Prohaska S., and Lauwers-Cances V. 2006 A Novel Three-Dimensional Computer-Assisted Method for a Quantitative Study of Microvascular Networks of the Human Cerebral Cortex. *Microcirculation*, 13: 1-18
- [2] Goldsmith H. L., Skalak, R., 1975, Hemodynamics, *Annual review of fluid mechanics*, 7: 213-247.
- [3] Greg C. Randall & Patrick S. Doyle. 2005. Permeation-driven flow in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices, Edited by Daniel D Joseph, University of Minnesota, Minneapolis, MN, and approved June 18, 2005. (received for review April 21, 2005)
- [4] Lima R, Wada S, Tsubota K and Yamaguchi T. 2006 Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel, *Measurement science and technology*, 17: 787-808.
- [5] McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Wu H, Schueller OJ and Whitesides GM. 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis*, 21: 27-40.
- [6] Patzek TW and Silin DB. 2001. Shape factor and hydraulic conductance in noncircular capillaries I. One-phase creeping flow, *Journal of Colloid and Interface Science*, 236: 295-304.
- [7] Parthasarathi A.A., Japee S.A. and Pittman RN. 1999. Determination of red blood cell velocity by video shuttering and image analysis. *Annals of Biomedical Engineering*, 27: 313-325.
- [8] Pries AR, Kanzow G and Gaethgens P. 1983. Microphotometric determination of haematocrit in small vessels, *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 245: H167-H177.
- [9] Pries AR, Ley K, Claassen M and Gaehtgens P. 1989. Red cell distribution at microvascular bifurcations, *Microvascular Research*, 38: 81-101.
- [10] Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P and Gross JF. 1990. Blood flow in microvascular networks: experiments and simulation, *Circulation Research*, 67: 826-834.
- [11] Pries AR, Secomb TW and Gaehtgens P. 1996. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature, *Cardiovascular Research*, 32: 654-667.
- [12] Shevkoplyas SS, Gifford SC, Yoshida T and Bitensky MW. 2003. Prototype of an in vitro model of the microcirculation, *Microvascular Research*, 65: 132-136.
- [13] Sourice A., Plantier G and Saumet JL. 2005. Red blood cell velocity estimation in microvessels using the spatiotemporal autocorrelation, *Measurement science and technology*, 16: 2229-2239.

- [14] Sugii Y, Okuda R, Okamoto K and Madarame H. 2005. Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro PIV technique, *Measurement science and technology*, 16: 1126-1130.
- [15] Verneuil E, Buguin A and Silberzan P. 2004. Permeation-induced flows: Consequences for silicone-based microfluidics, *Europhysics Letters*, 68: 412-418.
- [16] Wayland H and Johnson PC. 1967. Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *Journal of Applied Physiology*, 22: 333-337.

Annexe 1: Plan des micro-canaux et schéma des masques

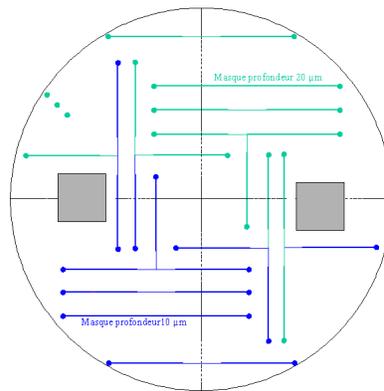


FIG. 6.1 – Plan général des micro-canaux utilisés. En foncé (bleu) les canaux de profondeur $10\ \mu\text{m}$ et en clair (vert) ceux de $15\ \mu\text{m}$ de profondeur.

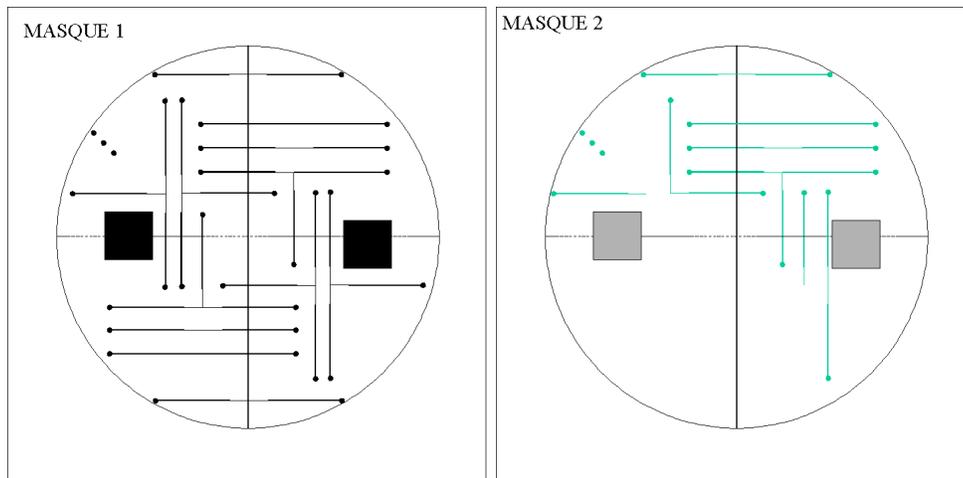


FIG. 6.2 – Les masques utilisés pour la lithographie molle. Comme nous avons deux profondeurs, $10\ \mu\text{m}$ et $15\ \mu\text{m}$ nous en avons utilisé deux.

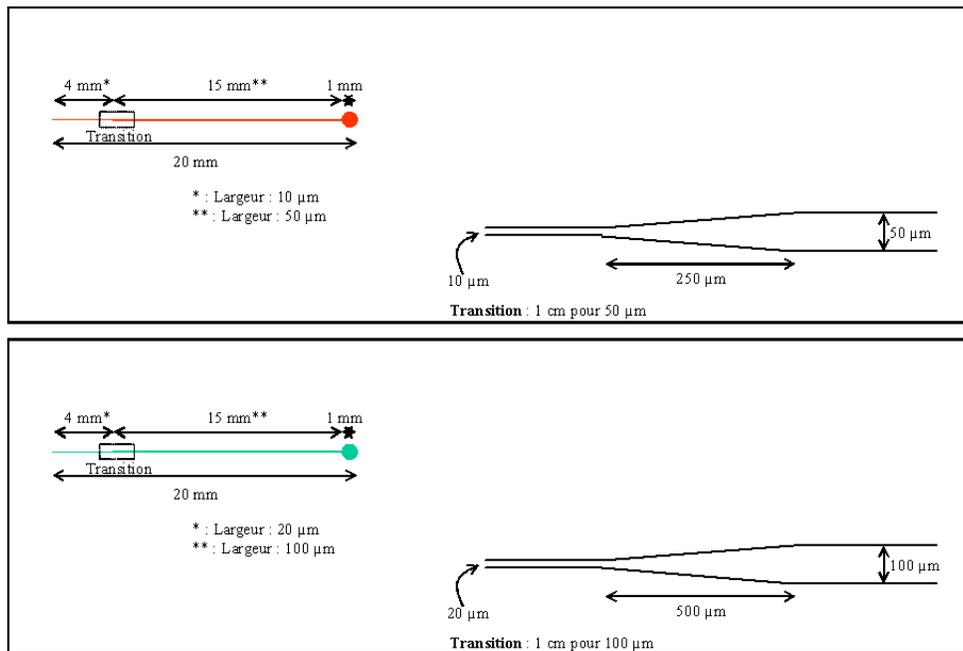


FIG. 6.3 – Détails des motifs de base: chaque branche des micro-bifurcations est reliée en amont (respectivement en aval) à un canal d'alimentation (respectivement de drainage) de largeur plus importante ($10 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ou $15 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$). Le schéma ci-dessus présente la manière dont sont raccordés ces canaux.

Annexe 2: DualSlit, modèle simplifié

Le modèle présenté dans cette annexe a pour objet d'étudier la relation entre la valeur de la vitesse mesurée par la technique de la DualSlit (V_{exp}) et la moyenne dynamique de la vitesse définie par l'équation 3.1 (V_{ds}). Pour cela, on considère une situation idéalisée où des trains de particules, uniformément espacées d'une distance d_i , transitent entre les deux capteurs utilisés en DualSlit à une vitesse V_i imposée. La fréquence de passage des particules devant chaque capteur est donc égale à $f_i = \frac{V_i}{d_i}$. On fait l'hypothèse que chaque train de particules module l'intensité lumineuse de façon à ce que les signaux $S1_i(t)$ et $S2_i(t)$ enregistrés par les deux capteurs soient :

$$S1_i(t) = \cos(\omega_i t) \text{ et } S2_i(t) = \cos(\omega_i t + \phi_i),$$

où $\omega_i = 2\pi f_i$ et $\frac{\phi_i}{\omega_i} = \frac{dl}{V_i}$ est le temps de transit des particules d'un capteur à l'autre (dl est la distance qui sépare les deux capteurs). Par conséquent, $\phi_i = 2\pi \frac{dl}{d_i}$.

Dans la suite, on considère plusieurs trains de particules circulant à des vitesses différentes et on suppose que ces trains modulent simultanément les signaux temporels, avec :

$$S1(t) = \sum_i S1_i(t) \text{ et } S2(t) = \sum_i S2_i(t).$$

La fonction de corrélation des deux signaux temporels est donnée par :

$$f(\tau) = \int_0^{T-\tau} s_1(t) \cdot s_2(t + \tau) dt,$$

avec T , la durée totale du signal.

Cette fonction est évaluée numériquement à l'aide du logiciel Matlab pour différentes valeurs des paramètres. La valeur de τ maximisant cette fonction, notée Γ , en est déduite. On obtient alors $V_{exp} = \frac{dl}{\Gamma}$.

Par ailleurs, dans ce modèle simplifié, on peut écrire la moyenne dynamique de la vitesse comme suit :

$$V_{ds} = \frac{\sum_i N_i V_i}{\sum_i N_i},$$

où N_i est le nombre de particules du train i passant devant chaque capteur pendant une durée ΔT , *i.e.* $N_i = f_i \Delta T$. Il vient :

$$V_{ds} = \frac{\sum_i \frac{V_i^2}{d_i}}{\sum_i \frac{V_i}{d_i}}.$$

Cette dernière équation peut être interprétée comme une version discrète de l'équation 3.1.

Dans la suite, deux cas sont étudiés. Dans le premier cas, la distance de séparation entre les particules, notée d , est indépendante du train considéré. On note alors que le déphasage est lui aussi indépendant du train considéré. Dans le second, pour tenter de modéliser l'effet Fahraeus, la distance de séparation est proportionnelle à la vitesse du train $d_i = kV_i$. La pulsation est alors indépendante du train considéré. Avec ces hypothèses, on note que, dans le premier cas :

$$V_{ds} = \frac{\sum_i V_i^2}{\sum_i V_i},$$

alors que dans le second :

$$V_{ds} = \langle V_i \rangle .$$

Les tableaux suivants présentent les résultats obtenus pour différentes combinaisons des paramètres :

Cas 1 :

V_1 mm/s	V_2 mm/s	V_3 mm/s	Δ mm	d mm	ω_1 rad/s	ω_2 rad/s	ω_3 rad/s	φ rad	Γ s	V_{exp} mm/s	V_{ds} mm/s
1.9	-	-	1	6	1.989	-	-	1.047	0.5215	1.9175	1.9
-	3.8	-	1	6	-	3.979	-	1.047	0.2639	3.789	3.8
-	-	5.7	1	6	-	-	5.969	1.047	0.1791	5.58	5.7
1.9	3.8	-	1	6	1.989	3.979	-	1.047	0.3110	3.21	3.16
1.9	3.8	5.7	1	6	1.989	3.979	5.969	1.047	0.2231	4.48	4.43

Cas 2 :

V_1 mm/s	V_2 mm/s	V_3 mm/s	d_1 mm	d_2 mm	d_3 mm	φ_1 rad	φ_2 rad	φ_3 rad	ω rad/s	Γ s	V_{exp} mm/s	$\langle V \rangle$ mm/s
1,9	-	-	3,80	-	-	1,65	-	-	3,14	0,52	1,91	1,9
-	3,8	-	-	7,6	-	-	0,83	-	3,14	0,26	3,84	3,8
-	-	5,7	-	-	11,4	-	-	0,55	3,14	0,22	4,61	5,7
1,9	3,8	-	3,8	7,6	-	1,65	0,83	-	3,14	0,39	2,54	2,85
1,9	3,8	5,7	3,8	7,6	11,4	1,65	0,83	0,55	3,14	0,31	3,18	3,8

Dans les deux cas, les ordres de grandeur de V_{exp} et de V_{ds} sont comparables même si les valeurs numériques sont plus proches dans le premier cas.