HAL
open science

# Analyse de l'interaction laser-matière pour la bioimpression

Jerome Bouter

## To cite this version:

Jerome Bouter. Analyse de l'interaction laser-matière pour la bioimpression. Physique des plasmas [physics.plasm-ph]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0020 . tel-02915662

**HAL Id: tel-02915662**

**https://theses.hal.science/tel-02915662**

Submitted on 15 Aug 2020

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE $n$ °209
SPÉCIALITÉ SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEUR

Par Jérôme BOUTER

# Analyse de l'interaction laser-matière pour la bioimpression

Sous la direction de
**Eric CORMIER, Professeur des Universités (CELIA - UMR 5107)**
Soutenue le 14 Février 2019

Membres du jury

**Président**
M. KELLAY Hamid, Professeur des Universités (LOMA / UMR 5798)
**Rapporteur**
M. DELAPORTE Philippe, Directeur de Recherche CNRS (LP3 / UMR 7341)
M. EGLES Christophe, (BMBI - UMR7338)
**Examinateur**
M. CORMIER Eric, Professeur des Univserités, directeur (CELIA / UMR 5107)
M. PETIT Stéphane, Ingénieur de Recherche CNRS, co-encadrant (CELIA / UMR 5107)
M. VIELLEROBE Bertrand, Directeur Technique, co-encadrant (POIETIS)

**Invité**
M. DE OLIVEIRA Hugo, Ingénieur de Recherche INSERM (BIOTIS - UMR 1026)

**Résumé**

Chaque année, le nombre de demandeur d'organe augmente en France comme dans le reste du monde. Pour combattre ce fléau, il existe aujourd'hui des technologies permettant d'imprimer du vivant, telle que la Bioimpression Assistée par Laser (LAB). Robuste et précise, cette méthode s'appuie sur les propriétés d'interaction laser-matière pour éjecter une bio-encre constituée de cellules vivantes. Pour éviter l'utilisation d'une couche absorbante sacrificielle, généralement utilisée, on focalise directement un faisceau laser dans la bioencre afin de générer un plasma puis une bulle de cavitation. La position de cette bulle est essentiellement maitrisée pas la longueur d'onde, et sa taille est gérée par l'énergie et la durée d'impulsion du laser. Ce sont les facteurs clés pour maîtriser l'éjection de matière biologique. Cependant, l'inhomogénéité locale apportée par les cellules perturbe l'impact du laser et donc la reproductibilité des jets, mais une fois imprimées, ces cellules sont viables et permettent de reconstruire des tissus vivants.

Mots clés : bioimpression, cellule, laser, claquage optique, plasma, cavitation, bulle, jet

**Laser-matter study for bioprinting**

Every year, the transplant waiting list gets bigger in France as in all over the world. To fight this curse, Bioprinting makes organ printing possible, especially with Laser Assisted Bioprinting (LAB). Robust and precise, this method use laser-matter interaction to eject a bioink made of living cells. To avoid the use of absorbing sacrificial layer, we directly focalize a laser beam into a living cells bioink, to create a plasma then a cavitation bubble. Its position, which is mainly driven by laser wavelength, and its size, managed by the energy and pulse duration, are the most important keys to control liquid jet ejection. However, the laser energy deposition and jet ejection is disturbed because of cells local concentration disparity, but when cells are printed, they are still viable and able to reconstruct living tissues.

Key words : bioprinting, cells, laser, optical breakdown, plasma, cavitation, bubble, jet

# Remerciements

Je voudrais remercier Monsieur Eric Cormier, directeur de thèse au CELIA et Professeur à l'Université de Bordeaux, qui m'a encadré durant toute la durée de cette thèse. Son savoir, ses connaissances et ses encouragements ont été un réel apport et soutien au fil des trois ans.

Je voudrais remercier Monsieur Bertrand Viellerobe, directeur technique de Poietis et co-encadrant de la thèse, pour nos multiples échanges scientifiques et techniques ainsi que sa disponibilité. Son soutien et sa confiance m'ont permis de donner le meilleur de moi-même dès le premier jour de notre collaboration.

Je voudrais remercier Monsieur Stéphane Petit, ingénieur chercheur du CELIA et co-encadrant de la thèse, pour sa disponibilité, son savoir et sa gentillesse. Travailler à ses côtés m'a permis d'aller au bout des réflexions et de me motiver à dépasser mes limites.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Philippe Delaporte, Directeur de Recherche CNRS au LP3 à Marseile, ainsi qu'à Monsieur Christophe Egles, Professeur des Universités au BMBI de l'UTC, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Je souhaite aussi remercier Monsieur Kellay Hamid, Professeur des Universités au LOMA, de l'honneur qu'il me fait d'être le président du jury, mais aussi de sa collaboration durant cette thèse et de son temps accordé.

J'exprime ma gratitude à Monsieur De Oliveira Hugo, ingénieur de recherche INSERM à BioTis, de sa présence en tant qu'invité à la soutenance de thèse.

Je souhaite aussi remercier Messieurs Fabien Guillemot et Bruno Brisson, fondateurs de Poietis, ainsi que Monsieur Eric Mevel directeur du CELIA, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer cette thèse au sein de leurs équipes.

J'en profite aussi pour remercier les stagiaires que j'ai pu encadrer et qui ont participé à ces travaux, avec dans l'ordre, Aude Clapies, Lou-Ana Deprey, Clément Goicoechea et Christie Rambier. Je remercie aussi Dan Soto, responsable du pôle développement technique de Poietis, pour son expertise, sa méthode et son soutien durant cette dernière année. Je remercie aussi Jean-Christophe Delagnes, ingénieur de recherche CNRS, pour ses conseils avisés et son aide durant la phase exploratrice au CELIA. Je remercie aussi Marine Salducci pour le temps passé à mes côtés en salle biologique, je n'oublie pas que c'est grâce à toi que cette thèse se termine avec un bel épiderme, donc mille mercis.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné et « supporté » tout au long de la thèse, notamment mes amis très proches, Aude, Catherine et Bastien. Désolé de vous avoir trop souvent parlé de cette rédaction, et encore merci pour votre présence au quotidien, je n'oublierai jamais ces belles années passées à vos côtés. Et je n'oublie pas Thomas, Steven, Yoann, Jonathan et Alice. L'aventure bordelaise n'a jamais été facile quand vos amis d'enfance sont loin,

merci à vous tous !

Je souhaite aussi remercier le couple phare, qui se reconnaîtra à travers ce surnom. Nos discussions et les bons moments passés ont tout autant contribué. Sans oublier Mister Garcia, avec des moments de partages musicaux inoubliables, je sais qu'au fond de toi, tu apprécies mon style. Marie, aussi une grande pensée pour toi, je te dois beaucoup, je sais que tu m'as toujours soutenu et je t'en remercie. Une très belle dédicace aux Poiechouilleurs des premières heures, avec el VDK, DJ Simon et Tuture. 3 ans qu'on est dans le même bateau, j'ai adoré travailler et chouiller avec vous. Vaness', je vais te manquer, je le sais, à toi de me remercier pour ma présence, j'attends toujours mon coussin d'ailleurs. Et puis, je n'oublie pas non plus toutes ces personnes que j'ai pu côtoyer et qui d'une manière ou d'une autre ont participé à la réalisation de ce travail, Guiche, Typh, Marion, Popo, Val, Mat', Marc, Romain, Yann, Victor, Audureau, Delphine, Laurence, Lydie, Kevin, Maël, et Jennifer. Merci à tous !

Enfin, je termine ces remerciements de la plus belle des manières, en écrivant ces quelques lignes à ma famille. Des remerciements seraient insuffisants tellement les sentiments sont forts. 8 ans que l'aventure a commencé après le BAC, 8 ans à vous demander quel sera mon avenir, je n'ose imaginer le stress de votre côté. Mais il est temps de fermer cette page, enfin ! Mon plus grand bonheur reste votre fierté, et j'espère qu'à travers ce parcours j'honorerai ce sentiment.

# Table des matières


**I Introduction** **6**

**1 La Bioimpression** **8**
1.1 La Bioextrusion - exemple d'une machine . . . . . 10
1.2 Impression par jet d'encre . . . . . 11
1.3 La Bioimpression assistée par laser . . . . . 12

**2 Enjeux de la thèse** **14**

**3 Matériel et Méthodes** **18**
3.1 La bioimprimante . . . . . 18
3.1.1 Impression par microvanne . . . . . 19
3.1.2 Impression par laser . . . . . 20
3.2 Systèmes d'imagerie . . . . . 22
3.2.1 Le TRI . . . . . 23
3.2.2 La caméra ultra-rapide . . . . . 24
3.3 Les montages d'expériences . . . . . 26
3.3.1 Le banc R&D Poietis . . . . . 27
3.3.2 Les chaînes lasers du CELIA . . . . . 30
3.4 Culture biologique et encres . . . . . 36
3.4.1 Culture primaire de fibroblastes . . . . . 36
3.4.2 Culture primaire de kératinocytes . . . . . 37
3.4.3 Préparation des encres . . . . . 38
3.4.4 Test du « Live-Dead » . . . . . 39

**II Génération et dynamique d'une bulle induite par laser** **40**

**1 Générer une bulle dans un liquide, par laser** **41**
1.1 L'interaction laser-matière . . . . . 41
1.1.1 Les niveaux d'énergies dans les matériaux . . . . . 42

1.1.2 Description qualitative du claquage optique dans l'eau . . . 43
1.2 Seuils de génération des bulles . . . . . 48
1.2.1 Impact de la durée d'impulsion . . . . . 49
1.2.2 Variation de la longueur d'onde . . . . . 54

**2 Comprendre et contrôler la dynamique d'une bulle 59**
2.1 La dynamique d'une bulle dans un liquide semi-infini . . . . . 59
2.2 Impact de l'énergie à différentes longueurs d'onde et durées d'impulsions . . . . . 62
2.2.1 Variation de la durée d'impulsion et de l'énergie . . . . . 62
2.2.2 Variation de l'ouverture numérique . . . . . 67
2.2.3 Variation de la longueur d'onde dans le régime femtoseconde 70
2.3 Comparaison entre l'eau et le milieu cellulaire . . . . . 73

**III Impression de liquide homogène : réalisation de motifs 2D 79**

**1 Déformation d'une surface libre, les prémisses d'un jet 80**
1.1 Comportement d'une bulle sous la surface . . . . . 81
1.2 Conditions de génération de jets . . . . . 87
1.3 Dynamique d'un jet - généralités . . . . . 90

**2 Contrôle et impression de motifs 2D 94**
2.1 Impact des paramètres lasers . . . . . 94
2.1.1 Variation de l'énergie et de la durée d'impulsion à 1030 nm . 94
2.1.2 Dynamique des jets à 2000 nm . . . . . 97
2.2 Reproductibilité des jets . . . . . 102
2.3 Ajout d'un receveur . . . . . 104
2.4 Impression de motifs . . . . . 106
2.4.1 Etalement et film mince . . . . . 108
2.4.2 Variation de l'énergie et du volume étalé . . . . . 111
2.4.3 Variation de la durée d'impulsion . . . . . 114
2.4.4 Méthode d'optimisation des impressions . . . . . 116

**IV Impression de liquide inhomogène : réalisation d'un modèle de peau 121**

**1 Impression de motifs 2D 122**
1.1 Une dynamique perturbée . . . . . 122
1.2 Impression de motifs cellulaire . . . . . 126

**2 Réalisation d'un modèle de peau** **130**
2.1 Anatomie de la peau . . . . . 130
2.2 Principe du modèle de peau . . . . . 131
2.3 Résultats : viabilité cellulaire . . . . . 134
2.4 Résultats : un modèle de peau . . . . . 136

# Première partie

# Introduction

Quel sera l'avenir de la médecine dans 10, 20 ou 50 ans ? Sera-t-il possible de diagnostiquer des maladies avant même la naissance de nos futurs enfants ou de soigner n'importe quelle maladie ? Ces questions n'ont encore de réponse que dans la science-fiction. Imaginez quelques instants cette machine, guidée par une intelligence artificielle, scanner l'ensemble de votre corps pour y déceler les moindres coupures, brûlures ou organes défectueux. Imaginez une lumière invisible ou tellement blanche qu'elle vous aveuglerait, vous régénérer en l'espace de quelques secondes... Vous êtes dans un futur, (pas si) lointain.

Revenons maintenant à la réalité. Aujourd'hui, le secteur de la santé est dans un nouvel élan, celui des nouvelles technologies et des outils du numérique. Les innovations sont de plus en plus nombreuses et révolutionnent la médecine telle que nous la connaissons avec l'utilisation des nanotechnologies, de l'e-santé, de la micro-électronique ou encore du « Big Data ». Néanmoins, que ce soit du diagnostic au soin apporté au patient, il reste des zones d'ombre et des limites technologiques nous empêchant de franchir une nouvelle étape dans le monde de la médecine.

Le coeur, le foie, les poumons ou même la peau, ces organes qui nous composent sont difficilement remplaçables voire irremplaçables. Est-ce qu'un médecin peut traiter son patient sans le mettre sur une liste d'attente d'organes ? Cette question parait beaucoup moins floue et impensable qu'il y a deux décennies. Cependant, malgré les avancées technologiques du $XX^{eme}$ siècle, nous sommes encore loin de pouvoir transplanter un organe conçu par une machine. En attendant, les listes d'attentes de greffons s'allongent avec les défauts que nous lui connaissons, à savoir, le système de priorisation, les rejets et le manque d'organes. En France, la pénurie fait rage avec 24 000 personnes sur liste d'attente. Grâce aux donneurs, 6 000 greffes ont été réalisées en 2017, chiffre en hausse chaque année, mais toujours insuffisant [1]. L'Etat français a mis en place début 2017, des mesures pour augmenter le nombre de donneurs (décret et modifications des limites d'âge), mais les besoins ne cessent de grandir. Ces besoins cliniques encouragent les chercheurs et entreprises de biotechnologies, à développer des outils capables de subvenir à ces nouveaux besoins. Un nouveau secteur d'activité est alors né, l'ingénierie tissulaire.

1. *Don d'organes : on est tous donneurs* - Publié le 26 juin 2018 par la Direction de l'information légale et administrative (Premier ministre)

# Chapitre 1

# La Bioimpression

L'ingénierie tissulaire est un secteur prometteur où l'ingénierie, la biologie et la science des matériaux se mêlent dans le but de développer des substituts biologiques capables de créer, remplacer et réparer les fonctions d'un tissu, d'un organe [1]. Le produit d'ingénierie tissulaire peut prendre différentes formes. On peut parler de cellules isolées comme par exemple, l'implantation de cellules dans le cartilage du genou que l'on retrouve souvent sous le nom de thérapie cellulaire. Mais l'ingénierie tissulaire c'est surtout la constitution d'un ensemble de cellules et d'un biomatériau. Dans ce cas, le principe est simple, des cellules sont prélevées du patient, mises en culture et amplifiées afin de créer une banque cellulaire. Elles sont ensuite mélangées à des biomatériaux contenant des actifs et autres facteurs de croissance, pouvant être activés à distance (chaleur, lumière, champ magnétique, etc.). Après croissance de cet organoïde dans les conditions qui lui sont favorables, il arrive à maturation pour une future greffe sur patient. Des résultats très encourageants ont déjà été réalisés pour des modèles de foie [2] et de peau [3][4][5].

Dans le monde de l'ingénierie tissulaire, plusieurs enjeux majeurs sont à surmonter pour pouvoir obtenir des organes. Le premier est d'avoir en sa possession une source capable de générer des cellules à la demande et non rejetées par le futur patient comme l'utilisation de cellules souches [6][7][8]. En restant dans le domaine biologique, un autre enjeu concerne celui de la viabilité des cellules lors du processus d'impression. D'un point de vue technologique, l'ingénierie tissulaire cherche aussi à automatiser le plus de procédures possible afin d'éviter les opérations manuelles tout en gagnant en reproductibilité et complexité. Le but étant, à partir d'un même fichier de CAO (Conception Assistée par Ordinateur), de reproduire $n$ fois le même organe. Les premières approches répondant à ces problématiques, avec l'utilisation de matrices (souvent cité par *scaffold* dans la littérature), ont pour le moment montré des résultats intéressants mais pas entièrement satisfaisants [9] [10]. Les principaux défauts résident dans les limitations physiques et mécaniques

du *scaffold* ainsi que dans l'impossibilité de vasculariser les tissus imprimés. Pour pallier ce problème une communauté a vu le jour, celle de la Bioimpression.

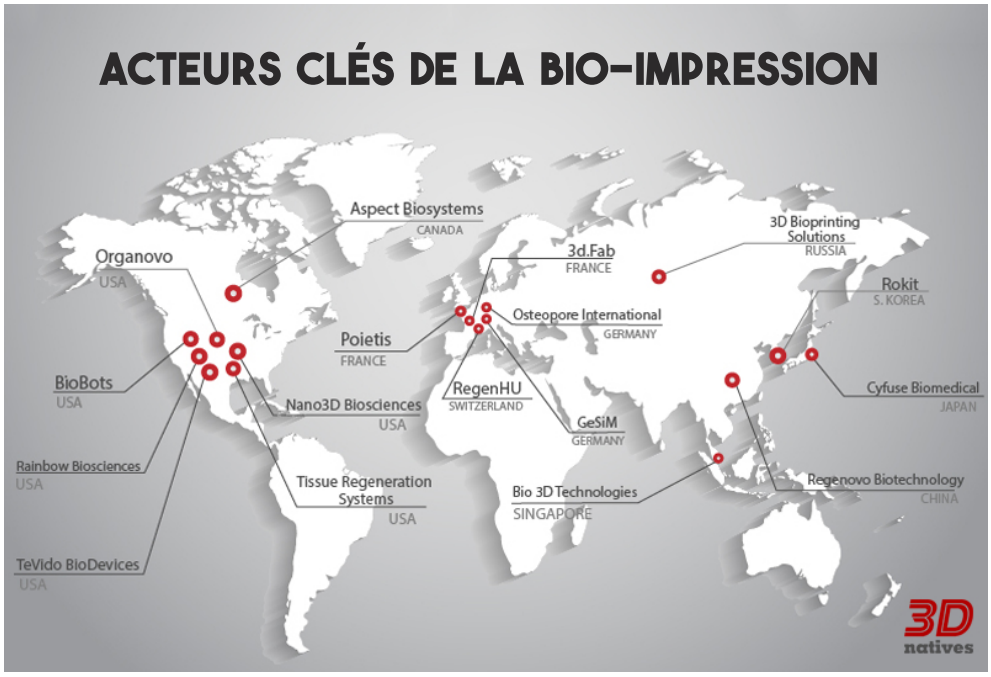



FIGURE 1.1 – Acteurs majeurs de la communauté de la Bioimpression en 2017

Basée sur le principe de la fabrication additive, la Bioimpression ajoute des cellules couche par couche dans le but de créer des modèles d'organes complexes et multicellulaires. Depuis ses débuts en 1988 avec le Docteur Robert J. Klebe et le *Cytoscribing* (une méthode de positionnement de cellules pour recréer un tissu 2D [12]), les acteurs de la Bioimpression se sont multipliés dans le monde entier (fig. 1.1), avec chacun ses spécialités et technologies. La majorité de ces entreprises sont des start-ups ou des TPE (Très Petite Entreprise). On peut regrouper ces méthodes d'impression en deux catégories : les technologies avec buse et les technologies sans buse. Dans la première catégorie, on retrouve la Bioextrusion, l'impression par jet d'encre, ou encore l'impression par micro-vanne. Dans la seconde, on recense la photo-polymérisation, l'*optical-tweeezer*, l'*electrospinning*, l'impression par onde acoustique et enfin, l'impression assistée par laser.

## 1.1 La Bioextrusion - exemple d'une machine

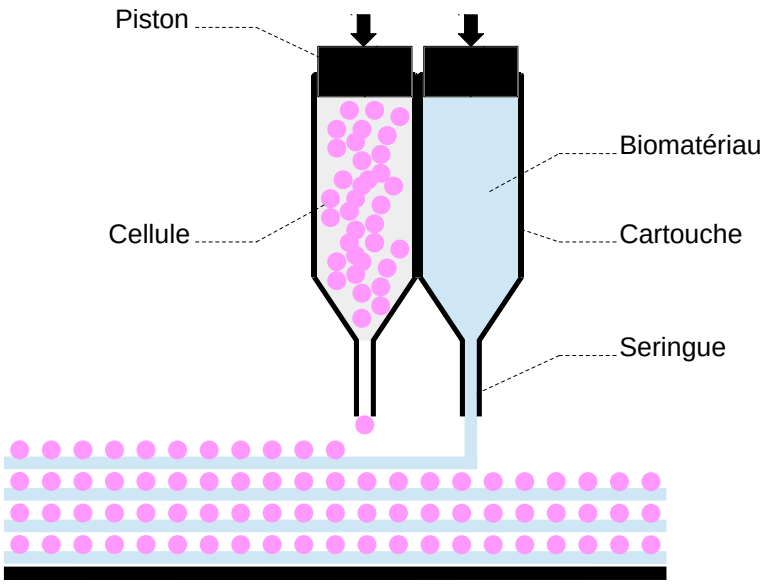



FIGURE 1.2 – Schéma basique d'un système d'impression par bioextrusion [13]

L'extrusion est un procédé de fabrication basé sur la compression d'un matériau contraint de traverser une buse afin d'en prendre la forme. Appliqué au monde de la biologie, la bio-extrusion est utilisée comme un procédé d'impression. Elle est souvent représentée comme fonctionnant avec deux réservoirs d'encre, l'un contenant un biomatériau, l'autre contenant des cellules. L'éjection se fait par un piston venant faire pression sur le liquide le faisant ainsi sortir de la tête d'impression, en commençant par le biomatériau puis les cellules.

Cette technologie permet de travailler avec des encres très concentrées, proche des concentrations tissulaires. Elle a donc un débit d'impression important. Les seuls inconvénients de cette méthode sont la résolution, qui est supérieure à $500\mu m$, et la viabilité puisque beaucoup de cellules meurent après impression ou pendant la maturation à cause des importantes forces de cisaillement qu'elles subissent lors du passage dans la buse de la tête d'impression ou encore à cause du bouchage des buses lors de fortes concentrations cellulaires.

## 1.2 Impression par jet d'encre

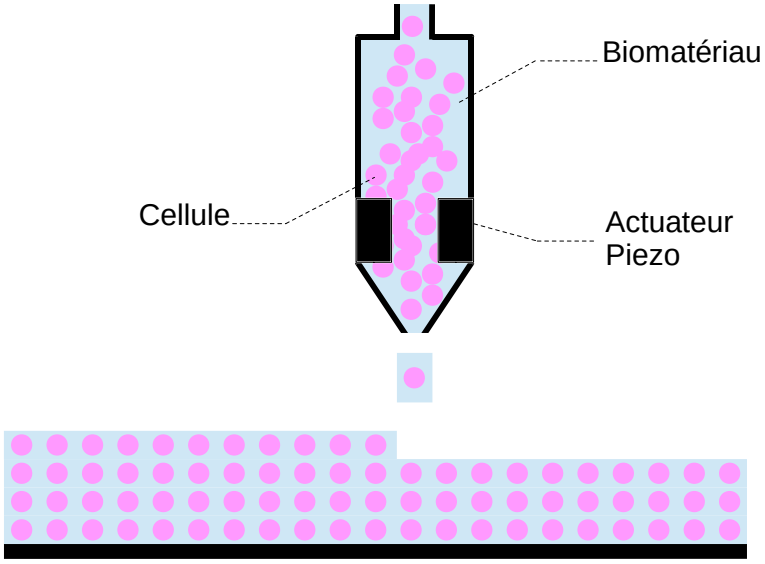



FIGURE 1.3 – Schéma basique d'un système d'impression par jet d'encre piezo [14]

Cette technique est largement inspirée des imprimantes de bureau classique, néanmoins sa précision et son rendement ont été améliorés. L'encre cellulaire est stockée dans une cartouche elle-même placée dans la tête de l'imprimante. Une décharge électrique stimule un cristal piézo-électrique qui convertit le signal en force mécanique. Une surpression est créée et provoque l'éjection d'une goutte. L'avantage de cette méthode, contrairement aux autres, est qu'elle nécessite une faible concentration cellulaire afin d'éviter que les cellules obstruent l'orifice des têtes d'impression qui est de plus en plus petit afin de gagner en résolution. De fait, le débit d'impression se réduit à mesure de la réduction de la taille de la buse. Le temps d'impression est rallongé dans des proportions qui peuvent mettre en danger la viabilité du tissu en cours d'impression. Comme pour l'extrusion, les forces de cisaillement de la buse diminuent la viabilité cellulaire post-impression. Une technologie similaire existe, appelée « Impression par microvanne », est décrite par la suite.

## 1.3 La Bioimpression assistée par laser

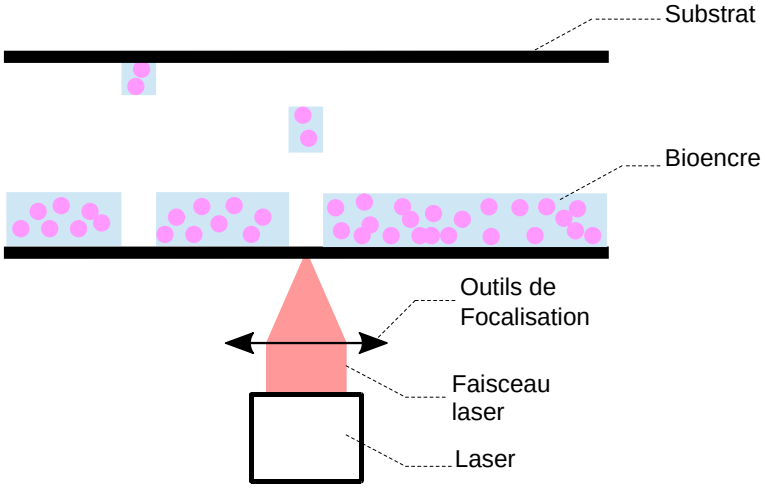



FIGURE 1.4 – Schéma basique d'un système d'impression par laser [15]

Dérivée de l'impression de films minces de solides, cette technique permet le dépôt de gouttes de biomatériaux et de cellules. Le principe repose sur un faisceau laser focalisé sur une cartouche, elle-même composée d'une lame de verre sur laquelle est disposé le liquide à imprimer. Un substrat receveur est placé au-dessus du système pour réceptionner le liquide éjecté. La Bioimpression par laser s'est rapidement démarquée des autres techniques car elle n'utilise ni masque, ni buse. Elle tire donc de cet avantage la meilleure résolution possible, à savoir la cellule unique, comme le montre la figure 1.5, où le nombre de cellules déposées est contrôlé par l'énergie du laser. De plus, l'impression assistée par laser montre un réel succès en terme de viabilité cellulaire, avec un taux de survie compris entre 90% et 100% et une capacité de différenciation maintenue, C'est sur cette méthode que se concentre l'intégralité de la thèse, dont on discutera plus en détail dans la partie suivante.

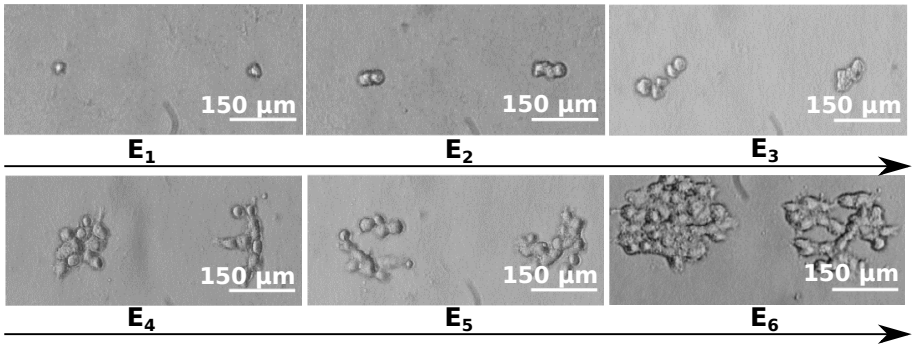



FIGURE 1.5 – Impression de cellules sur collagène à différentes énergies

# Chapitre 2

# Enjeux de la thèse

La Bioimpression assistée par laser prend ses origines dans les années 1960, où le laser émerge comme un outil précis et robuste permettant de retirer de la matière [16]. La première révolution de cette technique est de l'utiliser pour déposer de la matière [17][18]. Les premiers articles scientifiques sur ce sujet, datent de la fin des années 1980 avec le Docteur Bohandy qui s'en sert pour déposer des films fins de métaux à l'aide d'un laser Excimer [19]. Le« Laser Induced Forward Transfer » - LIFT - est né.

Les recherches autour du LIFT se sont développées mais toujours autour de matériaux inorganiques. Le problème réside dans le fait que le matériau est vaporisé par l'impact du laser, puis réceptionné par un substrat receveur. L'utilisation de cette technique n'est alors pas adaptée au monde de la Bioimpression. Pour y parvenir, différentes techniques se sont confrontées au fil du temps. Le MAPLE (Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation) s'est avéré être une alternative prometteuse. Elle consiste à créer une matrice de matériau absorbant, sur laquelle repose le matériau à imprimer. Sous l'effet de l'énergie du laser, le matériau est évaporé, propulsant ainsi le biomatériau sur le substrat receveur [20][21][22][23][24]. La contrainte de cette technique est l'utilisation d'une matrice et la nécessité de la retirer post impression. Très rapidement l'alternative de cette méthode est de recouvrir une lame donneuse d'un matériau sacrificiel et absorbant à la longueur d'onde du laser sur lequel on étale le liquide à imprimer. Elle a souvent pris différents noms dans la littérature, comme LDW [25] , LIFT [26] ou BioLP [27]. Dans la suite, nous faisons le choix de l'appeler LAB (Laser-Assisted Bioprinting).

Le principe du LAB peut se résumer en cinq étapes (fig.2.1). Un faisceau laser est focalisé sur une cartouche d'impression composée d'une lame de verre sur laquelle a été déposée une fine couche ($< 100\mu m$) de matériau absorbant à la longueur d'onde du laser, puis la bioencre ou le biomatériau à imprimer. Cette couche peut alors être de différente nature : métallique (l'or [29] ou le titane [30]), polymère (triazene [31]) et hydrogels (gélatine [32]). L'impulsion laser est alors

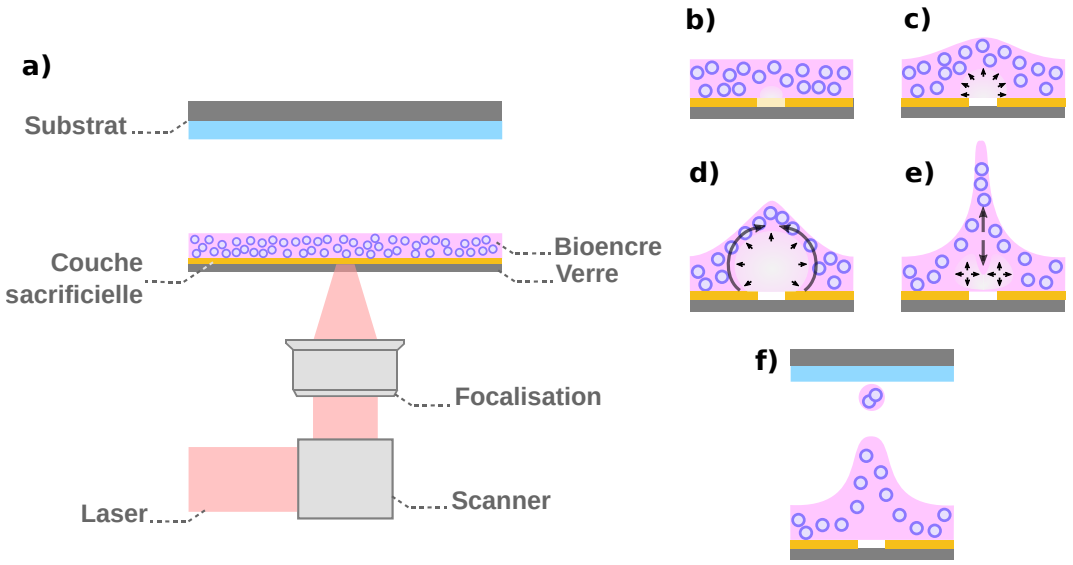



FIGURE 2.1 – Schéma descriptif du LAB (a) Focalisation d'un pulse laser sur la cartouche (b) Energie absorbée par la couche sacrificielle (c) Une bulle de cavitation est créée et grossit (d-e) La bulle s'effondre et un jet se créé (f) Une goutte est éjectée et atteint la surface du receveur. Inspiré de [15][28]

absorbée par cette couche, qui la transfère en énergie mécanique au liquide du dessus. On parle alors de couche sacrificielle car les énergies mises en jeu outrepassent les seuils d'ablation du matériau. Les effets de pression engendrés dans le liquide entraînent un phénomène de cavitation, c'est-à-dire la formation d'une bulle, qui grandit jusqu'à atteindre la surface. Un flux de liquide se met alors en place entre le bas de la bulle et le haut, jusqu'à déformer la surface libre. Lorsque les tensions de surface de cette interface sont dépassées, le liquide n'a pour solution que de s'éjecter vers le haut. Un jet de bioencre est alors créé. Celui-ci se développe jusqu'à éjecter à son tour une goutte. En plaçant un substrat receveur à bonne distance, elle y est interceptée. On répète ainsi l'opération $n$ fois à l'aide d'un scanner pour imprimer un motif de cellules ou de biomatériau, comme réalisé en figure 2.2. Ces impressions (fig.2.2) sont le résultat et le fruit d'études paramétriques complètes autour des nombreux paramètres que composent le LAB [15]. D'ailleurs, on en recense plus d'une centaine, mais on les résume souvent sous six catégories : le laser, la focalisation, la bioencre, la couche sacrificielle, le substrat receveur et l'environnement (fig.2.3). Chacune d'entre elles impacte directement la capacité et le résultat de l'impression. Par exemple, les caractéristiques du laser comme l'énergie déposée, permet entre autres, de contrôler le volume de liquide éjecté ainsi que le nombre de cellules. Quant à la longueur d'onde, elle doit être adaptée à la cartouche (transparente pour le support et absorbante pour la couche

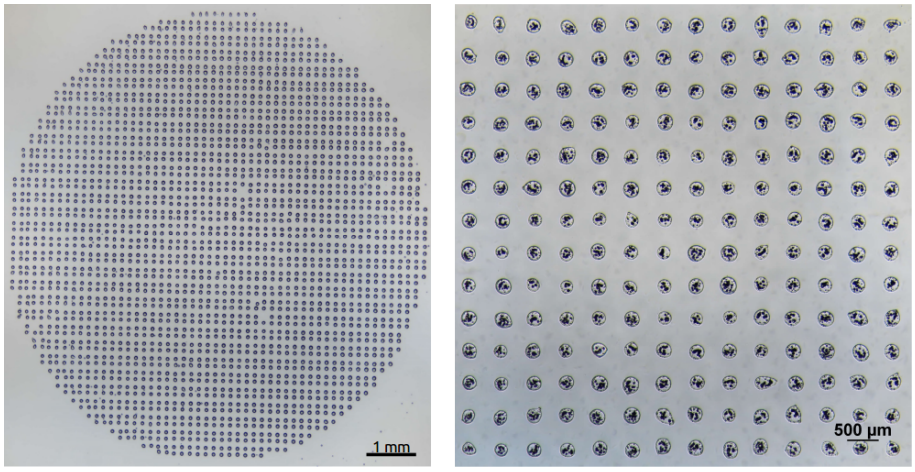



FIGURE 2.2 – Impression de biomatériau (gauche) et de Fibroblastes (droite) - réalisées sur la NGB17.03 à Poietis

sacrificielle) et non destructrice pour les cellules. Concernant la bioencre, il a été montré que la viscosité jouait un rôle majeur dans la maîtrise du processus d'impression [33][34]. Il n'y a aujourd'hui pas de valeur idéale de viscosité, mais les études montrent surtout la nécessité d'adapter le procédé lorsqu'elle évolue.

La versatilité du LAB est l'un de ses principaux points forts. Elle est capable d'imprimer différentes encres [35] [36], de différentes concentrations cellulaires et de tailles différentes [37], allant du nanomètre à la centaine de micromètres [38]. Elle permet aussi d'imprimer des éléments sur n'importe quel matériau et à différentes distances (de quelques centaines de micromètres à plusieurs millimètres). Cette technologie s'adapte aussi aux conditions environnementales en modifiant les paramètres laser et les conditions de focalisation. Sa résolution est aujourd'hui imbattable car elle permet d'imprimer à la cellule unique. Grâce à la technologie laser et aux systèmes optiques, sa précision est de l'ordre du micromètre et peut atteindre des vitesses d'impression de l'ordre de 10 000 gouttes par seconde.

Malgré tout, l'un des inconvénients de cette technique est l'utilisation d'une couche sacrificielle. Elle est à usage unique et des résidus subsistent dans les impressions. Même si les matériaux utilisés sont biocompatibles, l'impact de ces résidus à long-terme est méconnu. Cette contrainte est donc un réel frein aux développements techniques d'une bioimprimante par laser et aux projets qui y sont liés, en particulier pour les applications cliniques.

Pour pallier ce problème, deux laboratoires de Bordeaux, BioTis U1026, une Unité Mixte de Recherche (UMR) de l'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) et le CELIA, unité mixte de recherche (UMR 5107) en partenariat avec l'Université de Bordeaux, le CEA, et le CNRS, spécialisée dans

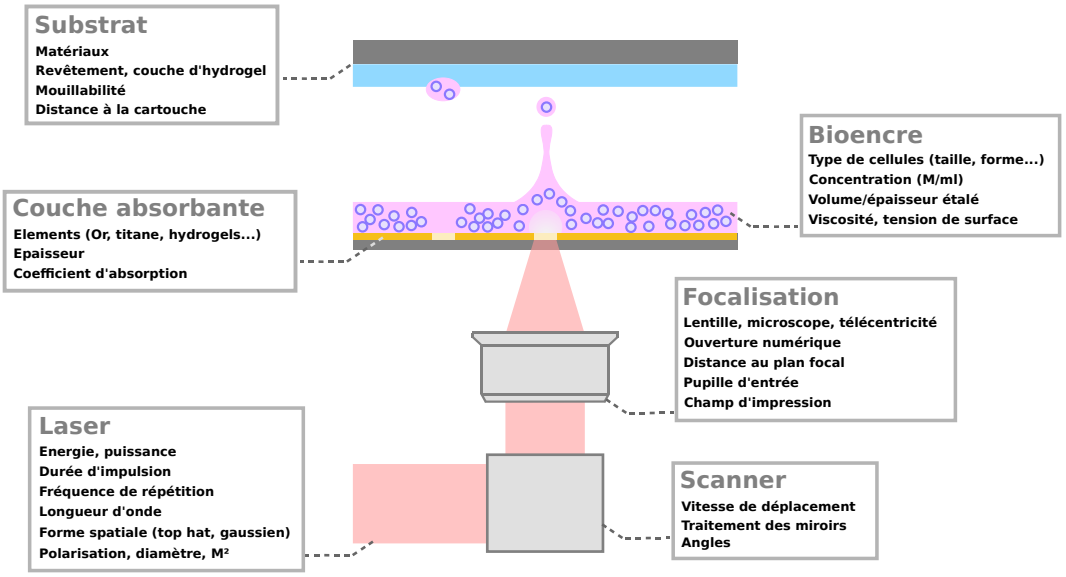



FIGURE 2.3 – Schéma explicatif des paramètres globaux du LAB - inspiré de [15]

l'interaction laser-matière et leurs applications depuis plus de 15 ans, lancent en 2014 une première campagne d'expérience sur l'étude de la dynamique et de la statistique des jets induits par laser sans couche sacrificielle. Cette première étude a permis de mettre en évidence les capacités d'impressions en fonction de l'énergie et de la durée d'impulsion d'un laser infrarouge [39].

Issue de BioTis, Poietis, start-up dans le développement de bioimprimantes par laser et la commercialisation de modèle de peau à façon, lance en 2016 une collaboration avec le CELIA (UMR 5107) à travers la thèse CIFRE présentée ici, qui a pour but d'étudier les phénomènes d'impression de cellules vivantes sans couche sacrificielle et de l'appliquer au développement d'un modèle de peau. Pour y arriver, l'idée générale est de simplifier la méthode d'impression, à savoir, générer un jet de bioencre en y focalisant directement l'impulsion laser à l'intérieur. De précédentes études encourageantes ont montré la possibilité d'imprimer des liquides homogènes sans couche sacrificielle [40][41][42], mais certains points sont encore flous ou non applicables au monde biologique et aux contraintes industrielles. Pour étudier un problème complexe, il est nécessaire de le simplifier pour mieux en comprendre les subtilités. Ce travail de thèse se divise en trois parties distinctes. La première permet de comprendre comment une bulle de cavitation est générée dans un liquide en fonction de différents paramètres laser. La deuxième traite de l'interaction entre cette bulle et la surface ainsi que la dynamique d'un jet d'encre. Enfin, le problème se complexifie en dernière partie avec l'ajout d'inhomogénéité dans la solution imprimable et la réalisation d'un modèle de peau.

# Chapitre 3

# Matériel et Méthodes

Tout au long de la thèse, deux lieux de travail ont permis la réalisation de l'ensemble des tests expérimentaux : Poietis et le CELIA (UMR 5107). On retrouve à Poietis l'ensemble des équipements liés aux bioimprimantes et au monde biologique ainsi qu'un banc d'essai laser. Au CELIA (UMR 5107), trois chaînes laser sont mises à disposition pour étudier l'interaction entre les différents paramètres laser et les jets. Pour pouvoir étudier et observer les phénomènes physiques mis en jeux durant le processus d'impression, deux systèmes d'imagerie sont utilisés, le TRI (*Time Resolved Imaging*) et une caméra ultra-rapide. L'ensemble des études sur cellules ont été réalisées dans les locaux de Poietis afin de respecter les règles d'hygiènes et de sécurité.

## 3.1 La bioimprimante

Poietis développe et intègre ses propres machines de Bioimpression bimodale. Elles sont basées sur un même schéma général. La modalité impression laser permet d'imprimer les cellules, tandis que la partie microvanne permet d'imprimer les hydrogels, comme le collagène. Des platines de translation et de rotation permettent d'ajuster les distances et déplacements (têtes d'impressions et substrats). Généralement, ces substrats sont des plaques multipuits six puits pour culture cellulaire, à placer soi-même dans un support prévu à cet effet. L'ensemble est installé sous un système à barrière de flux d'air afin de garder l'enceinte propre. Pour contrôler ces équipements et le processus de bioimpression, Poietis a développé sa propre suite logicielle composée d'une conception assistée par ordinateur (fig.3.1) [1] et d'un logiciel de gestion d'impression.

1. Illustration disponible sur le site de Poietis à l'adresse : www.poietis.com

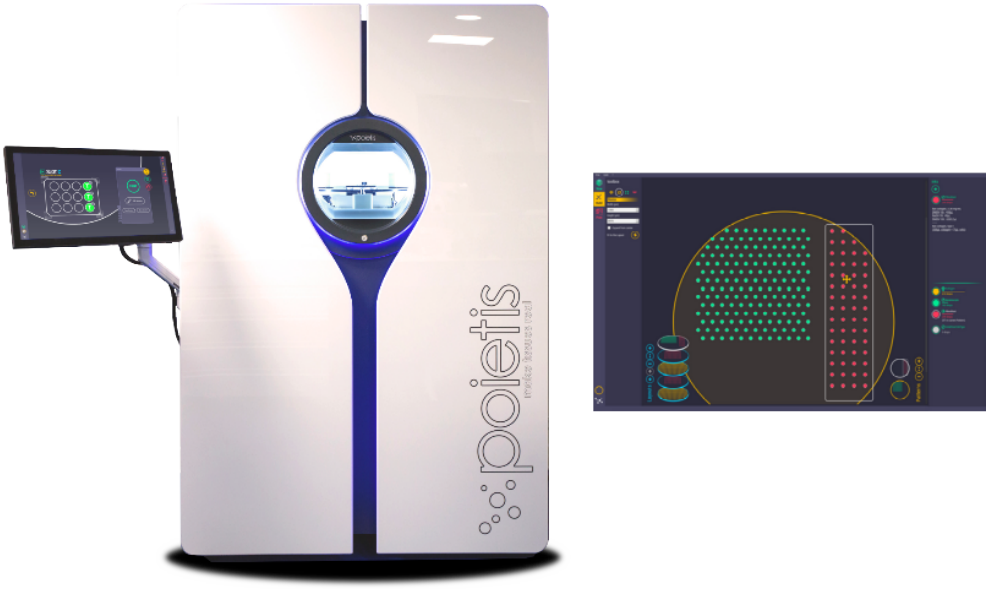



FIGURE 3.1 – NGB 17.03 et sa CAO

### 3.1.1 Impression par microvanne

Le principe utilisé pour imprimer les hydrogels réside sur l'utilisation d'une électro-vanne, appelée valve solénoïde. Un liquide sous pression est inséré à l'intérieur de la tête dont sa progression est bloquée par un clapet magnétique. Dès que l'on alimente le système en courant électrique, une bobine électromagnétique s'active et soulève ce clapet. L'objectif est d'ouvrir la valve pour éjecter le liquide de la buse de sortie par différentiel de pression. Lorsque l'alimentation électrique est coupée, l'aimant arrête de fonctionner et la valve se referme. Pour gérer la quantité de liquide éjectée, on applique une tension qui permet de la maintenir ouverte sans l'endommager (3V). Toute la durée durant laquelle le signal électrique est non nul, de l'ordre de la milliseconde, le liquide est éjecté. D'autres paramètres peuvent aussi influencer le volume déposé comme la pression que l'on applique au liquide en entrée de la tête, ou encore, la taille des buses de sortie. Il en existe de différents diamètres, de $50\mu m$ à $250\mu m$. Afin de maintenir à température le liquide à l'intérieur de la tête d'impression, un système Peltier y est intégré permettant de refroidir, si besoin, les réservoirs et les tuyaux menant jusqu'à la tête d'impression.

### 3.1.2 Impression par laser

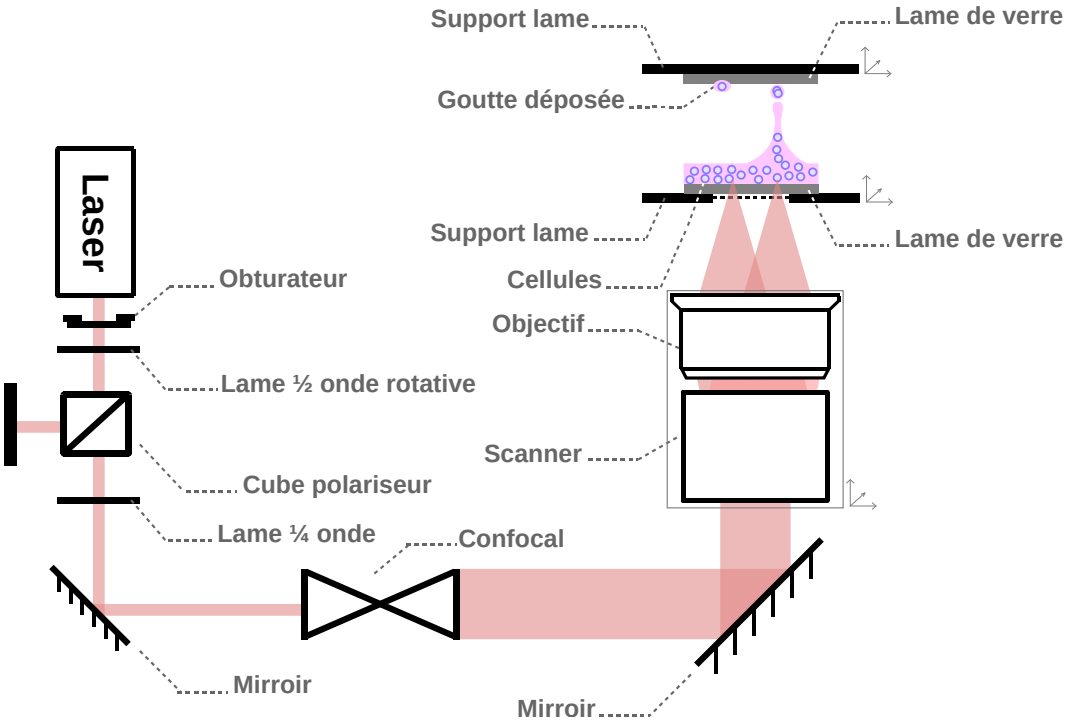



FIGURE 3.2 – Chaîne de Bioimpression par laser - NGB 17.03

Un laser commercial délivre des impulsions brèves à la demande du scanner et d'un ordinateur de contrôle. Un obturateur automatique sécurise l'ensemble de la chaîne entre chaque séquence d'impression. Le faisceau traverse dans un premier temps une lame demi-onde placée sur une monture rotative, dont le rôle principal est de tourner la polarisation du faisceau tout en la gardant linéaire. Le cube polariseur placé en aval, décompose et sépare l'axe ordinaire et extra-ordinaire du faisceau. L'ensemble lame demi-onde et cube permettent alors de gérer la puissance en fonction de l'angle de la lame. Puis une lame quart d'onde repasse la polarisation de linéaire à circulaire afin d'optimiser l'ablation de la couche d'or lors des impressions. Pour modifier la taille du faisceau, un confocal de grandissement 10 est positionné en amont du scanner afin de remplir (pleine pupille) un objectif. Enfin, ce même scanner modifie l'angle du faisceau de manière très précise ($< 0.01°$) en direction d'un objectif télécentrique qui redresse le faisceau et le focalise sur la cartouche d'impression. L'ensemble scanner et objectif de focalisation est fixé à des platines de translation, tout comme le substrat receveur afin de gérer au micromètre près et automatiquement toutes les distances.

Le principe d'impression est relativement simple. On génère une séquence d'im-

pression à l'aide de la CAO, qui convertit chaque point en coordonnée tout en intégrant les paramètres du laser à appliquer. Le scanner, la lame demi-onde et les platines de support s'ordonnent entre elles pour établir les trajectoires et les paramètres optimaux afin d'imprimer le motif demandé.

## 3.2 Systèmes d'imagerie

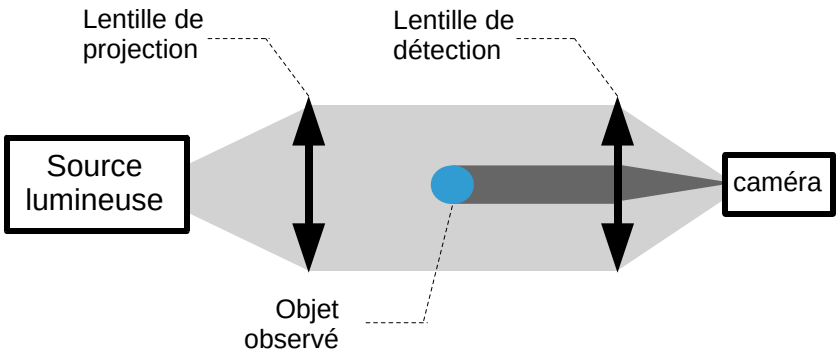



FIGURE 3.3 – Schéma basique d'un système d'ombroscopie

Pour pouvoir observer la dynamique d'une bulle générée par laser et l'éjection du liquide qui y est liée, des systèmes d'imagerie spécifiques sont nécessaires. Dans le cadre de la thèse, deux de ces systèmes sont utilisés, le TRI (Imagerie Résolue en Temps) et une caméra ultra-rapide. Ils se basent tous les deux sur le même principe, à savoir l'ombroscopie (fig.3.3). On éclaire la scène à l'aide d'une LED ou d'une lumière intense, dont on récolte l'ombre générée par l'objet observé. On appellera la source lumineuse et sa lentille de projection « illuminateur ». Quel

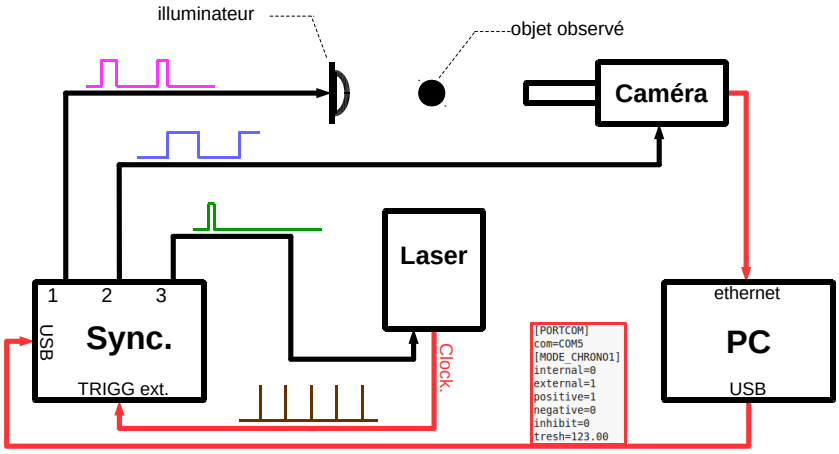



FIGURE 3.4 – Schéma explicatif d'un système d'imagerie synchrone

que soit le dispositif utilisé, la caméra et l'illuminateur sont contrôlés par un ordinateur et un boîtier de synchronisation (fig.3.4). L'utilisateur crée sa séquence d'acquisition qui est envoyée au boîtier de synchronisation puis est convertie en des trains d'impulsions. Les sorties 1,2 et 3 de la figure 3.4, ne se déclenchent que

lorsque la synchronisation externe du boîtier est sur un front montant. Pour synchroniser tous les éléments, on utilise en général le laser comme référence. Celui-ci délivre une « horloge » utilisée comme déclencheur du boîtier de synchronisation. En prenant compte les délais de chaque élément, le chronogramme envoyé doit être judicieusement travaillé et adapté aux types d'expériences.

### 3.2.1 Le TRI

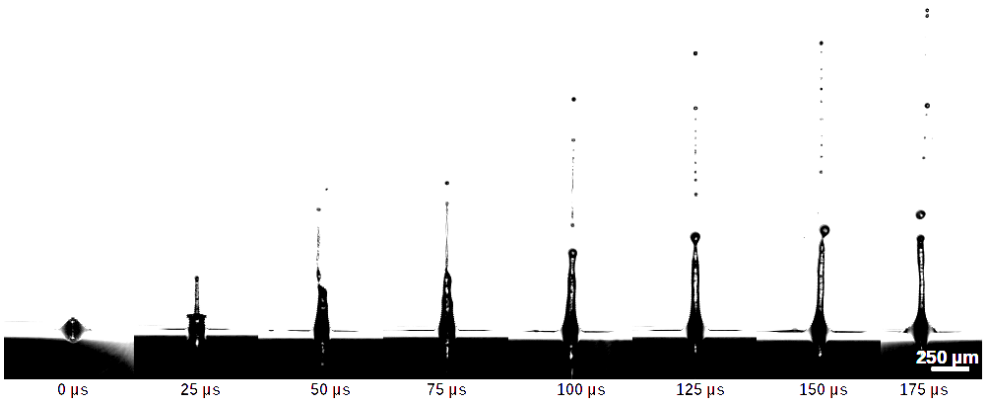



FIGURE 3.5 – Exemple d'une reconstitution par TRI d'une dynamique de jet induit par laser avec couche sacrificielle

Le système d'Imagerie Résolue en Temps (TRI) tire son avantage par son coût ($< 5000$€) et sa facilité de mise en place. Totalement indépendant de sa fréquence de fonctionnement (nombre d'images par seconde), le principe du TRI est le suivant : on capture un instant précis d'un événement que l'on répète $n$ fois en décalant temporellement la prise de photo pour en reconstituer toute l'évolution (fig.3.5). Si l'événement n'est pas répétable ni reproductible, une grande quantité de photos par prise ($> 20$) est nécessaire pour interpréter l'histoire complète, ce qui en fait son plus gros défaut. De même, si on cherche une grande résolution temporelle (par exemple, un événement qui durerait $300\mu s$, avec une résolution de $1\mu s$, il faudrait répéter 300 fois le même événement). Pour s'assurer une marge de sécurité, on acquiert de manière générale, 10 à 20 photos d'un même événement, même s'il est reproductible et répétable. On passe alors de 300 photos à 6000. Pour s'éviter une telle quantité de données, et des contraintes manipulateurs, l'astuce est de définir des temps caractéristiques et de réduire la résolution temporelle. Lorsqu'une dynamique est totalement inconnue, il faut dans un premier temps sonder son histoire, c'est-à-dire relever le moment où l'événement commence et se termine, puis, par dichotomie, trouver les temps qui le caractérisent. Comme énoncé précédemment, le TRI se base sur le principe d'ombroscopie. Un illuminateur inonde la scène

puis une caméra dotée d'un zoom capture l'ombre générée par l'objet observé ; le tout étant contrôlé par un ordinateur et une synchronisation adéquate. Durant la thèse, les images sont capturées par une caméra de chez iDS (modèle UI-5360CP) et d'un zoom (4X) de chez Island Optic System, et enregistrées par le logiciel uEye©, fonctionnant en mode « Trigger ». Dans notre cas, l'illuminateur est une LED émettant à 905 nm qui illumine la scène pendant 100 ns. Pendant ce laps de temps, la caméra n'a pas d'autre choix que de capturer cette scène, qui, dans cette gamme temporelle et notre cas d'étude, n'évolue pas de manière significative. La synchronisation joue alors un rôle essentiel dans l'acquisition d'image par TRI. Elle permet de gérer le décalage temporel de l'illuminateur, mais aussi de synchroniser tous les éléments au même $T_0$ indépendamment des retards de chacun.

### 3.2.2 La caméra ultra-rapide

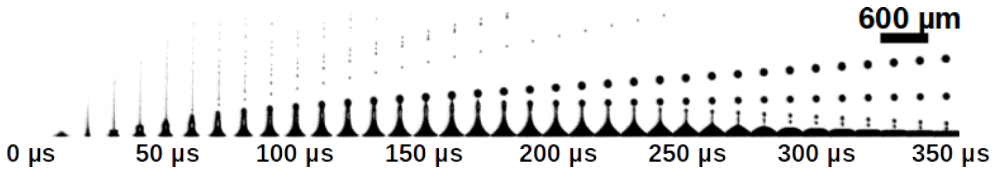



FIGURE 3.6 – Exemple d'une chronologie de jet acquit par caméra ultra rapide. L'intervalle entre chaque image est de 10 $\mu s$

L'utilisation d'une caméra ultra-rapide répond en grande partie au seul inconvénient du TRI, la reconstitution d'images. Les fréquences des caméras ultra-rapides peuvent atteindre le million d'images par seconde, donc une résolution temporelle de $1\mu s$ entre chaque image capturée. En reprenant le même exemple que précédemment, la caméra ultra-rapide à cette fréquence n'a besoin que d'une seule acquisition pour capturer les 300 images. En gardant le même principe des 10 à 20 photos par temps, seulement 10 à 20 événements sont donc nécessaires. Ainsi, on peut obtenir une histoire complète pour chaque événement beaucoup plus rapidement qu'avec un TRI. Ce gain de temps a un prix, puisqu'une caméra ultra-rapide de cette résolution peut facilement atteindre 500 000€ à l'achat. En collaboration avec le LOMA, (Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine), une caméra Phantom pouvant atteindre 181 000 images par seconde, nous a été prêtée. Dotée d'un zoom et d'un éclairage visible, la résolution spatiale du système est de $10\mu m$. Malgré cette faible résolution, l'acquisition de dizaine de milliers de jets en quelques semaines a permis une étude plus approfondie de la dynamique des jets et de bulles. Le fonctionnement de la caméra ultra-rapide est simple, elle est reliée au boîtier de synchronisation comme le montre la figure 3.4, tout comme le laser. Seul l'éclairage diffuse en continu. A 181 000 image par seconde, une image

est prise toutes les $5,5\mu s$, ce qui est limitant pour des dynamiques qui ne durent que $20\mu s$, par exemple. Pour pallier ce problème, on utilise la caméra ultra-rapide

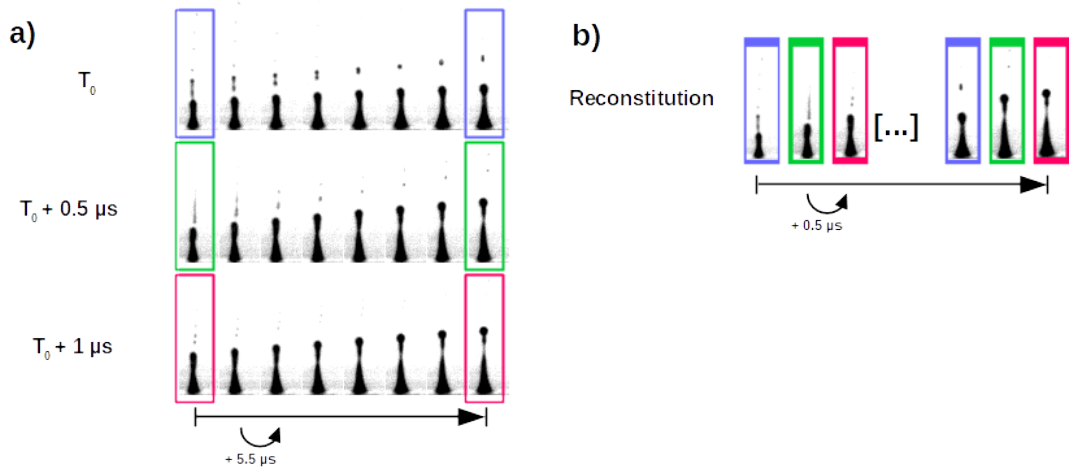



FIGURE 3.7 – Exemple de reconstitution de vidéos via une caméra ultra rapide avec la méthode du TRI

comme un TRI en décalant temporellement le déclenchement de la caméra. De cette manière, on peut obtenir une résolution temporelle de 500 ns en décalant 11 fois la séquence d'acquisition. On commence par enregistrer une vidéo à $T_0$, puis une seconde à $T_0 + 0.5\mu s$ et on répète l'opération jusqu'à $T_0 + 5\mu s$ (fig.3.7a). Puis, via une routine sous imageJ [2], on combine chaque séquence pour obtenir une dynamique résolue à 500 ns (fig.3.7).

2. Logiciel de traitement d'image, disponible en téléchargement à l'adresse suivante : https ://imagej.nih.gov/ij/download.html

## 3.3 Les montages d'expériences

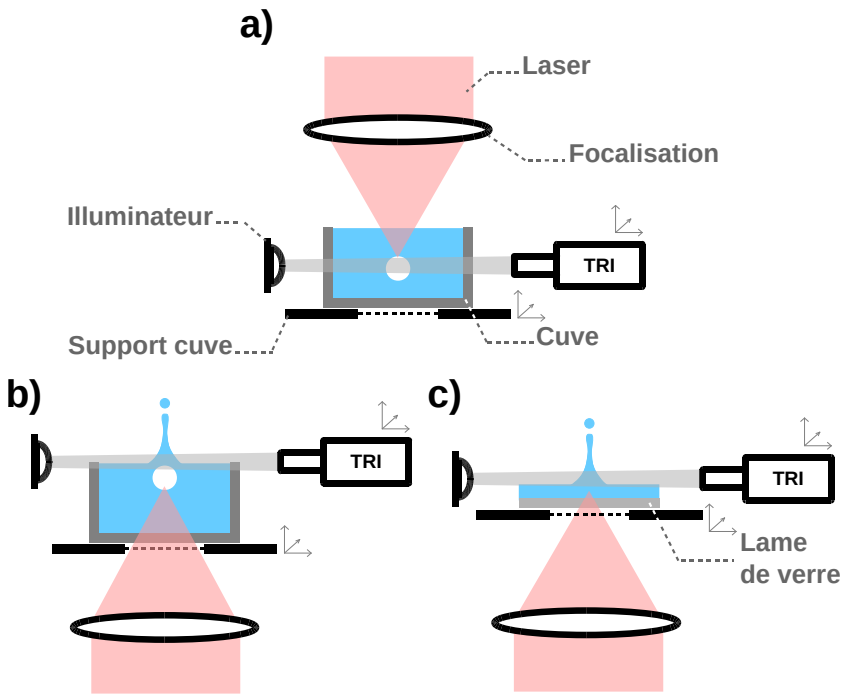



FIGURE 3.8 – Schéma basique des zones d'intérêt (a et c) pour observer une bulle (b) pour observer un jet sur une lame de verre

Outre la bioimprimante développée par Poietis, quatre bancs d'essais ont été mis en place afin de mener à bien ces travaux de recherche. Au sein de Poietis, un banc d'essai y a été dédié où trois types de lasers industriels se sont succédés avec deux outils de focalisation. Quant aux bancs d'essais du CELIA, trois sources ont été testées pour trois longueurs d'onde différentes. Quel que soit le banc et l'endroit, on peut dissocier les études en deux parties. Dans un premier temps, l'étude de la dynamique de bulle se réalise dans une cuve. Le faisceau laser est focalisé directement dans une cuve (transparente) remplie du liquide à étudier (fig.3.8a). On observe alors par transparence, la dynamique de la bulle à l'aide d'un système d'imagerie préalablement expliqué. La cuve ainsi que le système d'imagerie sont positionnés sur des platines de translation (3 axes par élément). Pour l'étude des jets, le même dispositif peut être utilisé, en ajustant la hauteur des caméras en dehors de la cuve, ou en utilisant une lame de verre à travers laquelle passe le laser (fig.3.8b). Dans le cas des lames, on focalise le faisceau à travers en attaquant par l'interface air-verre. Le liquide est préalablement étalé sur la lame à l'aide d'une pipette de précision (type *pipetman*) de $20\mu L$. Les lames mesurent 15

mm de diamètre pour une épaisseur de 700$\mu m$ et sont positionnées sur un support adéquat pouvant les recueillir sans bouger.

### 3.3.1 Le banc R&D Poietis

Le principe du banc d'essai R&D de Poietis se base sur celui de la chaîne dans la bioimprimante NGB 17.03 expliquée dans le paragraphe « Bioimprimante ». Le schéma complet du montage est exposé en figure 3.10. On peut le résumer en quatre grandes sections : le laser, la mise en forme du faisceau, la focalisation et la zone d'impression. La partie mise en forme du faisceau comprend la gestion de l'énergie (association d'une lame demi onde et d'un cube de polarisation) et d'un confocal pour agrandir le faisceau. Trois lasers se sont succédés : un SATSUMA© d'Amplitude Systèmes, un SIRIUS© de Spark Lasers et un laser YLPP© d'IPG Laser GmbH. A chaque laser ses spécificités comme le résume le tableau ci-dessous.

| | **Satsuma** | **Spark** | **YLPP** | **Unité** |
|---|---|---|---|---|
| **Longueur d'onde** | 1030 | 1064 | 1064 | [nm] |
| **Cadence** | 200 | 40 | 30 | [kHz] |
| **Puissance moyenne** | 5 | 5 | 30 | [W] |
| **Energie** | 25 | 120 | 1000 | [$\mu J$] |
| **Taille de faisceau** | 2 | 1 | 8 | [mm] |
| **Durée d'impulsion** | 350 fs - 10 ps | 8 ps | 150 ps - 3 ns | – |

Pour chaque laser, un système de grandissement différent doit être installé pour ajuster la taille du faisceau en entrée de scanner et de la pupille d'entrée de l'objectif de focalisation. Pour rappel, un confocal est une association de deux lentilles convergentes et un afocal d'une divergente avec une convergente. On place la seconde lentille de manière à confondre son plan objet au plan image de la première lentille. D'un faisceau parallèle en entrée sort un faisceau parallèle en sortie mais agrandi. Le rapport des focales donne le grandissement du système.

Les optiques de focalisation sont de deux types : un objectif télécentrique type F-Thêta d'ouverture numérique 0.12 et un objectif de microscope d'ouverture 0.25. L'intérêt d'utiliser une lentille télécentrique F-Thêta est de pouvoir focaliser un faisceau à différentes positions. Sur un champ donné, il convertit un faisceau ayant subi un angle, en un décalage $(x, y)$, tout en le focalisant sur un même plan focal (fig.3.9a). Le défaut de ces objectifs est la faible ouverture numérique qu'ils proposent et le compromis avec le champ d'impression. Plus le champ sera grand, plus l'ouverture diminuera, et inversement. Pour tester des ouvertures plus fortes, il faut utiliser des objectifs de focalisation laser (fig.3.9b). Ils ressemblent à ceux utilisés en microscopie mais sont adaptés à la longueur d'onde d'utilisation et supportent les fluences laser sans risque d'endommagement. Les seuls inconvénients qu'on leur trouve, sont l'impossibilité de scanner la cible et d'avoir des courtes focales. Plus

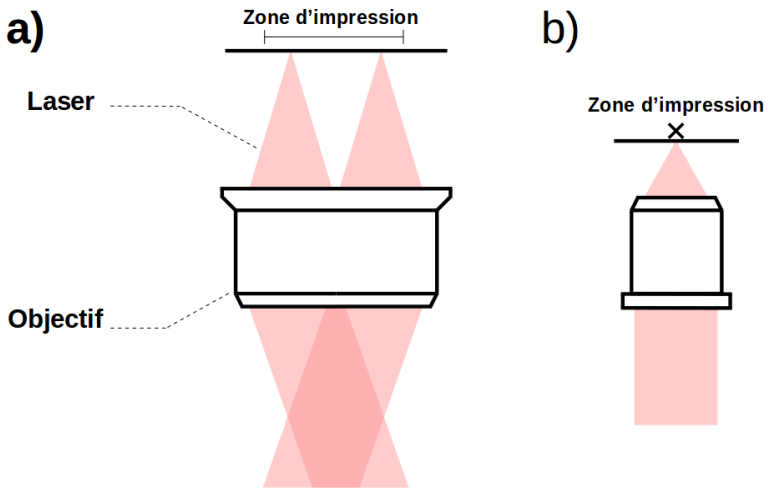



FIGURE 3.9 – Schéma basique d'objectif télécentrique type F-Thêta (a) et laser (b)

l'ouverture numérique est grande, plus la focale diminue, ce qui peut très rapidement amener une nouvelle contrainte au banc d'essai comme la proximité entre le support de la lame et l'objectif.

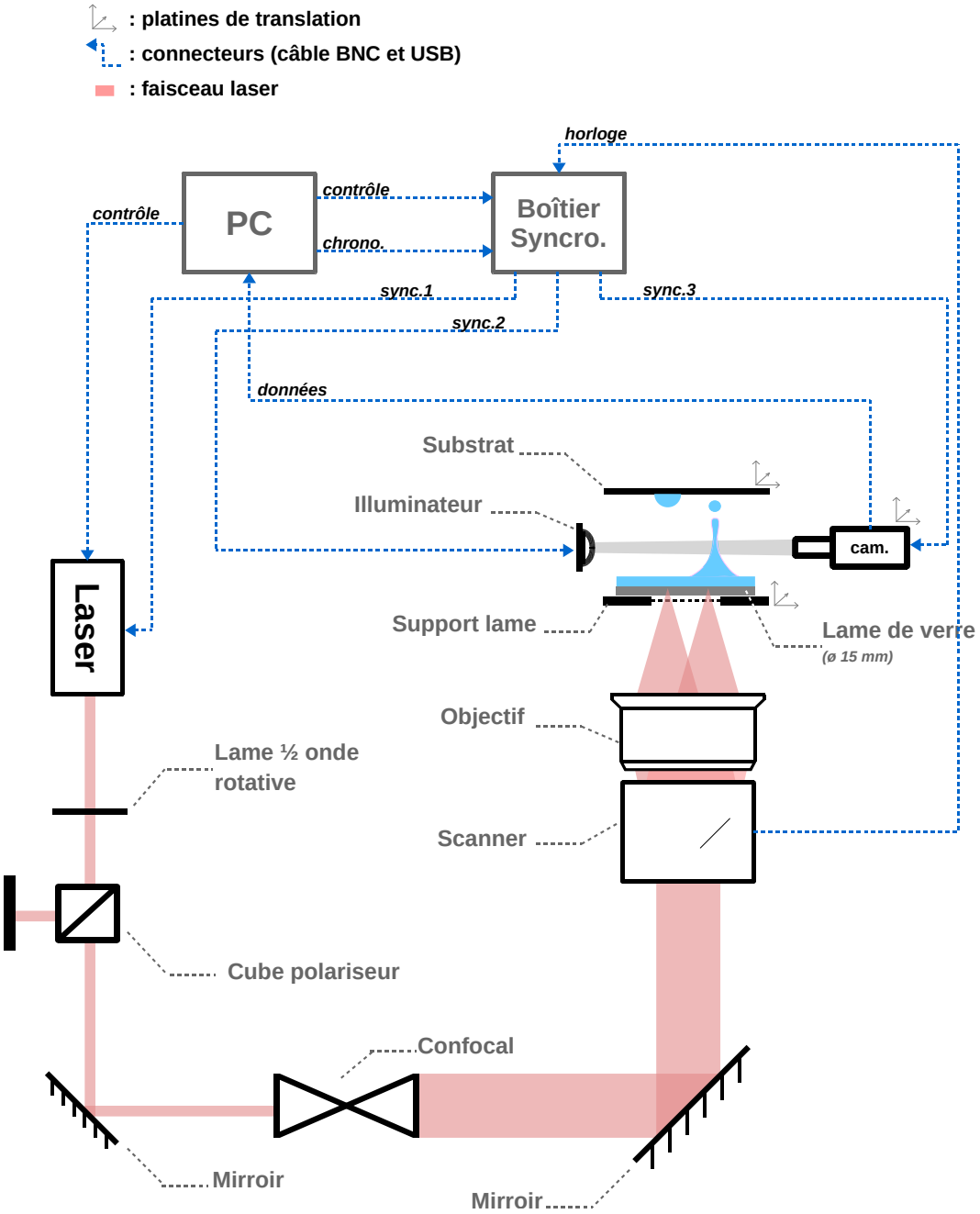



FIGURE 3.10 – Schéma de montage du banc d'essai de Poietis

### 3.3.2 Les chaînes lasers du CELIA

**Chaîne à 1030 nm : Solstice**

La chaîne est basée sur une amplification d'impulsion comprimée (FCPA « *Fiber Chirped Pulse Amplification* ») dotée d'une fibre microstructurée dopée à l'ytterbium, délivrant des impulsions jusqu'à $500\mu J$ à $100kHz$. Le spectre est centré à $1032nm$ avec une bande spectrale de $6nm$. La qualité du faisceau est quantifiée via le $M^2$ mesuré à 1.4. Pour gérer l'énergie, on associe une lame demi onde et cube polariseur.

La longueur de l'impulsion peut être variée en translatant deux réseaux du compresseur FCPA, jusqu'à $30ps$. Puis, à l'aide d'une ligne à dispersion, on ajuste finement cette durée d'impulsion de 400 fs à 400 ps. La ligne à dispersion est calibrée en mesurant les impulsions par autocorrélation à l'aide d'un autocorrélateur de génération de second harmonique (PulseCheck© de APE). Dans le cadre de la thèse, seulement 400 fs et 10 ps ont été testées sur ce banc.

Afin de réduire la cadence initiale de 100kHz, le faisceau est envoyé à travers une cellule de pockels contenant un cristal de KDP [3], que l'on impose à 1Hz. Le fonctionnement d'une cellule de pockels peut être expliqué en quelques mots : elle contient un cristal biréfringent variable en fonction de l'intensité électrique appliquée et modifie ainsi la polarisation du faisceau. Une fois associée à un polariseur, elle permet de laisser passer ou non le faisceau à des cadences très rapides (jusqu'à la nanoseconde) et gérer ainsi la fréquence d'un faisceau laser qui le traverse.

Le faisceau est ensuite focalisé à l'aide d'un objectif ouvert à 0.25 dans une cuve ou sur des lames de verre de 15 mm de diamètre.

Ce banc d'expérience a été monté dans un premier temps avant le début de la thèse, dans le cadre d'une collaboration entre le CELIA et l'INSERM[39], puis réutilisé et adapté dans le cadre d'une nouvelle collaboration entre Poietis, le CELIA, le LOMA et BioTis dans le but d'étudier la dynamique des jets et des bulles à l'aide d'une caméra ultra-rapide. On retrouve alors cet élément comme seul outil de visualisation de jets et de bulles. Une LED émettant dans le visible éclaire en continu la scène, dont l'ombre est capturée par la caméra. L'ensemble est synchronisé à l'aide d'un générateur de retard (20 voies), ISEO© configurable et synchronisé à une horloge de 77 MHz.

3. KH2PO4 : Phosphate de monopotassium

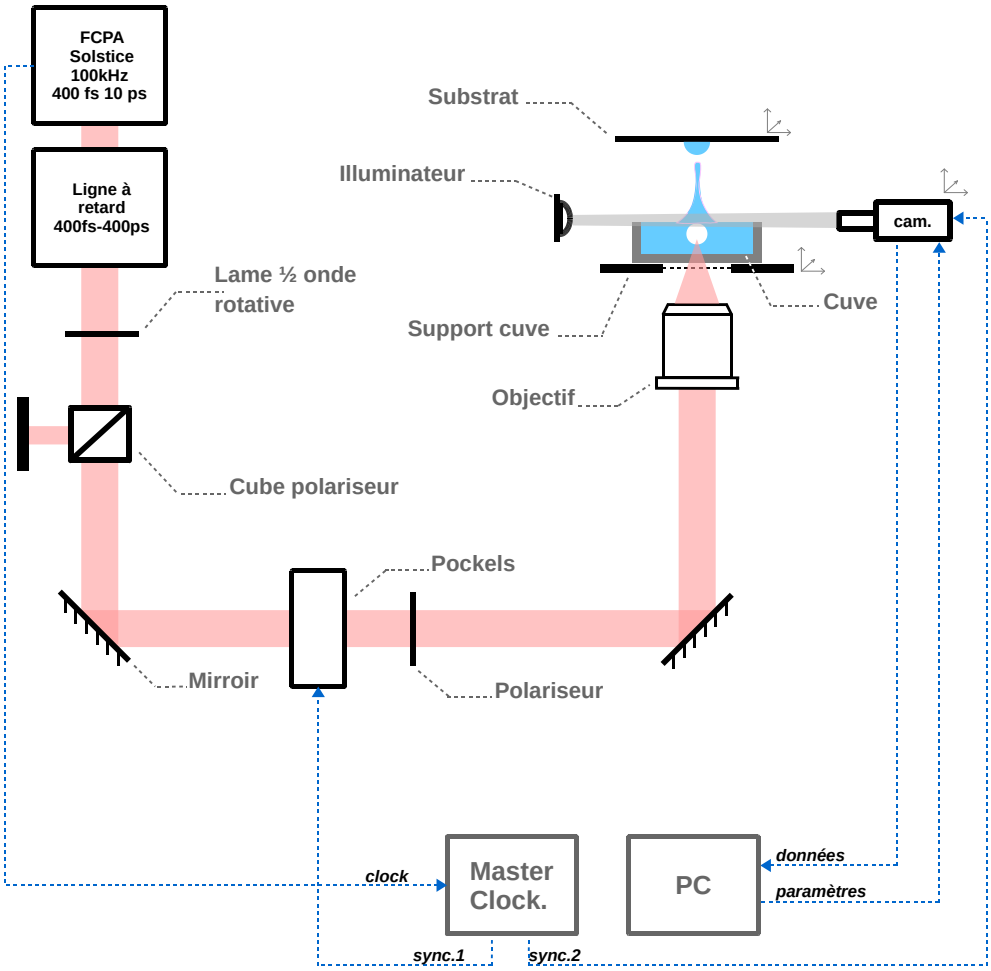



FIGURE 3.11 – Schéma de montage du banc d'essai 1030 nm du CELIA

**Chaîne à 1300 et 2000 nm : Aurore**
La chaîne Aurore du CELIA se base sur un laser Ti :Sa émettant à 800 nm, 20 W à 1 kHz pour une durée de 400 ps est compressé pour atteindre 25 fs de durée d'impulsion. Injecté dans un amplificateur paramétrique de type TOPAS, il en sort un signal à 60 fs (mesuré via un autocorrelateur), centré à 2000 nm et un « *idler* » à 1300 nm.

Brièvement, l'amplificateur paramétrique est basé sur le principe d'optique non-linéaire. Un photon incident du signal entrant passe à travers un cristal non-linéaire et en sort divisé en deux photons de faible énergie. La température et les angles entre le faisceau et le cristal impactent directement les longueurs d'onde du signal et de l'idler. Grâce à ce système, on peut sonder des longueurs d'onde de 1200 à 1400 nm ainsi que de 1700 nm à 2400 nm. Une fois la longueur d'onde sélectionnée, le système ressemble fortement au précédent.

L'ensemble des optiques et des traitements sont adaptés pour travailler à 2000 nm puis à 1300 nm. Des traitements Or sont utilisés pour les miroirs, et des lentilles de $CaF_2$ [4] pour la focalisation. Une lame demi-onde et un cube de polarisation adapté à chaque longueur d'onde sont utilisés pour gérer l'énergie du système. Sur échantillon, l'énergie disponible atteint $100\mu J$. Une cellule de pockels en RTP [5] et un polariseur à grille permettent à nouveau de gérer la fréquence des impulsions (fixée à 1 Hz), puis le faisceau est filtré spatialement à l'aide d'un iris. On focalise ensuite le faisceau dans une cuve à l'aide d'une lentille de focale 20 mm dont l'ouverture numérique est d'environ 0,10. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$ pour un $M^2$ de 1.5 au plan focal.

Non transparent à ces longueurs d'onde, la cuve absorbe le faisceau c'est la raison pour laquelle on focalise le faisceau à travers l'interface air-liquide. Une deuxième configuration a aussi été testée, en focalisant le faisceau à travers une lame de $CaF_2$ sur laquelle on étale le liquide étudié. On utilise alors le TRI pour observer la dynamique des bulles et des jets, le tout synchronisé par un générateur ISEO *master-clock*, déclenché sur un signal de référence de la chaîne.

4. Fluorure de calcium
5. RbTiOPO4 : Rubidium Titanyle Phosphate

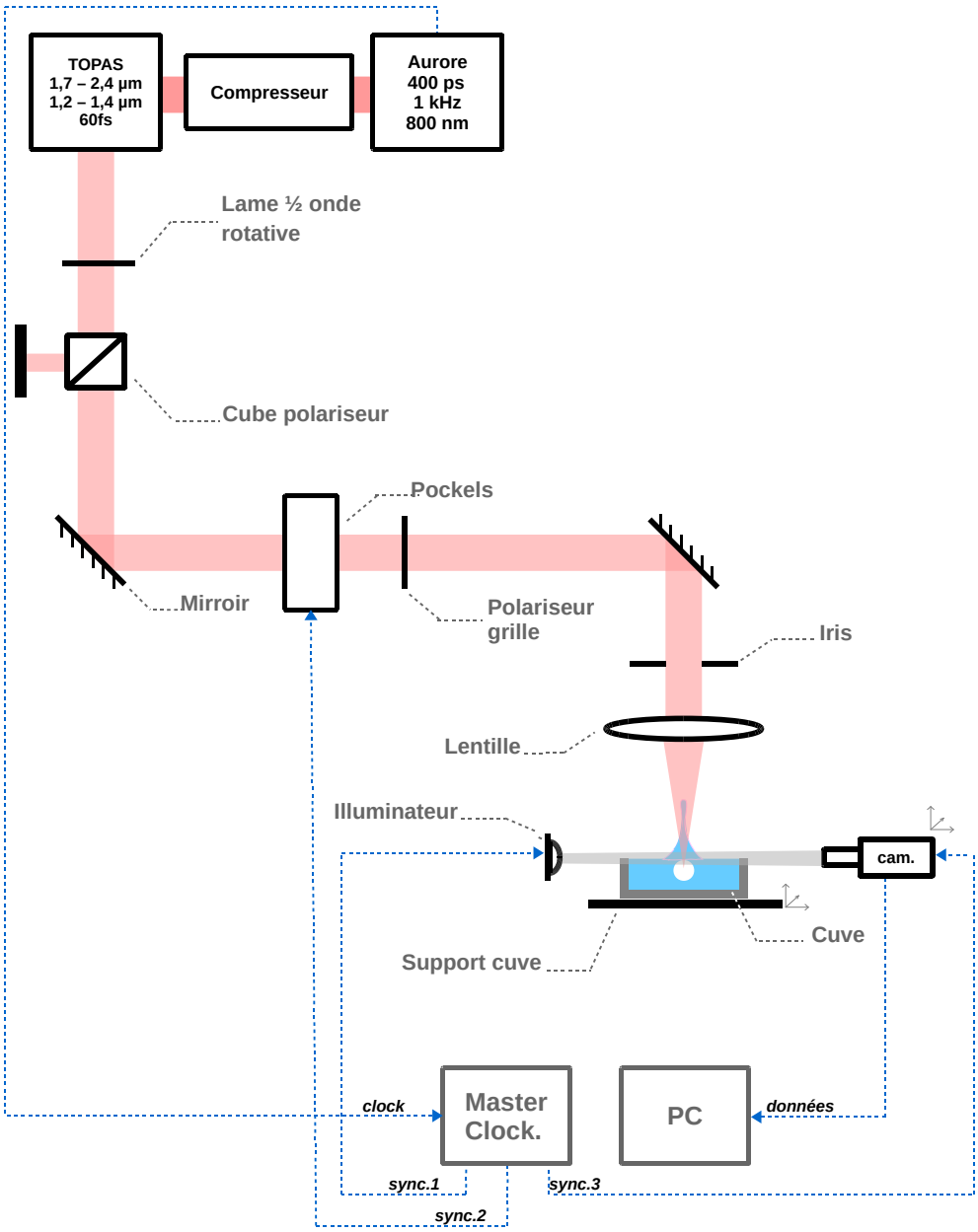



FIGURE 3.12 – Schéma de montage du banc d'essai 1300-2000 nm du CELIA

**Chaîne à 515 nm : BlastBeat**
Pour ce dernier montage, la chaîne Blast Beat du CELIA est utilisée. A partir d'un laser fibré commercial à base d'Ytterbium (de la société Amplitude Systèmes), des impulsions de 150fs à 1030nm à une cadence de 166kHz passent à travers un cristal doubleur de fréquence de BBO [6] permettant de convertir ces impulsions à 515nm. La puissance disponible à ce niveau est de 20W avec une durée d'impulsion mesurée par autocorrélation à 150fs.

Le faisceau est acheminé à l'aide de miroirs jusqu'à une lame demi onde et un TFP « *Thin Film Polarizer* » afin de gérer la puissance délivrée sur le reste du système. Puis une cellule de pockels en KDP [7] ainsi qu'un autre polariseur à film mince gère la fréquence du signal fixé à 1Hz.

On focalise le faisceau dans une cuve via une lentille de 20 mm. Le faisceau au plan focal est mesuré à $11\mu m$ pour un $M^2$ de 1.7. Une photodiode est installée en-dessous de la cuve dans le but de capturer le signal résiduel du laser. Le tout est, une nouvelle fois, synchronisé à l'aide d'une d'un générateur ISEO sur lequel on gère les délais entre chaque élément.

6. Bêta-borate de baryum
7. KH2PO4 : Phosphate de monopotassium

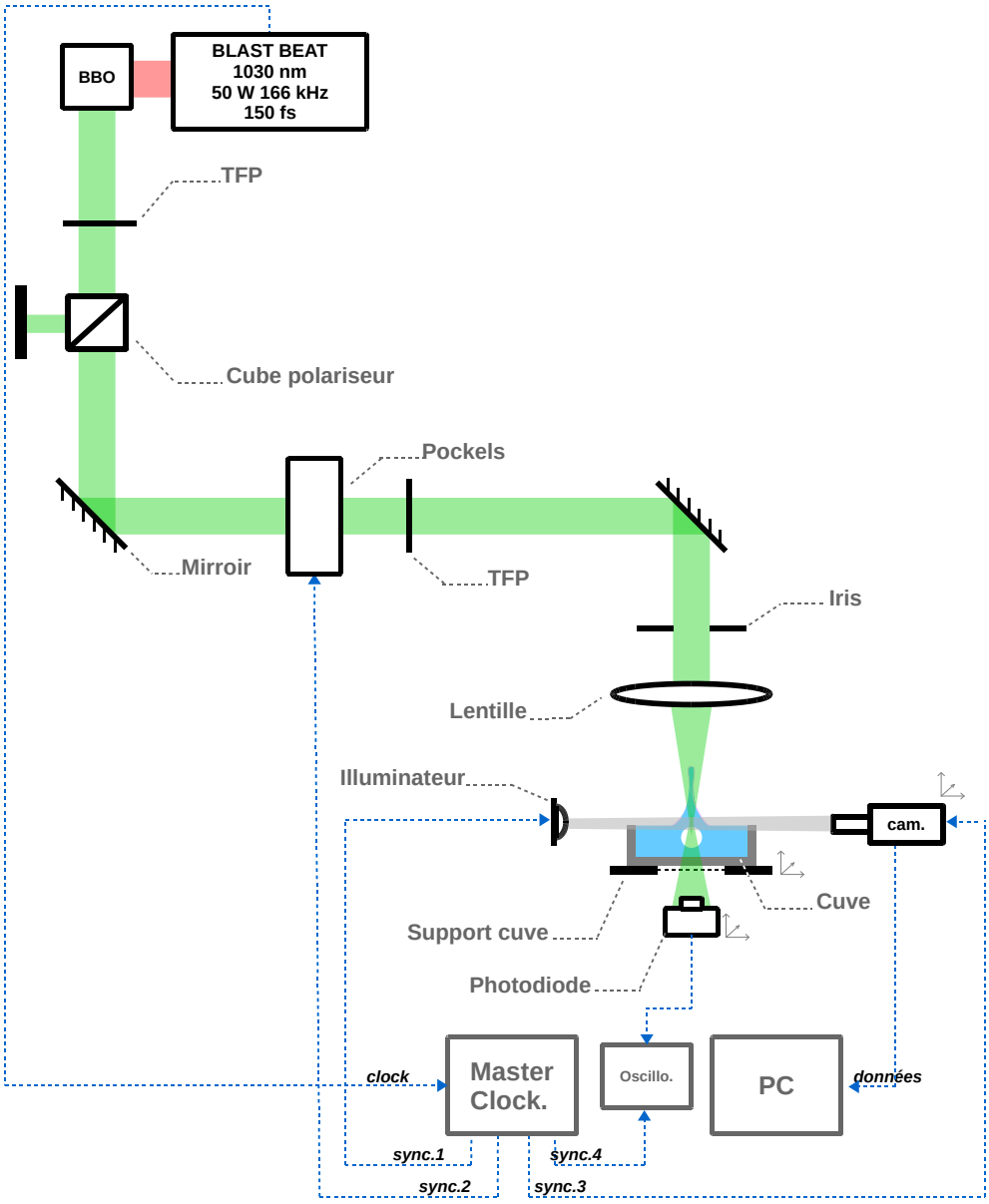



FIGURE 3.13 – Schéma de montage du banc d'essai 515 nm du CELIA

## 3.4 Culture biologique et encres

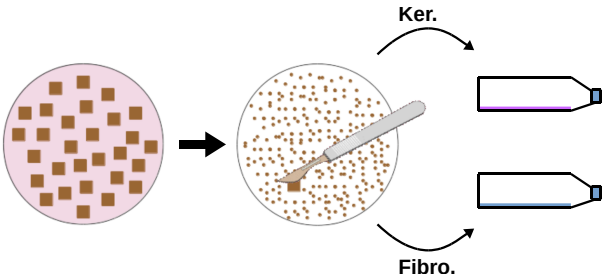



FIGURE 3.14 – Schéma basique d'une méthode de séparation de cellules d'explants

Les cultures de cellules sont obtenues à partir d'explants de peaux humaines issus de chirurgie plastique (plastie abdominale, mammoplastie ou prépuce), après consentement éclairé du donneur. Les explants sont dégraissés puis découpés en morceaux d'une dizaine de $mm^3$ puis trempés dans une solution de Trypsine mélangé à de l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique), mélange qui a pour rôle de couper les liaisons entre les cellules. Les différents types cellulaires sont séparés donnant d'un côté des fibroblastes et de l'autre des kératinocytes. Ces cellules sont ensuite filtrées puis mises en culture pour amplification. Dans les milieux de culture, on rencontre souvent les éléments suivants : le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) qui est un milieu de culture cellulaire nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules, le SVF (Sérum de Veau Ftal) qui est un réactif d'origine animal qui apporte des nutriments et facteurs de croissance essentiels aux cellules, ainsi que du rouge de phénol pour vérifier à l'oeil les éventuelles contaminations et changements de pH et enfin de la normocine, un antibiotique (antifongique et antibactérien). Pour assurer le bon développement des cellules, les milieux sont changés tous les deux jours et les flasques sont nettoyées avec du PBS (*Phosphate-buffered saline*) par la même occasion.

### 3.4.1 Culture primaire de fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules principales du derme (de la peau). Leur fonction principale est la synthèse de collagène, de l'élastine et des glycoprotéines de structure. Les fibroblastes sont capables de produire mais aussi de dégrader le collagène et la matrice extracellulaire avec laquelle ils interagissent par des récepteurs membranaires de type intégrine. Ils sécrètent donc aussi des collagénases et des protéases. Leur activité est intense au cours des phénomènes de cicatrisation ; ils participent également à la défense anti-infectieuse et antivirale de la peau. Les fibroblastes sont des cellules adhérentes qui, en culture, montrent une morphologie

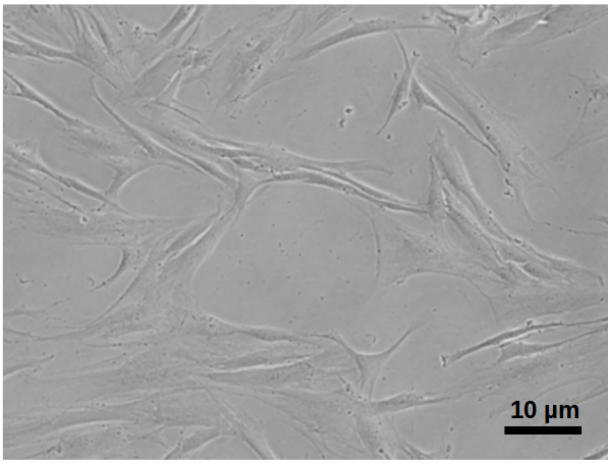



FIGURE 3.15 – Observation d'une culture de fibroblates

caractéristique en fuseau allongé (fig.3.15). Leur milieu de culture de prédilection est un milieu composé de DMEM, de SVF et de normocine. Lorsque la confluence de la flasque (le rapport entre l'espace occupé par les cellules et la surface totale de la flasque) avoisine les 90-100%, les cellules doivent être « passées » à l'aide d'un mélange Trypsine-EDTA pendant 2 à 3 minutes. Le nombre de passages est limité à 10 et la densité d'ensemencement des fibroblastes est de 3000 à 10 000 $cellules/cm^2$ selon les besoins.

### 3.4.2 Culture primaire de kératinocytes

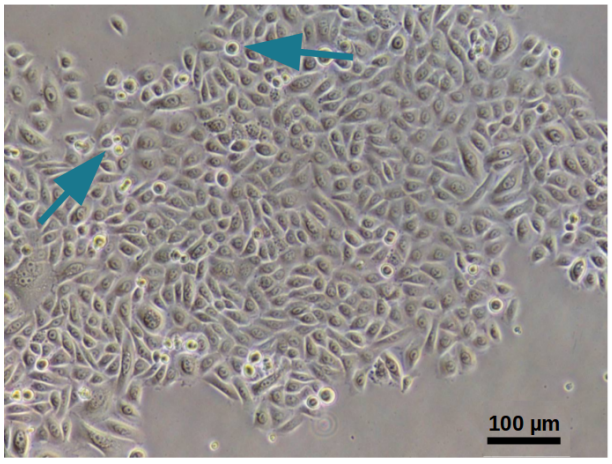



FIGURE 3.16 – Observation de kératinocytes en culture. Les flèches indiquent les cellules issues de la couche basale

Les kératinocytes (fig.3.16) représentent 90 à 95 % des cellules de l'épiderme (de la peau). Leur morphologie et leur rôle diffèrent en fonction de la zone de l'épiderme où ils sont localisés. Dans la couche basale, ils forment une assise de cellules cubiques ou prismatiques et sont hautement prolifératifs. Ils sont liés à la jonction dermo-épidermique par des hémidesmosomes. Dans la couche épineuse, ils sont répartis en trois à cinq assises de cellules polyédriques à noyau arrondi et semblent hérissés d'épines signalant la présence de desmosomes. Dans la couche granuleuse, ils sont répartis en une à trois couches de cellules granuleuses aplaties contenant des grains de kératohyaline et des granules lamellaires. Dans la couche cornée, couche externe de l'épiderme, ils sont sous forme de grandes cellules polyédriques plates complètement kératinisées, sans noyau, ni organite, ni kératohyaline : ce sont les cornéocytes. Lors de la mise en culture des kératinocytes primaires à partir de peau humaine, seules les petites cellules issues de la couche basale garderont leur potentiel de prolifération. Leur milieu de culture utilisé est le CnT-Prime© de la société CELLnTEC, dont le composé exact est non divulgué mais adapté à ce type cellulaire. Lorsque la confluence de la flasque avoisine les 70%, les cellules doivent être « passées » à l'aide d'un mélange Trypsine-EDTA pendant 5 minutes. Le nombre de passages est limité à 4 et la densité d'ensemencement des kératinocytes et 10 000 $cellules/cm^2$.

### 3.4.3 Préparation des encres

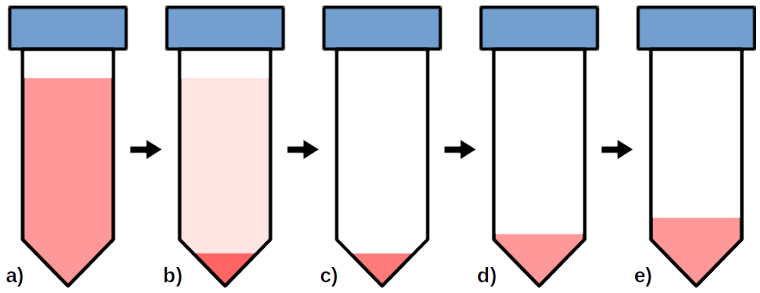



FIGURE 3.17 – Méthode de préparation des encres cellulaires. (a) Cellules passées (b) post centrifugeuse (c) élimination du surnageant (d) suspension dans un premier volume (e) encre cellulaire dans son volume final

Une fois les cellules à la bonne confluence (comme désigné précédemment), elles sont passées à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA puis comptées avec une cellule de Malassez. En fonction du nombre de cellules disponibles et de la concentration désirée, on calcule le volume final de la solution par

$$V_f = \frac{N_{cellules}}{C_f}$$

avec $V_f$ le volume final, $N_{cellules}$ le nombre de cellules comptées avec la cellule de Malassez et $C_f$ la concentration cellulaire finale. Le tube contenant les cellules, est centrifugé (1500 rpm pendant 5 min) afin de d'isoler les cellules. Après avoir éliminé le surnageant, on suspend de nouveau les cellules dans un volume $V < V_f$, que l'on prélève afin d'en connaître le volume à ajouter pour terminer la préparation de l'encre.

### 3.4.4 Test du « Live-Dead »

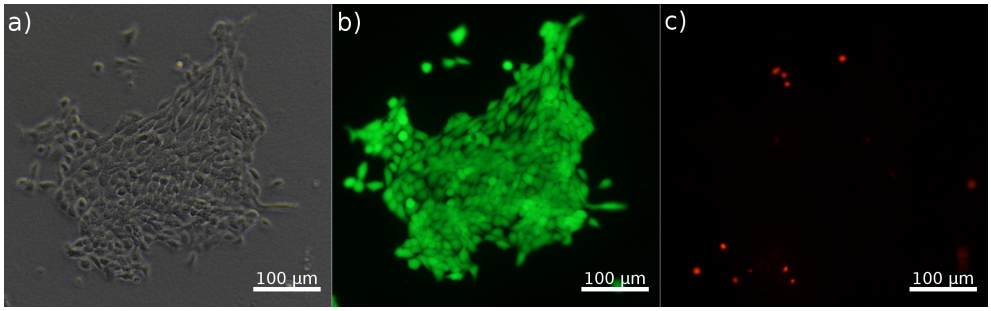



FIGURE 3.18 – Exemple de Live-Dead de fibroblastes 24h post impression (a) Photo normale (b) Vivants (c) Morts

Le test du live-dead permet de contrôler le nombre de cellules vivantes post impression. Le principe repose sur la fluorescence des cellules en fonction de leur état. On mélange de l'ethidium et de la calcéine à du milieu cellulaire, que l'on utilise comme bain pour les cellules imprimées. Après une quinzaine de minutes, on les retire et les observe sous une lumière émettant à 488nm et 521nm. L'ethidium pénètre dans la cellule lorsque la membrane est altérée (cellule morte), et lorsqu'il s'attache à son ADN, il fluoresce dans le rouge (fig.3.18c). Quant à la calcéine, elle est acceptée par la membrane cellulaire et y pénètre. Lorsque la cellule est vivante, les enzymes actives à l'intérieur coupent une liaison de calcéine qui fluoresce dans le vert (fig.3.18b). Sur six zones différentes de l'impression, on compte le nombre de cellules vivantes et le nombre de cellules mortes, que l'on compare à un échantillon témoin. De cette manière, on obtient le pourcentage de survie des cellules. Par convention, des tests sont effectués à 6h, 24h et 48h post impression. A partir d'une viabilité de 75%, on considère que le système est viable. Il faut noter qu'après un test de viabilité, l'échantillon est mort et on ne peut pas le réutiliser.

# Deuxième partie

# Génération et dynamique d'une bulle induite par laser

# Chapitre 1

# Générer une bulle dans un liquide, par laser

## 1.1 L'interaction laser-matière

Lorsqu'un laser interagit avec la matière, les photons excitent les cortèges électroniques des atomes et molécules qui le constituent. L'étude de cette interaction connaît depuis le début des années 1990 un développement important, lié à l'émergence de lasers impulsionnels de fortes puissances [44][45].

On retrouve parmi ces études, une branche appelée LIB « *Laser-Induced Breakdown* » traduit en français par « claquage induit par laser », définit par l'ionisation partielle ou complète d'un solide, d'un gaz ou d'un liquide traduit par la formation d'un plasma. Par définition le plasma est un quatrième état de la matière constitué d'un mélange entre noyaux et électrons qu'on ne rencontre naturellement que dans les étoiles et le milieu interstellaire.

L'eau, principal liquide constituant l'ensemble de notre étude, est une molécule composée de deux atomes d'hydrogènes et d'un atome d'oxygène. Chaque atome est constitué d'électrons situés sur différentes bandes orbitales et liés par une interaction électromagnétique. Le noyau d'un atome possède une charge électrique positive grâce aux protons qui le constitue, alors que les électrons ont une charge négative. Cette opposition de charge implique alors une attirance naturelle entre ces deux éléments, ce qui permet à l'atome dans un état fondamental, de ne pas perdre ses électrons. Mais lors d'un claquage optique, si l'énergie d'un photon est insuffisante pour arracher ces électrons du noyau, alors un autre processus physique se met en place, qu'on appellera, processus non-linéaire.

Dans les liquides transparents, comme ceux que nous allons étudier, des premiers modèles sont exposés par Kennedy [47] et Sacchi [48] permettant de mieux comprendre les phénomènes physiques qui régissent la formation d'un plasma. Ces

deux premiers modèles montrent une réelle avancée dans la compréhension de ces phénomènes, et sont complétés depuis une dizaine d'année, par les travaux de Vogel [49][50][51]. Ses travaux expérimentaux et les modèles qui en découlent se basent sur une première approximation, celle d'un liquide considéré comme un matériau diélectrique. Pour mieux comprendre cette notion, un rappel est nécessaire concernant les niveaux d'énergies d'un matériau.

### 1.1.1 Les niveaux d'énergies dans les matériaux

Dans un matériau, les niveaux d'énergies (ou orbitales moléculaires) occupés par les électrons forment des bandes d'énergies continues, séparées par des bandes d'énergies ne contenant aucune orbitale moléculaire (fig.1.1). La première bande

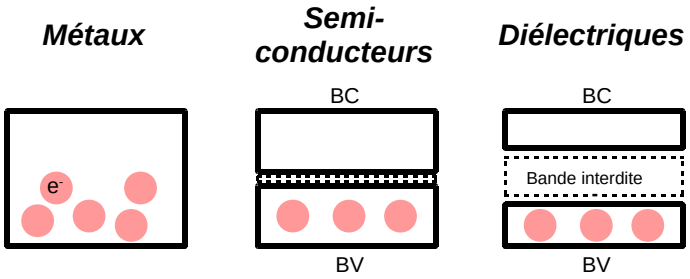



FIGURE 1.1 – Schéma de structures électroniques pour les métaux, semi-conducteurs et diélectriques

est appelée bande de valence (BV), elle est la plus remplie. La seconde, appelée bande de conduction (BC), est la bande non remplie. Enfin, la bande sans orbitale, est appelée bande interdite. Les électrons de la BV, sont dans des états localisés et participent à la conduction électrique du matériau, alors que ceux délocalisés dans la BC, participent à la conduction électronique. Les propriétés électriques et électroniques dépendent donc de la répartition des bandes et de celle qui les séparent. On peut sensiblement représenter les structures de trois façons : les métaux, les semi-conducteurs et les diélectriques.

Dans le cas des métaux, la bande de valence et la bande de conduction sont confondues, d'où le fait qu'ils soient d'excellents conducteurs.

Pour les semi-conducteurs, les bandes sont séparées par une bande interdite très faible qui est facilement surpassable en injectant de l'énergie pour transférer les électrons d'une bande à l'autre.

Enfin, les derniers qui retiendront notre attention dans le reste de la thèse sont les diélectriques. La bande de valence et de conduction sont séparées par une large bande interdite, difficilement surpassable à moins d'apporter beaucoup d'énergie ou plusieurs grappes d'énergie.

Mais cette représentation peut s'avérer parfois erronée dans le cas de matériaux impurs. Ces impuretés engendrent des niveaux intermédiaires d'énergies dans la bande interdite, réduisant ainsi le nombre de photons nécessaires pour ioniser (fig.1.2).

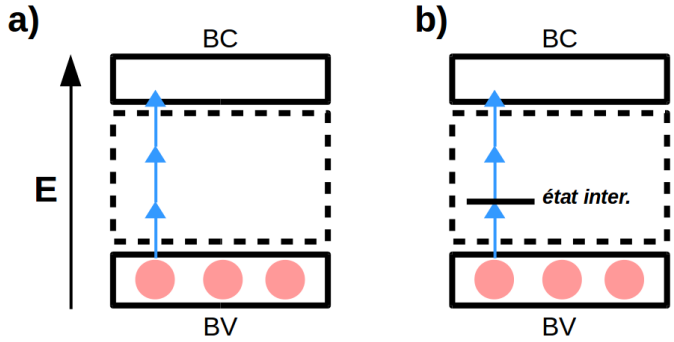



FIGURE 1.2 – Schéma d'une structure électronique d'un diélectrique (a) parfait, dont le nombre de transition est de 3 (b) présentant des impuretés.

### 1.1.2 Description qualitative du claquage optique dans l'eau

L'eau est un élément complexe, considéré comme diélectrique comme le suggère Sacchi [48] et Vogel [50], dont la bande interdite s'élève entre $6.5eV$ et $9.5eV$. Contrairement aux gaz, où le claquage optique produit des électrons libres et des ions, dans les liquides, la notion d'électron libre n'existe pas. On y retrouve aussi bien des électrons qui restent accrochés à une molécule que des électrons « quasi-libre », c'est-à-dire, possédant une énergie cinétique suffisamment grande pour bouger dans le liquide sans être capturées par des puits de potentiels [47]. On définit donc l'ionisation par la transition entre l'état lié des électrons à quasi-libre.

Etant donné la bande interdite de $6.5 - 9.5eV$ pour l'eau et les longueurs d'onde qui vont être étudiées (2000 nm, 1300 nm, 1030 nm et 515 nm), les énergies associées (de $0.7eV$ à $2.4eV$) sont insuffisantes pour franchir directement la bande interdite. Pour exciter un électron jusqu'à la bande de conduction, deux processus sont mis en avant, la photoionisation et l'ionisation par impact.

La photoionisation recense à ce jour deux processus, l'ionisation multiphotonique (MPI « *MultiPhoton Ionization* ») et l'ionisation par voie tunnel [53]. Brièvement, la MPI est le fait de passer la barrière d'énergie via l'absorption de plusieurs photons, et l'ionisation tunnel par la distorsion de cette barrière facilitant le passage d'un électron d'une bande à l'autre comme schématisé dans la figure 1.3. Pour différencier un cas de l'autre, Keldysh introduit un paramètre, portant son propre

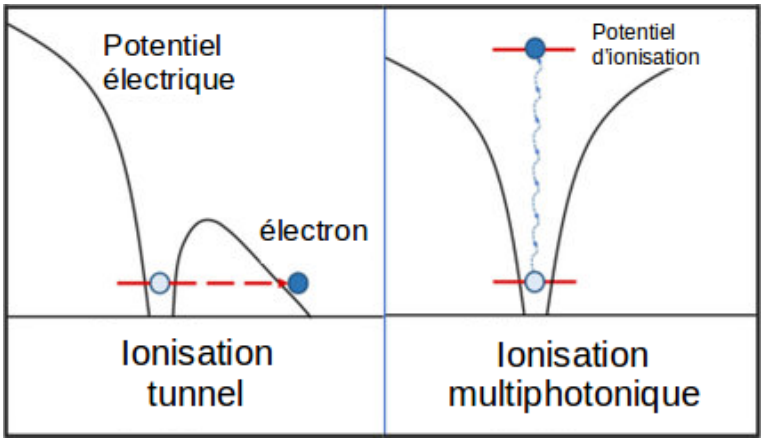



FIGURE 1.3 – Schéma explicatif de l'ionisation tunnel et multiphotonique. Extrait et traduit de [52]

nom [54]. On calcule ce paramètre par

$$\gamma = \omega \frac{\sqrt{2m_e\Delta}}{eE}$$

Avec $m_e$ la masse d'un électron, $e$ sa charge, $\Delta$ la valeur de la bande interdite, $\omega$ la fréquence du champ électromagnétique, et $E$ l'amplitude du champ électrique. La figure 1.4 représente la probabilité d'ionisation en fonction du paramètre de Keldysh $\gamma$, en utilisant le modèle proposé par Vogel [53], celui de Keldysh, ainsi que la seule contribution de l'effet tunnel et MPI. On y observe alors une dominance de l'effet tunnel pour $\gamma \ll 1$ et une MPI dominante pour $\gamma \gg 1$.

Comme illustré en figure 1.5, une fois l'électron amené dans cet état de quasi-liberté par photoionisation, il peut absorber des photons dans un processus de non résonance appelé « Bremsstrahlung inverse » lors de collisions avec des particules lourdes (ions et noyau atomique)[55]. L'électron gagne alors en énergie cinétique durant cette absorption et suite à des effets de Bremsstrahlung inverse répétés, cette énergie devient suffisante pour produire un nouvel électron quasi-libre lors d'une ionisation par impact [56].

Pour pouvoir réaliser une ionisation par impact, l'énergie apportée doit être supérieure à celle nécessaire pour surpasser la bande interdite. D'après la littérature et notamment celle de Kaiser [56], on suppose que pour l'eau, l'énergie cinétique critique que l'électron doit accumulée pour une ionisation par impact est de l'ordre de $E_{crit} = 1.5\Delta$.

Une fois cette ionisation réalisée, deux électrons sont disponibles dans la bande de conduction et peuvent gagner, de nouveau, en énergie cinétique par effet de Bremsstrahlung inverse. La combinaison de ces deux effets s'accumulent en une

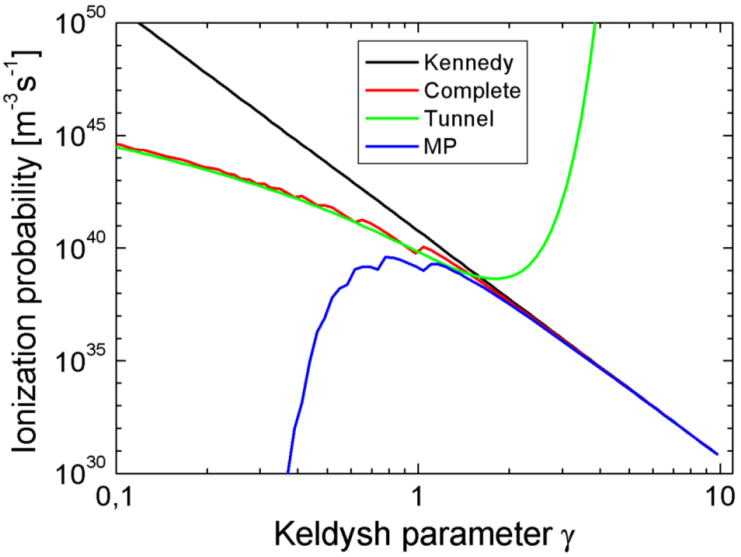



FIGURE 1.4 – Probabilité d'ionisation à $\lambda = 780$ nm, en fonction du paramètre de Keldysh pour différents modèles. Extrait de [50]

avalanche, augmentant le nombre d'électron quasi-libre dans la bande de conduction. On appellera ce processus « ionisation en cascade ». Cette cascade peut être ralentie voire arrêtée par différentes pertes. Ce pour quoi, une quantité suffisante d'énergie doit être apportée pour surpasser ces pertes. L'énergie générée via l'effet de Bremsstrahlung inverse doit être supérieure aux pertes d'énergies durant des collisions inélastiques ainsi qu'aux pertes liées aux recombinaisons électron-trou et aux diffusions en dehors de la zone d'intérêt.

L'augmentation du nombre d'électron quasi-libre, appelé plus simplement densité d'électron $\rho_e$, atteint une valeur critique de $10^{20} cm^{-3}$, critère de formation d'un plasma dans l'eau. La figure 1.6 représente l'évolution de la densité d'électron quasi-libre selon le modèle de Vogel [50] pour deux durées d'impulsions, 6ns et 100fs, et à deux longueurs d'onde différentes, respectivement 1064nm et 800nm. La figure a été normalisée en abscisse à la durée d'impulsion pour faciliter la visualisation, ainsi qu'à l'intensité seuil correspondant à une densité d'électron de $10^{20} cm^{-3}$. La courbe en pointillée représente la contribution de la photoionisation.

A première vue, la dynamique de formation du plasma est différente entre le régime nanoseconde et le régime femtoseconde. En nanoseconde, très peu d'électrons sont formés en dessous de l'intensité seuil (fig.1.6c) car insuffisants pour générer des électrons quasi-libre par photoionisation. Mais une fois atteint, la quantité augmente drastiquement (fig.1.6a) grâce à une ionisation en cascade. La plage de valeurs de génération de plasma est alors très mince en nanoseconde.

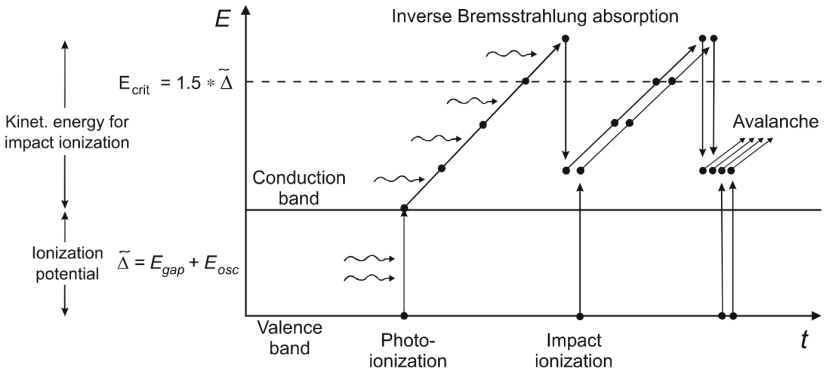



FIGURE 1.5 – Représentation schématique du processus de photoionisation, d'effet Bremsstrahlung inverse et d'avalanche pour la formation d'un plasma. Extrait de [50]

En régime femtoseconde, la figure 1.6b-d montre une réelle dépendance du processus de photoionisation, comparé au régime nanoseconde. Les intensités mises en jeux en femtoseconde sont plus élevées, d'où l'apport d'électrons quasi-libre initiateurs d'une avalanche avant même avoir atteint l'intensité seuil. De même, comme le montre la figure 1.6b, dans le régime femtoseconde, il y a continuellement un apport d'électrons initiateurs, permettant de commencer une avalanche même en dessous des seuils.

A ce stade, la différence entre ces deux régimes impulsionnels montre une dépendance des seuils de génération de plasma (ou d'une densité critique d'électron quasi-libre) en fonction de la durée d'impulsion. Toujours en discutant des travaux et des modèles de Vogel [53], la figure représente la variation du seuil de densité critique d'électron en fonction de la durée d'impulsion à différentes longueurs d'onde. Comme le montre la figure 1.7, extrait des mêmes travaux de Vogel, pour une durée d'impulsion $\tau < 10ps$, les seuils sont fortements dépendants de l'intensité, mais non de la fluence (énergie par unité de surface), en contraste avec les impulsions plus longues.

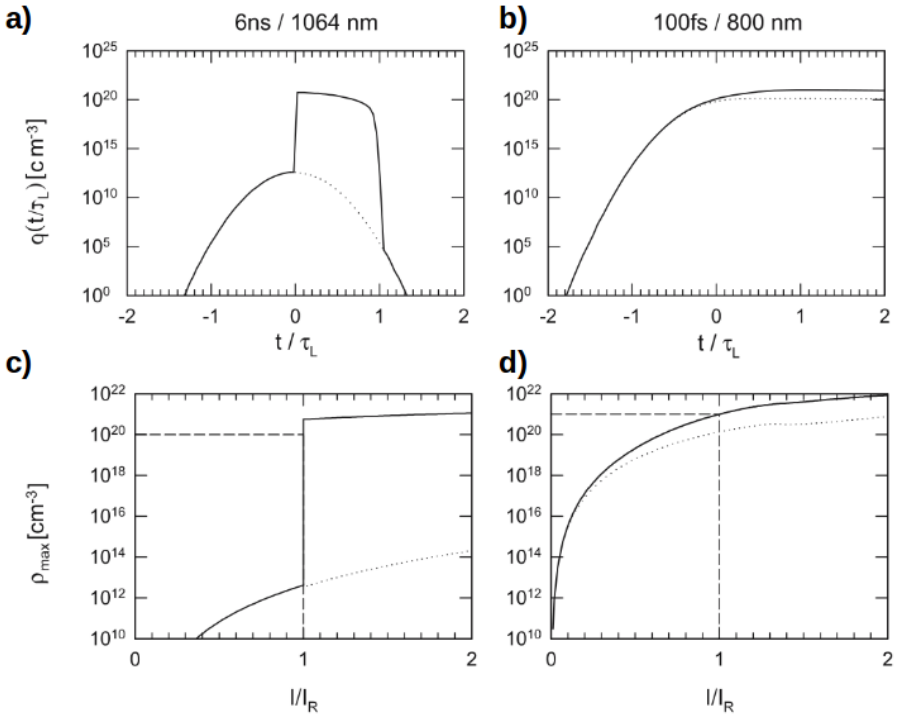



FIGURE 1.6 – (a-b) Evolution de la densité d'électron quasi-libre durant la durée d'impulsion du laser, à 6ns 1064nm et 100fs 800 nm. (c-d) Maximum de densité d'électron atteint pour une intensité donnée. Les courbes en pointillées représentent la contribution de la photoionisation. Extrait de [50]

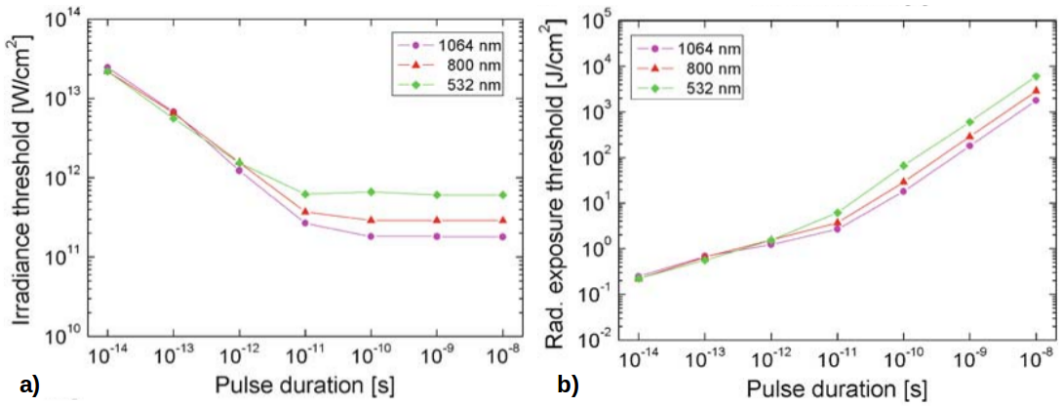



FIGURE 1.7 – Seuil de densité critique d'électrons en fonction de la durée d'impulsion pour différentes longueurs d'onde (a) pour des intensités seuils (b) pour des fluences seuils. Extrait de [50]

## 1.2 Seuils de génération des bulles

Rapidement après les premières recherches sur l'interaction laser-matière dans les solides et les gaz, le début des études en milieu aqueux a commencé dans les années 1960 [57] [58] [59] [60] [61]. Ces différentes expériences mettent en lumière la formation d'un plasma lorsqu'un faisceau laser impulsionnel est focalisé directement dans un liquide. De ce plasma, divers phénomènes physiques ont été observés, comme l'émission d'une lumière blanche, un claquement audible, la propagation d'onde de choc ou encore la formation de bulle. Chaque domaine a pu être investigué en profondeur, comme le résume Lauterborn et Vogel [62] mais souvent avec des caractéristiques expérimentales et des applications différentes.

Dans le cadre de la thèse, on s'intéresse exclusivement à la génération de bulle induite par laser pour comprendre les mécanismes qui régissent l'interaction entre le liquide et le laser tout en confrontant les résultats expérimentaux au modèle introduit précédemment de Vogel [53].

En définissant le seuil de génération de bulle comme étant la plus petite valeur en intensité pour laquelle une bulle est formée et observable avec le système du TRI[1] (à savoir une bulle de $5\mu m$ de diamètre), on s'intéresse aux intensités et fluences seuils de formations des bulles en fonction de différents paramètres lasers.

Pour rappel, l'intensité est le rapport de la puissance crête sur la surface considérée. On la définit selon la formule suivante,

$$I(W/cm^2) = \frac{P_{crete}}{S} = \frac{E/\tau}{S}$$

Avec E l'énergie appliquée, $\tau$ la durée d'impulsion et S la surface du faisceau.

La fluence est par définition l'énergie par unité de surface qu'on retrouve sous la forme

$$F(J/cm^2) = \frac{E}{S}$$

La taille du faisceau au plan focal est en général mesurée et on rappelle que dans le cas d'un faisceau gaussien, la surface considérée dans la formule de la fluence est donnée par la relation

$$S = \frac{\pi D^2}{2}$$

avec D le diamètre du faisceau mesuré.

1. *Time Resolved Imaging*, expliqué en introduction

### 1.2.1 Impact de la durée d'impulsion

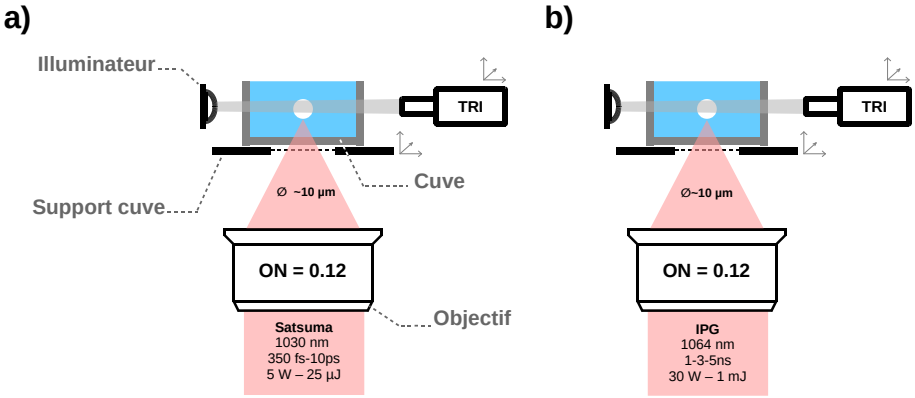



FIGURE 1.8 – Schéma du système de génération de bulle induit par laser dans une cuve remplie d'eau. Deux lasers sont utilisés, d'abord un Satsuma allant de 350 fs à 10 ps, puis un IPG de 150 ps à 5 ns.

Afin d'étudier l'impact de la durée d'impulsion, les seuils de génération de bulle sont mesurés en focalisant un faisceau laser issu, dans un premier temps d'un laser Satsuma puis d'un IPG (fig.1.8). L'objectif de focalisation utilisé est un objectif télécentrique dont l'ouverture numérique est calculée à 0.12. La taille du faisceau en entrée d'objectif est de $10mm$, et celui au plan focal est estimée à $10\mu m$. Le faisceau est focalisé dans une cuve en verre de 10x45 mm, pour une épaisseur de verre de 1.7mm. La cuve est considérée comme transparente aux longueurs d'onde utilisées (1030 et 1064 nm). Le seuil de génération de bulle est observé à l'aide du TRI en diminuant progressivement l'énergie du laser.

La figure 1.9 montre la dépendance en intensité du seuil de génération de bulle. On y observe dans un premier temps une intensité seuil qui décroît avec la durée d'impulsion et une fluence seuil qui augmente aussi avec la durée d'impulsion. Deux régimes se dessinent, celui inférieur à 10 ps et celui supérieur à 10 ps. Les barres d'erreurs sont issues des incertitudes de mesures sur la durée d'impulsion, estimée à 10%, de la définition de l'énergie seuil, qui fluctue selon le régime impulsionnel et du diamètre du faisceau au plan focal.

Au-dessus de 10 ps, l'intensité seuil suit une loi de la forme $I = \tau^{-0.2}$ et une loi en fluence de la forme $F = \tau^{0.7}$. On remarque que pour ce régime, le seuil est faiblement dépendant de l'intensité, et au contraire, fortement dépendant de la fluence. D'après le travaux de Vogel [49], Docchio [63] ainsi que ceux de Zysset [64], on retrouve la même dépendance sous la formule générique $I \propto \tau^n$ avec $0.6 < n < 0.7$. Dans l'étude de l'interaction laser-matière, il est connu que les seuils de dommages dans les solides, en régime nanoseconde suivent la même loi

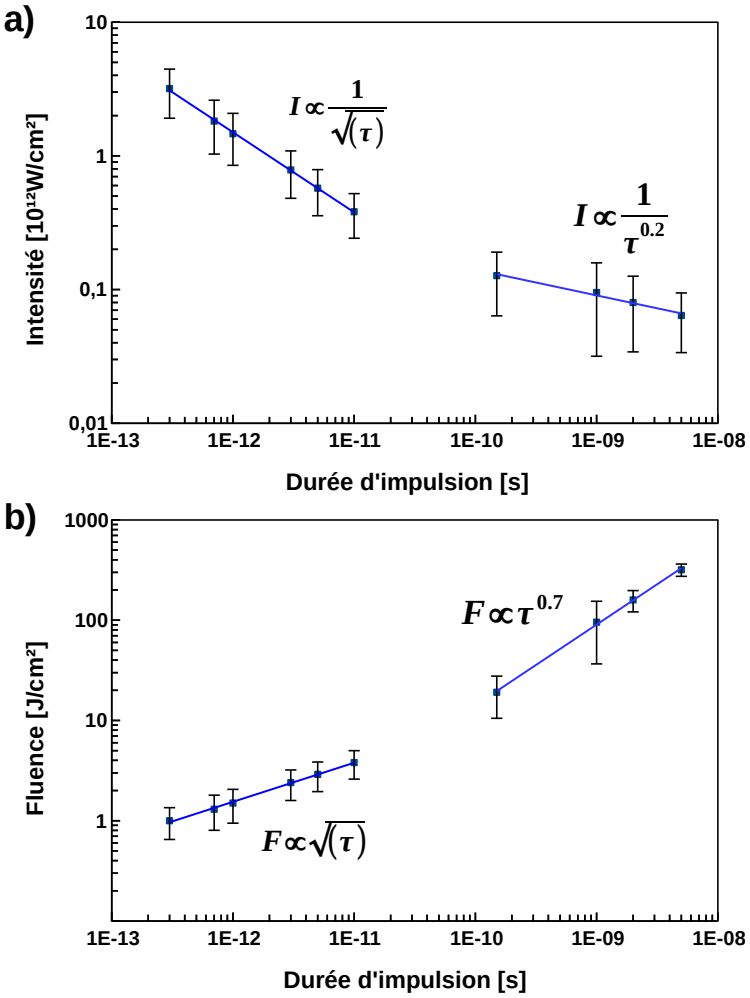



FIGURE 1.9 – Variation de l'intensité seuil (a) et de la fluence seuil (b) à différentes durée d'impulsion à 1030 nm pour des ouvertures numériques de 0.12

mais pour n=0.5, comme démontré par Koechner, [65] et plus récemment par Wood [66]. L'analogie est intéressante, car elle permet de confirmer l'importance du phénomène d'ionisation en cascade dans ce régime impulsionnel, mais elle met aussi en évidence une différence. Celle-ci peut être expliquée par les travaux de Van Stryland [67], qui montre une différence entre les seuils obtenus pour de grand volume focal ($n = 0.5$) et de plus petit volume ($n = 0.6 - 0.7$). Il explique cette différence par une probabilité plus importante de trouver des impuretés dans le cas de grand volume focal, aidant ainsi plus facilement l'ionisation en cascade qui nécessite des électrons libre pour s'enclencher. Les impuretés jouent donc un rôle essentiel dans l'initiation de la cascade. Dans le cas de l'eau, tout porte à croire

que si la fluence nécessaire pour générer un plasma est supérieure aux cas des solides, ceci met en évidence la nécessité de générer des électrons libres par un effet d'ionisation multiphotonique afin d'enclencher par la suite une cascade [50].

Comme montré par la figure 1.9, en dessous de 10 ps, l'intensité suit une loi de la forme $I = \frac{1}{\sqrt{\tau}}$ et la fluence suit une loi de la forme $F = \sqrt{\tau}$. Contrairement au régime précédent, l'intensité joue un rôle plus important sur le seuil de génération de bulle. Quant à la fluence, son impact est moins important que pour le régime $> 10ps$ mais joue tout de même un rôle. En théorie, dans le cas d'impulsions très courtes, la photoionisation prend de plus en plus le pas sur l'avalanche pour produire une densité suffisante d'électron libre [50] et la fluence ne devrait avoir aucun impact. En reprenant le cas des matériaux transparents, la littérature indique que dans le cas d'ionisation multiphotonique, le seuil en fluence suit une loi de la forme $F \propto e^{\tau}$ [66], mettant ainsi en avant la faible intervention de l'énergie sur ces seuils. Pour expliquer cette différence, entre notre cas et celui des modèles pour les matériaux transparents, Lenzner [68] montre que pour un matériau dont la bande interdite est de $9eV$, les seuils d'ionisations, pour des durées $\tau < 100fs$, sont exclusivement dépendant de la MPI, affirmation confirmée par les travaux de Stuart [69]. De plus, Du [70] montre que dans le cas de la Silice, pour des impulsions en dessous du régime picoseconde, la MPI favorise la génération d'électron libre avant que l'ionisation en cascade augmente la densité d'électron. Avec ces arguments, on comprend alors que pour l'eau et des impulsions courtes $300fs < \tau < 10ps$, la MPI favorise grandement à la génération d'une bulle, mais a tout de même besoin d'enclencher une ionisation par avalanche, d'où la compensation avec l'énergie.

Confrontons maintenant grâce à la figure 1.10 les données expérimentales de la figure 1.9 au modèle de Vogel exposé plus tôt en figure 1.7. On note quelques similarités, à savoir le changement de comportement à $10ps$, ainsi qu'une dépendance plus importante en intensité pour des durées d'impulsions courtes ($< 10ps$), et une fluence seuil qui augmente avec la durée. Néanmoins, dans le régime $< 10ps$, les seuils expérimentaux sont supérieurs par rapport au modèle de Vogel, et inférieurs dans le régime nanoseconde.

De plus, ces données s'accordent aussi avec les tendances d'autres chercheurs, comme montré en figure 1.11 [49] [64] [71] [72] [73] [63] [74] [75] [76] [77] [78].

Dans le régime nanoseconde, quelques différences sont notables entre tous ces résultats, avec une différence pouvant parfois atteindre un facteur 10. Cette différence montre bien qu'il est difficile, dans les milieux aqueux, de s'accorder sur une méthode, une définition et un calcul précis des seuils d'ionisation. Certains s'accordent sur la notion de génération d'un plasma pour définir le seuil d'ionisation quand d'autres préfèrent parler de bulle. Encore, expérimentalement, il a été noté que dans le régime nanoseconde, la définition du seuil est plus compliquée car le processus de génération de bulle est très instable.

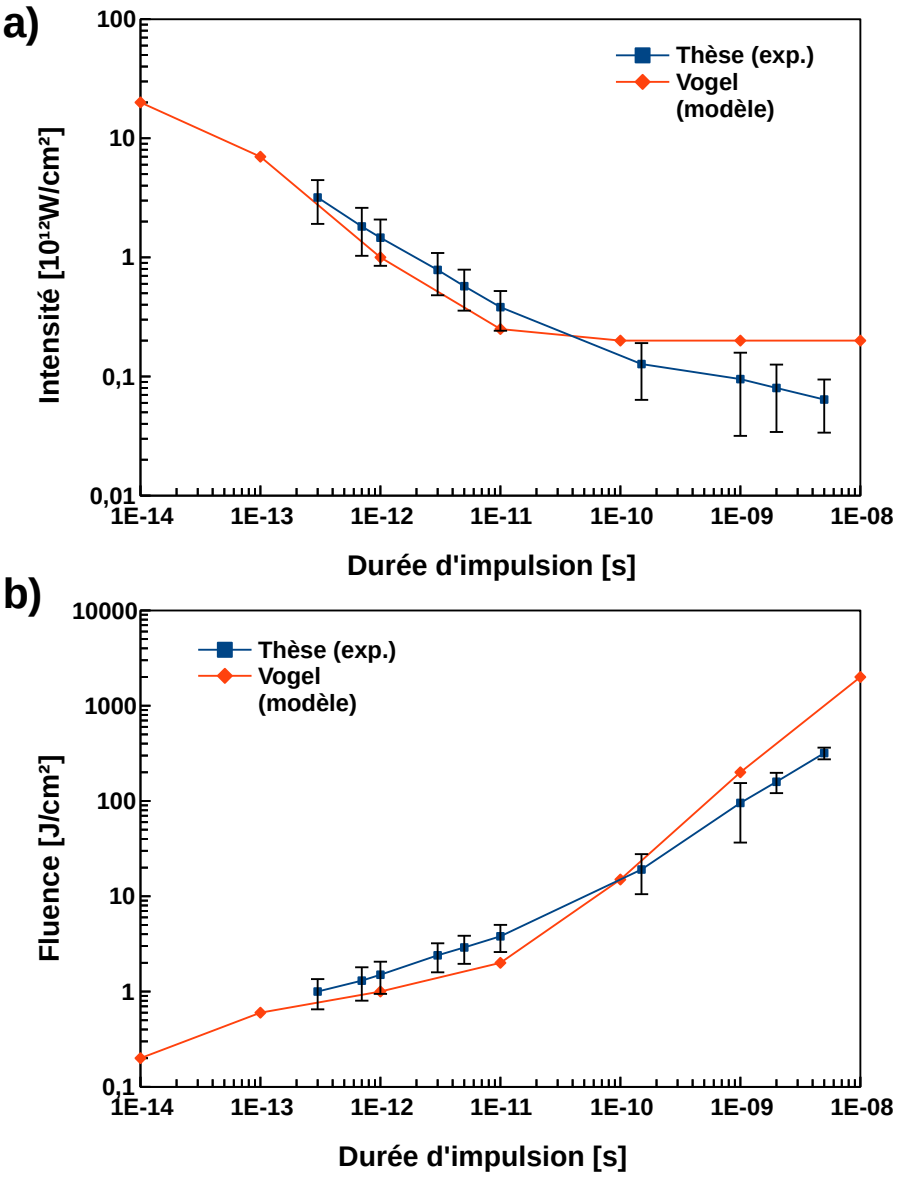



FIGURE 1.10 – Variation de l'intensité seuil (a) et de la fluence seuil (b) en comparaison au modèle numérique de Vogel [50]

Pour harmoniser les résultats de l'ensemble de la communauté, Vogel [50] préconise d'utiliser un faisceau de haute qualité, de mesurer la taille du faisceau focalisé et d'utiliser cette valeur pour calculer le seuil d'intensité et non pas la taille du faisceau théorique. L'ouverture numérique du système fait alors débat, car plus l'objectif utilisé est peu ouvert, plus le faisceau est sujet à des effets

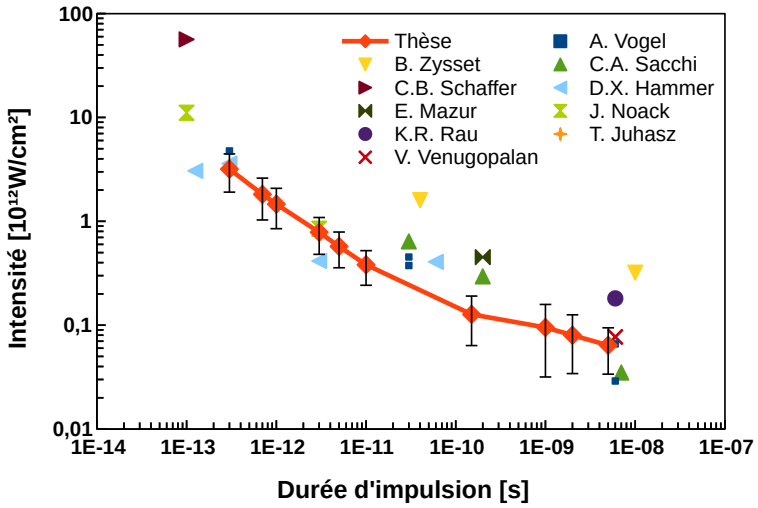



FIGURE 1.11 – Comparaison entre les intensités seuils de formations de bulle mesurées durant la thèse avec les données d'autres chercheurs

d'auto-focalisation. Pour éviter ces effets, des ouvertures plus grandes ($ON > 0.65$) doivent être utilisés comme le préconise Vogel [50] avec l'utilisation d'objectifs à immersion. Cependant, dans notre cas, aucun effet d'auto-focalisation n'a été observé. Mais si ça avait été le cas, les effets d'une auto-focalisation auraient pour conséquence une diminution de la taille du faisceau au plan focal et donc une sous-estimation des seuils mesurés. Etant donné la concordance des résultats avec la communauté ainsi que le modèle de Vogel, nous pouvons affirmer que pour une ouverture numérique de 0.12, il n'existe pas d'effet d'auto-focalisation et que nos données sont exploitables.

### 1.2.2 Variation de la longueur d'onde

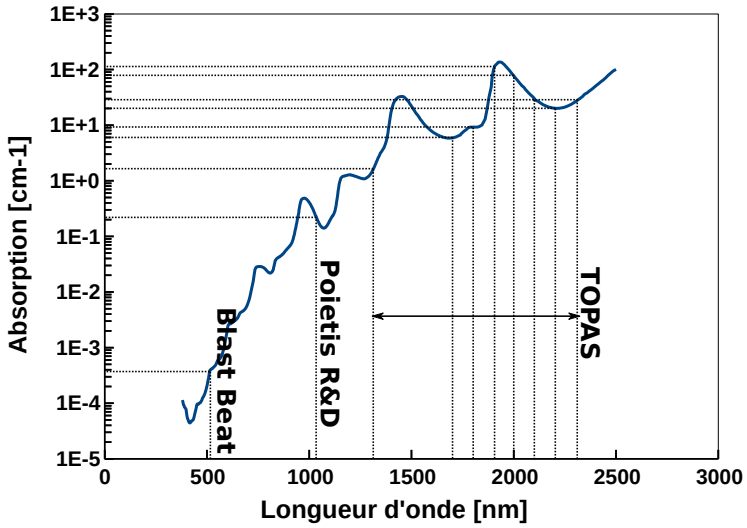



FIGURE 1.12 – Courbe d'absorption de l'eau en fonction de la longueur d'onde. En pointillé, les longueurs d'onde testées grâce aux différents montages expérimentaux. Les données sont extraites de [79] et [80]

Lorsque l'on s'intéresse à l'étude en longueur d'onde, la première notion qui nous vient à l'esprit est celle des seuils d'absorption à un photon, que l'on retrouve le plus souvent sous la forme de « spectre d'absorption ». Concernant l'eau, on peut retrouver grâce à littérature [79] [80] le spectre affiché en figure 1.12. On remarque que pour les longueurs d'onde que nous allons utiliser, le coefficient d'absorption de l'eau augmente d'un facteur 1000 entre 515 nm et 1030 nm, puis d'un facteur 100 entre 1030 nm et 2000 nm. A ce stade, nous ne pouvons savoir quel est l'impact de ces facteurs d'absorption sur nos seuils de formation de bulle, ce pourquoi nous réalisons trois campagnes d'expériences pour l'étudier.

La première est réalisée sur la chaîne à $515nm$ BlastBeat du CELIA, décrit dans la partie « Introduction » de la thèse et illustré en figure 1.13a. Un faisceau délivrant des impulsions de $150fs$ est focalisé dans une cuve de verre à l'aide d'une lentille de focale $20mm$ en passant par l'interface air-liquide. Cette disposition est différente de celle présentée précédemment, car à cette longueur d'onde, le verre de la cuve absorbe l'énergie du laser. La taille du faisceau focalisé est mesurée à $20\mu m$ de diamètre.

La seconde est réalisée sur la chaîne 1300-2000 nm Aurore du CELIA, illustré en figure 1.13b. Un faisceau à $1300nm$ et autour de $2000nm$ délivrant des impulsions de $60fs$ est focalisé par une lentille de $20mm$, directement dans une cuve via

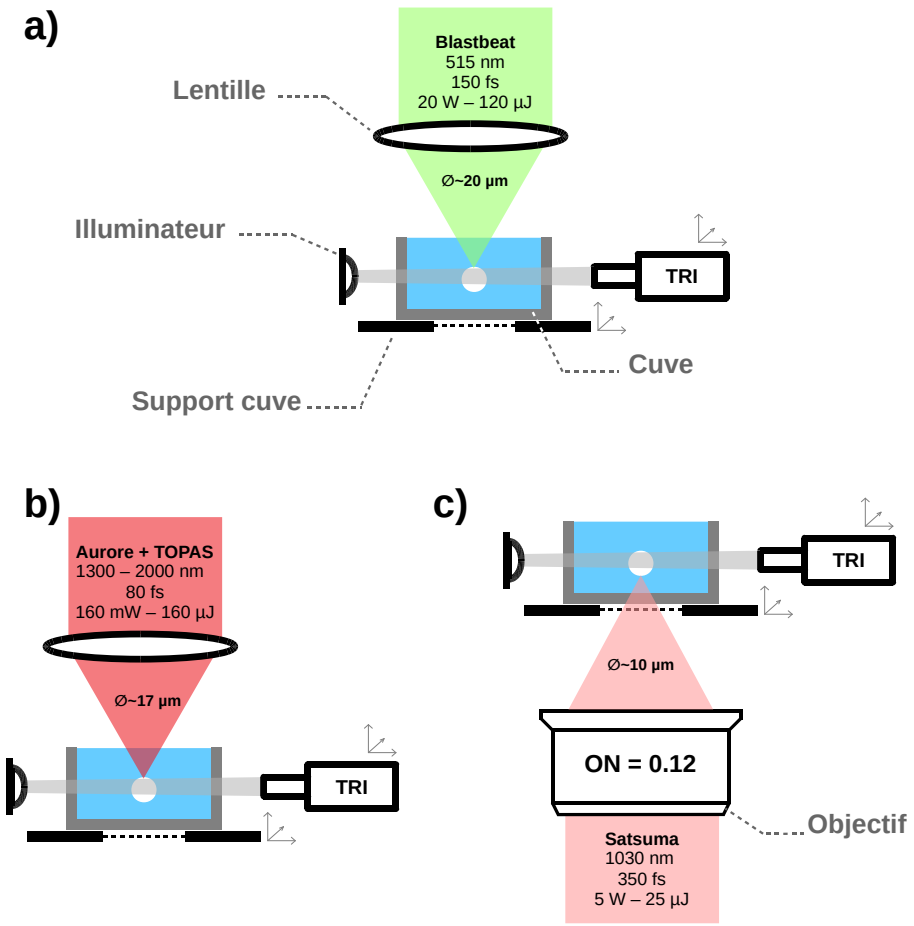



FIGURE 1.13 – Schéma simplifié de l'étude en longueur d'onde des seuils de génération de bulle (a) à 515 nm (b) à 1300 et autour de 2000 nm (c) à 1030 nm

l'interface air-liquide, pour les mêmes raisons qu'à $515nm$. Le diamètre du faisceau est mesuré à $17\mu m$.

La dernière campagne est réalisée sur le banc R&D de Poietis, avec le laser Satsuma d'Amplitude Systèmes émettant à $1030nm$, illustré en figure 1.13c. Des impulsions de $350fs$ sont focalisées à l'aide d'un objectif télécentrique de type F-Thêta dont l'ouverture numérique est de 0.12 dans une cuve remplie d'eau, à travers l'interface air-verre. Le diamètre du faisceau est estimé à $10\mu m$.

Pour ces trois systèmes, la détermination du seuil de génération de bulle est identique à la précédente, c'est-à-dire l'apparition d'une bulle (à partir de $1\mu m$ de diamètre) observé à l'oeil à l'aide du TRI, dont la résolution est de $0.7px/\mu m$.

Les résultats exposés en figure 1.14 montrent la variation de l'intensité seuil en fonction de la longueur d'onde dans le régime femtoseconde. Comme toutes les

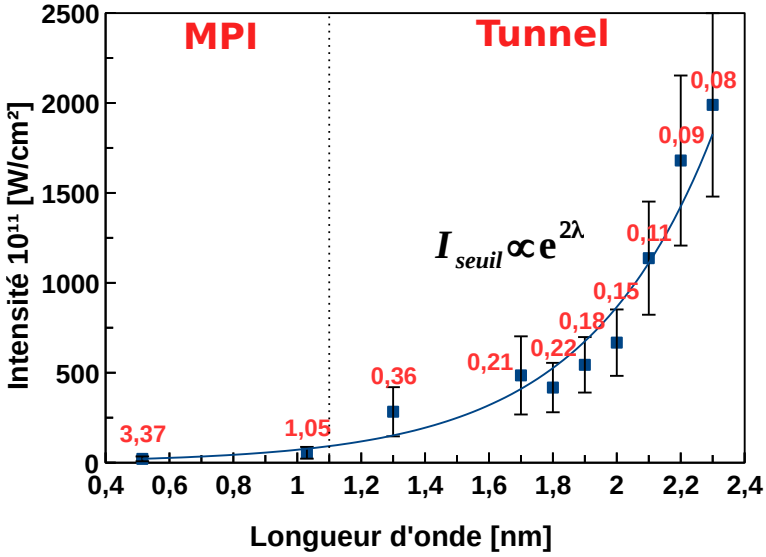



FIGURE 1.14 – Variation de l'intensité seuil en fonction de la longueur d'onde avec en étiquette le paramètre de Keldysh associé pour une bande interdite de 9.5 eV

valeurs ne sont pas à la même durée, on ajuste le seuil via les valeurs trouvées précédemment. Le paramètre de Keldysh a aussi été noté pour chaque valeur de seuil sur le graphique en tant qu'étiquette de donnée. Les barres d'erreurs sont obtenues par l'incertitude de mesure de l'énergie seuil, l'incertitude de mesure des durées d'impulsions et les incertitudes du diamètre du faisceau focalisé.

La figure fig. 1.14 montre une dépendance en $exp(2\lambda)$. Plus la longueur d'onde augmente, plus il devient difficile pour l'ionisation multiphotonique d'être efficace, car l'énergie du photon diminue avec la longueur d'onde qui augmente. De fait, la quantité de photons requise pour une MPI augmente elle aussi avec la longueur d'onde. La figure 1.14 nous renseigne aussi sur le paramètre de Keldysh, qui diminue lorsque la longueur d'onde augmente, ce qui conforte le fait que c'est l'effet tunnel qui domine lorsque la longueur d'onde dépasse les $1030nm$.

Aujourd'hui, il est encore difficile d'identifier précisément et d'être certain des phénomènes physiques responsables de cette augmentation du seuil en fonction de la longueur d'onde puisque lorsque l'effet tunnel domine les effets de photoionisation, la longueur d'onde ne devrait avoir aucun effet sur les seuils, et d'après les travaux de Linz [51] le modèle développé prédit une décroissance de l'intensité seuil en fonction de la longueur d'onde, comme le montre la figure 1.15.

Ce modèle peut être remis en question par le simple fait qu'il n'a expérimentalement pas été prouvé que cette décroissance soit réelle. En effet, dans la même revue, les seuils de formation de bulles ont été mesurés entre $355nm$ et $1085nm$ et ont effectivement montré une légère décroissance de 20%. Il est donc intéressant de

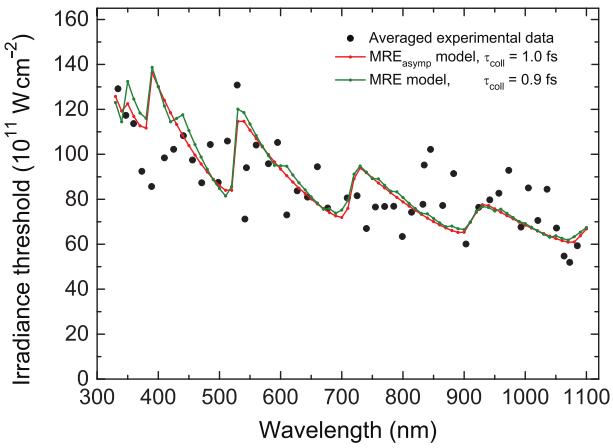



FIGURE 1.15 – Dépendance du seuil d'ionisation en fonction de la longueur d'onde. Les points noirs sont une moyenne expérimentale des données récoltées et les deux courbes sont un fit au modèle développé. Figure directement extraite de [51]

noter que pour compléter ce modèle, des expériences autour des mêmes longueurs d'onde que nous exposons seraient utile.

Cependant, toujours en comparaison avec le modèle de Linz ainsi que ses interprétations, il décrit une décroissance en intensité seuil dû à une ionisation par avalanche de plus en plus dominante et efficace sur la MPI. Nous ne pouvons contredire cette interprétation au vu des résultats de la figure 1.14 car l'énergie apportée pour compenser la chute de l'efficacité de la MPI serait en lien avec une ionisation par avalanche qui prendrait le dessus.

Quelques pistes et interrogations sont alors nécessaires pour identifier la différence entre les prédictions du modèle et notre étude expérimentale. A $2000nm$, au vu de la courbe d'absorption de l'eau exposée en figure 1.12, un phénomène d'absorption à un photon existe. Comme les seuils d'ionisation augmentent avec la longueur d'onde, on traduirait alors cet effet comme étant un frein à la création du plasma. L'énergie déposée par le laser est en partie utilisée pour ce type d'absorption, d'où la nécessité d'en apporter beaucoup plus pour ioniser. Une deuxième hypothèse provient d'une publication de Lai et Chien-Jen dans le domaine de la génération d'harmonique [81]. Ils expliquent la chute de l'efficacité de leur processus de HHG (*High Harmonic Generation*) en fonction de la longueur d'onde par la défocalisation du faisceau induit par la création d'un plasma. Cette défocalisation s'intensifie autour de $2000nm$. On pourrait alors aussi expliquer la variation de l'intensité seuil par cette défocalisation car si le faisceau défocalise, il faut de fortes intensités pour compenser les pertes.

Etant donné la nouveauté de cette expérience sur le sujet, il est totalement compréhensible qu'un modèle ne colle pas parfaitement aux données expérimen-

tales et que la compréhension des phénomènes soit encore floue. Pour preuve, la simple modélisation de l'eau comme un matériau diélectrique peut faire débat, puisque les premiers travaux de Sacchi [48] et Vogel [50] montraient une bande interdite de $6.5eV$, tandis que les travaux de Linz [51][82] en s'appuyant sur ceux de Elles [83] et Sander [84], utilisent une bande interdite de $9.5eV$.

L'étude de la génération de bulle dans un liquide semi-infini met en avant deux principales informations. La première réside dans les seuils de formation de bulle en fonction de la durée d'impulsion à 1030 nm. Les seuils en intensité sont inversement proportionnels à la durée d'impulsion. La seconde concerne l'impact de la longueur d'onde sur les seuils de génération de bulle dans le domaine du visible et du proche infrarouge. Maintenant que les seuils ont été investigués, la question se pose sur la suite de la formation de la bulle, sa dynamique et l'impact de l'énergie et des longueurs d'onde sur l'ensemble du procédé.

# Chapitre 2

# Comprendre et contrôler la dynamique d'une bulle

## 2.1 La dynamique d'une bulle dans un liquide semi-infini

Dans la vie de tous les jours, on rencontre une forte diversité de systèmes faisant interagir des bulles dans des liquides. Qu'elles soient générées par des effets mécaniques, chimiques, acoustiques ou optiques, la compréhension de cet élément est aujourd'hui un enjeux majeur dans divers secteur d'activité, comme l'industrie navale [85] ou le médical [86].

Les premières investigations autour de la dynamique d'une bulle remontent à la fin de la première guerre mondiale, et plus précisément en 1917 [87], où Lord Rayleigh modélise la dynamique d'une bulle dans un liquide. Depuis, un bon nombre de modèles numériques ont vu le jour [88],[89],[90],[91],[92], se basant tous sur les travaux de Rayleigh-Plesset.

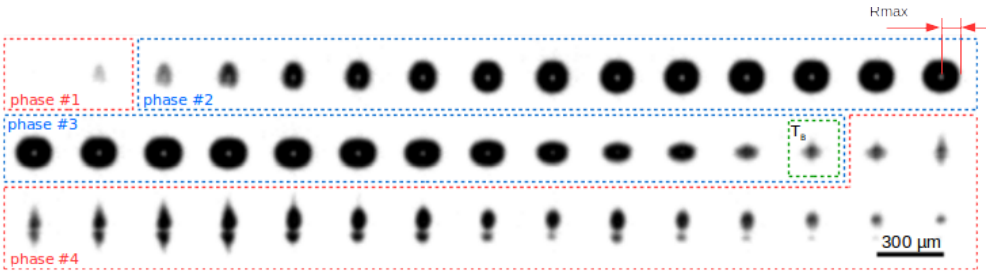



FIGURE 2.1 – Dynamique d'une bulle dans un liquide semi-infini générée par laser, et observée par caméra ultra-rapide grâce à la méthode « super tri ». La résolution temporelle de cette séquence d'acquisition est de 500 ns

Comme le montre la figure 2.1, la vie d'une bulle peut se résumer en quatre phases : sa formation (fig. 2.1 - phase 1), sa croissance (fig. 2.1 - phase 2), sa contraction (fig. 2.1 - phase 3) et son effondrement (fig. 2.1 - phase 4). La formation de la bulle concerne les premières microsecondes de sa vie, que l'on observe par l'apparition d'une tache noire de quelques micromètres. Elle est générée à partir du plasma qui évapore le liquide en question. Etant donné que la pression de vapeur saturante de l'eau est inférieure à la pression hydrostatique qui l'entoure ($0.1MPa$), une bulle se forme. Cette dépression entraînant la formation d'une bulle, est un phénomène qu'on retrouve dans la littérature sous le nom de cavitation [88][93].

Comme montré en figure fig.2.1-phase 2, une fois créée, la bulle croît et gagne en volume. C'est la différence entre la pression interne de la bulle et la pression externe qui induit l'augmentation de son volume. L'équation de la dynamique d'une bulle proposée par le modèle de Rayleigh [87] illustre ce lien par la relation,

$$\rho R\ddot{R} + \frac{3}{2}\rho\dot{R}^2 = p_i - p_e$$

avec $R$ le rayon de la bulle, $\rho$ la densité du liquide, $p_i$ la pression interne de la bulle et $p_e$ la pression externe exercée par le liquide.

La bulle atteint ensuite son volume maximal, qu'on mesurera par la suite via son rayon maximal, $R_{max}$ avec laquelle on calcule l'énergie de la bulle [94] par,

$$E_B = \frac{4}{3}\pi(p_0 - p_V)R_{max}^3$$

avec $R_{max}$ le rayon maximal de la bulle, $p_0$ la pression hydrostatique et $p_v$ la vapeur de pression à l'intérieur de la bulle (on supposera $p_v = 2330Pa$ pour une température de $20\,°C$, d'après les courbes de pression de vapeur de l'eau et $p_0 = 1bar = 0.1MPa$ [94]).

Après avoir atteint sa taille maximale, la pression interne à la bulle $p_v$ étant bien plus petite que la pression à ses bords $p_0$, la bulle se compresse. Cette phase est celle de la contraction (fig. 2.1-phase ). A partir d'un certain temps, noté $T_B$ sur la figure 2.1, la bulle commence à s'effondrer. Ce temps caractéristique est calculé à partir des travaux de Rayleigh [87], par la relation suivante,

$$T_B = 2 \times 0.915R_{max}\sqrt{\frac{\rho}{p_{stat} - p_v}}$$

avec $p_i = p_v$ et $p_e = p_{stat}$.

La figure 2.1-phase 4 montre qu'après l'effondrement de la bulle, deux plus petites sont créées. Elles gagnent à leur tour en volume avant leur disparation totale.

Par la suite, nous nous intéresserons seulement au volume et l'énergie de la bulle. Pour y arriver, deux méthodes s'offrent à nous. La première est une mesure

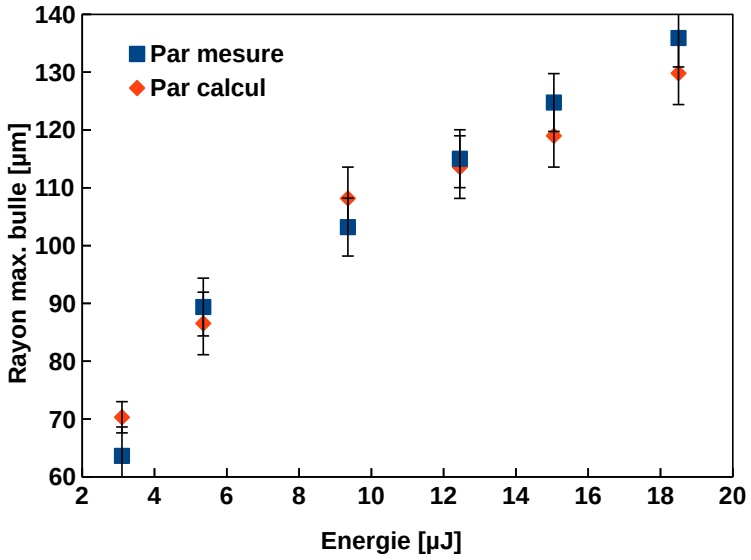



FIGURE 2.2 – Comparaison des méthodes pour la définition du rayon maximal de la bulle.

directe du rayon maximal de la bulle. La seconde est le calcul de ce rayon par le temps $T_B$ présenté plus haut. Comme le montre la figure 2.2, les deux méthodes fonctionnent très bien et montre des résultats très proches. En effet, l'écart entre les valeurs mesurées et celles calculées ne dépassent pas les 9%. Afin de déterminer la meilleure méthode, on calcule les incertitudes de mesures qui y sont liées.

Dans le cas d'une mesure directe du rayon maximal, seule l'incertitude de mesure est prise en compte. Elle est directement liée à la résolution de la caméra et à la conversion en pixel sur un logiciel de traitement d'image. Concernant le TRI, cette conversion est de $1.4\mu m/px$ tandis que celle de la caméra ultra rapide est de $10\mu m/px$. Donc respectivement, pour une erreur d'un pixel, celle sur le rayon est de $1.4\mu m$ et $10\mu m$.

Dans le cas d'un calcul à partir du temps $T_B$, c'est l'outil de détermination de cette donnée qui va être le seul élément d'incertitude. Pour le TRI, la résolution temporelle est de $1\mu s$, correspondant ainsi à une équivalence de $5.5\mu m$, tandis que pour la caméra ultra rapide, avec le mode de fonctionnement basique, la résolution temporelle est de $5.5\mu s$ soit $30\mu m$, tandis que dans le mode de fonctionnement « super TRI », la résolution est de $500ns$ soit $2.7\mu m$.

En comparant le cas avec mesure directe du rayon et celui du calcul par $T_B$, il est plus judicieux de mesurer directement le rayon de la bulle lorsque le TRI est utilisé, de même pour une utilisation « basique » de la caméra ultra-rapide. Mais pour gagner en précision, en utilisant le mode « super TRI » on utilise le temps $T_B$.

## 2.2 Impact de l'énergie à différentes longueurs d'onde et durées d'impulsions

Une fois passés les seuils d'ionisation, la question se pose sur l'apport d'énergie supplémentaire sur la dynamique de la bulle. Tout comme la partie précédente, différents paramètres lasers sont étudiés, comme l'énergie, la durée d'impulsion ou encore la longueur d'onde, afin d'en connaître l'impact sur la dynamique de la bulle et plus précisément sur son volume et son énergie. En plus des paramètres lasers, deux objectifs de focalisation sont testés. Post expérience, les données sont traitées à l'aide du logiciel de traitement d'image, Fiji, afin de récupérer les informations nécessaires à la réalisation des graphiques qui vont suivre.

### 2.2.1 Variation de la durée d'impulsion et de l'énergie

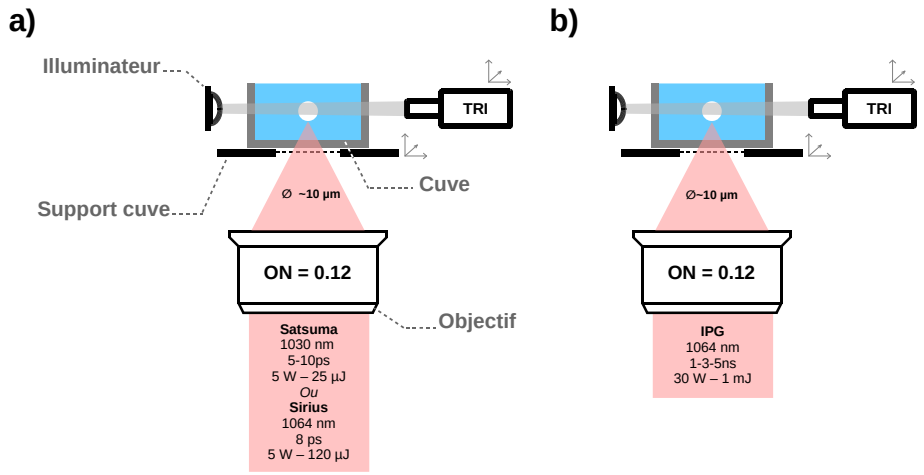



FIGURE 2.3 – Schéma d'expérience pour la variation de l'énergie (a) dans le domaine picoseconde et femtoseconde (b) dans le domaine nanoseconde

Trois lasers sont utilisés successivement dans les mêmes configurations. Un faisceau de $10mm$ de diamètre est amené sur un objectif télécentrique d'ouverture numérique 0.12, focalisant le faisceau directement dans une cuve remplie d'eau. Le faisceau au plan focal est estimé à $10\mu m$. Le Satsuma délivre des impulsions de 0.350, 0.700, 1, 3, 5 et 10 ps pour des énergies maximales sur échantillon de $19\mu J$. Le Sirius délivre des impulsions de 8 ps pour une énergie maximale de $88\mu J$. Enfin, l'IPG délivre des impulsions de 1, 2 et 5 ns pour des énergies sur cible respectivement de $250\mu J$, $420\mu J$ et $930\mu J$.

On étudie la dynamique des bulles à l'aide du TRI, en capturant, pour un $\Delta t$ donné, les images acquises par la caméra. Chaque séquence est ensuite traitée via

un logiciel de traitement d'image, Fiji. On mesure automatiquement le diamètre maximal des bulles en fonction du temps pour chaque énergie étudiée, en allant du minimum au maximum que puisse délivrer chaque configuration.

A partir du diamètre maximal de la bulle, on calcule son énergie via la formule exposée dans la sous-partie précédente afin de construire le graphique de la figure 2.4.

Aucune barre d'erreur n'est visible sur le graphique 2.4 car l'erreur totale de mesure ne prend en compte que la résolution de la caméra et l'automatisation du traitement d'image, qui est inférieur à 1%. Une étude répétée aurait pu, par l'expérience, déterminer un écart-type réaliste.

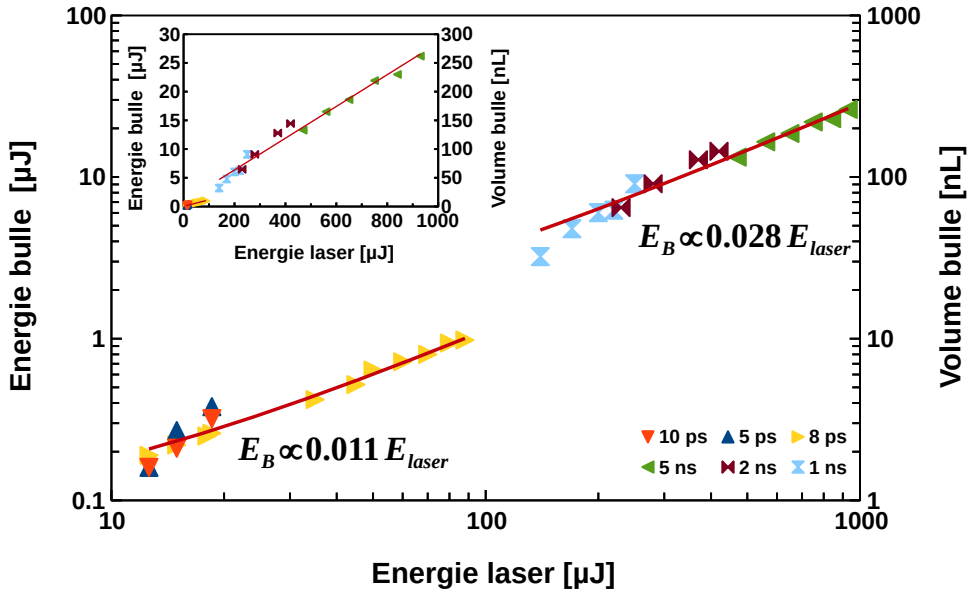



FIGURE 2.4 – Calcul du volume maximal d'une bulle et comparaison entre le régime picoseconde et nanoseconde. La courbe insérée en haut à gauche est la version linéaire de cette même figure.

En observant la figure 2.4, on remarque dans un premier temps que l'énergie de bulle augmente de manière linéaire en fonction de l'énergie appliquée par le laser. Dans le domaine picoseconde, cette linéarité peut se simplifier par la relation $E_B \propto 0.011 \times E_{laser}$, tandis que dans le domaine nanoseconde, on trouve la relation $E_B \propto 0.028 \times E_{laser}$. A ce stade, on peut introduire la notion d'efficacité de transfert d'énergie $\eta$ définit comme étant le rapport de l'énergie de la bulle sur celle du laser $\eta = \frac{E_{bulle}}{E_{laser}}$. En nanoseconde il semblerait que l'efficacité de ce transfert soit de 2.8% contre 1.1% dans le régime picoseconde. Etant donné ces différences, on peut supposer que le régime nanoseconde est plus efficace que le

régime picoseconde. Néanmoins, pour pouvoir affirmer cette hypothèse, il faudrait comparer les efficacités pour les mêmes valeurs d'énergies.

Toujours en observant la figure 2.4, on remarque aussi une rupture abrupte de l'énergie de bulle en régime nanoseconde. En effet, expérimentalement nous n'avons observé aucune bulle en dessous de $33nL$ à 1 ns, $66nL$ à 2 ns ou encore $135nL$ à 5 ns. Cette observation nous apporte donc la confirmation qu'il n'est pas possible d'atteindre des petites bulles ($V < 10nL$) avec des impulsions longues. Pour expliquer cette différence avec le domaine picoseconde, on peut supposer qu'elle est directement liée au type de dépôt et de transfert d'énergie. Dans le régime nanoseconde, le transfert de l'énergie se fait pendant toute la durée de l'impulsion. Pour des impulsions longues, les seuils d'ionisation sont fortement dépendant de l'énergie déposée et nécessitent des énergies plus importantes que pour les impulsions picoseconde et femtoseconde. Donc proche des seuils, la quantité d'énergie transférée au système est bien plus importante en nanoseconde qu'en picoseconde.

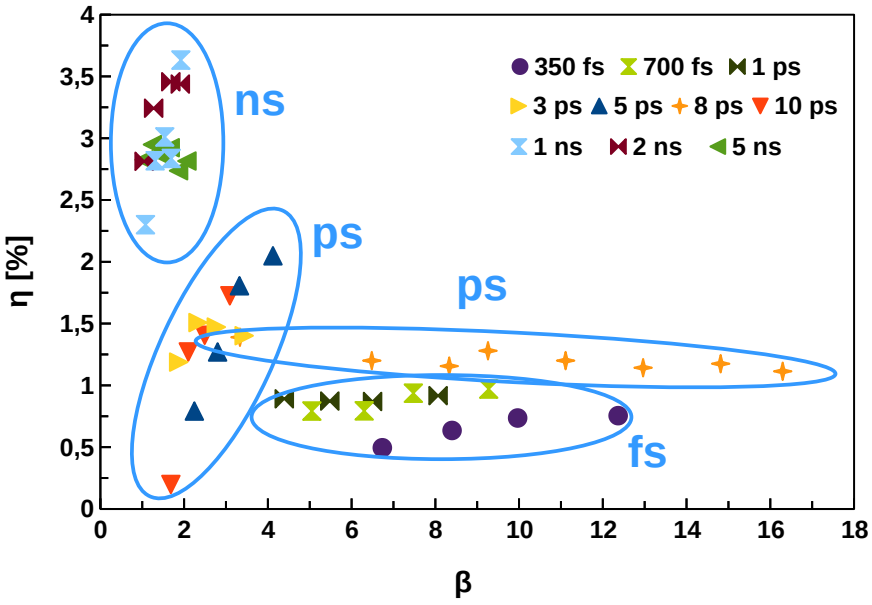



FIGURE 2.5 – Comparaison à différentes durées d'impulsion du pourcentage d'énergie transmise du laser à la bulle

Pour compléter cette étude, la figure 2.5 représente l'efficacité $\eta$ du transfert d'énergie en fonction de $\beta = \frac{E_{laser}}{E_{seuil}}$. On y observe trois comportements différents pour les 3 types de durées d'impulsions. Dans le domaine nanoseconde, on trouve une efficacité proche de 3% mais avec une certaine instabilité. En effet, pour différentes valeurs de $\beta$, l'efficacité $\eta$ varie de 2.2 à 3.3 pour une durée de $1ns$, ainsi que de 2.7 à 3.5 pour une impulsion de $2ns$. Cependant, à $5ns$, $\eta$ semble se stabiliser.

Le régime femtoseconde (y compris $1ps$, considéré dans ce cas comme de la longue femtoseconde) présente le pourcentage de transfert d'énergie le plus faible, avec une moyenne de $0,75$. Aucune fluctuation n'est observable en fonction de $\beta$ ce qui nous mène à penser que ce régime est le plus stable.

Enfin, le domaine picoseconde présente des disparités. Pour $\beta < 4$, la tendance montre que l'efficacité augmente avec $\beta$. Mais pour $\beta > 4$ le transfert d'énergie se stabilise, comme on peut l'observer pour $3ps$ et surtout $8ps$. Dans tous les cas, pour $\beta > 2$, le régime picoseconde est plus efficace qu'en femtoseconde mais moins qu'en nanoseconde.

Aussi bien en nanoseconde qu'en picoseconde, pour pouvoir compléter ce travail, il faudrait investiguer des énergies supérieurs à $\beta = 4$ pour confirmer cette différence entre les trois régimes. Mais pour y arriver, il faudrait disposer de plus de puissance pour atteindre ces valeurs, ce que nous n'avons pu faire jusqu'à aujourd'hui.

Pour compléter ces observations et expliquer cette dépendance en durée d'impulsion, Noack [95] montre lors de ses études, que cette différence est liée au pourcentage de transmission du faisceau. En nanoseconde ce coefficient est plus bas qu'en picoseconde puis en femtoseconde (4% à $76ns$ contre 77% à $3ps$ et 59% à $300fs$). Ceci montre que dans le régime nanoseconde, l'énergie déposée est beaucoup plus absorbée que dans les régimes plus courts. En effet, comme exposé précédemment, pour des impulsions nanosecondes, une fois le plasma généré, l'énergie continue d'être déposée. Ce n'est donc plus le liquide qui absorbe l'énergie mais le plasma. Celui-ci étant opaque, l'absorption y est donc favorable. Tandis que pour des impulsions courtes, le plasma est créé après le dépôt de l'énergie, donc plus favorable à la transmission de l'énergie à travers le liquide.

En conclusion, on retiendra de ces analyses que le régime nanoseconde convertit plus efficacement l'énergie du laser en énergie de bulle, produisant et transportant ainsi plus de volume que pour des régimes plus courts. Les régimes picoseconde et femtoseconde présentent un avantage majeur qui est celui de produire des bulles de quelques nanolitre pour des énergies très faibles, de l'ordre du microjoule.

L'ensemble des résultats montrés dans cette sous partie soulèvent trois points importants. Les impulsions femtosecondes et picosecondes peuvent générer des petites bulles et déplacer des petits volumes, contrairement au régime nanoseconde qui ne peut déplacer que des gros volumes. Néanmoins, quel que soit le régime, plus le laser apporte de l'énergie, plus la bulle grossit. Si on suit la loi linéaire régissant le diamètre des bulles avec l'énergie, on peut facilement imaginer la possibilité de générer des bulles aussi grosses en femtoseconde et picoseconde qu'en nanoseconde. Enfin, la dernière information concerne le rendement énergie déposée et énergie de la bulle, qui est plus intéressant en nanoseconde car plus efficace que le régime picoseconde puis le régime femtoseconde. Par contre, le système parait instable très

proche des seuils, donc pour générer les plus petites bulles pour chaque durées. Il faudra donc porter une attention particulière à cette conclusion. Face à l'ensemble de ces points, on privilégiera les durée courtes pour déplacer de petits volumes et gagner en précision, contre des durées courtes, plus efficaces, qui nécessitent beaucoup d'énergie mais déplacent beaucoup de volume.

### 2.2.2 Variation de l'ouverture numérique

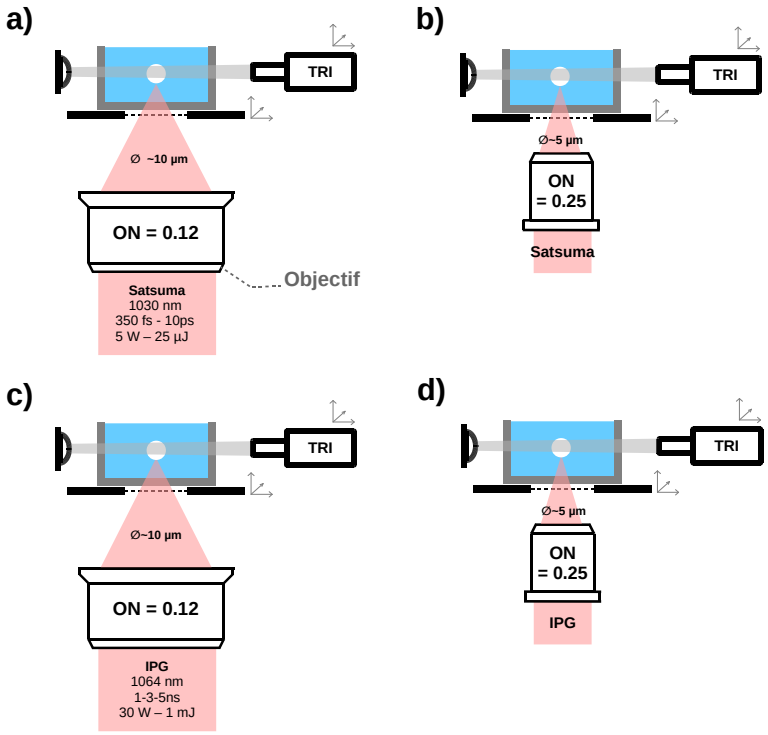



FIGURE 2.6 – Schéma de montage afin d'évaluer l'impact de l'ouverture numérique (a et c) Avec un objectif télécentrique d'ouverture 0.12 (b et d) Avec un objectif de microscope d'ouverture 0.25.

Dans cette étude, on fait varier le type de focalisation en modifiant l'objectif, comme montré sur la figure 2.6. On focalise dans une cuve remplie d'eau un faisceau issu de la source Satsuma, délivrant des impulsions de $350fs$ à $10ps$ pour des énergies de $25\mu J$ sur cible, avec dans un premier temps, un objectif télécentrique d'ouverture numérique 0.12 avec une taille de faisceau au plan focal estimée à $10\mu m$, puis dans un second temps, un objectif de microscope Thorlabs (LMH-10X-1064) d'ouverture numérique 0.25 avec une taille de faisceau au plan focal estimé à $5\mu m$. Dans la même configuration, on focalise ensuite un faisceau issu de la source IPG, délivrant des impulsions de $1ns$ à $5ns$ jusqu'à $1mJ$.

A l'aide du TRI, on regarde à travers la cuve la dynamique de la bulle avec la même méthode qu'utilisée précédemment. On compare alors les énergies et volumes des bulles en fonction de l'énergie pour les deux objectifs testés.

Comme le montre la figure 2.7, le volume et l'énergie de la bulle augmentent en fonction de la fluence, aussi bien pour une ouverture de 0.12 que de 0.25. On remarque aussi une indépendance en fonction de l'ouverture numérique étant donné

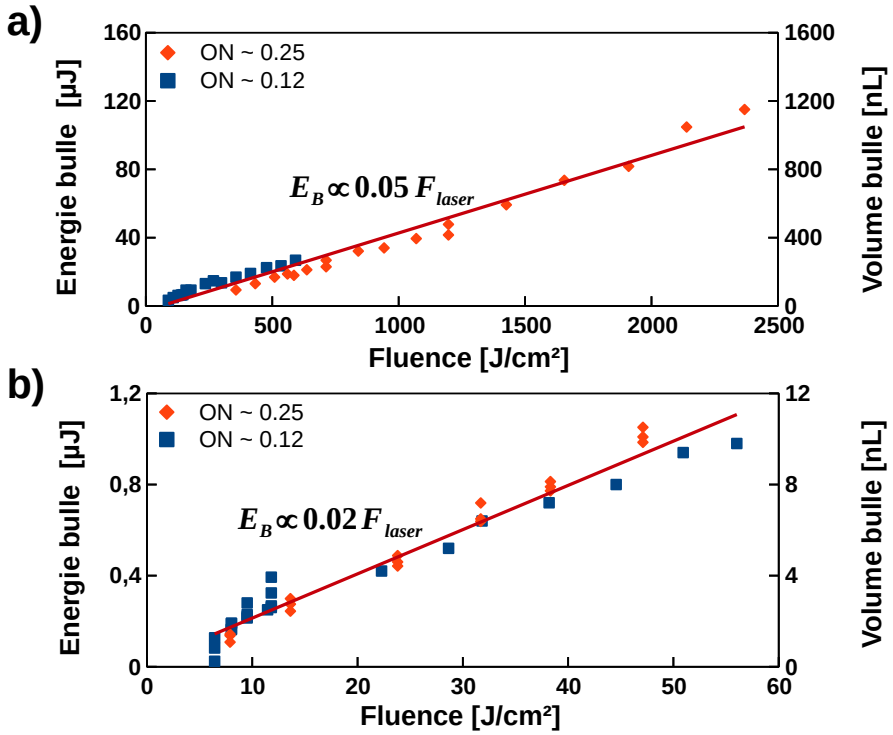



FIGURE 2.7 – Impact de l'ouverture numérique sur le volume des bulles. Etude de l'énergie et du volume de la bulle en fonction de la fluence. (a) Pour des impulsions de $1ns$ à $5ns$. (b) Pour des impulsions de $3ps$ à $10ps$.

que les courbes se superposent et grâce à cela, une loi en fluence se dessine. Dans le régime nanoseconde (fig. 2.7a), la variation suit la loi $E_B = 0.05 \propto F_{laser}$, quant au régime picoseconde, elle suit la loi $E_B = 0.02 \propto F_{laser}$. Comme dans la partie précédente sur la dépendance en durée d'impulsion, le régime picoseconde est moins efficace que le régime nanoseconde. Etant donné que la fluence dépend directement de l'énergie du laser et de la taille du faisceau au plan focal, on compare dans un autre graphique la dépendance en énergie afin de compléter les informations sur l'impact de l'ouverture numérique.

La figure 2.8 montre que dans le régime nanoseconde et picoseconde, la différence entre les deux ouvertures numériques est forte. Concernant les données pour l'ouverture de 0.12, celles-ci sont identiques à celles étudiées précédemment, d'où le fait qu'on retrouve la même variation, à savoir un volume de bulle proportionnel à 3% en nanoseconde et 1% en picoseconde.

Dans le régime nanoseconde, la figure 2.8a montre encore une fois une dépendance en énergie pour une ouverture de 0.25. Plus l'énergie délivrée par le laser augmente, plus la bulle gagne elle aussi en énergie (et en volume). On en déduit

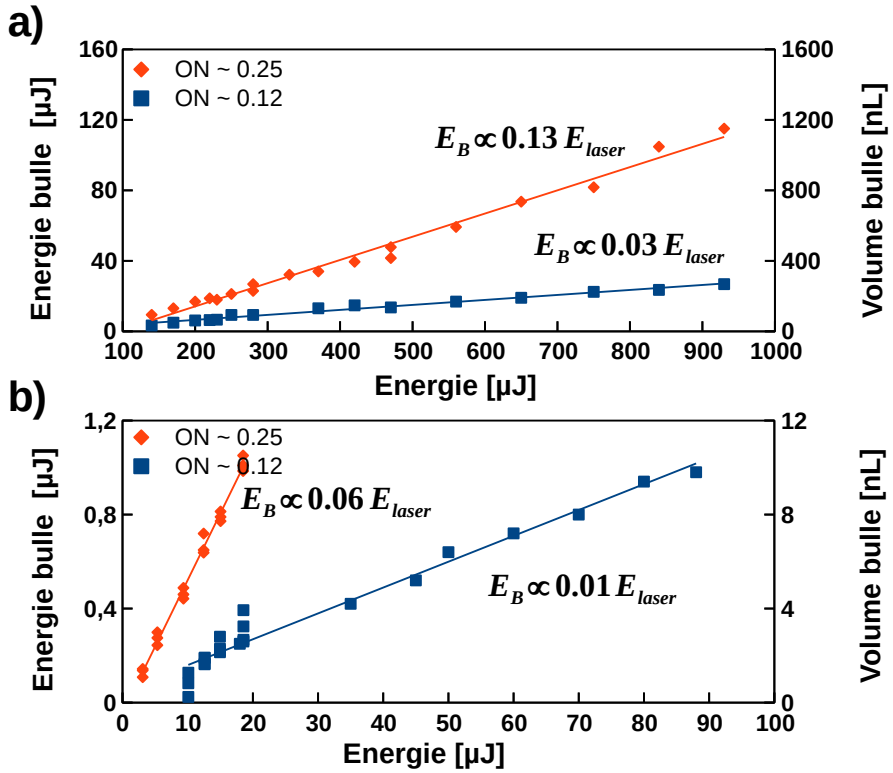



FIGURE 2.8 – Impact de l'ouverture numérique sur le volume des bulles. Etude de l'énergie et du volume de la bulle en fonction de l'énergie laser. (a) Pour des impulsions de $1ns$ à $5ns$. (b) Pour des impulsions de $3ps$ à $10ps$.

comme précédemment une loi linéaire de la forme $E_B \propto 0.13 \times E_{laser}$. On remarque que la pente de cette dernière est bien plus importante que celle réalisée avec une ouverture de 0.12. La conversion en énergie du laser en énergie de la bulle semble plus efficace pour une ouverture numérique grande.

Dans le régime picoseconde, la figure 2.8b montre aussi une dépendance en énergie et en ouverture numérique puisque les deux pentes sont différentes. Pour une ouverture de 0.25, la loi linéaire est de la forme $E_B \propto 0.06 \times E_{laser}$, donc une conversion en énergie de 6% contre seulement 1% pour $ON$ 0.12.

Que ce soit pour le régime picoseconde ou nanoseconde, on explique cette variation en énergie de bulle par la fluence. En effet, l'analyse de la figure 2.7 a montré une indépendance en fonction de l'ouverture numérique. Etant donné que la taille du faisceau au plan focal diminue avec l'ouverture numérique, on compense la perte en surface avec l'énergie. C'est pourquoi, pour atteindre une taille de bulle identique dans les deux configurations, il est nécessaire d'apporter plus d'énergie pour une taille de faisceau plus grand.

### 2.2.3 Variation de la longueur d'onde dans le régime femtoseconde

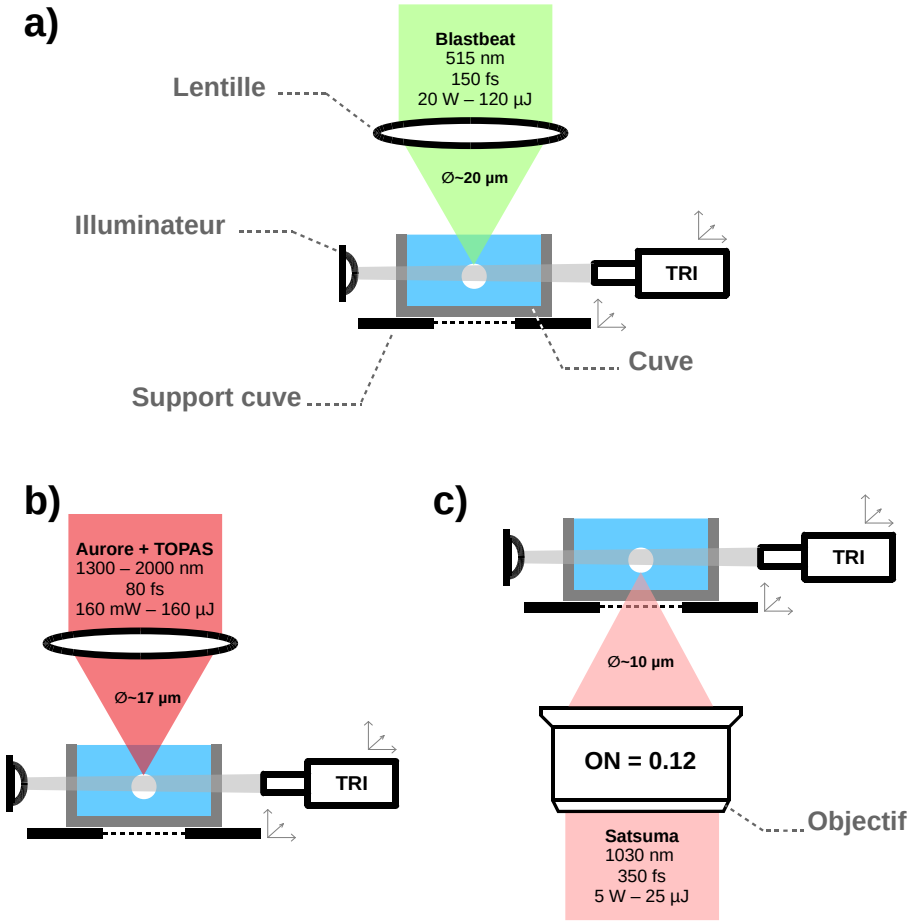



FIGURE 2.9 – Schéma expérimental de la taille des bulles en fonctions de la longueur d'onde (a) à 515 nm (b) à 1300 et 2000 nm (c) à 1030 nm

Dans le chapitre précédent, l'étude des seuils de formation de bulle ont montré une dépendance en longueur d'onde avec un comportement en intensité de la forme $I_{seuil} \propto exp(2\lambda)$. Afin d'étudier le comportement des bulles après avoir dépassé leur seuil de formation, on utilise trois systèmes différents afin de sonder différentes longueurs d'onde.

Comme résumé en figure 2.9, le premier système utilise la chaîne BlastBeat, délivrant des impulsions de $150fs$ à $515nm$ avec des énergies maximales de $20\mu J$ sur cible. Le faisceau laser est focalisé dans une cuve à travers l'interface air-liquide grâce à une lentille de courte focale de $20mm$. La taille du faisceau au plan focal est mesurée à $20\mu m$. La deuxième configuration utilise la chaîne Aurore, avec des

impulsions d'environ $60fs$ à $1.3\mu m$ et $2.0\mu m$. Le faisceau est focalisé dans une cuve remplie d'eau, en passant par l'interface liquide-air, à l'aide d'une lentille de $CaF_2$ de focale $20mm$. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$. Enfin, la dernière configuration utilise le laser Satsuma délivrant des impulsions de $350fs$ à $1030nm$ pour des énergies atteignant $25\mu J$. Le faisceau est focalisé à travers une cuve remplie d'eau, à l'aide d'une lentille télécentrique d'ouverture numérique 0.12 avec une taille de faisceau au plan focal estimée à $10\mu$.

A l'aide du système de TRI, on observe et mesure les diamètres de bulles maximum en fonction de différentes énergies, pour une même taille de faisceau, afin d'obtenir le graphique suivant (fig.2.10).

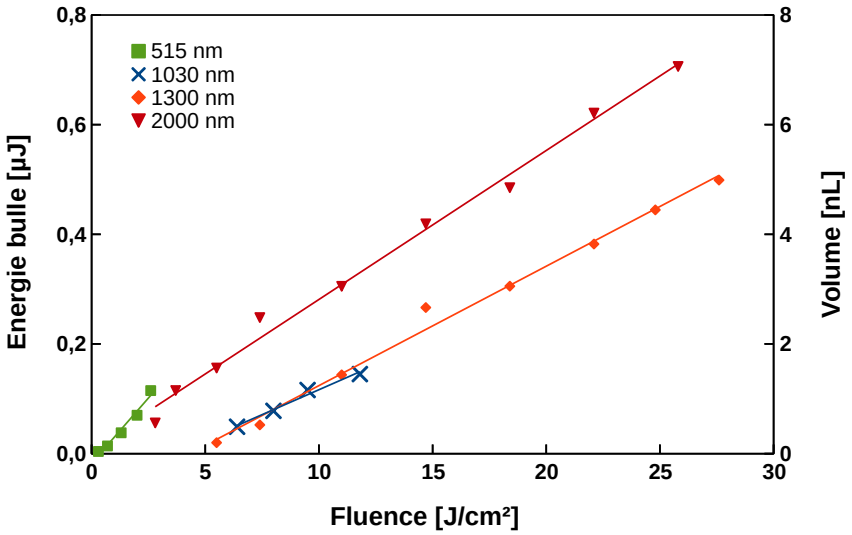



FIGURE 2.10 – Variation de l'énergie et du volume de la bulle en fonction de la fluence du laser dans le régime femtoseconde

La figure 2.10 montre la variation de l'énergie de la bulle et de son volume en fonction de la fluence appliquée. Avant toute chose, on explique le décalage des courbes sur l'axe des abscisses non seulement par les seuils de formation de bulles, qui sont différents pour chaque longueur d'onde, mais aussi par le manque de données autour de ces seuils. Concernant la variation des énergies de bulle, on observe dans un premier temps un comportement linéaire pour chaque longueur d'onde. Ainsi, on représente chaque variation par les relations suivantes :

$$E_B(\lambda = 515nm) \propto 0.047 \times F_{laser}$$

$$E_B(\lambda = 1030nm) \propto 0.020 \times F_{laser}$$

$$E_B(\lambda = 1300nm) \propto 0.020 \times F_{laser}$$

$$E_B(\lambda = 2000nm) \propto 0.027 \times F_{laser}$$

Les pentes à $1300nm$ et $1030nm$ sont sensiblement les mêmes, alors que celles à $2000nm$ et $515nm$ sont nettement supérieures.

De ce fait, on suppose que le processus de conversion d'énergie est beaucoup plus efficace à $515nm$ et $2000nm$. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il faudrait compléter la courbe à $515nm$ afin d'observer le comportement de la bulle pour une fluence plus importante. Aujourd'hui, il est difficile de savoir si au dessus des fluences étudiées, le comportement reste linéaire, car on pourrait aussi s'attendre à un régime stationnaire, où la quantité d'énergie apportée ne couplerait plus aussi efficacement.

Pour expliquer la différence d'efficacité entre ces deux longueurs d'onde, on se rapporte aux observations faites précédemment sur les seuils. Commençons par 2000 nm. Même si les seuils sont plus élevés, nous avions remarqué que l'absorption à 1 photon était importante, et desservait l'initiation de la bulle. On suppose maintenant que l'énergie qui a été déposée et absorbée par ce processus sert tout de même à sa dynamique une fois initiée. Deux hypothèses sont alors envisageables à ce stade, l'un concerne la formation d'électrons libres et l'autre l'échauffement du liquide par des effets thermiques. Dans un premier temps, on suppose que l'énergie qui a été absorbée par un processus à 1 photon a créé des électrons libre dans espace plus important que celui où le plasma est présent. Dans ce cas, ils ne contribuent qu'à la taille du plasma une fois le seuil atteint. Dans un second temps, on suppose que l'énergie absorbée à 1 photon excite et agite les molécules d'eau, conduisant ainsi à un échauffement thermique. Cet échauffement peut entraîner la formation d'une bulle, que l'on retrouve souvent sous la terme de thermocavitation [96][97]. Cette nouvelle notion est une réelle question sur ce processus de formation et de bulle, mais n'a pas été plus investigué. Pour lever le voile sur cette interrogation, il faudrait observer si un plasma se forme lors de la formation de la bulle. Si non, alors l'hypothèse devrait être validée.

A 515 nm, toujours en se rapportant aux seuils, on sait que celui-ci est très bas et que le processus qui contrôle la formation de la bulle est purement multiphotonique. En ce sens, on sait que seulement 2 photons sont nécessaires pour créer des électrons libres. Cette faible quantité de photons abaisse non seulement les seuils d'ionisation mais surtout augmente l'efficacité du procédé. Tandis qu'à 1030 et 1300 nm, les phénomènes d'absorption à 1 photon et par photoionisation se contrebalancent.

## 2.3 Comparaison entre l'eau et le milieu cellulaire

Dans cette section, on s'intéresse à la différence qu'il peut y avoir lorsque l'on utilise du milieu cellulaire à la place de l'eau, précédemment utilisée.

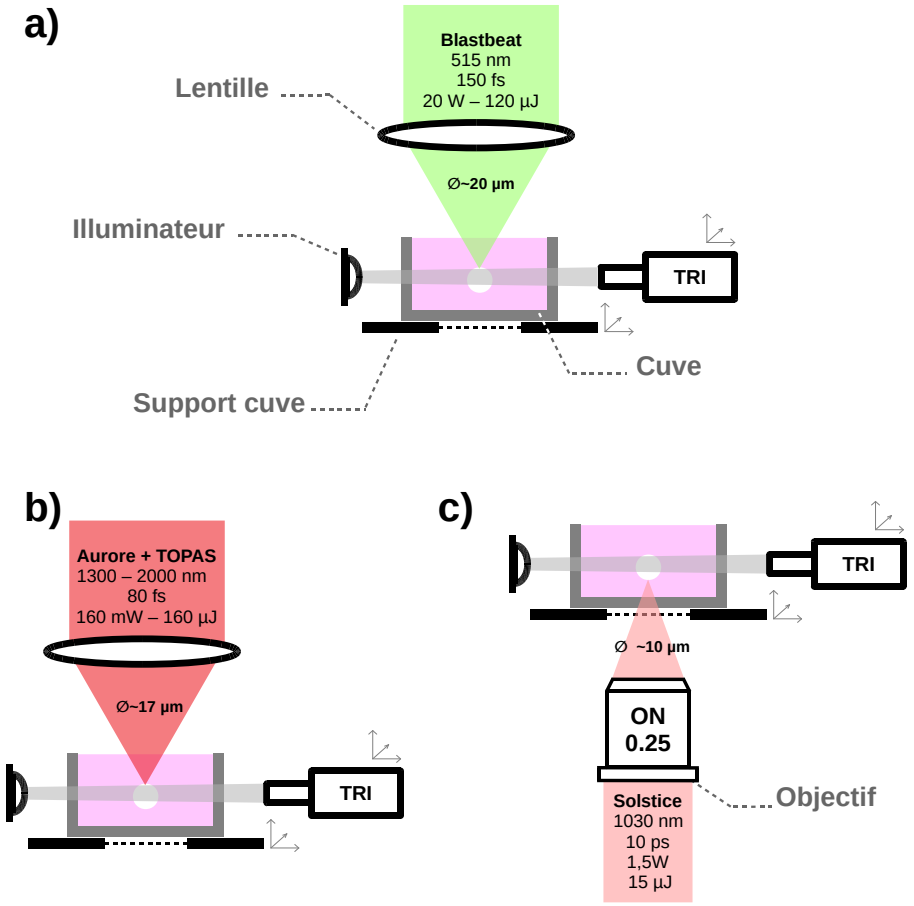



FIGURE 2.11 – Schéma expérimental pour l'étude de la dynamique des bulles dans du milieu cellulaire (a) à 515 nm (b) à 1300 et 2000 nm (c) à 1030 nm

Le milieu cellulaire utilisé est du DMEM [1] dont la composition est disponible en annexe. De couleur rouge/rose, il contient un colorant, le rouge de phénol, essentiel pour la détection de pH trop acide ou basique lors de la mise en culture des cellules. Dans le domaine de la biologie, l'utilisation du milieu cellulaire est immanquable car les cellules encourent un risque si elles sont mises en suspension dans des milieux non adaptés. L'eau par exemple, ne l'est pas car les cellules implosent à

1. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

cause de la pression osmotique entre l'eau qui entoure la cellule et celle contenue dans la cellule. Le but est donc d'étudier la différence entre l'eau utilisée jusqu'ici et le milieu cellulaire en fonction de la longueur d'onde du laser et de l'énergie appliquée afin de valider les observations faites dans les parties précédentes.

Pour y arriver, comme résumé en figure 2.11, on utilise la chaîne BlastBeat, délivrant des impulsions de $150fs$ à $515nm$ avec des énergies maximales de $20\mu J$ sur cible. Le faisceau laser est focalisé à travers l'interface air-liquide, dans une cuve remplie de milieu cellulaire grâce à une lentille de courte focale de $20mm$. La taille du faisceau au plan focal est mesuré à $20\mu m$. La deuxième configuration utilise la chaîne Aurore, avec des impulsions d'environ $60fs$ à $1.3\mu m$ et $2.0\mu m$. Le faisceau est focalisé dans une cuve remplie de milieu cellulaire, en passant par l'interface liquide-air, à l'aide d'une lentille de $CaF_2$ de focale $20mm$. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$. Enfin, la dernière configuration utilise la chaîne Solstice, délivrant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ pour des énergies atteignant $15\mu J$ sur cible. Le faisceau est focalisé à travers une cuve remplie de milieu cellulaire, à l'aide d'un objectif de focalisation ouvert à 0.25 et dont la distance focale est de $20mm$. On estime la taille du faisceau au plan focal à $5\mu m$.

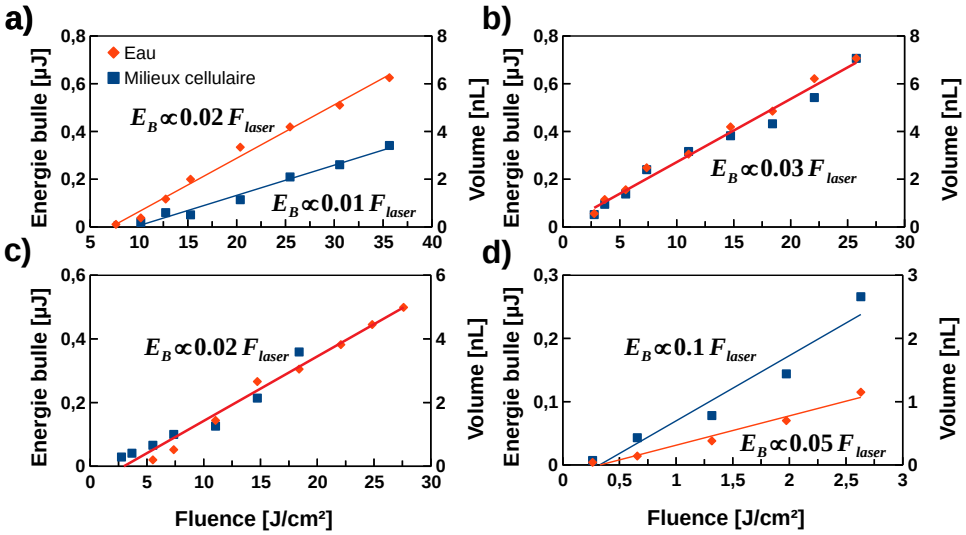



FIGURE 2.12 – Comparaison entre l'eau et le milieu cellulaire pour des énergies de bulle et des volumes (a) à $1030nm$ à $10ps$ (b) à $2000nm$ à $80fs$ (c) à $1300nm$ à $80fs$ (d) à $515nm$ à $150fs$

Comme le montre la figure 2.12a, la tendance de l'énergie et du volume de la bulle à $1030nm$ est toujours linéaire à la fluence, quel que soit le type de milieu. Ainsi, on retrouve pour l'eau la même tendance que celle présentée plus tôt dans l'étude des ouvertures numériques, et une différence concernant le milieu cellulaire.

En effet, dans le cas de l'eau, on trouve une pente de 0.02 contre une pente de 0.01 pour le milieu cellulaire. On comprend donc qu'il est plus difficile de générer des bulles de même taille que l'eau, avec le milieu cellulaire pour les mêmes fluences. Néanmoins, en extrapolant la droite linéaire $E_B \propto 0.01 F_{laser} = 0.01 \frac{E_{laser}}{S_{faisceau}}$, il est possible de compenser cette perte de volume en apportant deux fois plus d'énergie au système.

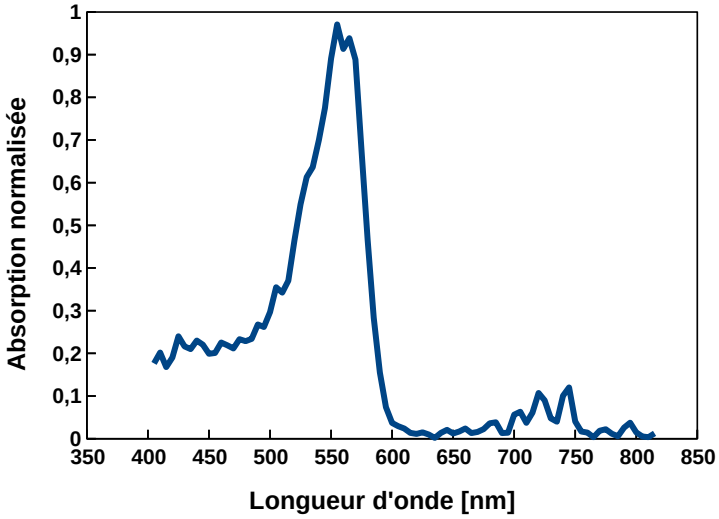



FIGURE 2.13 – Spectre d'absorption du DMEM

En observant la figure 2.12d, on remarque aussi une tendance linéaire pour les deux milieux à $515nm$, avec une nouvelle fois des pentes différentes. Dans le cas de l'eau, on retrouve bien la relation $E_B \propto 0.05 F_{laser}$ exposée dans la partie précédente, mais contrairement à $1030nm$, cette fois-ci, c'est la pente du milieu cellulaire qui est deux fois supérieure. Il semblerait qu'à cette longueur d'onde, la composition de ce milieu favorise le transfert d'énergie entre le laser et la bulle.

Enfin, les figures 2.12b et 2.12c montrent une variation en énergie de bulle directement proportionnelle à la fluence du laser. Aussi bien l'eau que le DMEM ont des pentes similaires qui prennent la même forme à savoir $E_B \propto 0.02 F_{laser}$ à $1300nm$ et $E_B \propto 0.32 F_{laser}$ à $2000nm$. Grâce à ces observations, on peut dire qu'à ces deux longueurs d'onde, l'énergie et le volume de la bulle sont invariants en fonction du type de milieu (eau et DMEM).

Encore une fois, il semblerait que le système le plus efficace soit celui à $515nm$, car sa pente est plus élevée dans le DMEM pour n'importe quelle autre longueur d'onde. De plus, jusqu'à maintenant, aucune courbe ne nous avait montré une telle efficacité.

Pour expliquer cette différence à 515 nm, on s'intéresse une nouvelle fois à

l'absorption à 1 photon. Comme le montre la figure 2.13, un pic d'absorption est observé autour de cette longueur d'onde. Par rapport à l'eau, il y a donc une différence notable entre ces deux milieux à ce niveau. Comme expliqué précédemment, l'absorption à 1 photon améliore l'efficacité du système, hypothèse vérifiée par cette expérience.

**Conclusion du chapitre**

Dans la première partie de ce chapitre, on a cherché à comprendre comment et quels paramètres lasers sont nécessaires afin de générer une bulle dans un milieu aqueux. Longuement étudié dans les solides et les gaz, le claquage induit par laser est bien moins connu dans les liquides. Néanmoins, des modèles physiques existent comme celui proposé par Linz et Vogel. On y retrouve alors des phénomènes physiques connu dans le milieu de l'interaction laser matière comme la photoionisation, l'ionisation par impact, ou encore l'avalanche.

Conformément à la théorie, les seuils d'ionisation de l'eau ont montré une forte dépendance en intensité pour des durées d'impulsions courtes ($< 10ps$) et une dépendance plus importante en fluence dans les durées les plus longues ($> 10ps$). Nos données expérimentales rejoignent celles du modèle décrit ainsi que ceux de la communauté des bulles induites par laser. Mais lorsque l'on change la longueur d'onde du laser, nous avons pu observer une différence avec les prédictions du modèle de Linz, avec une intensité seuil qui augmente avec la longueur d'onde. Ces résultats viennent alors alimenter un nouveau débat sur le rôle de la longueur d'onde dans l'interaction laser matière, car en désaccord avec les modèles proposés. A ce sujet, quelques hypothèses ont été suggérées, comme la présence d'absorption à 1 photon qui défavorise la création du plasma et rehausse les seuils d'ionisation. Encore, il est possible qu'à $2000nm$, le plasma généré défocalise beaucoup plus le faisceau qu'aux autres longueurs d'onde, obligeant ainsi à apporter davantage d'énergie pour combler les pertes.

Malgré ces interrogations, nous avons tout de même pu analyser la dynamique d'une bulle à différentes durées d'impulsions et diverses longueurs d'onde. La première remarque que nous avions pu faire concernait la différence entre le régime $< 10ps$ et le régime nanoseconde. La quantité d'énergie transportée par la bulle était nettement supérieure et efficace dans le second régime, mais avec une impossibilité de générer des bulles de petites tailles ($< 30nL$) proche du seuil. Dans une nouvelle section, nous avons comparé différentes ON et avons pu mettre en avant la dépendance de l'énergie de la bulle en fonction de la fluence. Plus la fluence augmente, plus la taille de la bulle augmente linéairement. Cependant, nous ne savons pas aujourd'hui si cette tendance reste linéaire avec des énergies beaucoup plus élevées. En étudiant la longueur d'onde, nous avons été encore une fois confronté à des différences malgré le même régime impulsionnel. L'efficacité du transfert d'énergie entre le laser et la bulle nous a semblé meilleure à 515 nm et 2000 nm Il est difficile de pouvoir expliquer ces différences, mais nous pensons que ceci soit lié aux seuils de génération de bulle qui sont plus élevés à 2000 nm, donc nécessitent des énergies plus élevées pour former le plasma puis la bulle. Cette énergie, une fois dépassée est nettement supérieure à celle des autres longueurs d'onde et favorise l'apparition de bulles plus énergétiques.

En connaissant ces résultats, nous avons voulu nous rapprocher un peu plus de l'objectif final en comparant le milieu cellulaire avec l'eau. Toujours en analysant l'efficacité de la conversion d'énergie du laser en énergie de bulle, nous avons constaté qu'aucune différence n'était notable entre 1300 nm et 2000 nm, alors qu'à 515 nm le milieu cellulaire était 2 fois plus efficace que l'eau, et qu'à 1030 nm, c'était l'inverse. Tout comme la longueur d'onde, ces résultats lancent un débat sur la notion d'absorption et de conversion d'énergie avec notamment la participation de l'absorption à 1 photon à 1300 nm et 2000 nm ainsi qu'à 515 nm avec le milieu cellulaire.

# Troisième partie

# Impression de liquide homogène : réalisation de motifs 2D

# Chapitre 1

# Déformation d'une surface libre, les prémisses d'un jet

Au cours de sa vie dans un liquide infini, la bulle s'agrandit de façon symétrique sans jamais rencontrer de surfaces. Elle grossit jusqu'à atteindre son rayon maximal, puis contraint par la pression du liquide, elle rétrécit jusqu'à imploser. Mais lorsque cette bulle se retrouve à moins d'un diamètre d'une surface, elle prend la forme d'une hémisphère et sa dynamique en est perturbée (fig. 1.1). Proche d'une surface solide, la fin de vie de la bulle est fortement dépendante de la distance qui les sépare. Plus on s'éloigne de la surface, plus elle retrouve sa forme arrondie avec une dynamique qu'on lui connaît [98].

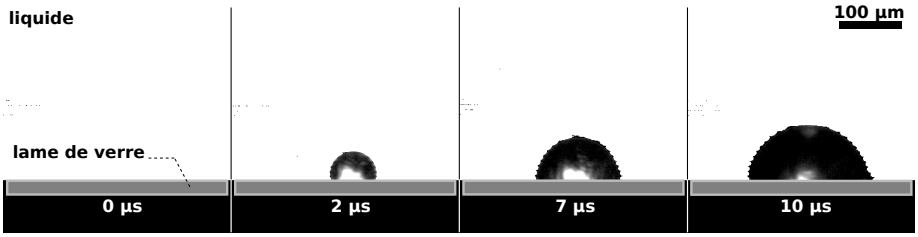



FIGURE 1.1 – Dynamique d'une bulle générée par laser proche d'une surface rigide (une lame de verre)

Lorsque la bulle se retrouve proche d'une surface libre, comme l'air, la dynamique risque elle aussi d'être modifiée par rapport à ce que nous avons pu observer jusqu'ici. L'idée de ce chapitre est de comprendre comment créer une bulle proche d'une surface libre en vue de la déformer et de mettre en évidence un paramètre capable de définir les conditions de formation d'un jet applicable à la bio-impression de cellules vivantes.

## 1.1 Comportement d'une bulle sous la surface

Comme les chapitres précédents, l'énergie du laser et les longueurs d'onde $1030nm$, $1300nm$ et $2000nm$ sont étudiées.

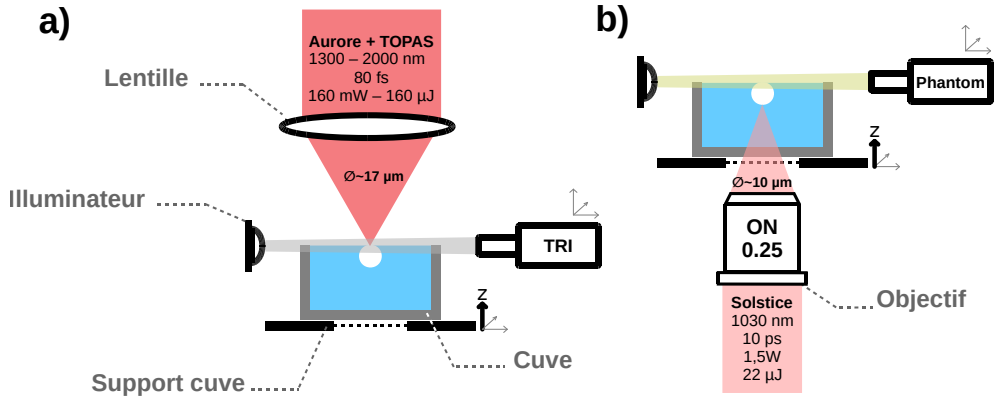



FIGURE 1.2 – Schéma d'expérience pour l'observation de la bulle générée proche de la surface (a) à 1300 et 2000 nm à l'aide du TRI (b) à 1030 nm à l'aide de la caméra ultra rapide Phantom

La figure 1.2 illustre le schéma de montage de l'expérience. On utilise un faisceau issu de la chaîne Aurore associé à un TOPAS, pour générer des impulsions de $80fs$ à 1300 et $2000nm$. On focalise ces faisceaux via une lentille de $CaF_2$ de focale $20mm$ à travers l'interface air-liquide. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$ et les impulsions délivrent jusqu'à $160\mu J$ sur cible. On observe les bulles générées sous la surface grâce au système de TRI [1]. Le second montage utilisé (fig. 1.2b) utilise un faisceau issu de la chaîne Solstice émettant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ et focalisé via un objectif de focalisation Thorlabs (LMH-10X-1064), grâce auquel la taille de spot au plan focal est estimée à $10\mu m$. Les impulsions délivrent sur échantillon une énergie maximale de $22\mu J$. Les bulles sont observées à l'aide d'une caméra rapide Phantom.

1. *Time Resolved Imaging*

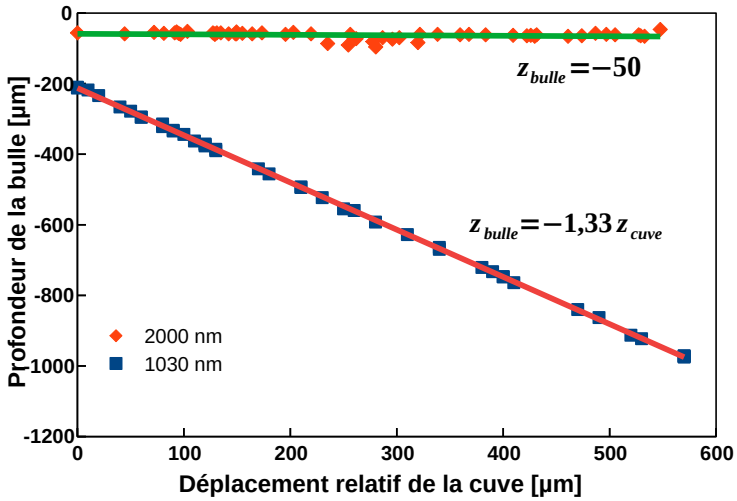



FIGURE 1.3 – Variation de la position de la bulle sous la surface de l'eau en fonction de la variation de la position de la cuve selon l'axe z

En modifiant la position du laser par rapport à la cuve, on observe la position de la bulle dans le liquide. La figure 1.3 expose le résultat pour les deux longueurs d'onde, avec une dépendance directe de la position de la bulle en fonction de la position de l'interface air-liquide, de la forme $z_{bulle} = -1.3 z_{cuve}$ à 1030 nm. La courbe ne démarre pas à 0 car nous avons pris la décision de commencer l'expérience $200\mu$ en dessous de la surface. La pente de $-1.3$ est négative car la bulle pénètre de plus en plus dans l'eau, dont on considère l'origine comme la surface. On explique alors simplement la pente de la droite par l'indice de réfraction de l'eau qui est de 1,33. A 1030 nm il est donc possible de positionner précisément une bulle en dessous de la surface.

A 2000 nm, on remarque que la bulle reste collée à la surface quelle que soit la profondeur à laquelle on fait pénétrer le faisceau. Ceci s'explique par l'absorption à 1 photon du liquide, qui, sur moins de $100\mu m$, absorbe toute l'énergie. Il n'est donc pas possible de positionner la bulle comme on le souhaite à différentes profondeurs à cette longueur d'onde mais on verra par la suite de la thèse que l'on peut tirer avantage de ce confinement.

On ne s'intéresse maintenant qu'à 1030nm. On mesure les rayons de bulle en ne prenant en compte que le diamètre parallèle à la surface. Via ce diamètre, on en déduit le rayon. Les mesures sont effectuées pour une énergie donnée.

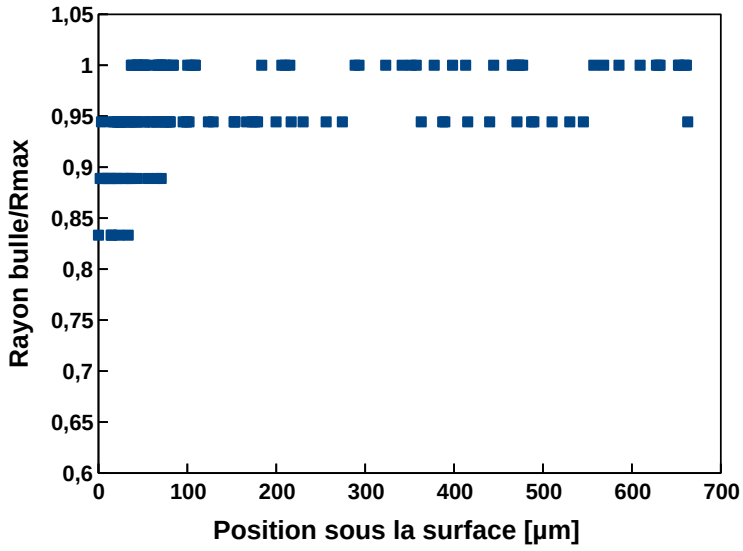



FIGURE 1.4 – Variation du ration $R_{bulle}/Rmax$ d'une bulle à différentes positions sous la surface. Réalisé à $103nm$ $10ps$ $8\mu J$ pour une bulle de rayon maximal de $90\mu m$

La figure 1.4 renseigne sur le rayon de la bulle en fonction de sa position sous la surface. Elle a été réalisée en même temps que l'expérience précédente. On remarque que plus la bulle s'approche de la surface, plus elle diminue en taille et perd 15% de sa valeur maximale lorsqu'elle se trouve à moins de $50\mu m$ de la surface. Lorsque la bulle est à plus de $90\mu m$ de profondeur, sa taille redevient très proche de sa valeur maximale (à une erreur près de 5%). Etant donné que le rayon maximal de la bulle est de $90\mu m$, on comprend que lorsque la bulle est amenée à moins d'un rayon de la surface, elle commence progressivement à réduire en taille. On suppose alors que très proche de cette surface, l'énergie déposée et transférée est différente ou que l'énergie de la bulle s'est diffusée en dehors de la bulle, voir dans l'air. Enfin, on peut aussi supposer que la bulle proche de la surface libre est simplement contrainte par l'interface, comme dans le cas d'une surface solide avec la formation d'une bulle hémisphérique.

Revenons à 2000 nm, avec une bulle confinée proche de la surface. Sachant que toute l'absorption se passe dans les premiers $50\mu m$, en mesurant le diamètre de la bulle, on s'attend à sonder différentes fluences lasers, comme représenté en figure 1.5. Sur cette figure, on y représente pour chaque position de cuve absolue, la taille

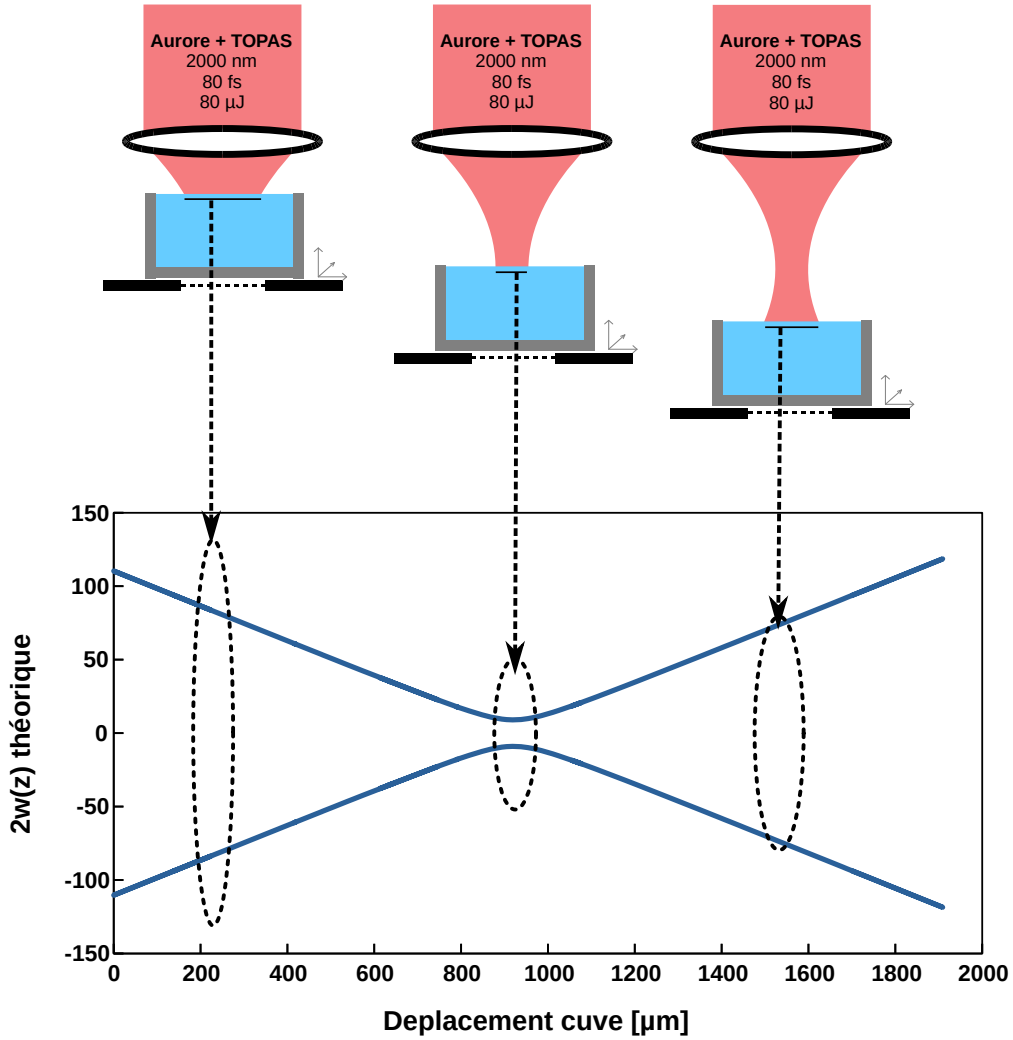



FIGURE 1.5 – Schéma illustratif de la variation de la position de la cuve. Le graphique représente la variation du diamètre du faisceau en fonction du déplacement de la cuve.

du faisceau gaussien donné par

$$w(z) = w_0\sqrt{1 + \left(\frac{z - z_0}{z_R}\right)^2}$$

avec $w_0$ le waist du faisceau, et $z_R$ la longueur de Rayleigh. A l'aide de cette taille de faisceau, on peut calculer la fluence pour une énergie donnée et d'en déterminer le rayon de la bulle en se basant sur la régression linéaire trouvée dans la partie précédente, avec $V_{bulle} = 0.27 \times F_{laser} + 0.1$. On compare alors le

résultat de ce calcul aux résultats de l'expérience en figure 1.6. On remarque que les résultats expérimentaux montrent une variation non linéaire du rayon en fonction de la position de la cuve. Un plateau se met en place à partir de $600\mu m$ jusqu'à $1300\mu m$. Pour la partie théorique, la variation du diamètre de la bulle par rapport à la fluence suit une loi en $1/x^2$ et décroit rapidement lorsque l'on s'écarte du plan focal.

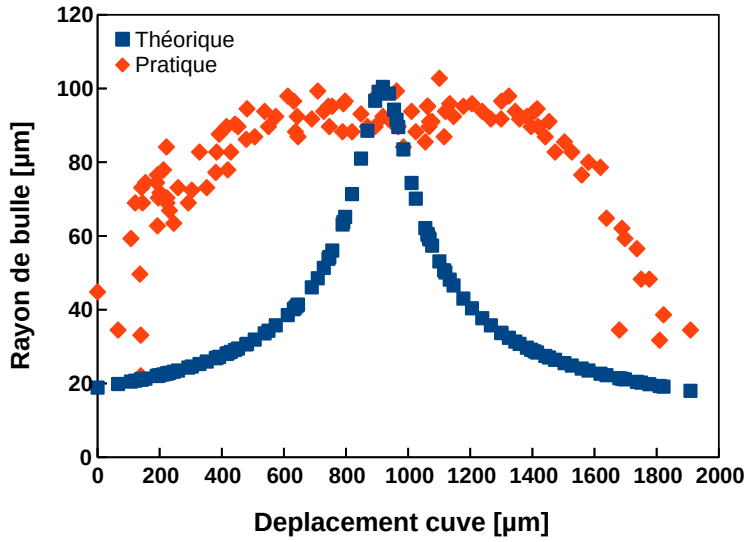



FIGURE 1.6 – Rayon maximal des bulles en fonction de la position de la cuve.

Pour expliquer le plateau et la différence avec la théorie, on suppose qu'il y a un effet de saturation autour du plan focal. Une fois les seuils d'ionisation atteints, à énergie constante, la taille du faisceau n'importe plus, ce qui peut expliquer ce plateau. Mais nous n'avions pas observé un tel comportement dans les expériences précédentes avec la variation de la fluence avec l'énergie. On pourrait aussi penser que c'est la zone de Rayleigh qui est responsable de cette « saturation » car par définition, cette zone représente une faible variation de la taille du faisceau. Mais comme celle-ci est d'environ de $340\mu m$, c'est insuffisant pour remplir la totalité de la zone du plateau saturant. On peut aussi penser qu'un effet d'auto-focalisation se met en place, typique d'un élargissement d'une zone de Rayleigh par exemple. Mais étant donné que l'absorption linéaire contraint le faisceau à être absorbée sur une courte distance, on ne devrait pas observer d'auto-focalisation. Toujours liée à cette absorption, on se demande même si ce que nous observons n'est pas un élargissement de la zone d'intérêt par effet thermique. Déjà évoqué dans la partie précédente cette absorption à 1 photon contribue à l'élargissement des bulles, en ce sens, on peut imaginer qu'elle élargit aussi la zone de formation des bulles.

Il faut aussi noter que l'expérience ne tient pas compte du rayon maximal de la bulle à chaque position, mais d'un rayon effectif à une durée précise, durée pour laquelle le rayon est maximal au centre de la courbe. On s'attendrait donc à aplatir les queues de la courbe et s'éloigner encore plus de la théorie.

On retiendra de cette expérience que la bulle générée à 2000 nm reste confinée aux bords de l'interface air-liquide et qu'elle n'est pas sensible aux faibles variations de la position de la cuve et qu'une bulle générée à 1030 nm peut par contre, être générée à différentes distances de la surface et que son diamètre ne varie qu'une fois très proche de la surface.

## 1.2 Conditions de génération de jets

Jusqu'à maintenant, nous nous étions restreint à l'étude de la dynamique, de la position et de la forme de la bulle sous la surface. Nous allons dans cette section, nous intéresser de plus près à ce qu'il se passe au dessus de celle-ci. Pour y arriver, la figure 1.7 résume le schéma des expériences.

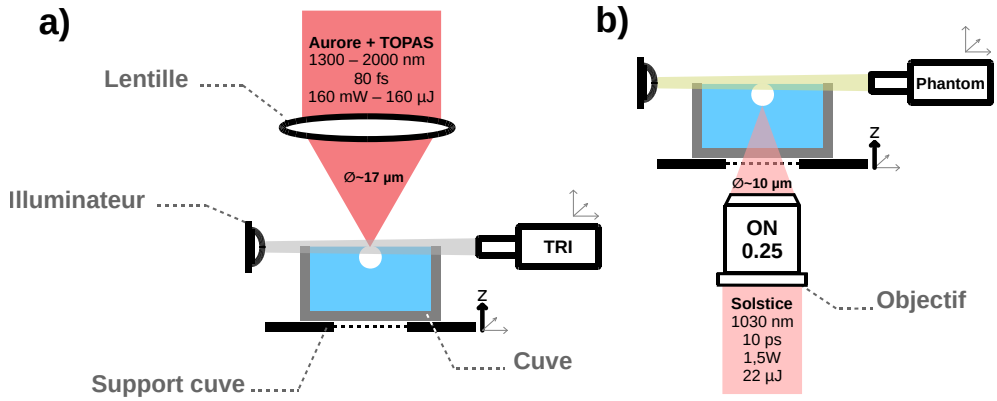



FIGURE 1.7 – Schéma d'expérience pour l'observation de la bulle générée proche de la surface et de la déformation de la surface(a) à 1300 et 2000 nm à l'aide du TRI (b) à 1030 nm à l'aide de la caméra ultra rapide Phantom

On utilise un faisceau issu de la chaîne Aurore associée à un TOPAS, pour générer des impulsions de $80fs$ à 1300 et $2000nm$. On focalise ces faisceaux via une lentille de $CaF_2$ de focale $20mm$ à travers l'interface air-liquide. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$. Les impulsions délivrent jusqu'à $160\mu J$ sur cible. On observe les bulles et les déformations générées grâce au système de TRI. Le second montage utilisé (fig. 1.7b) utilise un faisceau issu de la chaîne Solstice émettant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ et focalisé via un objectif de focalisation Thorlabs (LMH-10X-1064), grâce auquel la taille de spot au plan focal est estimée à $10\mu m$. Les impulsions délivrent sur l'échantillon une énergie maximale de $22\mu J$. Les bulles et les déformations sont observées à l'aide d'une caméra rapide Phantom.

A $1030nm$ on observe la position de la bulle sous la surface et l'impact qu'elle a sur l'interface air-liquide. Comme le montre la figure 1.8, on réalise 13 séquences de jets avec des positions différentes de bulles sous la surface (fig. 1.8b). On observe alors à $t = 13\mu s$ après le tir laser, la bulle et l'interface air liquide (fig. 1.8), ainsi que la perturbation dans l'air à $t = 100\mu s$ (fig. 1.8a).

On observe dans un premier temps une perturbation du liquide en dehors de l'eau lorsque la bulle est proche de la surface, à savoir moins d'un rayon de bulle. Lorsqu'elle est juste collée à la surface (séquence 12 de la figure 1.8b), aucune déformation à ce temps-ci n'est observée.

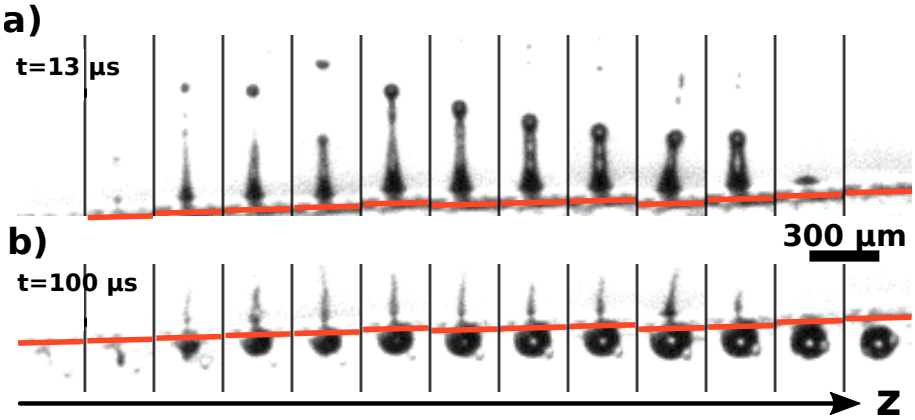



FIGURE 1.8 – Variation de la position de la bulle sous la surface. (a) Observation de la bulle et la déformation de la surface 13$\mu s$ après le tir laser. (b) Observation de la déformation 100$\mu s$ après le tir laser. La ligne rouge délimite l'interface air-liquide.

En regardant plus loin dans le temps avec la figure 1.8a, on s'aperçoit que la perturbation observée précédemment a donné naissance à un une perturbation beaucoup plus grande. On appellera donc par la suite ce type de perturbation, jet. On remarque encore une fois que pour une bulle placée à moins d'un rayon de la surface, un jet est créé.

Grâce à ces observations, on peut être certain du lien existant entre la profondeur de la bulle et la formation ou non d'un jet.

L'interaction d'une bulle avec une interface libre a longtemps été étudiée et modélisée [99] [100] [91]. Lorsqu'une bulle est générée sous une surface libre, on considère le paramètre critique suivant

$$\gamma = \frac{d}{R_{max}}$$

appelé paramètre de Standoff, avec $d$ la profondeur à laquelle est générée la bulle et $R_{max}$ son rayon maximal. Cette bulle grossit dans le liquide jusqu'à rencontrer la surface. Selon le paramètre $\gamma$, l'espace entre ces deux éléments se réduit petit à petit. Cette région de haute pression crée un flux du bas de la bulle vers le haut déplaçant ainsi le liquide sous la surface libre. Ces effets de haute pression et de déplacement de liquide entraînent la formation d'un jet. Il a été montré que l'angle de la surface libre (initialement à $180^o$) permet de définir l'éjection de liquide ou non. S'il est en-dessous de $109^o$ alors la surface se rompt pour laisser place au jet [101] [102].

Pour trouver les valeurs de Standoff de conditions de formation de jet, on mesure pour chaque séquence de la figure 1.8 la profondeur de bulle et le rayon associé. On trouve alors une condition de formation de jet pour $\gamma < 0.8$.

Passons maintenant à une longueur d'onde de $2000nm$. Précédemment nous avions vu qu'il n'était pas possible de générer de bulle à plus de $20\mu m$ de la surface. Connaissant maintenant l'impact de cette proximité sur la génération de jet, on étudie alors ce comportement à cette longueur d'onde.

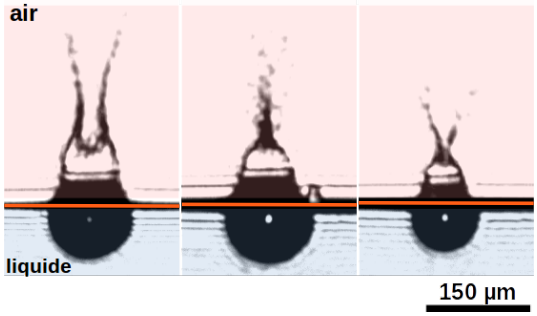



FIGURE 1.9 – Déformation de la surface à $2000nm$, $80\mu J$, pour différentes positions de la cuve. Les photos sont prises $5\mu s$ après l'impact laser.

On varie la position de l'interface air-liquide pour sonder les différentes tailles de bulles, dont on observe aussi en surface les effets. La figure 1.9 montre le résultat de cette expérience. On observe dans un premier temps que quelle que soit la position de la cuve, on retrouve bien une bulle accrochée à la surface ainsi qu'une explosion de l'interface libre dans l'air dont la base suit la même forme que la bulle. On ne parle plus de rupture de l'interface liquide-air, mais d'une ablation de surface avec la génération d'un spray. En calculant le paramètre de Standoff, on remarque que ce dernier est inférieur à 0.4. Malgré cette ablation de surface, on observe par la suite un jet, comme le montre la figure 1.10. Une étude plus approfondie sera menée par la suite sur la dynamique des jets induits par laser à cette longueur d'onde.

A ce stade, nous pouvons donc affirmer que les conditions de formation de jets sont remplis pour $\gamma < 0.8$, avec deux types distincts : par rupture ($\gamma > 0.4$) ou par ablation de surface ($0.4 < \gamma$).

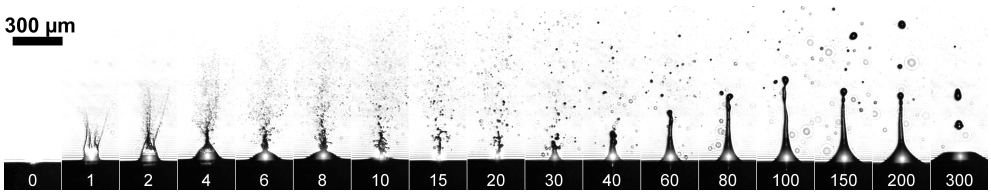



FIGURE 1.10 – Exemple d'un jet à $2000nm$, $80\mu J$. Les temps affichés sont en microsecondes.

## 1.3 Dynamique d'un jet - généralités

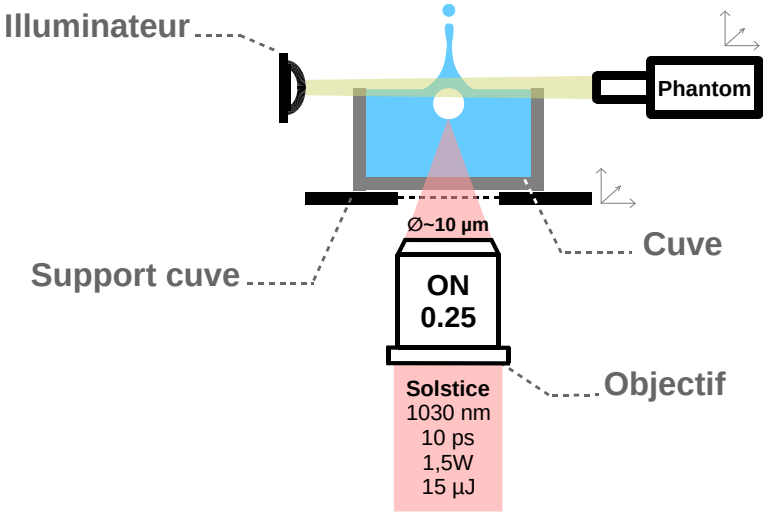



FIGURE 1.11 – Schéma d'expérience pour l'observation de jets et de bulles à l'aide d'une caméra ultra rapide

Précédemment, nous avions vu que la génération de jet est directement liée à la taille de la bulle et sa position par rapport à la surface libre avec le paramètre de Standoff. Pour mieux comprendre la dynamique de ce jet, on réalise l'expérience suivante. Comme illustré en figure 1.11, on utilise un faisceau issu de la chaîne Solstice émettant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ et focalisé via un objectif de focalisation ouvert à 0.20. La taille de spot au plan focal est estimée à $10\mu m$. Les impulsions délivrent sur échantillon une énergie maximale de $22\mu J$. Les jets et les bulles sont observées à l'aide d'une caméra rapide Phantom.

Une fois les conditions de jets remplis, on observe sa dynamique comme montré en figure 1.12. On dissocie la séquence en trois parties. La première concerne l'initiation du jet. La surface se déforme dès les 5 premières microsecondes, sous l'effet de l'élargissement de la bulle proche de l'interface liquide-air. La surface se rompt quelques microsecondes plus tard pour former un premier jet. Sous la forme d'une pointe très fine (de l'ordre de la dizaine de micromètres), celui-ci grandit rapidement sans changer d'aspect jusqu'à sa rupture à $70\mu s$, en un chapelet de gouttelettes de 10 à 20 $\mu m$ de diamètre. Enfin, un second jet plus épais (proche d'une centaine de micromètres) et de forme cylindrique, s'initie quelques temps après la formation du premier. Les deux jets paraissent de vitesses très différentes, avec un second jet plus lent. Ce dernier s'allonge dans le temps jusqu'à se rompre en plusieurs parties. Dans un premier temps, le jet relâche deux gouttes de 100-150 $\mu m$ de diamètre, puis se rompt à la base un peu plus tard vers 300 $\mu s$.

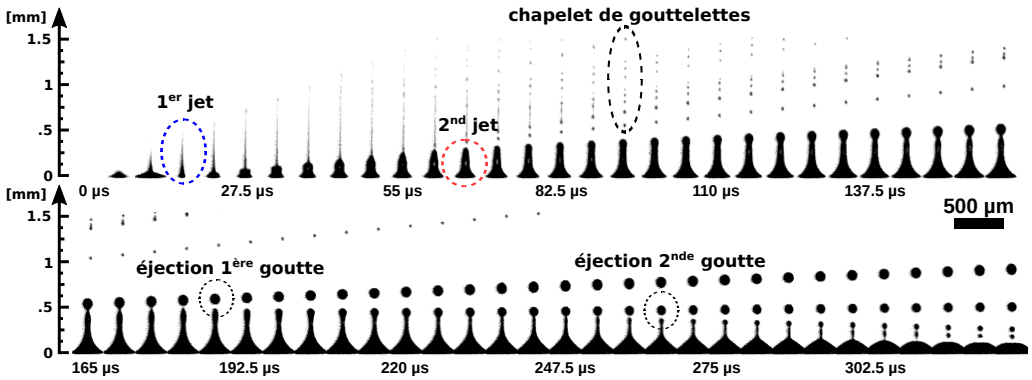



FIGURE 1.12 – Exemple d'une chronologie d'un jet d'eau à $8\mu J$ - 10 ps. En bleu, le premier jet. En rouge, le second jet. Chaque image est séparée de $5,5\mu s$

En suivant l'évolution de la hauteur du jet tout au long d'une séquence, on est capable de tracer le graphique exposé en figure 1.13. On y trouve alors la variation de la hauteur d'un jet en fonction du temps ainsi que la variation de la hauteur de deux gouttes générées par le second jet, appelées « 1ère goutte » et « 2nde goutte » sur la figure 1.12.

Tout d'abord, ce graphe (fig.1.13) montre une nette différence entre le premier et le second jet. Le premier jet (de 0 à 50 $\mu s$) a une vitesse moyenne de $30m/s$ pour un diamètre à la base de 20 $\mu m$ (mesuré sur la figure 1.12). Le second jet a une vitesse linéaire moyenne de $2m/s$ et un diamètre initial (avant la formation d'une goutte) de 80 $\mu m$. Mais celui-ci perd en vitesse après l'éjection d'une première goutte. De manière générale, les gouttes ont la même vitesse que les jets qui les éjectent.

On explique la formation de ces gouttes par les instabilités de Rayleigh-Plateau (1857). Sous les effets de tension de surface, le filament d'eau créé devient instable puis se rompt.

Jusqu'à aujourd'hui, les travaux de Blake et Pearson [100] [99] [91] expliquent très bien la formation du premier jet et sont résumés par Patrascioiu [28]. Ce premier jet est directement lié à la rupture de la surface sous les effets de la bulle proche de l'interface liquide-air. C'est aussi la remarque que l'on peut faire en observant les premières images de la figure 1.14. Cependant, les modèles et explications données s'arrêtent temporellement après le premier jet et ne donnent que très peu d'information sur la génération d'un second jet. Lors de l'effondrement de la bulle, elle grossit de nouveau à $7\mu s$ et s'enfonce dans le liquide.

Cette croissance induit un gradient de pression dû à la forme toroïdale de la bulle [91] générant ainsi un tore de haute pression entre la bulle et la surface libre (fig.1.15) [28]. Ce tore de pression entraîne du liquide dans la même direction que le premier jet. Cette théorie peut être confrontée à celle de Chen [103] qui explique la

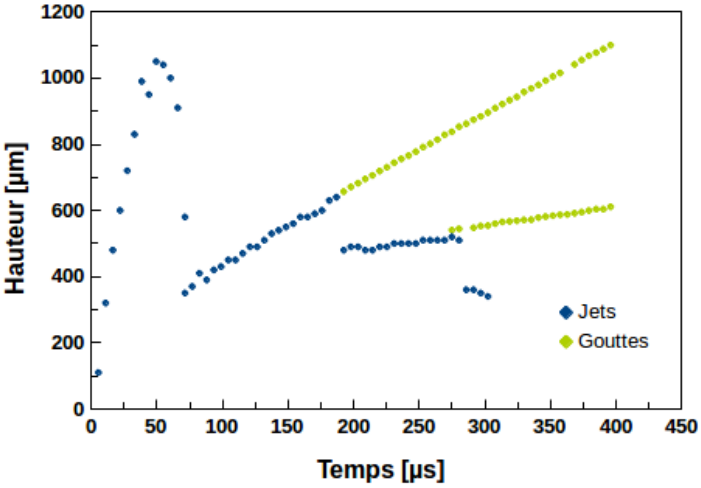



FIGURE 1.13 – Dynamique des jets et gouttes à $8\mu J$ 10 ps. En bleu la hauteur des jets, en vert la dynamique des gouttes supérieures à 50 $\mu m$ de diamètre.

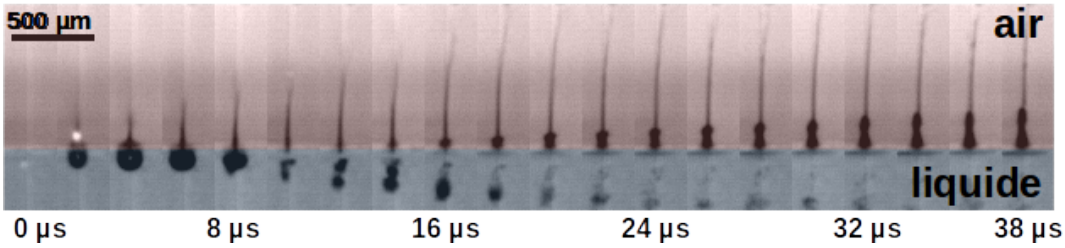



FIGURE 1.14 – Chronologie d'un jet et d'une bulle à $8\mu J$ $10ps$. Le temps entre chaque image est de 2 $\mu s$

formation du second jet par la formation d'un cratère autour du premier jet suite à l'effondrement de la bulle. Ce cratère s'enfonce jusqu'à atteindre une profondeur maximale puis se détend formant ainsi le second jet.

Etant donné que très peu de chercheurs expliquent la formation de ce second jet, les modèles sont encore perfectibles. Néanmoins les explications données par Patrascioiu et Chen semblent toutes les deux s'adapter à ce qu'on observe en figure 1.14, c'est-à-dire la formation du second jet quelques microsecondes après l'effondrement de la bulle.

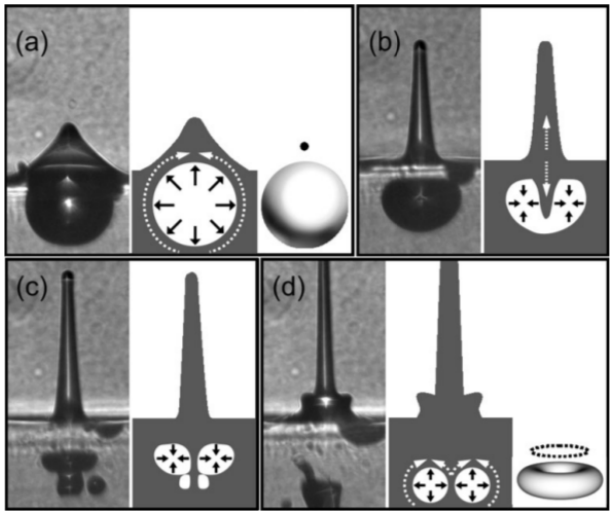



FIGURE 1.15 – Série de photos et de dessins représentatifs de la dynamique d'un jet induit par une bulle. (a) Phase de croissance d'une bulle sphérique proche d'une surface libre (b) Formation d'un jet et d'un contre-jet (c) déformation de la bulle sous une forme forme toroïdale (d) croissance et formation d'un jet cylindrique. Les flèches noires décrivent la croissance et la compression de la vapeur, les flèches blanches indiquent le flux de liquide et les points noirs indiquent les singularités - Extrait de [28]

# Chapitre 2

# Contrôle et impression de motifs 2D

## 2.1 Impact des paramètres lasers

### 2.1.1 Variation de l'énergie et de la durée d'impulsion à 1030 nm

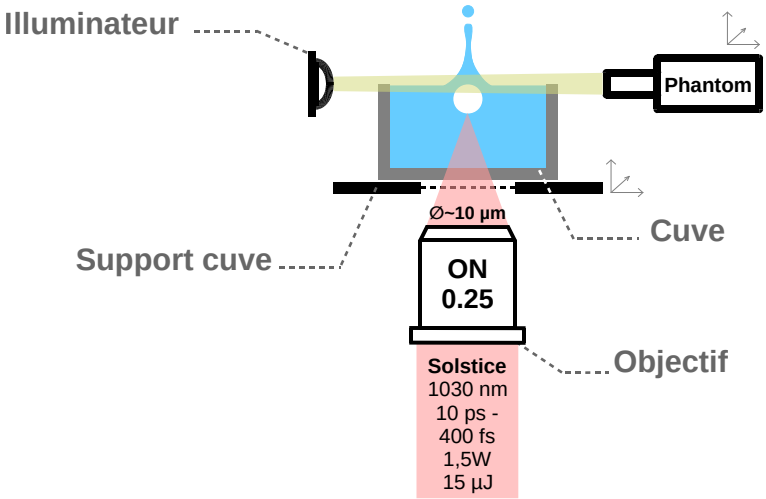



FIGURE 2.1 – Schéma d'expérience pour l'observation de jets à $8 - 13 - 22\mu J$ à $400fs$ et $10ps$

L'expérience consiste ici à faire varier l'énergie appliquée au système dans le régime picoseconde et femtoseconde, et d'en étudier l'impact sur la dynamique des jets. Comme illustré en figure 2.1, on utilise un faisceau issu de la chaîne Solstice

émettant des impulsions de $400fs$ et $10ps$ à $1030nm$, focalisés via un objectif de focalisation ouvert à 0.20 dans une cuve remplie d'eau. La taille de spot au plan focal est estimé à $10\mu m$. Les impulsions délivrent sur échantillon des énergies de $8 - 13 - 22\mu J$. Les jets sont observés à l'aide d'une caméra rapide Phantom. On

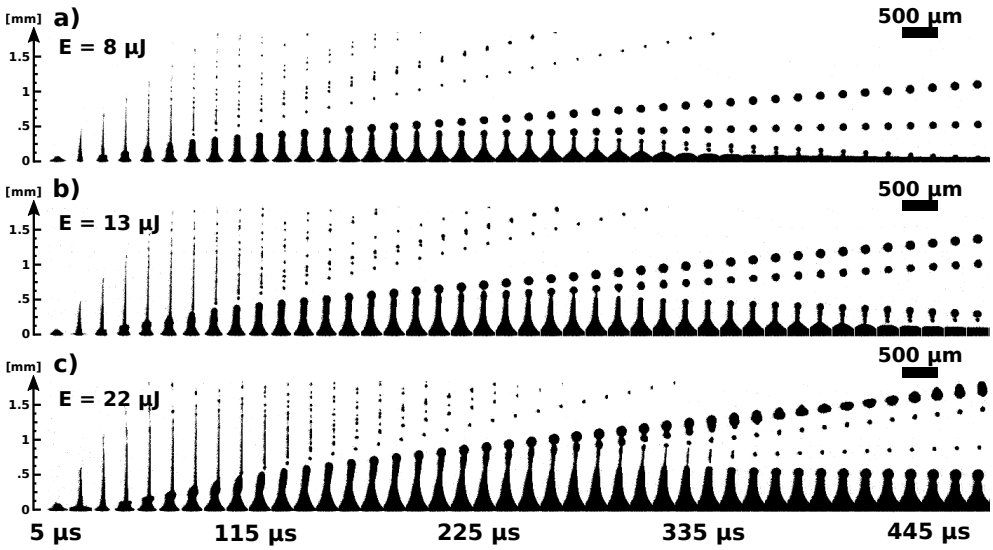



FIGURE 2.2 – Chronologies de jets à 10 ps pour différentes énergies. (a) $8\mu J$ (b) $13\mu J$ (c)$22\mu J$. Chaque image est séparée de 11 $\mu s$.

étudie dans un premier temps la dynamique du jet à différentes énergies dans le domaine picoseconde (fig.2.2). On y observe pour les trois énergies, un premier jet fin d'environ $30\mu m$ de diamètre, transportant très peu de volume (30 à $80pL$). Celui-ci est rapide puisque l'on mesure une vitesse moyenne de $40m/s$. Il est difficile d'observer de grandes différences sur les hauteurs de jets étant donné la résolution des images. Néanmoins, on mesure tout de même une hauteur moyenne d'environ $1mm$ pour les trois énergies.

C'est surtout sur le second jet que les différences entre les énergies sont les plus notables. La hauteur des jets et leurs épaisseurs augmentent avec l'énergie. Par exemple, à $8\mu J$, la hauteur maximale est d'environ $600\mu m$, contre $1,3mm$ à $22\mu J$. Les vitesses des seconds jets sont respectivement de $4 - 5 - 7.5m/s$ pour des volumes transportés de $0.8 - 1.1 - 1.85nL$ à $8 - 13$ et $22\mu J$.

On suppose donc que c'est la taille et le volume des bulles qui augmentent le volume transporté par le jet puisque pour ces énergies, les volumes de ces bulles sont de $3 - 5 - 10nL$. Si la vitesse augmente malgré la quantité de matière déplacé qui augmente, c'est sans doute lié à l'énergie de la bulle qui augmente elle aussi avec l'énergie du laser.

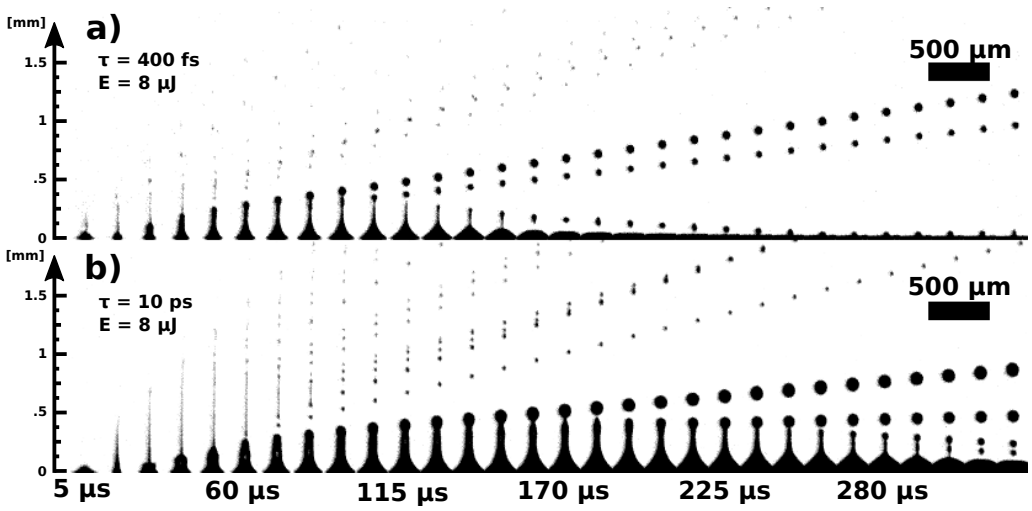



FIGURE 2.3 – Chronologies de jets à $8\mu J$ pour deux durées d'impulsions. (a) $400fs$ (b) $10ps$. Chaque image est séparée de $11\mu s$.

On effectue la même démarche pour comparer le régime picoseconde et femtoseconde, avec la figure 2.3. On mesure à $400fs$, une hauteur maximale du premier jet de $360\mu m$ contre presque $1mm$ à 10 ps. Concernant le second jet, on mesure aussi des différences, avec un volume maximal transporté de $800pL$ à $10ps$ contre $130pL$ à $400fs$. Par contre, concernant la vitesse du second jet, on trouve une vitesse de $6m/s$ à $400fs$ contre $4m/s$ à $10ps$. Il semblerait donc que pour le régime femtoseconde, que le volume transporté par le jet soit nettement inférieur à celui du régime picoseconde mais que ces jets soient plus rapides.

La différence entre ces deux régimes réside dans l'efficacité du transfert d'énergie entre le laser et la bulle. En effet, nous avions vu en tout début de thèse qu'en femtoseconde, la taille des bulles était plus petite qu'en picoseconde à même énergie. Ici, on quantifie le volume de la bulle à environ 1 nL à 400 fs contre 3 nL à 10 ps.

Précédemment, nous avions vu que pour un facteur 3.6 entre le volume d'une bulle à $8\mu J$ et celle à $22\mu J$ n'avait de conséquence qu'une augmentation d'un facteur 2.4 sur le volume transporté par le jet. Alors qu'en modifiant la durée d'impulsion, le facteur 3 sur le volume des bulles engendre un facteur 6 sur le volume des seconds jets. On suppose donc qu'en dehors de la modification de la taille de la bulle, il existe un lien entre la méthode du dépôt d'énergie et la dynamique du jet. Même si cette hypothèse n'est pas vérifiée ni étudiée, on peut tout de même conclure de manière générale que c'est la taille et l'énergie de la bulle qui contrôle la dynamique du jet et le volume qu'il transporte mais qu'en changeant de durée d'impulsion, les variations sont différentes.

### 2.1.2 Dynamique des jets à 2000 nm

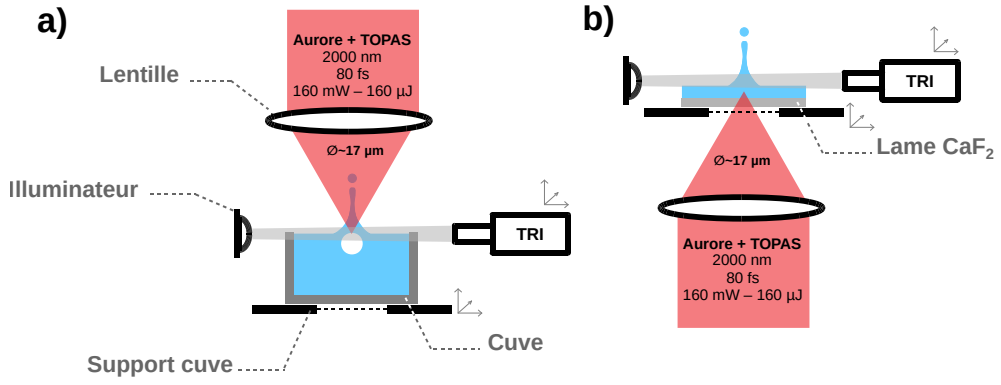



FIGURE 2.4 – Schéma d'expérience d'observation de jets à 2000 nm (a) En attaquant par l'interface air-liquide (b) En attaquant par l'interface verre-liquide.

Dans cette section, nous étudions la dynamique des jets à différentes énergies pour une longueur d'onde de $2000nm$. Pour réaliser cette expérience et comme illustré en figure 2.4, on utilise un faisceau issu de la chaîne Aurore associée à un TOPAS, pour générer des impulsions de $80fs$ à $2000nm$. On focalise ces faisceaux via une lentille de $CaF_2$ de focale $20mm$ dans une cuve remplie d'eau à travers l'interface air-liquide. Une seconde configuration est testée en focalisant cette fois-ci le même faisceau à travers une lame de $CaF_2$ sur laquelle repose un volume d'eau étalé. La taille du faisceau est mesurée à $17\mu m$ sur échantillon. Les impulsions délivrent jusqu'à $160\mu J$ sur cible. On observe les jets générés grâce au système de TRI.

Dans un premier temps, on étudie la dynamique des jets dans la configuration d'attaque par l'interface air-liquide. La figure 2.5 représente la variation de cette dynamique à $22-35$ et $80\mu J$. On observe dans un premier temps une explosion en surface dans les deux premières microsecondes, quelle que soit l'énergie appliquée. Nous avions déjà noté que cette explosion était liée au paramètre de Standoff et à la proximité de la bulle de la surface libre. Comme on peut l'observer sur chaque séquence au temps $t = 1\mu s$ cette explosion s'intensifie avec l'énergie. Le premier jet, comme nous l'appelions jusqu'ici, se trouve entre 1 et $15\mu s$, mais ce denier est totalement perturbé. Sa forme n'est plus celle d'un jet, ce pourquoi, nous l'appellerons dorénavant « spray ». Ce spray s'intensifie lui aussi avec l'énergie, mais donne tout de même naissance à un second jet, bien définit et non perturbé. Ce second jet se développe et transporte de plus en plus de liquide lorsque l'énergie augmente avec respectivement $1.5-2.8-4.9nL$ pour $22-35-80\mu J$. Etant donné qu'avec le système de TRI, les images présentées sont des reconstitutions partielles d'évènements différents, il nous est quasiment impossible de définir des vitesses de

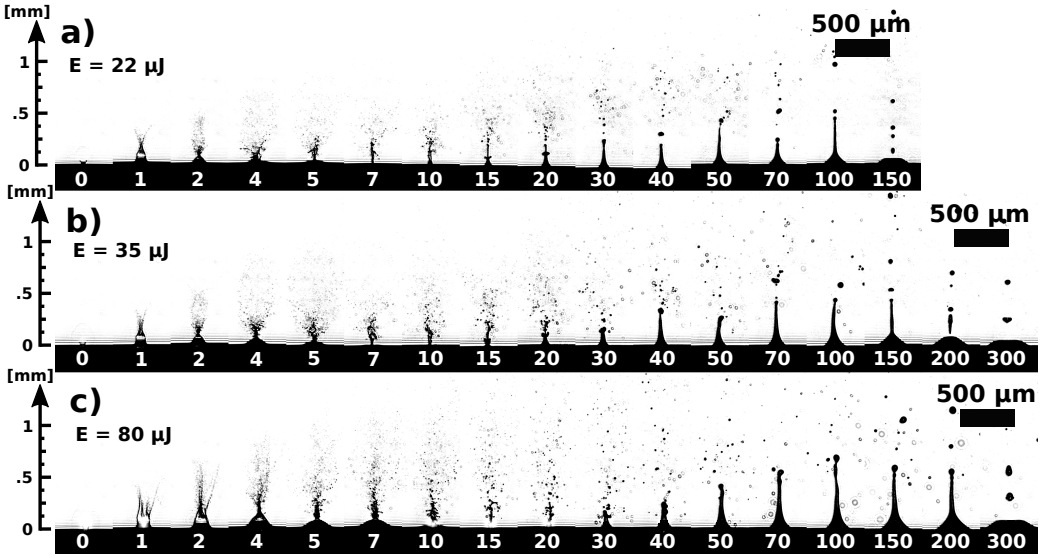



FIGURE 2.5 – Chronologies de jets à 2000 nm pour différentes énergies (a) $22\mu J$ (b)$35\mu J$ (c)$80\mu J$. Le temps affiché en dessous de chaque image est en $\mu s$

jets. Par contre, il semblerait que la hauteur maximale atteinte par l'ensemble de ces jets ne soit que très peu sensible à l'énergie.

Etant donné les contraintes imposées par l'absorption du laser par l'eau aux bords de l'interface air-liquide, une seconde configuration d'expérience est testée (fig.2.4b). En passant à travers la lame de $CaF_2$, le faisceau laser est absorbé cette fois-ci à l'interface verre-liquide. De cette manière on force la bulle à croître dans un volume prédéfini. Pour un volume déposé sur la lame, on varie l'énergie du laser et on observe les conséquences sur la dynamique des jets. La figure 2.6 expose trois recompositions de dynamique à $35 - 50 - 80\mu J$.

A $35\mu J$, seule une déformation de la surface est observée, et aucun jet n'est créé. Lorsque l'énergie augmente, à $50\mu J$ par exemple, cette déformation s'agrandit jusqu'à donner un jet. On retrouve alors une dynamique connue, à savoir la naissance d'un premier jet durant les 100 premières microsecondes suivi d'un second jet. Ce premier mesure environ $20\mu m$ de diamètre pour une hauteur maximale d'environ $1.7mm$ atteinte $70\mu s$ après l'impact laser, aussi bien à $50\mu J$ que $80\mu J$. Le second jet s'initie à $t = 20\mu s$ et mesure environ $65\mu m$ de diamètre à $50\mu J$ et $80\mu m$ à $80\mu J$. Il est difficile d'émettre des conclusions sur l'impact de l'énergie par manque de données dans cette configuration, mais il semblerait que le premier jet ne soit que peu impacté par l'énergie. Par contre, le second jet transporterait plus de liquide lorsque l'énergie augmente.

Ce que nous observons aussi est la formation d'une couronne lors de la formation du second jet, aux alentours de $t = 30 - 40\mu s$. Cette couronne n'a encore

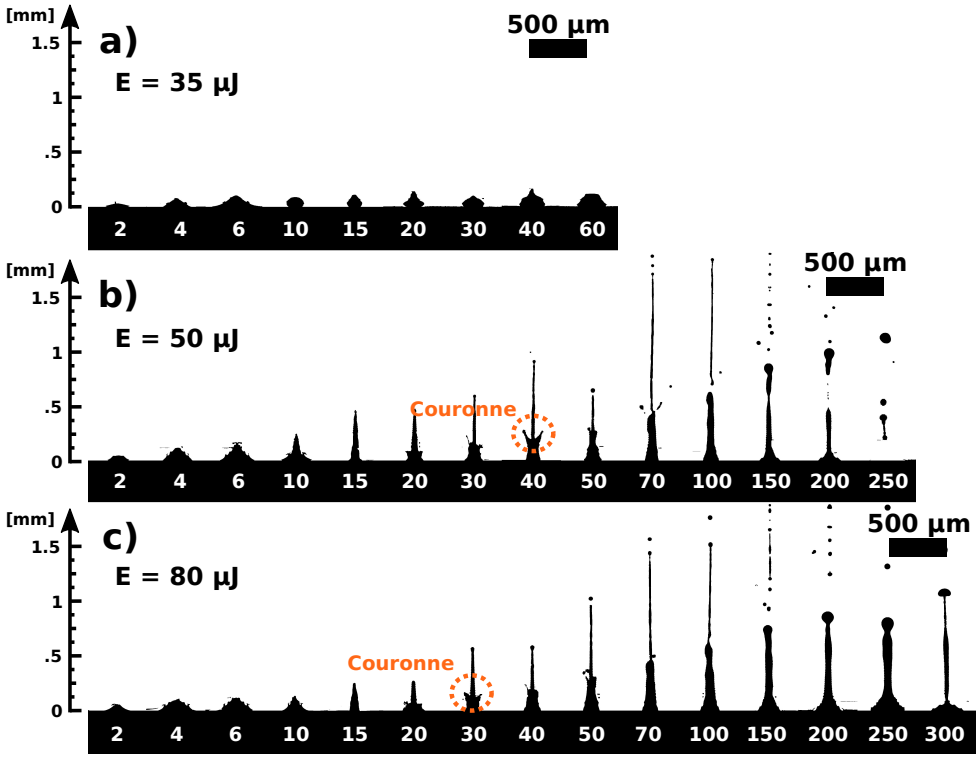



FIGURE 2.6 – Chronologies de jets à $2000nm$ pour différentes énergies en attaquant par une lame de $CaF_2$ à (a) $35\mu J$ (b) $50\mu J$ et (c) $80\mu J$. Les temps affichés en dessous de chaque image sont en $\mu s$.

jamais été observée jusqu'à maintenant dans le cadre de la thèse, il se pourrait donc qu'elle soit liée à la configuration de l'expérience et donc à la présence d'une interface solide.

Ce qui nous intéresse ici est surtout la forme et la dynamique du jet. Elle ressemble fortement à ce que nous pouvons observer dans le cas de la génération de jet par ablation d'une couche sacrificielle. Pour illustrer ces propos, nous réalisons le montage exposé en figure 2.7.

Un faisceau issu de la chaîne solstice délivrant des impulsions de 10 ps à $1030nm$ sont focalisés sur une lame de verre couverte d'une fine couche d'or (environ $30nm$). L'objectif utilisé est un objectif de focalisation de type microscope de chez Thorlabs, ouvert à 0.20. Le faisceau au plan focal est estimé à $10\mu m$ de diamètre. Sur la lame, on dépose au préalable l'eau à l'aide d'une pipette type Pipetman. A l'aide d'une caméra ultra rapide Phantom, on observe la dynamique des jets.

On présente en figure 2.8 un bref aperçu de deux dynamiques observées à $4\mu J$ et $9\mu J$. On y observe un premier jet qui se déploie dans les 100 premières microsecondes, avec une épaisseur d'environ $20 - 25\mu m$ et à une vitesse de $14m/s$

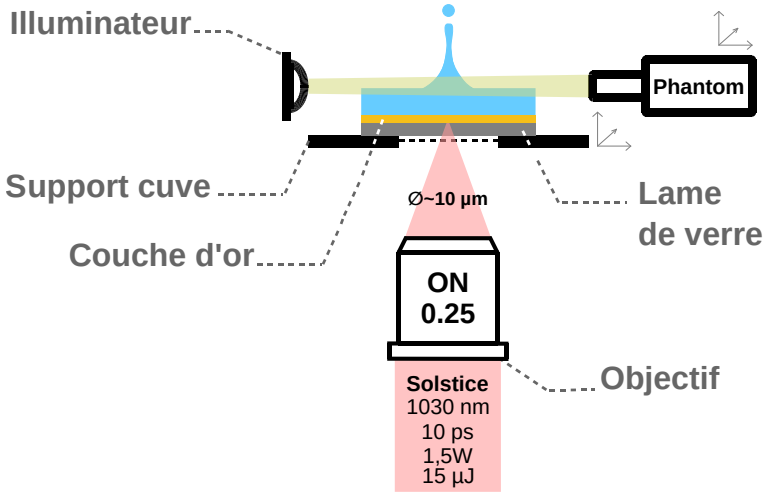



FIGURE 2.7 – Schéma d'expérience pour la génération et l'observation de jets par ablation de couche sacrificielle à $1030nm$ pour des impulsions de $10ps$

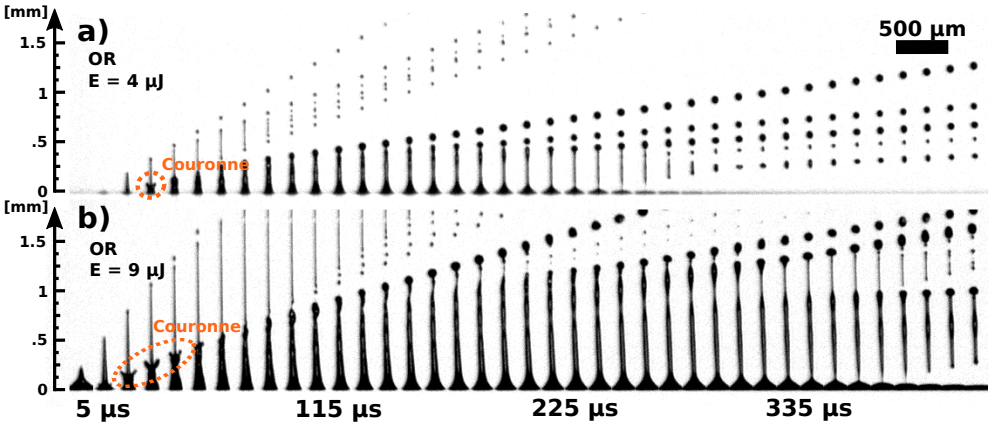



FIGURE 2.8 – Dynamique de jets générés par ablation d'or à $1030nm$ à $10ps$ pour différentes énergies (a) $4\mu J$ (b) $9\mu J$. Chaque image est séparée de $11\mu s$

à $4\mu J$ et $28m/s$ à $9\mu J$. Initié dans les 10 premières microsecondes, le second jet transporte à son tour plus de volume, à savoir $0.5nL$ à une vitesse de $3m/s$ à $4\mu J$ et $1.4nL$ à une vitesse de $7m/s$ à $9\mu J$. Encore une fois, l'énergie du laser entraîne le transport de plus matière et une vitesse de déplacement plus rapide, aussi bien pour le premier jet que le second. Enfin, nous observons aussi, pour les deux énergies, la formation d'une couronne à $t = 20\mu s$.

En conclusion, à cette longueur d'onde, deux configurations sont possibles et donnent des résultats très différents. En attaquant par l'interface air-liquide, on force le paramètre de Standoff à être inférieur à 0.4, entraînant alors l'ablation

du liquide et la formation d'un spray puis d'un jet. Avec la seconde configuration, à savoir l'attaque par une interface verre-liquide, on force la bulle à croitre dans un volume prédéfini. Les jets créés ressemblent fortement à ceux que nous observons avec une couche sacrificielle. C'est un avantage considérable étant donné que les études menées sur les jets par ablation d'une couche sacrificielle sont jusqu'à aujourd'hui, bien connues et maîtrisées. Travailler à cette longueur d'onde permettrait, par analogie, de trouver rapidement et efficacement des paramètres d'impressions idéales pour l'impression de cellules.

## 2.2 Reproductibilité des jets

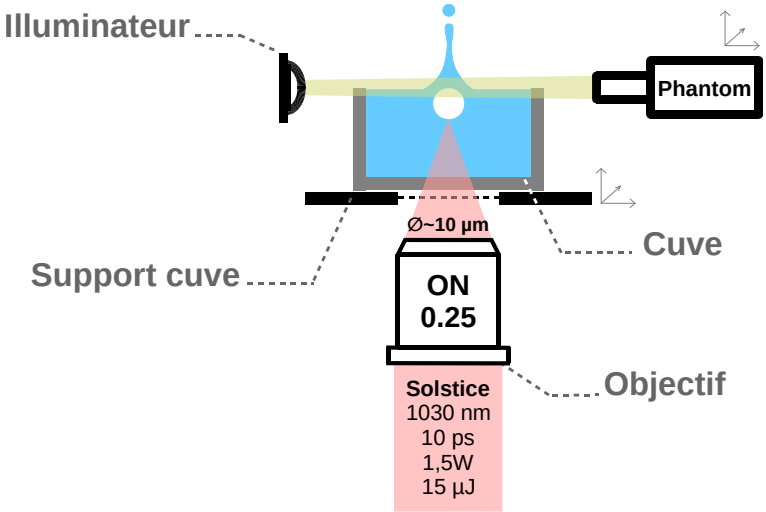



FIGURE 2.9 – Schéma d'expérience pour l'observation de jets générés par laser à $1030nm$ à $10ps$

Dans le but de contrôler le volume de liquide déposé, les jets générés doivent être reproductibles à plus de 90% avec une variabilité tolérée de l'ordre de 20%. Connaissant ces objectifs, l'idée est donc dans cette section d'étudier ces critères.

Pour ce faire, on utilise un faisceau issu de la chaîne Solstice émettant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ et focalisé via un objectif de focalisation Thorlabs avec lequel on estime la taille de spot au plan focal à $10\mu m$. Les impulsions délivrent sur échantillon une énergie maximale de $22\mu J$. On répète la même expérience 50 fois en observant les jets à l'aide d'une caméra rapide Phantom.

La figure 2.10 expose le résultat de ces 50 jets pour trois temps données, 16 - 70 et 200 $\mu s$. Ils représentent respectivement le premier jet, la transition entre le premier et le second, puis la fin du second jet avec l'éjection d'une goutte. On trace sur la figure en pointillé la ligne des hauteurs mesurées. Le but est d'avoir un aperçu visuel des écarts de hauteurs entre les jets.

A $16\mu s$ la hauteur de jet moyen est de $840\mu m$ pour un écart type relatif de 10%, une largeur à la base moyenne de $170\mu m$ et un écart relatif de 6% ainsi qu'une largeur à mi-hauteur de $60\mu m$ pour un écart relatif de 10%.

A $70\mu s$, le jet se rompt à une hauteur moyenne de $550\mu m$ avec un écart relatif de 3%, une largeur à la base de $270\mu m$ et un écart relatif d'également 3%. Sa largeur à mi-hauteur est de $115\mu m$ pour un écart relatif de 7%.

Et enfin, à $200\mu s$, une largeur de base de $355\mu m$ pour un écart relatif de 4% ainsi qu'une largeur à mi-hauteur de $115\mu m$ pour un écart relatif de 7%.

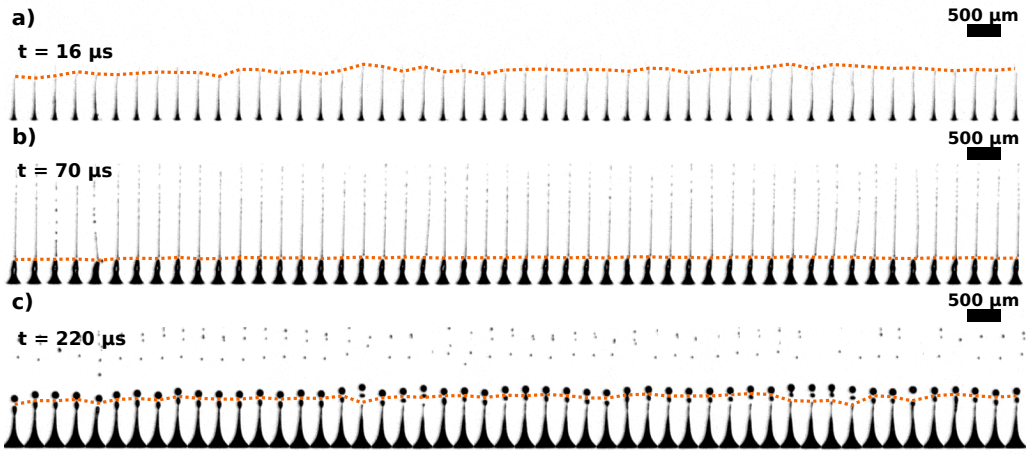



FIGURE 2.10 – Etude de reproductibilité et de variabilité des jets à $1030nm$ $10ps$ et $13\mu J$ à différents temps. (a)$16\mu s$ (b) $70\mu s$ et (c) $220\mu s$

Le premier jet est légèrement moins reproductible que le second au vu des écarts relatifs. On peut l'expliquer par le fait que le second jet étant plus lent et plus épais est plus robuste pour ce type de test de reproductibilité. Enfin, un point important qui peut expliquer la variabilité du processus est la stabilité du laser. Celui-ci est estimé à environ 5%, ce qui, pour une énergie appliquée de $13\mu J$ représente $0.65\mu J$. Comme nous savons que la dynamique d'un jet (son volume et sa vitesse) est impacté par l'énergie appliquée par le laser, on relie ces légères fluctuations à celle du système.

Au vu des résultats et des écarts relatifs mesurés (quasiment tous inférieurs à 10%), on valide la robustesse du phénomène. De même sur les cinquante tirs effectués, tous ont donné un jet. Le phénomène est donc reproductible, bien au delà de nos attentes qui étaient de 90%.

## 2.3 Ajout d'un receveur

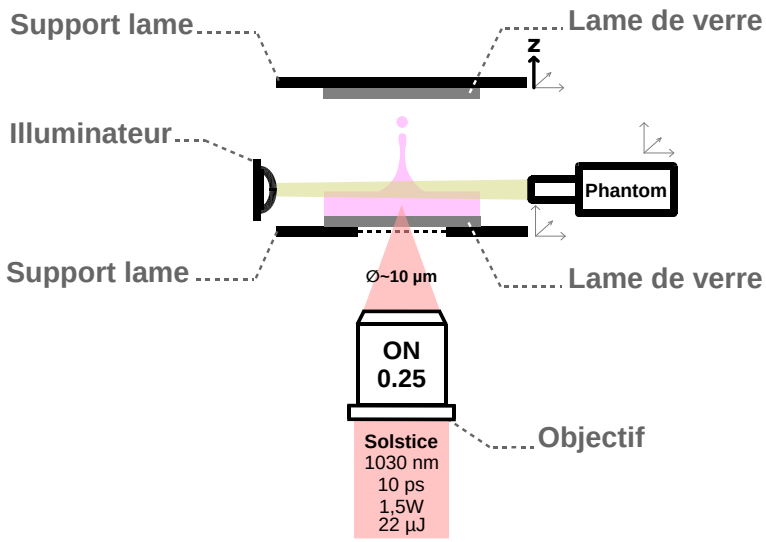



FIGURE 2.11 – Schéma d'expérience pour l'observation de jet de milieu cellulaire à $1030nm$ $10ps$ $8\mu J$ pour différentes positions d'un substrat receveur.

Dans cette section, on étudie la dynamique de jet de milieu cellulaire lorsqu'un substrat receveur est placé au-dessus du système (fig.2.11). Pour rappel, le milieu cellulaire est un mélange industriel spécialement conçu pour la culture cellulaire.

Pour réaliser cette expérience, on utilise un faisceau issu de la chaîne solstice délivrant des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ focalisés sur une lame de verre recouverte de milieu cellulaire. L'objectif utilisé est un objectif de focalisation Thorlabs, ouvert à 0.20. Le faisceau au plan focal est estimé à $10\mu m$ de diamètre. Sur la lame, on dépose le milieu cellulaire à l'aide d'une pipette type Pipetman. On observe la dynamique des jets avec une caméra ultra rapide Phantom, .

En déplaçant le receveur grâce à une platine de translation, on compare la hauteur des jets pour des distances comprises entre 300 et 1000 $\mu m$ à $8\mu J$, $1030nm$, $10ps$. Les résultats sont exposés en figure 2.12.

Lorsque le receveur est placé à 1 mm, seules les gouttes éjectées y sont interceptées. La dynamique du premier et du second jet n'est alors pas perturbée par la lame de verre. A 650 et $450\mu m$ seuls les premiers jets sont impactés par le receveur car cassés à cette même hauteur puis la dynamique reprend le fil de son histoire. Dans les deux cas, les seconds jets ne sont pas perturbés car ne dépassent pas les 400 $\mu m$ de hauteur. C'est à partir de 300 $\mu m$ que le second jet est totalement modifié. En plus d'être interrompu, le jet continu de transférer du volume par effet de capillarité jusqu'à sa rupture à 350 $\mu s$, comme le montre la figure 2.13, où le

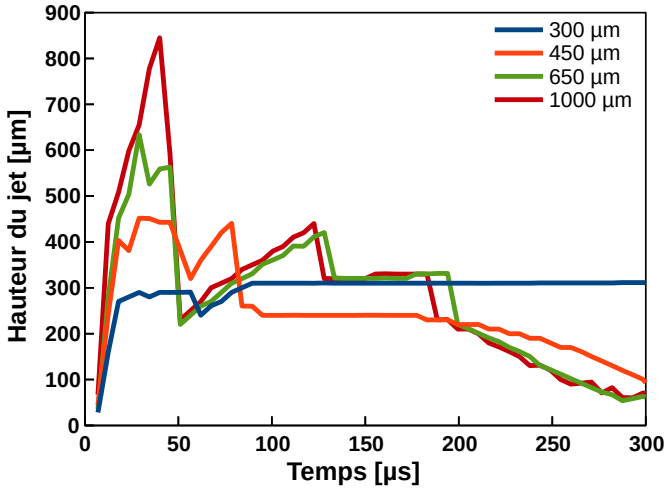



FIGURE 2.12 – Variation de la hauteur des jets en fonction de la hauteur du substrat par rapport au donneur pour des jets de milieu cellulaire à $8\mu J$ et $10ps$

volume final transféré atteint alors d'environ $1,3nL$. On appellera alors ce type de jet, un jet par transfert.

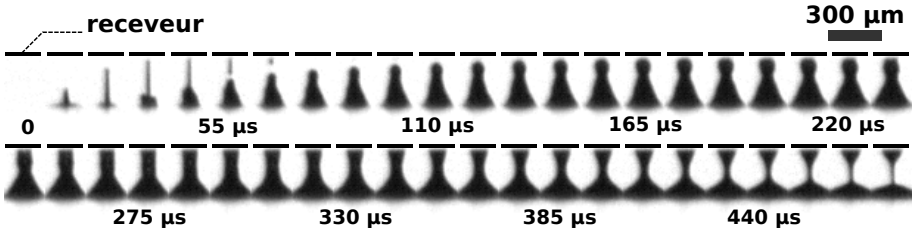



FIGURE 2.13 – Chronologie de jets pour un substrat placé à 300 $\mu m$ de la surface

Etant donné que les jets suivent la même dynamique au fil du temps, lorsque le receveur intercepte seulement le premier jet, c'est la quantité manquante qui est transférée ainsi que le volume des gouttes projetées par le second jet. Donc plus le substrat se rapproche de la surface, plus le volume déposé augmente. Lorsqu'il impact la dynamique du second jet, alors un régime de transfert s'établit entre l'encre et la lame de verre qui a pour conséquence d'augmenter drastiquement le volume transféré. La distance entre le donneur (l'encre) et le receveur (le substrat) offre un nouvel axe de recherche et de variation, sur lequel il est relativement facile de jouer pour moduler le volume de liquide déposé. Pour y arriver, il faut connaître la taille du premier et du second jet. On privilégie des distances supérieures à la hauteur du premier jet pour déposer très peu de liquide, et des distances légèrement inférieures au second jet pour en déposer des plus importants.

## 2.4 Impression de motifs

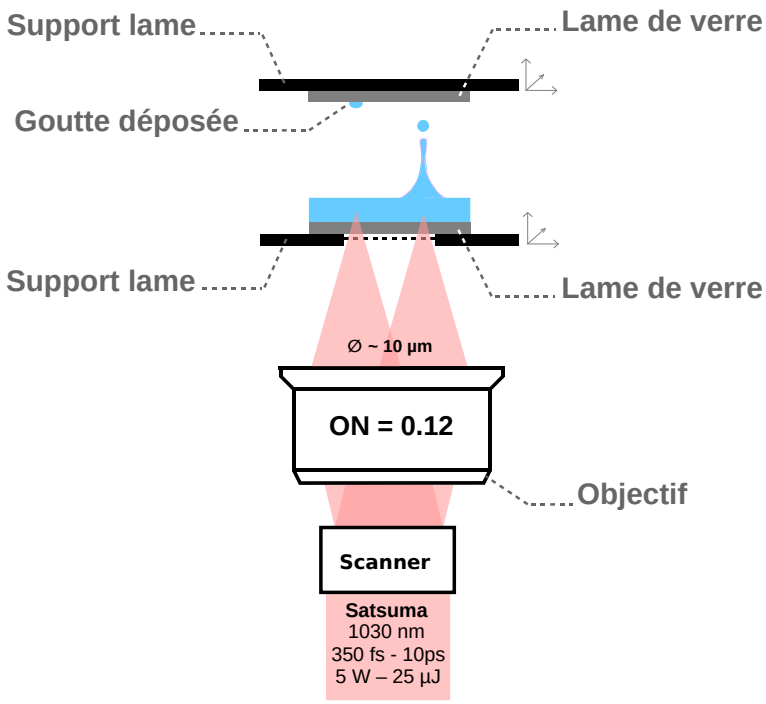



FIGURE 2.14 – Schéma d'expérience pour l'impression de motifs à $1030nm$ de $350fs$ à $10ps$ jusqu'à $22\mu J$ sur cible. Un scanner balaye le faisceau laser sur un objectif type F-thêta, qui le focalise sur la cartouche. Les gouttes sont imprimées sur une lame de verre positionnée à différentes distances de la cartouche

Dans le cadre de la bio-impression de cellules vivantes, l'impression d'objets en 3D est nécessaire pour la reconstruction d'organes. Pour y arriver, des couches 2D se succèdent les unes après les autres jusqu'à obtenir l'objet final. Jusqu'à maintenant, les bulles générées par laser et les jets qui en découlent ont été étudiés, mais il reste à visualiser le type de motif qu'il est possible d'imprimer en fonction de différents paramètres lasers, comme la durée d'impulsion et l'énergie.

Pour imprimer ces motifs, on s'aide d'un laser industriel, Satsuma, de la société Amplitude Systèmes, qui délivre des impulsions allant de $350fs$ à $10ps$ pour une longueur d'onde de $1030nm$. Comme le montre la figure 2.14, ces impulsions sont transportées jusqu'à un scanner qui balaye un objectif télécentrique de type F-thêta. Grâce à cet objectif, les faisceaux sont déplacés dans le champ, tout en étant focalisés sur le même plan. Ainsi, la cartouche d'impression, composée d'une lame de verre transparente de $15mm$ de diamètre et d'une encre préalablement étalée, est impactée par les tirs de laser qui génèrent à leur tour un jet. Un substrat

receveur est maintenu au dessus de cette cartouche afin d'en récolter l'encre éjectée. En répétant l'opération à plusieurs reprises, tout en modifiant les coordonnées d'impact du laser, on créé un motif de goutte d'encre sur le substrat receveur. L'ensemble étant contrôlé par des platines de translation, on adapte la position de la cartouche et du substrat receveur pour affiner la profondeur de bulle ainsi que la distance cartouche-substrat.

L'encre utilisée pour imprimer est un mélange de PBS [1], de BSA [2] à $15mg/ml$ et de 5% de glycérol. Le BSA a pour rôle d'abaisser la tension de surface afin de pouvoir étaler correctement le mélange sur la lame de la cartouche. Quant au glycérol il permet de retarder l'évaporation de l'encre une fois étalée.

Pour chaque motif d'impression et jeux de paramètres testés, on étudie le taux de remplissage (à savoir le nombre de gouttes imprimées sur le nombre de gouttes désirées), le diamètre moyen des gouttes imprimées, ainsi que l'écart-type relatif associé. Le but est de comprendre comment tous ces paramètres s'unissent pour imprimer des motifs complet et uniformes.

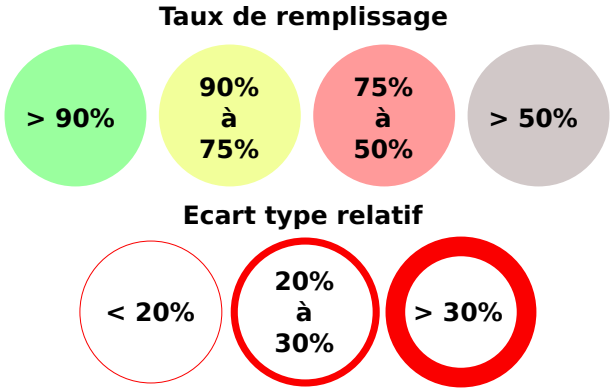



FIGURE 2.15 – Légende des représentations graphiques des impressions de gouttes

Les images interprétées sont des photos d'impressions de gouttes représentant un carré de 1x1 cm avec un espacement entre chaque goutte de 500 $\mu m$. Afin d'en tirer le maximum d'information, une routine sous ImageJ est utilisée. Elle calcule les éléments décrits précédemment, automatiquement. Le code couleur et la légende associée à ces graphes sont décrits en figure 2.15.

1. *Phosphate Buffered Saline*
2. *Bovine Serum Albumin*

### 2.4.1 Etalement et film mince

Jusqu'à maintenant, toutes les études ont été menées dans des cuves remplies d'eau où le paramètre de Standoff désignait les conditions optimales pour générer un jet. Maintenant, l'encre est prélevée, déposée puis étalée sur une lame de verre. Ne pouvant visualiser la position de la bulle dans ces conditions, on calcule la distance entre elle et la surface libre par

$$h = e - d_{PF}$$

avec $e$ l'épaisseur du film étalé et $d_{PF}$ la distance entre la cartouche et le plan focal du laser. La seule inconnue à cette formule est l'épaisseur du film. Pour l'estimer, deux méthodes sont analysées.

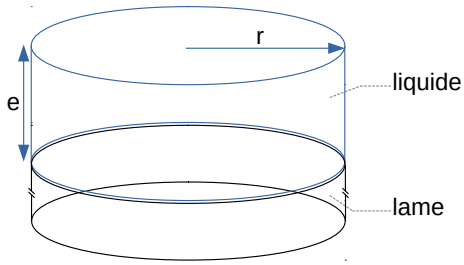



FIGURE 2.16 – Schéma explicatif du modèle cylindre

La première approximation est celle d'un cylindre (fig.2.16), dont les surfaces sont celles de la lame et le volume celui déposé par la pipette. Dans ces conditions, on définit alors l'épaisseur du film par

$$e = \frac{V}{\pi \times r^2}$$

avec $r$ le rayon de la cartouche d'impression et $V$ le volume déposé à la pipette (précise à 1,2% du volume prélevé).

La deuxième hypothèse est celle d'un modèle d'une calotte sphérique car plus on ajoute de liquide, plus il en prend la forme. A ce moment, la hauteur $h$ d'une calotte, pour un volume $V$ et un rayon donné $\phi$, peut se retrouver via l'équation suivante

$$V = \frac{1}{6}\pi h(\frac{3}{4}\phi^2 + h^2)$$

En résolvant l'équation (cf. Annexe), on trouve la relation

$$h = \sqrt[3]{\frac{3V}{\pi} + \sqrt{\frac{-3V}{2\pi} + \frac{\phi^6}{64}}} + \sqrt[3]{\frac{3V}{\pi} - \sqrt{\frac{-3V}{2\pi} + \frac{\phi^6}{64}}}$$

Cette hauteur définit la hauteur maximale de la calotte, en son centre. Pour des volumes allant de 10 à 20 $\mu L$, elle varie de 450 à 900 $\mu m$ (fig.2.18).

Enfin la dernière hypothèse prend source dans la théorie des films minces, prenant compte de certaines caractéristiques fluidiques comme la longueur capillaire, les angles de contacts ainsi que les tensions de surface [104].

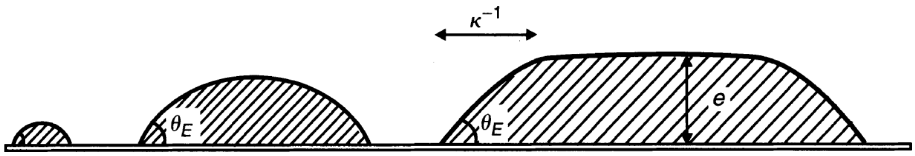



FIGURE 2.17 – Gouttes d'eau déposées sur une surface plane - extrait de [104]

Par définition, la longueur capillaire est la longueur pour laquelle les effets de tension superficielle dominent les effets de la gravité, qu'on retrouve sous la forme

$$k^{-1} = \sqrt{\frac{\Gamma}{\rho g}}$$

avec $\Gamma$ la tension superficielle, $g$ la masse volumique et $\rho$ la densité de l'eau. Dans le cas de l'eau, la longueur capillaire vaut 2,7 mm. Lorsqu'on étale un liquide sur une surface plane, l'angle de contact formé entre ces deux éléments est régit par les tensions superficielles entre le liquide et l'air $\Gamma_{LA}$, le liquide et le solide $\Gamma_{SL}$ et enfin l'air et le solide $\Gamma_{SA}$. Le bilan des forces nous donne l'expression suivante

$$\cos\theta_E = \frac{\Gamma_{SA} - \Gamma_{SL}}{\Gamma_{LA}}$$

avec $\theta_E$ l'angle de contact entre le liquide déposé et la surface (fig.2.17). Cet angle est fixe pour un couple liquide-surface donné. Grâce à cette valeur, on peut définir l'épaisseur minimale que le liquide puisse atteindre avant qu'il ne se déstabilise, par la relation

$$e = 2k^{-1}\sin(\frac{\theta_E}{2})$$

Il est par contre très difficile de mesurer ces angles de contact, c'est pourquoi, les barres d'erreurs en figure 2.18 sont de l'ordre de la centaine de $\mu m$.

La figure 2.18 résume alors les différentes hypothèses et mesures réalisées. On remarque que le calcul à partir de la calotte est très loin des autres. Ceci s'explique par le fait que notre liquide étalé ne prend pas forcément cet aspect pour les volumes testés, comme peut le montrer le schéma exposé plus haut en figure 2.17. En mesurant directement la hauteur du film ou en le calculant par la mesure de l'angle de contact, les valeurs divergent elles aussi. On explique ces différences

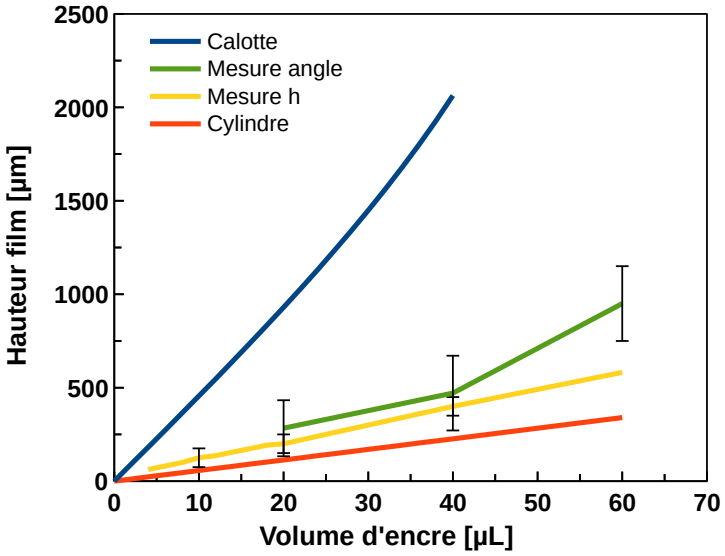



FIGURE 2.18 – Variation de la hauteur du liquide étalé dans le cas d'une calotte sphérique ou d'un cylindre

par les outils et incertitudes de mesures. Enfin, on remarque que c'est tout de même le modèle du cylindre qui se rapproche le plus de nos mesures avec un facteur correctif de 2. Dans la suite des expériences nous prendrons uniquement les valeurs d'épaisseur de film mesurées avec une incertitude de $50\mu m$.

### 2.4.2 Variation de l'énergie et du volume étalé

Dans cette section, à l'aide du système présenté en figure 2.14, on fait varier l'énergie du laser ainsi que le volume d'encre étalé sur la cartouche d'impression. Des impulsions de $10ps$ à $1030nm$ sont focalisées à l'aide d'une F-thêta sur la cartouche. Une lame de verre de microscope jouant le rôle substrat receveur est placée à $500\mu m$ de la cartouche.

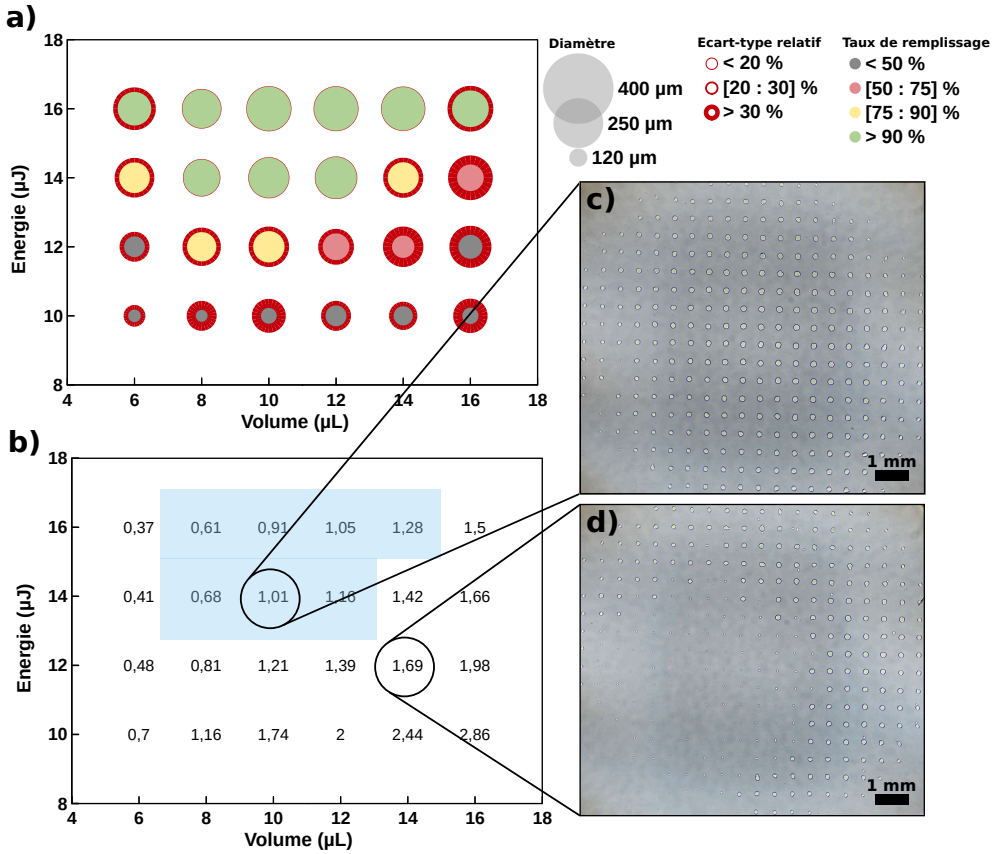



FIGURE 2.19 – Mesure des tailles de gouttes imprimées en fonction de l'énergie et du volume. (a) Diamètre, écart-type et taux de remplissage, (b) Paramètre de Standoff pour chaque variable, la zone en bleue correspond aux meilleurs motifs (c) impression d'un motif 1x1cm à $14\mu J$, $10\mu L$ à $10ps$ (d)impression d'un motif 1x1cm à $12\mu J$, $14\mu L$ à $10ps$

Le résultat de cette expérience est exposé en figure 2.19. Il se présente en plusieurs parties. La première (fig.2.19a) représente le taux de remplissage, le diamètre des gouttes et leur écart-type relatif, en fonction de l'énergie et du volume d'encre étalé sur la cartouche. La seconde (fig.2.19b) est un calcul du paramètre de Standoff basé sur les expériences présentées en début de manuscrit ainsi que sur la

mesure de l'épaisseur de volume étalé. On prend donc comme rayon maximal de bulle, ceux obtenus dans l'expérience sur la variation de l'ouverture numérique à $10ps$, $1030nm$, $ON = 0.12$. Tandis que pour la profondeur de bulle, on repère le plan focal et en déduit la position de la bulle par rapport au volume étalé.

En analysant la figure 2.19, on remarque que plus l'énergie augmente, plus le diamètre moyen des gouttes imprimées augmente et l'écart-type diminue. Par contre, à énergie fixe, la taille des gouttes est invariant au volume. La photo de la figure 2.19c, nous permet d'observer une impression idéale, à savoir un taux de remplissage supérieur à 90% ainsi qu'une disparité entre les gouttes inférieure à 20%. On y observe au centre des gouttes imprimées rondes d'environ $220\mu m$ de diamètre mais qui diminue légèrement en allant sur les bords de l'impression. Sur les coins de l'image, aucune goutte n'est observée. Pour expliquer cette variation, on l'explique par la forme de l'encre étalée, qui tend à diminuer sur les bords. Etant donné que le laser est focalisé sur un même plan, la forme que l'encre impose une variation de profondeur de bulle et donc une variation du paramètre de Standoff. Dans ce cas, plus on va vers les bords, plus le paramètre de Standoff diminue jusqu'à ne plus pouvoir générer de jets. Un exemple d'impression de mauvaise qualité est exposé en figure 2.19d, avec taux de remplissage d'environ 75 % pour un écart-type relatif de diamètre de goutte supérieur à 30 %. Ceci est expliqué par une impression en deux phases. La première se situe du centre vers le coin extérieur bas, avec des gouttes imprimées de l'ordre de $40\mu m$ de diamètre. La deuxième concerne le reste de la photo avec des gouttes d'environ $150\mu m$ de diamètre qui diminuent de plus en plus sur les bords. L'effet de bord est encore plus important que celui observé précédemment. Au centre, la distance entre la bulle et la surface est trop important, et lorsque l'on s'éloigne du centre, la profondeur de bulle diminue.

Ensuite, sur la figure 2.19b on remarque qu'une zone d'intérêt se dessine, où le motif est totalement rempli avec un écart-type relatif de diamètre de goutte inférieur à 20%. Il s'agit, en majeur partie de la zone où le paramètre de Standoff est compris entre 0,6 et 1,2 (fig.2.19b). Même si ces valeurs semblent erronées par rapport aux études précédentes, qui mettaient en évidence un paramètre optimal entre 0,4 et 0,8, l'expérience reste comparable car toutes les impressions et calculs sont réalisés dans les mêmes conditions. On décide alors de comparer ces paramètres entre eux.

On remarque que pour des paramètres de Standoff équivalent, le résultat de l'impression n'est pas tout le temps le même. Pour les couples énergie-volume d'un même $\gamma$, $(12\mu J; 10\mu L)$ et $(16\mu J; 12\mu L)$, le premier semble être moins robuste que le suivant, car le motif n'est pas totalement imprimé, et l'écart-type entre les gouttes imprimées est de 21%. Le paramètre de Standoff ne définit pas non plus la taille des gouttes imprimées car pour le couple $(12\mu J; 10\mu L)$, le diamètre moyen est de $170\mu m$ contre $220\mu m$ pour le couple $(16\mu J; 12\mu L)$. Enfin le couple

$(10\mu J; 8\mu L)$ donne un résultat très décevant malgré un $\gamma$ de 1,16. Le motif est imprimé à 20% et la disparité entre les gouttes est élevée, soit 35%. La zone bleue définit en figure 2.19b met en avant les couples compris entre 0,6 et 1,2 pour chaque couple $Energie - Volume$. En superposant les graphes 2.19a et 2.19b, certaines valeurs de $\gamma$ ne donnent pas de beaux motifs imprimés (disparités entre les gouttes et remplissages inférieur à 75%) alors qu'en théorie, ils devraient définir les conditions idéales pour générer des jets maîtrisés.

Pour expliquer ces résultats, trois hypothèses. La première critique le calcul du paramètre de Standoff, la seconde remet en question la taille de la bulle, et enfin la dernière traite de l'optimisation des impressions.

Concernant la méthode de calcul du paramètre de Standoff, le facteur 2/3 trouvé entre le calcul et l'expérimentation enclenche un débat. Comme expliqué précédemment, les méthodes se basent sur une mesure directe de l'épaisseur du film, avec une incertitude de mesure de $50\mu m$. Cette incertitude permettrait donc de rentrer dans les valeurs attendues. Néanmoins, il reste tout de même une grosse incertitude sur la position de la bulle. Pour pallier à ces problèmes il faudrait pouvoir mesurer directement la profondeur de la bulle, ce qui, pour les liquides minces s'avère compliqué, étant donné que pour une observation transverse, les effets de diffractions de la lumière empêchent la visualisation de cette bulle.

Concernant le diamètre des bulles, les mesures de rayon maximal ont été réalisées dans le cas de liquide semi-infini. Comme nous avions précédemment vu, il était possible d'approximer cette taille de bulle par 85% de la taille réelle dans le volume. Néanmoins, il faudrait pouvoir l'observer pour avoir une meilleure estimation de son diamètre, on installant une caméra et une source de lumière sur l'axe optique.

Enfin la dernière possibilité concerne l'optimisation du dernier paramètre d'impression, à savoir la distance entre la cartouche et le substrat. Précédemment, il a été montré que ce paramètre permettait de définir la quantité de volume transféré pour un $\gamma$ donné. Indépendamment de l'énergie, il est donc possible d'augmenter le volume transféré. Dans le cas où le $\gamma$ est optimal mais que peu de matière est déposée, on suppose que la distance cartouche-substrat est trop grande par rapport à la taille du jet. C'est aussi pourquoi, dans ces conditions, augmenter l'énergie du laser permet de remplir davantage le motif (fig.2.19a). Si la même expérience est menée à des distances plus faibles, les résultats où $0,6 < \gamma < 1.2$ (moins bon), deviendraient potentiellement meilleurs.

Au vu des résultats et de la discussion menée sur le calcul du paramètre de Standoff dans ces conditions d'impressions, il est aujourd'hui impossible de le définir comme unique facteur de qualité sur l'impression de motif pour des liquides minces. Il faut alors prendre en compte le couple $(Energie; Volume)$ pour optimiser les impressions.

### 2.4.3 Variation de la durée d'impulsion

Dans cette section, on étudie l'impression d'un même motif en fonction de la durée d'impulsion, entre $500fs$ et $10ps$. Le montage expérimental est strictement le même, ce pourquoi nous ne le décrirons pas de nouveau. La seule différence réside dans les variables et constantes de l'expérience. Ici, on étale sur la cartouche d'impression $10\mu L$ d'encre et on place un substrat receveur à $500\mu m$.

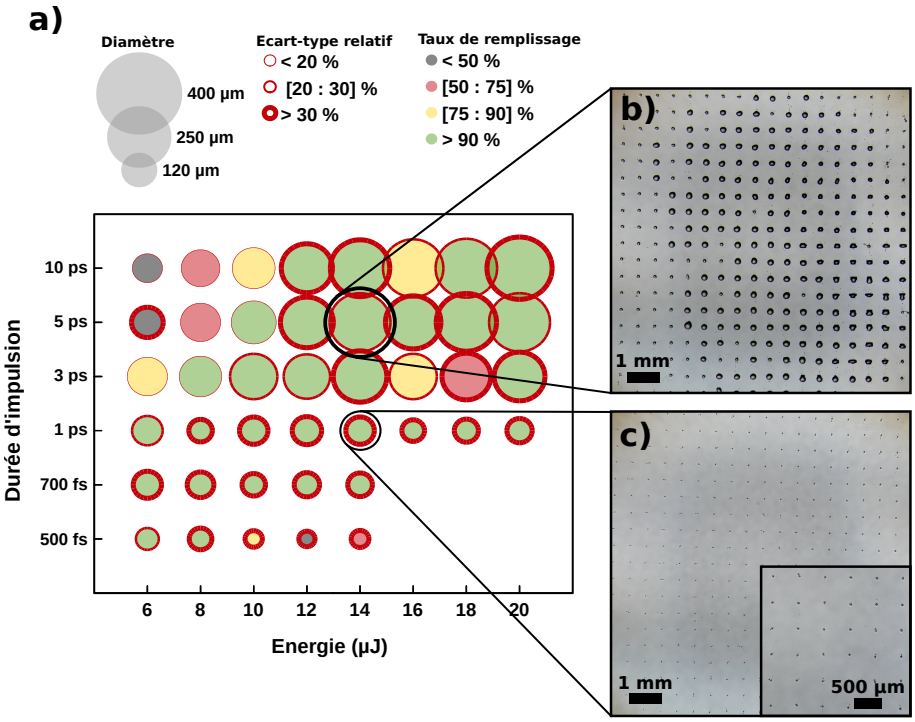



FIGURE 2.20 – Variation du taux de remplissage et du diamètre des gouttes moyens en fonction de la durée d'impulsion (b)Impression de motifs à $1ps$, $14\mu J$, $10\mu L$, $1030nm$ (c) Impression de motifs à $10ps$, $14\mu J$, $10\mu L$, $1030nm$

Le résultat est exposé en figure 2.20. On y discerne deux zones. La première est celle dont le diamètre des gouttes est supérieur à $120\mu m$ et la seconde, celle où il ne dépasse pas les $120\mu m$. Ces deux tendances sont nettement marquées pas la différence en durée d'impulsion. Le régime femtoseconde, n'imprime que des petites gouttes (fig.2.20b) tandis que les régimes au dessus de 1 ps impriment plus de volume (fig.2.20c). Pour expliquer ce phénomène, on se rapporte aux études réalisées sur la dynamique des bulles et des jets. Il avait été montré que le diamètre des bulles créées diminue entre le régime picoseconde et le régime femtoseconde, et que la dynamique était directement impactée par cette différence. Les jets générés en femtoseconde transportent moins de liquide que ceux en picoseconde. Ces ex-

plications confirment la différence entre ces deux régimes et les conséquences sur l'impression des motifs.

Au vu de la figure 2.20, tout porte à croire que le régime femtoseconde, quelle que soit l'énergie, est moins reproductible que le régime picoseconde car les écart-types relatifs sont tous supérieurs à 30%. On peut expliquer ce résultat de deux manières. Etant donné la taille des gouttes imprimées (fig.2.20b), il est plus compliqué, par traitement d'image, d'avoir des résultats aussi fiables que pour des gouttes beaucoup plus grosses, car on est plus sujet à des erreurs de seuillage. La deuxième raison concerne l'optimisation des paramètres d'impressions pour cette durée d'impulsion. L'ensemble des données récoltées dans cette expérience ont été réalisées dans les mêmes conditions. Le système n'est donc peut-être pas optimisé pour la génération de jets en régime femtoseconde. Malgré la nuance sur les conditions d'impressions, la différence entre les deux régimes impulsionnels est assez net. Le volume déposé est beaucoup moins important en femtoseconde qu'en picoseconde.

### 2.4.4 Méthode d'optimisation des impressions

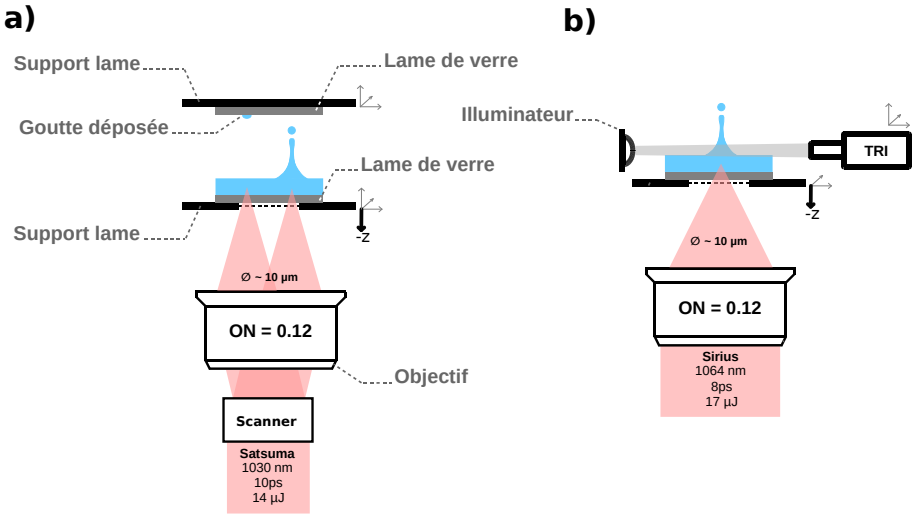



FIGURE 2.21 – Schéma de montage d'expérience pour la méthode d'optimisation des impressions (a) Réalisation de motifs (b) Observation de jets

Afin d'optimiser la qualité des impressions, à savoir le taux de remplissage et la disparité des gouttes imprimées, on réalise une dernière étude expérimentale sur l'impact de la distance entre le plan focal et la position de la cartouche, ainsi que le volume déposé. Par la suite, on utilisera le terme $d_{PF}$ pour désigner la distance entre la cartouche et le plan focal afin de simplifier l'écriture. Dans un premier temps, l'étude est menée à énergie fixe et dans un second temps, à différentes énergies. Pour ce faire, deux montages expérimentaux sont réalisés (fig. 2.21), dont le premier est strictement le même qu'exposé dans la section précédente et le second reprend l'analyse des jets avec un système de TRI. Pour réaliser cette expérience, on relève la position du plan focal puis on abaisse progressivement la position du support de la lame pour que le faisceau continue de focaliser dans le liquide.

Le résultat de cette première expérience est exposé en figure 2.22, où quatre $d_{PF}$ sont sondées, 0 -50 -100 et -150 $\mu m$ pour 7 volumes différents allant de 6 à 18 $\mu L$. Tout d'abord, on remarque que les taux de remplissage du motif et la reproductibilité des gouttes sont meilleurs à -50 et -100 $\mu m$ et chutent à 0 et -150 $\mu m$. Pour les deux $d_{PF}$ optimales, la variation du volume impacte la qualité du motif. Pour les liquides les plus petits (6 et 8 $\mu L$), les motifs sont dégradés mais s'améliorent avec l'augmentation du volume. A $-50\mu m$, ils se dégradent de nouveau, à partir de $14\mu L$ tandis qu'à $-100\mu m$ ils restent de très bonne qualité. Les deux images (fig.2.22b-c) montrent deux exemples d'impression, avec en premier

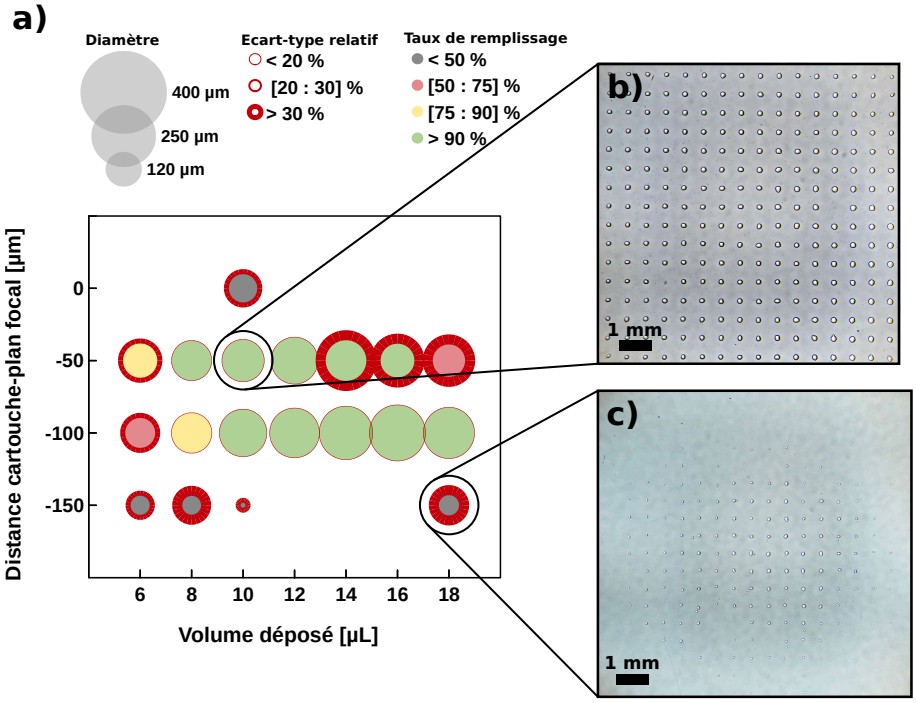



FIGURE 2.22 – (a) Variation du taux de remplissage et du diamètre des gouttes en fonction de la $d_{pf}$ et du volume d'encre étalé sur la lame (b) Image d'une impression pour une $d_{pf}$ de $-50\mu m$, $10\mu L$, $10ps$, $1030nm$ (c)Image d'une impression pour une $d_{pf}$ de $-150\mu m$, $18\mu L$, $10ps$, $1030nm$

une impression de bonne qualité car elle présente des gouttes d'environ $160\mu m$ de diamètre avec une inhomogénéité inférieure à 15%. Tandis que la seconde, le motif est incomplet et les gouttes imprimées sont très disparates.

On explique cette différence et le lien entre la $d_{PF}$ et le volume d'encre étalé, par le paramètre de Standoff. En effet, en jouant sur la $d_{PF}$ on joue sur la position de la bulle dans le liquide, par pas de $50\mu m$, et jouant sur le volume, on modifie aussi la distance entre la bulle et la surface libre. Etant donné le débat mené dans les précédentes sections sur l'épaisseur du film d'eau déposé, on ne peut connaître à ce stade le pas de variation. Mais au vue des résultats, on comprend qu'il existe une plage de couple ($d_{PF}$ ;Volume) optimale pour l'impression de motifs. Ne connaissant pas la taille de la bulle ni même sa profondeur dans le liquide, il est donc primordial de définir une méthode qui consiste à ajuster ce couple pour une énergie donnée afin de définir les paramètres d'impressions idéals.

Pour y arriver, on s'appuie sur le deuxième montage expérimental présenté en figure 2.21. L'idée est alors d'analyser les $d_{PF}$ optimales à des énergies de 10 à 60 $\mu J$ et des volumes de 10 à 60 $\mu L$. Comme le montre le résultat obtenu en figure

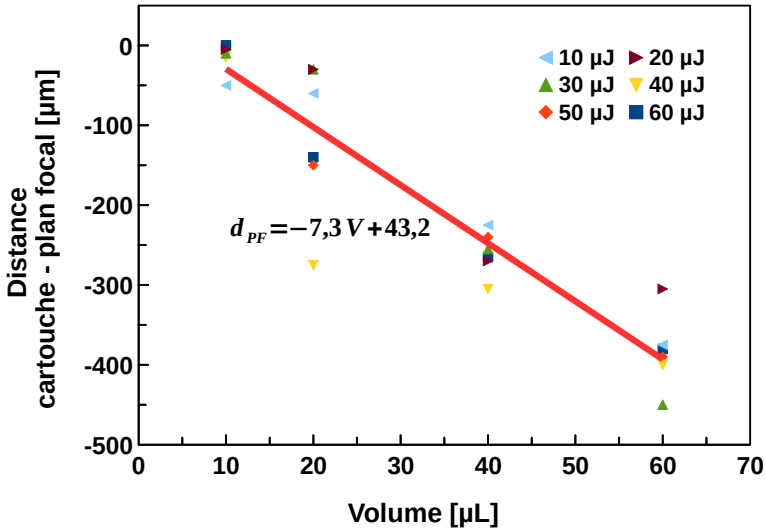



FIGURE 2.23 – Variation de la $d_{PF}$ optimale à différentes énergies et volumes

fig.2.23, pour un même volume, les $d_{PF}$ optimales ne varient que très peu avec l'énergie mais plus avec le volume. La régression linéaire entre la $d_{PF}$ et le volume étalé suit la loi

$$f(x) = -7,3 \times V + 43,2$$

Cette formule permet de trouver la position idéale de la cartouche d'impression pour un volume étalé sans connaître la taille des bulles générées ni même sa position par rapport à l'interface libre.

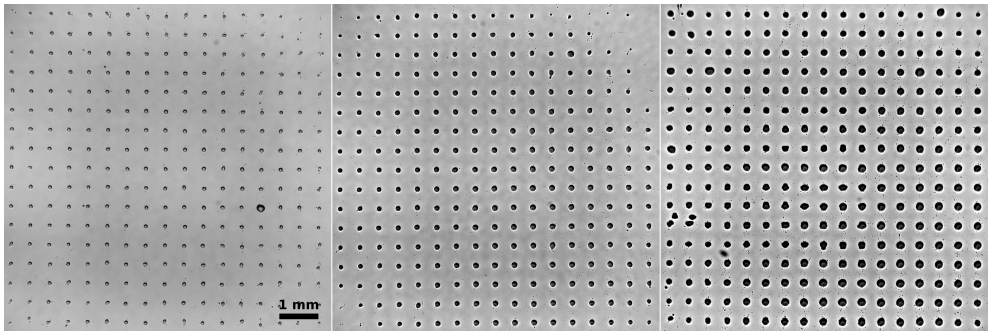



FIGURE 2.24 – Impression de motifs pour des conditions d'impressions optimales en volume et $d_{PF}$ à 12 14 et 16 $\mu J$

Une fois la méthode maîtrisée, les capacités d'impressions sont alors optimisées. Pour la valider, on teste ces performances en imprimant le même motif pour différentes énergies. La figure 2.24 montre alors des résultats très satisfaisants,

car pour les trois énergies testées, on adapte le volume déposé sur la cartouche d'impression ainsi que la $d_{PF}$. On arrive alors à obtenir un motif complet avec une faible disparité tout le long du motif tout en maîtrisant le volume imprimé en augmentant l'énergie du laser.

**Conclusion de partie**

De la déformation d'une surface libre à l'impression de motifs 2D, l'étude menée a permis de mettre en avant les paramètres critiques, comme par exemple le paramètre de Standoff. Ce dernier nous a permis de faire le lien entre la position de la bulle par rapport à la surface, et son rayon maximal. De cette étude, nous en avons déduit que pour $\gamma < 0.8$, les conditions sont réunies pour que la bulle déforme la surface en créant un jet. Pour pouvoir maitriser cette condition de formation de jet, outre la maîtrise de la taille de la bulle via l'énergie du laser, il est important d'en contrôler la profondeur. A $1030nm$ nous avons montré qu'il était possible de positionner au micromètre près la position de cette bulle, tandis qu'à $2000nm$, celle-ci restait accrochée sous la surface. Dans le premier cas, on peut en tirer plusieurs avantages, comme une gestion fine du paramètre de Standoff, et dans le second cas, il est intéressant de savoir que la bulle reste toujours au même endroit, surtout s'il nous est impossible de l'observer et de la calculer.

De cette déformation en découle la formation de jet, avec la mise en évidence de deux jets successifs, le premier étant fin et véloce, alors que le second, est plus volumineux et plus lent. A $2000nm$, nous avons remarqué que pour un paramètre de Standoff inférieur à 0.4, ce premier jet se retrouvait sous la forme d'un spray. Mais grâce au confinement de la bulle sous la surface, une configuration alternative a été envisagée, en focalisant le faisceau à travers une lame de verre. Cette fois-ci la bulle se retrouve à l'interface verre-liquide et reste dépendante du paramètre de Standoff. En jouant sur l'énergie on modifie directement son rayon maximal, tandis qu'en jouant sur l'épaisseur de liquide, on modifie la distance bulle-surface. Cette configuration et les résultats affichés sont quasiment identiques à ce que nous avons pu observer dans le cas de la génération de jet par ablation d'une couche sacrificielle.

En étudiant l'impression de motifs à $1030nm$, nous en sommes arrivés à un débat autour du paramètre de Standoff, car, sans observer la bulle il est impossible de définir précisément la valeur de ce paramètre. A défaut d'outils capable de mesurer les diamètres des bulles et leurs positions sous la surface, la tentative de calcul a soulevé un nouveau problème, celui de l'épaisseur d'un film mince d'eau. Pour pallier à ces problèmes, une méthode a été mise en place pour adapter à chaque volume étalé, la position d'une cartouche d'impression, par l'observation de jets. Elle consiste à relever les positions optimales de $d_{PF}$ pour chaque volume déposé, et d'en tracer une courbe d'étalonnage. En se servant de cette courbe, on peut ensuite faire varier l'énergie du laser pour générer des jets de différentes tailles et d'en contrôler le volume à imprimer.

# Quatrième partie

# Impression de liquide inhomogène : réalisation d'un modèle de peau

# Chapitre 1

# Impression de motifs 2D

## 1.1 Une dynamique perturbée

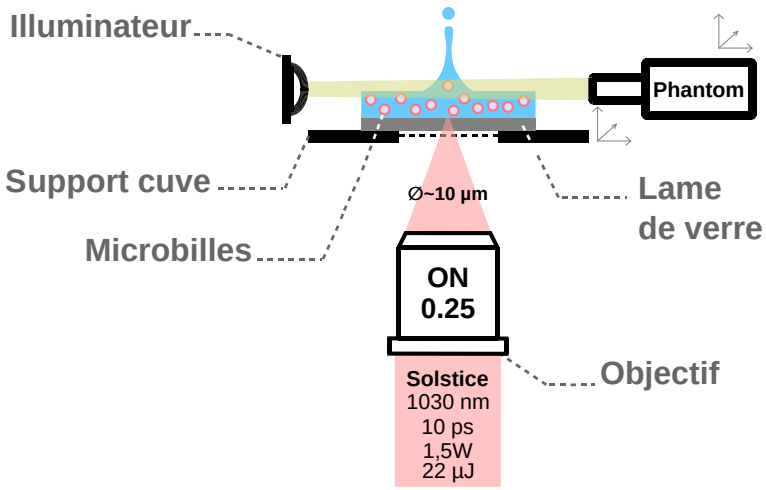



FIGURE 1.1 – Schéma d'expérience pour l'observation de jets d'une encre contenant des microbilles de PMMA de $15\mu m$ de diamètre, à différentes concentrations

Dans le but d'imprimer un motif 2D de gouttes d'encre cellulaire, on complexifie progressivement les études réalisées en modifiant la composition de l'encre. Afin d'éviter le coût d'achat et d'entretien des cellules, on utilise des micro-billes de PMMA [1] de $15\mu m$ de diamètre. La taille a volontairement été sélectionnée pour se rapprocher le plus possible de la taille des cellules qui seront utilisées par la suite.

La figure 1.1 expose le schéma d'expérience. Grâce à la chaîne Solstice du CELIA, on focalise un faisceau à $1030nm$, $10ps$ via un objectif de type microscope

1. Polyméthacrylate de méthyle

ouvert à 0.25 sur l'échantillon. Celui-ci est une lame de $15mm$ de diamètre où on étale un volume d'encre préalablement préparé, à base de PBS, de BSA ($15mg/ml$) et de micro-billes de PMMA à deux concentrations, $5M/ml$ et $20M/ml$. La taille du faisceau est estimée par calcul à $10\mu m$ sur échantillon pour des énergies maximales de $22\mu J$. On positionne l'échantillon aux conditions optimales pour générer des jets, que l'on observe via une caméra ultra-rapide de type Phantom.

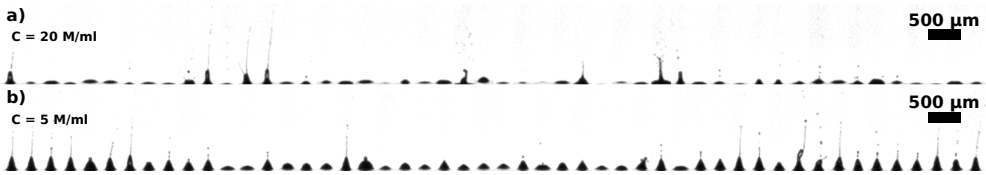



FIGURE 1.2 – Observation de 50 jets d'encre contenant des micro-billes de PMMA de $15\mu m$ à $10ps$, $1030nm$, $10\mu J$ pour une concentration en billes de (a) $20M/ml$ (b) $5M/ml$

Avant d'étudier l'impact des paramètres lasers comme l'énergie et durée d'impulsion, on étudie la reproductibilité et la disparité des jets pour les deux concentrations préparées. Pour cela, on se fixe à un temps de donné, $t = 70\mu s$, censé correspondre au temps transitoire entre le premier jet et le second jet, puis on observe 50 jets différents. Le résultat de cette expérience est exposé en figure 1.2. Pour une énergie sur cible de $10\mu J$, quelle que soit la concentration en micro-billes, la reproductibilité du phénomène est totalement perturbée. Tous les tirs lasers n'ont pas donné de jets car le taux de réussite à $20M/ml$ n'est seulement que de 16% contre environ 35% à $5M/ml$. De plus, si l'on observe les séquences qui ont donné un jet, ils sont tous différents par rapport à leur hauteur, diamètre ou encore forme.

C'est bien l'ajout de micro-billes qui génère ces disparités, car nous n'avions jamais observé de tels comportements en étudiant des encres homogènes. On peut émettre plusieurs hypothèses sur la disparité observée. On reprend pour ça, étape par étape, les phénomènes qui pourraient en être la cause.

Lors de de l'impact du laser dans la matière, celui-ci ne la voit plus comme uniforme comme c'est le cas dans les liquides homogènes. Pour preuve, voici une image d'une lame recouverte d'une encre à différentes concentrations (fig.1.3). On y observe assez facilement que plus la concentration augmente, plus la surface se remplit en micro-billes jusqu'à en être complétement recouvert à $50M/ml$. On peut alors dire qu'à l'échelle du micromètre, le faisceau rencontre sur son trajet des objets pouvant le perturber, soit en les traversants avant de se focaliser, soit au niveau du plan focal. Dans ce cas, on parle alors de diffraction, de réflexion, de diffusion, d'absorption, et donc de perte de puissance par la présence de ces micro-billes. La position et la taille du plasma se retrouve alors modifiées, perturbant

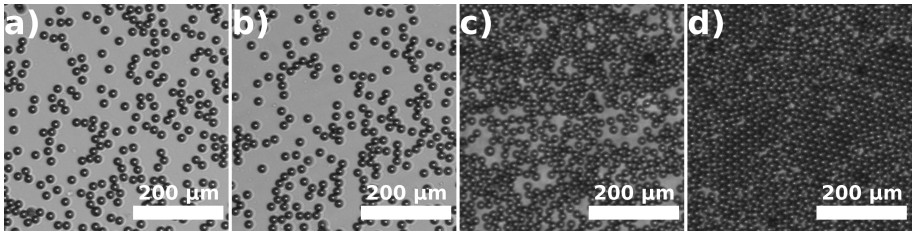



FIGURE 1.3 – Variation de la concentration de micro-billes de $15\mu m$ de diamètre pour $10\mu L$ d'encre étalée sur la cartouche d'impression à (a)$5M/ml$ (b)$10M/ml$ (c)$20M/ml$ (d)$50M/ml$

donc la suite des évènements. Par exemple, la bulle ne grandit pas comme espéré, ou trop loin de la surface, empêchant ou altérant la dynamique du jet.

Dans le cas où cette première hypothèse n'est pas vérifiée, et qu'une bulle est générée de façon nominale, on imagine qu'elle peut se retrouver perturbée par la présence d'objets à ses côtés. Si les bords (interfaces verre-liquide et liquide-air) influent sur sa dynamique, la présence des micro-billes peut elle aussi perturber sa croissance. Mais étant donné que la taille des bulles générées et la taille des micro-billes ont un facteur 10 de différence, à ces échelles la bulle se développe, de son point de vue, dans un liquide « homogène ». On peut donc dire que la dynamique et la symétrie de la bulle sont peu impactées par la présence des micro-billes. Cet argument prend tout son sens pour le jet, qui, à contrario, se retrouve à une échelle comparable à celle de la cellule. L'épaisseur du premier jet étant du même ordre de grandeur que celle d'une micro-bille, sa dynamique peut donc en être perturbée.

Un argument clé pouvant nous éclairer sur ces hypothèses se trouve dans l'étude la dynamique d'un jet induit par laser avec une couche sacrificielle. Encore rarement évoqué jusqu'à maintenant, le processus d'impression de cette technique est bien connu et maîtrisé [29][105][106][107][108][109]. Sa robustesse et sa qualité d'impression sont reconnues comme étant la technique de bioimpression la plus reproductible. Les encres cellulaires ou de micro-billes utilisées sont similaires à celles étudiées dans le cas précédent. Le fait d'avoir des jets reproductibles avec couche sacrificielle et non dans le notre, met en avant la théorie sur la perturbation liée au dépôt d'énergie, puisqu'elle est la seule variable entre les deux. Il subsiste quand même une interrogation, si c'est lors de la création du plasma que les micro-billes perturbent le reste de la dynamique ou si ce sont celles qui se trouvent sur le chemin du faisceau. Dans tous les cas, un travail doit être mené sur le dépôt d'énergie et la formation du plasma dans des liquides inhomogènes.

Malgré la non reproductibilité du phénomène, on décide d'observer un jet, comme le montre la figure (fig.1.4). Ce dernier se développe en deux étapes, avec l'apparition d'un premier jet fin véloce suivit d'un second plus épais et plus lent

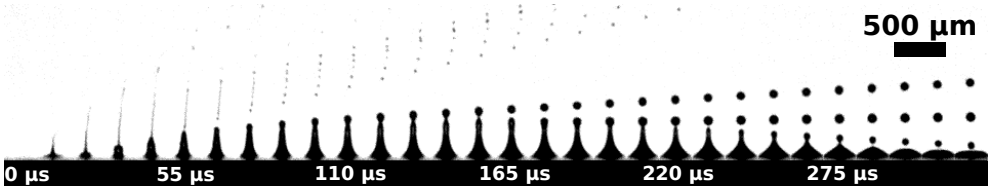



FIGURE 1.4 – Chronologie d'un jet contenant des micro-billes. L'espace entre chaque image est de $11\mu s$

avec une goutte puis une deuxième qui s'en détache. Au final, nous observons le même comportement que nous avions lors de l'étude de la dynamique d'encre homogène. A ce titre, en ajoutant un substrat receveur on arrive à projeter et transférer du liquide contenant des micro-billes.

Même si le phénomène est très inhomogène, à l'image de l'encre utilisée, nous arrivons tout de même à déplacer assez de liquide pour pouvoir transporter des micro-billes et donc les imprimer. C'est pourquoi, une étude plus approfondie est menée sur l'impression de motifs cellulaires.

## 1.2 Impression de motifs cellulaire

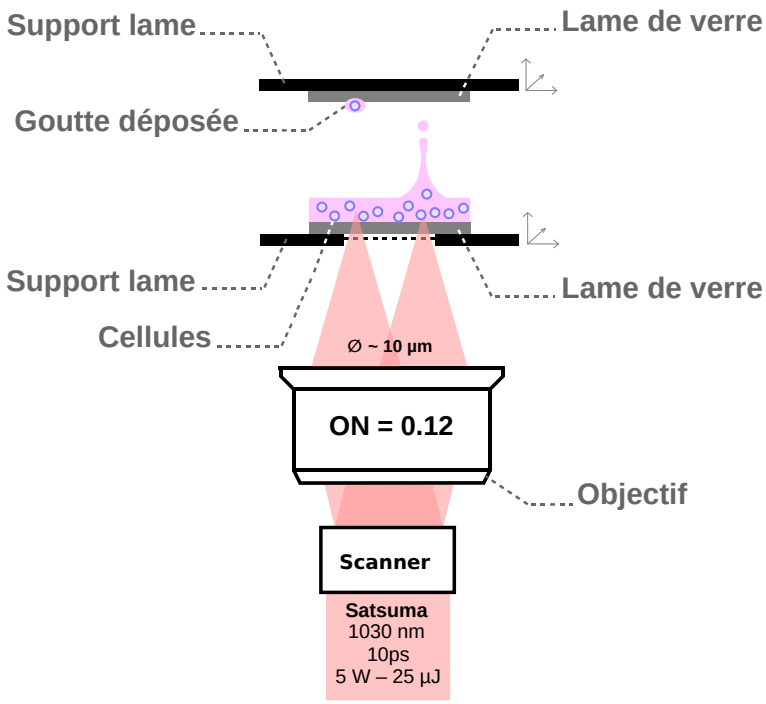



FIGURE 1.5 – Schéma d'expérience pour l'impression de motifs de cellules à $1030nm$ ,$10ps$, $14\mu J$

Dans cette section, on s'intéresse à l'impression de motifs cellulaire. Pour mener à bien cette étude, on réalise le montage de la figure 1.5. On utilise un laser industriel Satsuma de la société Amplitude Systèmes, qui délivre des impulsions de $10ps$ pour une longueur d'onde de $1030nm$. Les impulsions sont transportées jusqu'à un scanner qui balaye un objectif télécentrique de type F-thêta, dont l'ouverture numérique est d'environ 0.12. Grâce à cet objectif, les faisceaux sont déplacés dans le champ, tout en étant focalisés sur le même plan. Dans cette expérience, on fixe l'énergie sur échantillon à $14\mu J$.

La cartouche d'impression, composée d'une lame de verre transparente de $15mm$ de diamètre et d'une encre préalablement étalée, est impactée par les tirs de laser qui génèrent des jets. Un substrat receveur est maintenu au dessus de cette cartouche afin d'en récolter l'encre éjectée. En répétant l'opération à plusieurs reprises, tout en modifiant les coordonnées d'impact du laser, on crée un motif carré de $10x10mm$ avec des gouttes espacées de $500\mu m$. L'ensemble étant contrôlé par des platines de translation, on adapte la position de la cartouche et du substrat receveur pour affiner la profondeur de formation de bulle ainsi que la

distance cartouche-substrat, ici fixée à $500\mu m$.

Sur la cartouche est étalée $10\mu L$ de bioencre constituée de cellules de type Fibroblastes à différentes concentrations, $10M/ml$, $20M/ml$, $35M/ml$ et $70M/ml$, mélangées à leur milieu de prolifération ainsi qu'à 5% de SVF [2]. Le rôle du SVF est, comme pour la BSA précédemment utilisée, de pouvoir étaler facilement l'encre sur la cartouche en abaissant les tensions de surface.

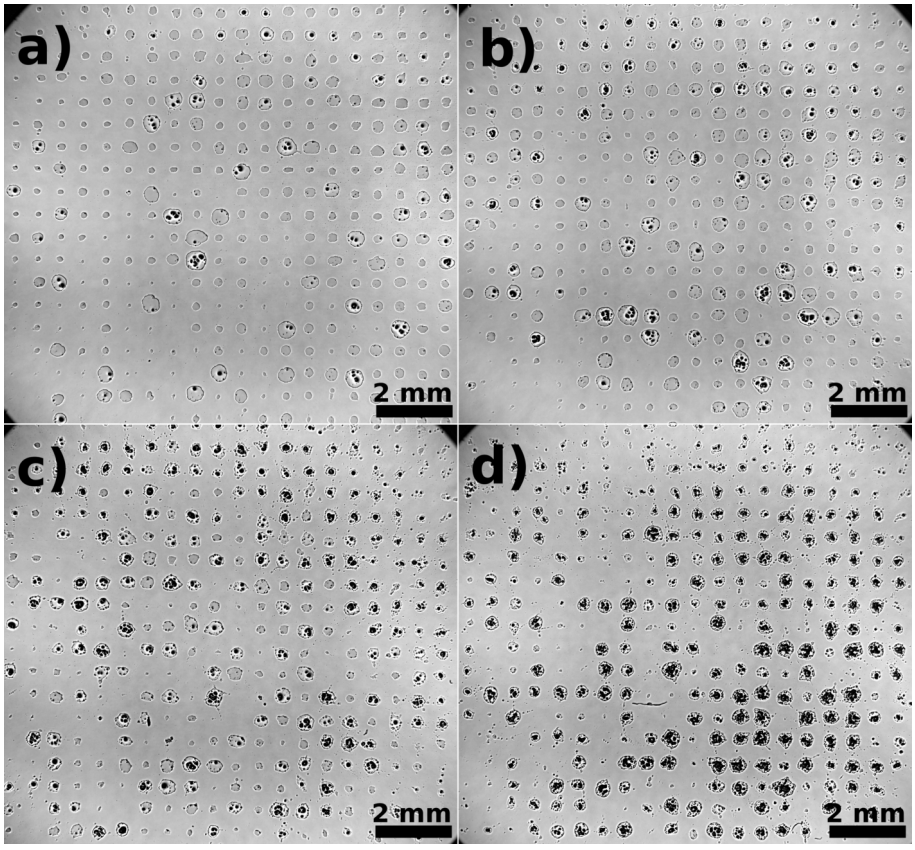



FIGURE 1.6 – Impressions de motifs de Fibroblastes à différentes concentrations (a) $10M/ml$ (b) $20M/ml$ (c) $35M/ml$ (d) $70M/ml$

Le résultat de cette expérience est affiché en figure 1.6 dont les données extraites sont résumées dans le tableau de la figure 1.7. Concernant la figure 1.6, on y trouve quatre photos de motifs prisent post-impression aux différentes concentrations étalées. Pour une concentration faible, c'est-à-dire de $10M/ml$, l'impression du motif est complet mais les gouttes contenant les cellules sont plus grosses que celles qui ne n'en contiennent pas (fig.1.6a). Le rapport entre le nombre de gouttes de cellules et les gouttes vides est d'environ 13%, ce qui est très insatisfaisant

2. Sérum de Veau Foetal

car le but est de transporter à chaque tir des cellules. Les mêmes observations sont faites en augmentant la concentration, par contre, le nombre de cellules imprimées augmente mais le nombre de gouttes imprimées diminue. A $70M/ml$ par exemple, le nombre de goutte est de 95 % contre 100% à $10M/ml$ et $20M/ml$. On observe aussi une augmentation du rapport entre les gouttes contenant des cellules et celles vides, en atteignant 97% à $70M/ml$. A $10M/ml$, on remarque que des gouttes peuvent contenir 1 ou 10 cellules. Quelle que soit la concentration, on remarque aussi que pour chaque goutte imprimée contenant des cellules, le nombre de cellules et la taille de la goutte varie. On comprend que la taille de goutte est directement liée au nombre de cellules qu'elle contient. Par contre, la différence entre le nombre de gouttes imprimées est difficilement explicable.

| **Concentration cellulaire [M/ml]** | **10** | **20** | **35** | **70** |
|---|---|---|---|---|
| *Nombre de gouttes imprimées* | 398 | 398 | 380 | 380 |
| *Nombre de gouttes contenant des cellules* | 50 | 90 | 180 | 370 |
| *Nombre de gouttes total désirée* | 400 | 400 | 400 | 400 |
| *Rapport goutte imprimée/goutte désirée [en %]* | ~100 | ~100 | 95 | 95 |
| *Rapport goutte cellules/goutte imprimée [en %]* | 13 | 23 | 47 | 97 |
| *Rapport goutte cellules/goutte désirée [en %]* | 13 | 23 | 45 | 93 |
| *Surface occupée par les cellules (carré) [en %]* | 13 | 25 | 45 | 89 |
| *Surface occupée par les cellules (hexagone) [en %]* | 11 | 22 | 38 | 77 |

FIGURE 1.7 – Tableau récapitulatif des données de la figure 1.6

Le tableau exposé en figure 1.7 est directement lié aux images de la figure 1.6. Pour cela, on a calculé le nombre de gouttes totale imprimées et séparé celles avec et sans cellules. Comme le résume le tableau de la figure 1.7, dans un volume de $10\mu L$ étalé, chaque concentration équivaut à un nombre de cellules. Pour $10M/ml$, on retrouve 100 000 cellules et pour $70M/ml$, 700 000.

En visualisant l'ensemble sur une coupe 2D, on calcule pour chaque concentration, l'espace occupée par les cellules selon un empilement « carré » et « hexagonal » (fig.1.8). On trouve alors pour $10M/ml$, $20M/ml$, $35M/ml$ et $70M/ml$, respectivement 13%, 25%, 45% et 89% avec le premier type d'empilement et 11%, 22%, 38% et 77% avec le second, considéré comme le plus compact. Grâce à ces calculs, on arrive à trouver une corrélation entre le rapport de gouttes contenant des cellules et la surface occupée par un tapis uniforme de cellules. Ainsi, on peut dire que plus on augmente la concentration cellulaire, plus on augmente les chances de pouvoir projeter des cellules sur le substrat receveur et que le nombre de gouttes imprimées contenant ces cellules y est directement lié. On peut aussi dire au vu de ces résultats, que les cellules ont tendances à former un tapis uniforme et on

suppose qu'augmenter la concentration après $70M/ml$ n'aura pas d'impact sur l'augmentation du nombre de cellules transférées par gouttes.

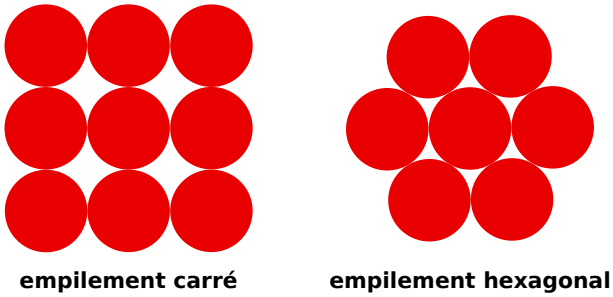



FIGURE 1.8 – Schéma des deux types d'empilements

Nous allons tenter d'expliquer la différence de cellules contenues dans chaque goutte du motif imprimées.

La première hypothèse que l'on peut faire sur cette différence est la présence de concentration effective de cellules à certains endroits de la lame. Comme nous avons vu que le nombre de gouttes contenant des cellules était lié à la concentration globale de cellules dans l'encre, on peut imaginer que si les cellules ne se repartissent pas de manière uniforme sur la lame, des zones de différentes concentrations peuvent se dessiner. Dans ce cas, en fonction de l'endroit où se forme le jet, le nombre de cellules sera différent.

La deuxième hypothèse est liée à celle formulée lors de l'exposition des résultats sur la disparité des jets de micro-billes. On avait alors supposé que si le laser rencontre sur son chemin des cellules, celui-ci pouvait être perturbé. C'est peut-être aussi le cas lorsqu'on observe des différences sur le nombre de cellules par gouttes. Si on considère une concentration effective locale égale en tout point, à l'échelle d'un jet, d'une goutte ou d'une bulle, alors à l'échelle du laser (dont le spot est de l'ordre de la dizaine de micromètre), ce n'est peut-être plus le cas. La concentration effective locale impacte donc la génération du plasma et par conséquence l'ensemble du processus d'impression.

Dans tous les cas, en augmentant la concentration globale de l'encre, on arrive à augmenter le nombre de gouttes contenant des cellules, ce qui permet d'imprimer des motifs quasi-complet. Connaissant la disparité sur le motif, on va tout de même tenter d'aller plus loin dans les possibilités qu'offre l'impression de cellules sans couche sacrificielle dans les parties suivantes.

# Chapitre 2

# Réalisation d'un modèle de peau

## 2.1 Anatomie de la peau

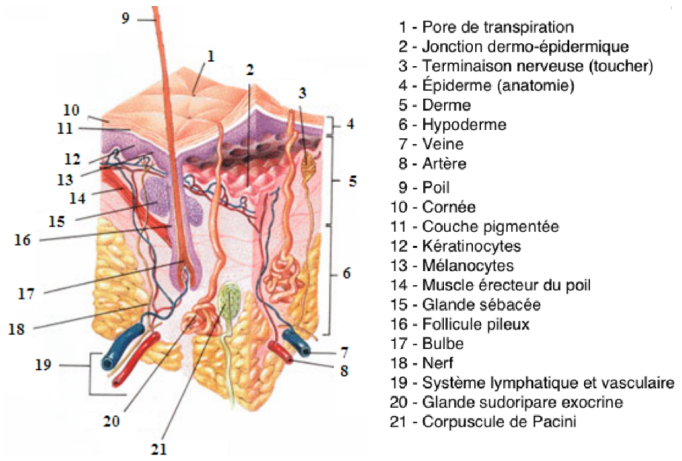



FIGURE 2.1 – Illustration de l'anatomie de la peau

La peau a comme particularité d'être un organe complexe en constant renouvellement. Sa caractéristique principale est d'être aussi bien imperméable que perméable. Dans ce cas, l'imperméabilité est considérée comme une une protection contre les agressions chimiques, biologiques et physiques. Tandis que la perméabilité est considérée comme une simple zone d'échange privilégiée.

Sur un plan structural, la peau est aussi considérée comme complexe, au vu des différentes couches superposées qui la constitue. La figure 2.1 [1] représente une coupe anatomique de la peau et met en avant les trois couches superposées de tissus que sont, l'épiderme (4), le derme (5) et l'hypoderme (6).

1. Illustration disponible à www.blogglophys.wordpress.com/2016/09/29/peau/

De manière générale la peau est la première protection au monde extérieur, et grâce à sa structure multicouche en feuillet, elle est tout aussi souple que résistante. L'épaisseur de la peau varie en fonction de sa position sur le corps humain. Elle peut aller de $500\mu m$ à $5mm$ d'épaisseur. Avec environ $2m^2$ de surface, la peau est considérée comme l'organe le plus étendu.

Pour rentrer un peu plus dans le détail, commençons par une description de l'épiderme. D'un point de vu macroscopique, elle est la couche la plus superficielle de la peau et selon sa position sur le corps humain, son épaisseur varie. Par exemple, elle est d'environ $40\mu m$ à la paupière contre $1,6mm$ sous la paume de main et la plante du pied. D'un point de vu microscopique et anatomique, l'épiderme est constitué essentiellement de kératinocytes. Ces cellules sont spécifiques de la peau puisqu'elles synthétisent la kératine, protéine fibreuse et insoluble dans l'eau (elles assurent donc la propriété d'imperméabilité). Les kératinocytes protègent aussi la peau contre l'exposition au soleil et aux rayons ultraviolets en accumulant la mélanine (produit par les mélanocytes) dans son noyau.

Ces kératinocytes sont disposés selon quatre couches dans l'épiderme (de l'extérieur à l'intérieur) : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et enfin la couche basale. La couche cornée est donc la partie la plus superficielle de l'épiderme, assurant ainsi le rôle de barrière contre les agressions extérieures. Elle mesure entre 10 à 20 $\mu m$ d'épaisseur et est composée d'une multitude de couches de kératinocytes morts. Les cellules de la couche basale, quant à elles, migrent progressivement vers la couche cornée en se contractant en kératine. Elles perdent alors leur noyau cellulaire au fur et à mesure de leur migration. Mais autre que les kératinocytes, d'autres cellules coexistent, comme les mélanocytes (responsable de la pigmentation de la peau) ou encore les cellules de Langerhans (qui contrôlent la présence d'antigènes).

Après l'épiderme vient le derme, tissu conjonctif composé essentiellement de fibroblastes insérés dans une matrice extracellulaire. Elle est séparée de l'épiderme par une membrane basale, la jonction dermo-épidermique. Ce compartiment est irrigué par des vaisseaux sanguins et innervé. Il est divisé en deux régions anatomiques distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire. La première est la zone de contact entre l'épiderme et le derme où des excroissances répartissent les vaisseaux sanguins et les transmissions nerveuses.

## 2.2 Principe du modèle de peau

Le but dans cette section est de comprendre comment recréer un modèle de peau, le plus représentatif possible de celui expliqué précédemment. Pour y parvenir, on imprime dans un premier temps un derme en plusieurs étapes (fig.2.2). La première étape est d'imprimer sur une membrane de polycarbonate une couche de

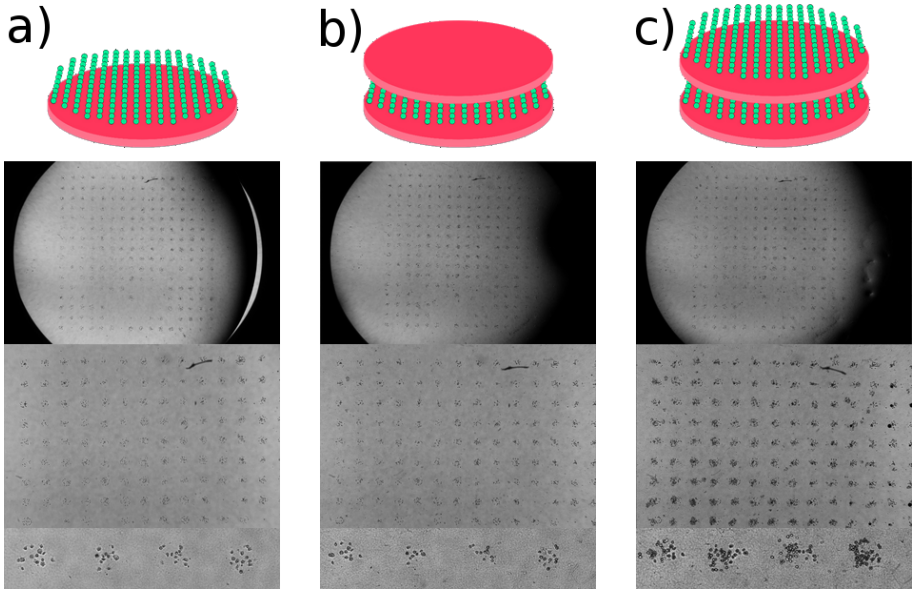



FIGURE 2.2 – Exemple d'illustration d'un contrôle qualité durant un processus de biofabrication d'un derme. (a) Des fibroblastes sont imprimés par laser sur une couche de collagène (b) Une nouvelle couche de collagène est imprimée (c) Une nouvelle couche de fibroblastes est imprimée. L'ensemble des motifs est conservé tout au long du processus d'impression. Extrait du site officiel de Poietis

collagène. Elle jouera par la suite le rôle de support des impressions. Cette couche est imprimée à l'aide d'une micro-vanne, présentée en introduction de thèse. Puis on imprime un premier motif de fibroblastes (fig.2.2a). Après avoir laissé les cellules pénétrer la couche de collagène, on procède de la même façon plusieurs fois (couche de collagène puis couche cellulaire) jusqu'à obtenir le résultat escompté.

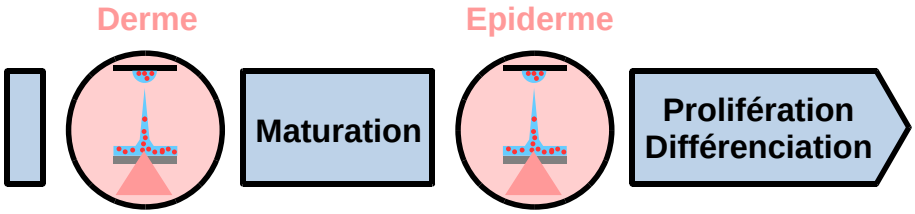



FIGURE 2.3 – Principe d'impression d'un modèle de peau de Poietis

L'objet imprimé est placé dans un incubateur jusqu'à maturation avant l'impression de la seconde partie, l'épiderme (fig.2.3). Des kératinocytes sont ensuite imprimés au dessus du derme en respectant un motif d'impression donné. L'ensemble est placé dans un incubateur pendant 2 jours en immersion dans du milieu cellulaire, puis pendant 12 jours en interface air-liquide. Cette dernière étape va

permettre à l'épiderme de se différencier. Une fois passées ces étapes, la peau reconstruite est fixée, c'est-à-dire immergée dans une solution de paraformaldehyde, figeant ainsi dans le temps le modèle reconstruit. Après déshydratation et inclusion dans de la parafine, des coupes transversales de $5\mu m$ sont trempées dans des solutions colorantes afin de de mettre en évidence les différentes structures du tissu imprimé. Ces coupes histologiques sont ensuite observées sous un microscope (fig.2.4).

Pour rappel, un des objectif de la thèse de reproduire le même type de résultat que la figure 2.4 mais cette fois-ci sans couche sacrificielle. Ce pourquoi, nous continuons donc d'imprimer des cellules afin de tendre le plus possible vers ce type de photo.

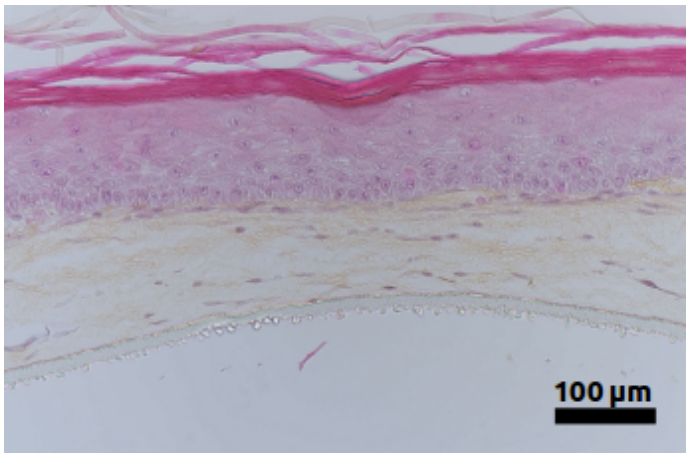



FIGURE 2.4 – Coupe histologique d'un modèle de peau vendue par Poietis : Poieskin©. Réalisé par LAB avec couche sacrificielle

## 2.3 Résultats : viabilité cellulaire

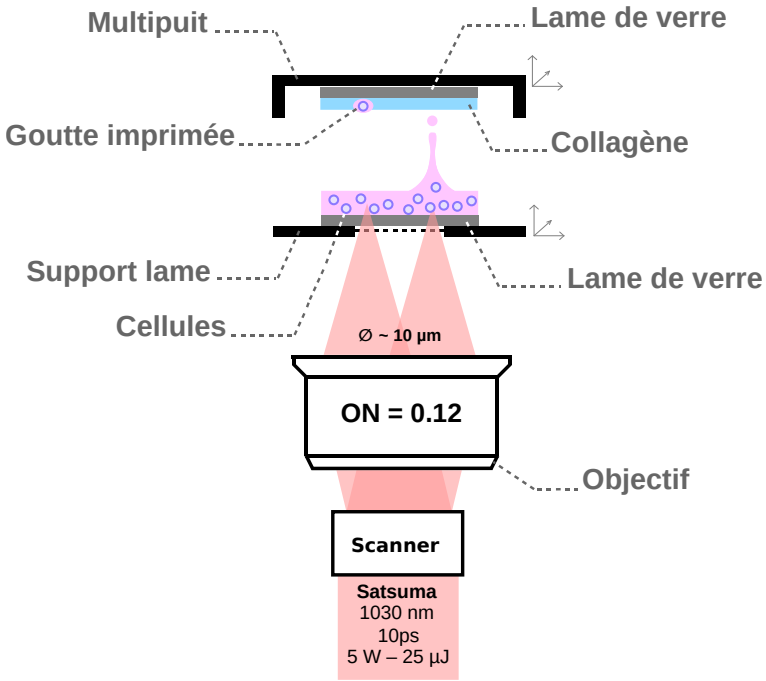



FIGURE 2.5 – Schéma d'impression de motifs sur une couche d'hydrogel composée de collagène et de milieu cellulaire

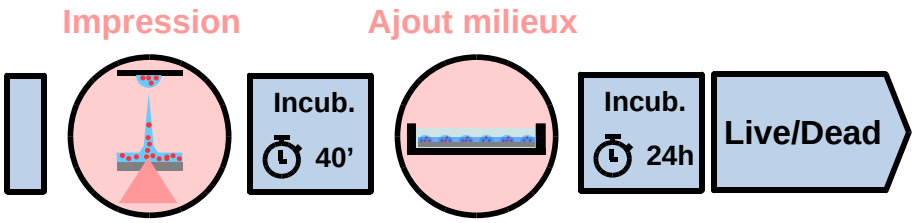



FIGURE 2.6 – Principe du test du Live-Dead. Un motif cellulaire est imprimé, placé dans une incubateur une quarantaine de minutes puis immergé dans du milieu cellulaire. Le test du Live-Dead est réalisé 24h après impression.

Précédemment, nous avons montré qu'il était possible d'imprimer un motif cellulaire, c'est pourquoi une étude de viabilité est mise en place pour vérifier la survie des cellules face à cette nouvelle technique d'impression sans couche sacrificielle. L'objectif est d'obtenir une viabilité d'environ 90%. Pour cela, on propulse les cellules sur un substrat receveur composé d'un mélange de milieu cellulaire et de collagène dans lequel les cellules pourront post impression, survivre

et proliférer (fig.2.5). Après impression, le substrat est placé dans un incubateur pendant 30 à 45 minutes afin que les cellules puissent s'accrocher à la matrice de collagène. Une fois cette étape passée, les impressions sont plongées dans du milieu cellulaire et placé d incubateur pendant 24h jusqu'au test du Live-Dead.

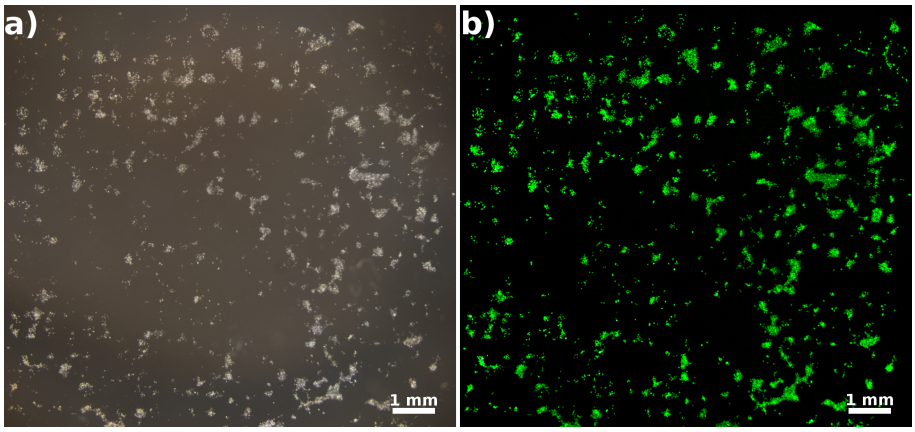



FIGURE 2.7 – Test du Live-Dead sur des Fibroblastes (a) Photo (b)Superposition du Live en vert et du Dead en rouge

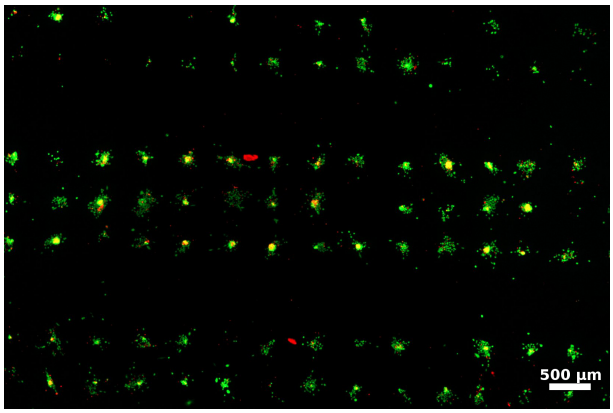



FIGURE 2.8 – Test du Live-Dead sur des Kératinocytes - superposition du Live (vert) et du Dead (rouge)

On étudie dans un premier temps la survie de Fibroblastes (fig.2.7). Les résultats sont très satisfaisants car environ 95% des cellules ont survécu avec un témoin pipette de 98%. De même pour les Kératinocytes (fig.2.8), où la viabilité est de 92% avec un témoin pipette de 98%. Les résultats sont très encourageants et favorables à la bioimpression par laser sans couche sacrificielle. Conventionnellement, seul un test de Live Dead suffit à certifier l'utilisation d'une technologie, mais il

n'est pas rare de le compléter avec d'autres tests comme celui de la prolifération. Il permet de vérifier si les cellules ont gardé leur vitesse de prolifération, qu'on réalise souvent par simple comptage cellulaire ou par marquage KI67. Encore plus rare, un autre test peut aussi être mené, comme la vérification de l'altération des chromosomes des cellules imprimées avec le test TUNEL (« Terminal deoxynucleotidyl transferase »). Enfin, il est aussi possible de vérifier le stress thermodynamique que peuvent subir les cellules lors de l'impression avec un marquage HSP70 (« Heat-Shock Protein 70 »). Pour compléter ce travail, il serait donc intéressant de s'intéresser à ces trois derniers tests.

## 2.4 Résultats : un modèle de peau

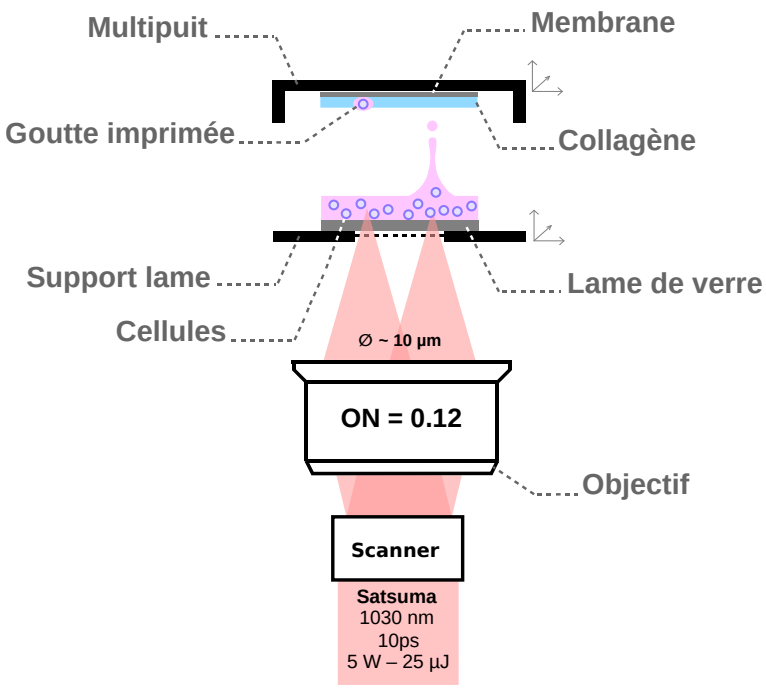



FIGURE 2.9 – Schéma d'un système d'impression d'un épiderme sur une membrane et d'une couche de collagène

Dans le cadre de la recherche et du développement d'un modèle de peau, Poietis souhaite tester les capacités du LAB sans couche sacrificielle pour la reconstruction d'un épiderme. L'objectif principal est d'imprimer un épiderme homogène d'environ 100 à 150 $\mu m$ d'épaisseur dont la structure se rapproche de celle du vivant, comme présenté dans la partie « Anatomie de la peau ». Pour réaliser ces tests, on place au fond d'une plaque multipuits des membranes de polycarbonate sur les-

quelles on imprime à l'aide d'une micro-vanne, une couche de collagène (fig.2.9). Préalablement, des Kératinocytes sont extraits puis mis en culture avant d'être utilisés en bioencre concentrée à $70M/ml$ avant d'être étalée sur la cartouche d'impression. Un laser Satsuma délivre des impulsions de $10ps$ à $1030nm$, pour une énergie de $25\mu J$ que l'on focalise à l'aide d'un scanner et d'une lentille de type F-thêta, afin d'imprimer le motif cellulaire. Les résultats des impressions sont mis en interface air-liquide dans un incubateur puis stoppé à 7 jours pour suivre l'avancement de la fabrication de l'épiderme reconstruit. Après une phase de coloration puis de découpe, les échantillons sont analysés sous un microscope à différents objectifs (10X et 40X) (fig.2.10). La photo en figure 2.10b montre tout d'abord, un

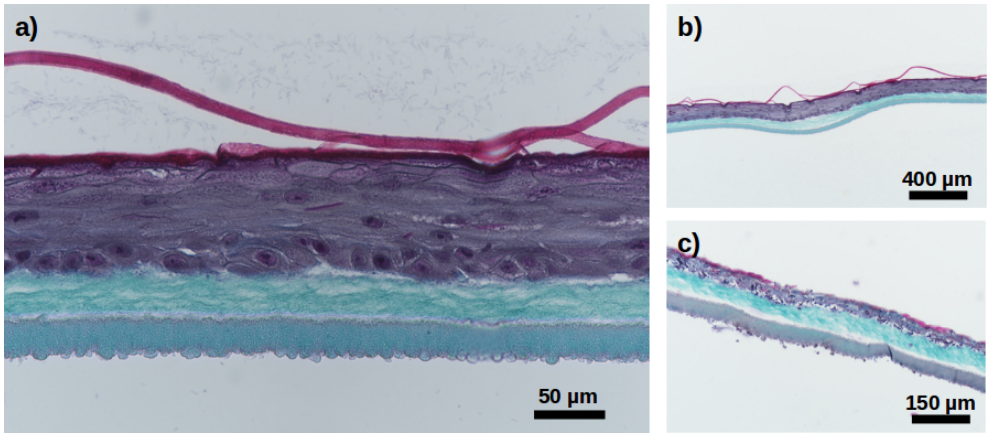



FIGURE 2.10 – Coupes histologiques d'épidermes à différents grossissements. Réalisé avec les paramètres d'impressions suivant : $25\mu J$, $10ps$, $1030nm$ pour le laser et $14\mu L$ à $70M/ml$ de cellules pour l'encre étalée sur la cartouche

épiderme homogène, comparé à celui de la figure 2.10c, utilisé ici comme simple comparatif. L'épiderme est bien reconstruit et similaire sur plusieurs millimètres au dessus de la couche de collagène. La structure est respectée, on retrouve bien la couche basale, où les cellules sont ordonnées et alignées. Au dessus, les cellules commencent à s'aplatir et à perdre leur noyau, représentatif d'une couche épineuse, jusqu'à présenter des granules, typique d'une couche granuleuse. Enfin, la couche cornée est elle aussi présente avec seulement deux feuillets.

Les résultats sont donc très favorables, et encourageants. L'épiderme est cependant trop petit par rapport aux premières attentes. On mesure environ $75\mu m$ contre les $100 - 150\mu m$ attendu. De même, la couche basale présente quelques défauts, comme un agencement horizontal des cellules, ainsi qu'en nombre insuffisant. La couche granuleuse s'en retrouve donc impactée, avec des cellules qui s'aplatissent trop rapidement et perdent trop vite leur noyau. Enfin, la couche cornée ne présente que très peu de feuillets, qu'on peut assez facilement expliquer

par un arrêt précoce de la phase de différenciation (7 jours contre 10-15 jours habituellement).

Le manque de cellules sur la couche basale et l'inhomogénéité est significatif d'un faible nombre de cellules imprimées et d'un manque de maîtrise du dépôt de cellules, donc potentiellement à un défaut d'impression.

Le LAB sans couche sacrificielle a montré des résultats intéressants dans les parties précédentes, même si l'inhomogénéité des motifs imprimés se retrouvent sur le modèle d'épiderme. Pour améliorer l'ensemble de la chaîne et au vu des résultats présentés, un effort sur la méthode d'impression reste donc à être mené comme la reproductibilité et le contrôle du nombre de cellules imprimées.

# Conclusion

Imprimer des tissus vivants, voici le maître de mot de l'ingénierie tissulaire, avec comme but principal de remplacer, rétablir et « améliorer » les organes défectueux des êtres vivants. Parmi les techniques existantes, le LAB (*Laser Assisted Bioprinting*) tire profit des technologies du laser pour se positionner comme la plus précise. Basée sur le principe du LIFT (*Laser Induced Forward Transfer*), elle utilise les propriétés d'interaction laser-matière afin de projeter des cellules vivantes d'une cartouche d'impression sur un substrat composé d'un biomatériau. Mais elle comporte un défaut avec l'utilisation d'une couche mince d'or, de titane ou de cuivre, qui se retrouve ablatée et projetée après interaction avec le laser. Cette couche « sacrificielle », se révèle être un frein aux avancées technologiques qui pourraient découler du LAB. Pour y pallier, la solution la plus simple est de la retirer et de s'appuyer sur les connaissances en interaction laser-matière pour reproduire les mêmes impressions de cellules sans couche sacrificielle.

En retirant cette couche, la cartouche d'impression ne se retrouve maintenant composée que d'une lame de verre, transparente à la longueur d'onde du laser, et de la bioencre à imprimer. On focalise directement le laser dans le milieu en question afin de générer un plasma puis une bulle par phénomène de cavitation. Lorsque cette bulle grossit et atteint la surface, elle génère à son tour un jet qui transfère le liquide et les cellules de la cartouche au substrat receveur.

En étudiant la génération et la dynamique d'une bulle en fonction de la durée d'impulsion, nous avons remarqué qu'il existe deux fenêtres. La première, pour des impulsions courtes ($< 10ps$), les seuils de formation de bulle sont fortement dépendant de l'intensité, et permettent d'atteindre des bulles de différentes tailles, jusqu'à plusieurs centaines de micromètres de diamètre. La seconde, pour des impulsions plus longues ($> 10ps$), les seuils sont plus gourmands en énergie et ne permettent pas d'atteindre des bulles de petits volumes. Par contre, leur efficacité de transfert d'énergie est supérieure à la gamme précédente. Quel que soit le régime, nous avons aussi montré que le volume d'une bulle est proportionnel à la fluence.

En parallèle, en analysant le spectre d'absorption de l'eau, nous nous sommes intéressés à l'impact de la longueur d'onde sur les seuils et dynamiques des bulles. Contrairement à nos attentes, l'absorption à 1 photon dessert les seuils mais contribue au transfert d'énergie entre le laser et la bulle. C'est donc à 515 nm et 2000 nm que les efficacités de conversion d'énergies sont les plus importantes. De plus, nous avons aussi découvert que la bulle restait confinée aux interfaces liquide-solide et liquide-air à 515, 1300 et 2000 nm, contrairement à 1030 nm où la bulle pouvait être créée à différentes positions dans le liquide. Enfin, nous avons aussi montré qu'en utilisant du milieu cellulaire, l'efficacité du procédé chutait à 1030 nm alors qu'elle augmentait à 515 nm.

En approchant la bulle de la surface libre, nous avons validé l'importance du

paramètre de Standoff pour la génération d'un jet droit et contrôlé. Mais en utilisant des films minces et sans outil de caractérisation en direct, cet outils n'a plus de sens, ce pourquoi nous avons mis au point une technique d'optimisation. Une fois cette étape remplie, nous sommes capable d'imprimer des liquides homogènes et d'en contrôler la quantité en adaptant l'énergie, la durée d'impulsion ou encore la distance cartouche-substrat. Un des faits marquant en étudiant ces jets a été la ressemblance frappante entre ceux réalisés à 2000 nm et ceux observés lors de l'utilisation d'une couche sacrificielle, ceci grâce au confinement de la bulle à l'interface verre-liquide.

Enfin, en complexifiant l'encre avec des cellules, la dynamique des jets à 1030 nm s'est retrouvée totalement perturbée malgré une bonne maîtrise du procédé. Cette disparité se retrouve aussi lorsqu'on imprime un motif cellulaire, avec un nombre de gouttes imprimées contenant des cellules ainsi qu'un nombre de cellules par gouttes, différents sur tout le motif. Ceci s'explique par l'inhomogénéité locale perturbant le dépôt d'énergie qui fragilise le reste de la chaîne. En dépit de ces disparités et suite au succès du test de viabilité, nous avons réussi à imprimer le premier épiderme par Bioimpression laser sans couche sacrificielle.

Que ce soit lors de l'étude du jet ou de la bulle, la variation en longueur d'onde s'est avérée être un élément important dans la méthode d'impression. Le fait d'avoir une bulle confinée à la surface à 515, 1300 et 2000 nm, a permis de mettre au point un système d'impression fortement similaire à l'impression de liquide par LAB avec couche sacrificielle. Cette découverte répond à l'un des objectifs principal de la thèse, à savoir la mise au point d'une méthode d'impression similaire au cas avec Or. Les avantages sont multiples comme la possibilité d'imprimer différents objets comme des cellules ou des microbilles, tout en gardant la connaissance acquise ces dernières années sur l'impression avec couche sacrificielle en la transposant à cette nouvelle méthode.

Cependant, il reste des zones d'ombre sur l'utilisation de ces longueurs d'onde. Tout d'abord, aucun modèle numérique n'existe à ce jour permettant de rejoindre les données expérimentales que nous avons acquises. De plus, ce qui manque à nos expériences est la réalisation de motifs d'impressions à 515, 1300 et 2000 nm ainsi qu'une étude approfondie à ces longueurs d'onde dans le régime picoseconde et nanoseconde. Enfin, la question de la viabilité cellulaire se pose aussi, et nécessite des réponses.

Toujours lié à l'absorption linéaire, la question s'est à un moment posé durant la thèse sur les effets thermiques autour de 2000 nm. Aujourd'hui, il semblerait que la thermocavitation soit étudiée dans le cadre de la formation de bulle proches de surfaces solides et liquides. Elle ouvre donc un nouveau champ des possibles car il serait possible avec un laser continu, de jouer sur l'absorption linéaire pour favoriser ce type de cavitation. Cependant, la viabilité cellulaire pourrait elle aussi

chuter si les températures misent en jeux détruisent les cellules aux alentours.

Enfin, si l'absorption linéaire a trouvé un intérêt à 1300 nm et 2000 nm, en ajoutant une poudre ou un additif aux liquides à 1030 nm, on pourrait tout aussi bien observer des comportements similaires. Il existe peut-être des matériau biocompatible qui permettrait de rehausser le coefficient d'absorption à cette longueur d'onde, sans devoir modifier le laser et les bancs d'essais.

Même si la viabilité du processus d'impression sans or a répondu aux attentes de biologistes, on se demande ce qu'il se passe aux alentours du plasma lorsque le tir arrive proche des cellules. Sont-elles impactées, détruites, perforées, altérées, projetées ? Le test de viabilité ne présente que le rapport entre les cellules imprimées vivantes et mortes et ne tiennent pas compte de celles qui sont restées dans la bioencre, ce pourquoi,il faudrait aussi analyser la viabilité des cellules restantes non imprimées.

Cette thèse a permis de mettre des limites à l'utilisation d'un laser à 1030 nm pour ce type d'exercice. Les résultats concernant la disparité des tirs pour l'impression de cellules ne sont pas satisfaisant pour rivaliser avec les impressions utilisant des couches sacrificielles. Il reste tout de même une étude à réaliser pour compléter ces travaux, à savoir réaliser des motifs d'impressions pour des impulsions longues (autour de la nanoseconde). Même s'il n'était pas possible d'atteindre de petites bulles, on peut toujours se demander si en jouant sur sa profondeur, on pourrait transporter de faibles volumes. De même, en utilisant des objectifs très ouverts, on atteindrait des tailles de faisceaux au plan focal plus petites que celles sondées et abaisseraient potentiellement la taille minimale de bulles. Par contre, pour des applications demandant de la précision, pour l'impression de bio-matériaux homogènes, travailler à 1030 nm offre des avantages, comme la possibilité de travailler avec des grands volumes ou à des durées d'impulsions courtes pour générer et déplacer de petits objets.

Au final, faut-il prendre le risque de modifier toute une chaîne de procédé alors que celle-ci a présenté des résultats encourageant comme la réalisation d'un épiderme ? Faut-il investir dans une technologie où personne ne s'est encore positionné ? Il n'y a pas de réponse parfaite, mais le sentiment qu'il faut continuer d'investiguer autour de ces questions. Même s'il reste un long chemin à parcourir pour maîtriser la quantité de cellules imprimées par éjection, cette thèse a permis de soulever de nouvelles problématiques liées à cette technologie. Les faits marquants resteront la réalisation de motifs complets et répétables de liquide homogène, la possibilité d'imprimer des cellules ainsi que la reconstruction du premier épiderme par Bioimpression laser sans couche sacrificielle.

# Bibliographie


[1] L. G. Griffith. Tissue Engineering–Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, 295(5557) :1009–1014, February 2002.

[2] Takanori Takebe, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Masaki Kimura, Takunori Ogaeri, Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, and Hideki Taniguchi. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459) :481–484, July 2013.

[3] J. T. Schulz III, R. G. Tompkins, and J. F. Burke. Artificial skin. *Annual review of medicine*, 51(1) :231–244, 2000.

[4] Christophe Egles, Jonathan A Garlick, and Yulia Shamis. Three-Dimensional Human Tissue Models of Wounded Skin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 585 :345–59, 2010.

[5] Christophe Egles and J A. Garlick. Customized 3d Human Tissues for Discovery. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 45 :S11–S11, 2009.

[6] Anna Chiara Piscaglia, Cristiana Di Campli, G. Gasbarrini, and Antonio Gasbarrini. Stem cells : new tools in gastroenterology and hepatology. *Digestive and liver disease*, 35(7) :507–514, 2003.

[7] James O'Malley, Knut Woltjen, and Keisuke Kaji. New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(5) :516–521, October 2009.

[8] Yulia Shamis, Kyle J Hewitt, Mark W Carlson, Mariam Margvelashvilli, Shumin Dong, Catherine K Kuo, Laurence Daheron, Christophe Egles, and Jonathan A Garlick. Fibroblasts derived from human embryonic stem cells direct development and repair of 3d human skin equivalents. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(1) :10, 2011.

[9] Dietmar W Hutmacher, Michael Sittinger, and Makarand V Risbud. Scaffold-based tissue engineering : rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, 22(7) :354–362, July 2004.

[10] B. P. Chan and K. W. Leong. Scaffolding in tissue engineering : general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(S4) :467–479, December 2008.

[11] La bio-impression, futur de la médecine sur-mesure ?, May 2017.

[12] Robert J. Klebe. Cytoscribing : a method for micropositioning cells and the construction of two-and three-dimensional synthetic tissues. *Experimental cell research*, 179(2) :362–373, 1988.

[13] Vladimir Mironov, Thomas Boland, Thomas Trusk, Gabor Forgacs, and Roger R. Markwald. Organ printing : computer-aided jet-based 3d tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 21(4) :157–161, April 2003.

[14] Brian Derby. Inkjet Printing of Functional and Structural Materials : Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution. *Annual Review of Materials Research*, 40(1) :395–414, June 2010.

[15] Fabien Guillemot, Agnès Souquet, Sylvain Catros, and Bertrand Guillotin. Laser-assisted cell printing : principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine*, 5(3) :507–515, April 2010.

[16] R.S. Braudy. Laser writing. *Proceedings of the IEEE*, 57 :1771–1772, 1969.

[17] Philippe Delaporte and Anne-Patricia Alloncle. Laser-induced forward transfer : A high resolution additive manufacturing technology. *Optics & Laser Technology*, 78 :33–41, April 2016.

[18] M. Feinaeugle, A.P. Alloncle, Ph. Delaporte, C.L. Sones, and R.W. Eason. Time-resolved shadowgraph imaging of femtosecond laser-induced forward transfer of solid materials. *Applied Surface Science*, 258(22) :8475–8483, September 2012.

[19] J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *Journal of Applied Physics*, 60(4) :1538–1539, August 1986.

[20] P. K. Wu, B. R. Ringeisen, D. B. Krizman, C. G. Frondoza, M. Brooks, D. M. Bubb, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, and D. B. Chrisey. Laser transfer of biomaterials : Matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write. *Review of Scientific Instruments*, 74(4) :2546, 2003.

[21] P. K. Wu, B. R. Ringeisen, J. Callahan, M. Brooks, D. M. Bubb, H. D. Wu, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, and D. B. Chrisey. The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write. *Thin Solid Films*, 398 :607–614, 2001.

[22] J. M. Fitz-Gerald, D. B. Chrisey, A. Piqu, R. C. Y. Auyeung, R. Mohdi, H. D. Young, H. D. Wu, S. Lakeou, and R. Chung. Matrix assisted pulsed laser evaporation direct write (MAPLE DW) : a new method to rapidly prototype active and passive electronic circuit elements. In *MRS Proceedings*, volume 625, page 99. Cambridge Univ Press, 2000.

[23] A. Visan, G.E. Stan, C. Ristoscu, G. Popescu-Pelin, M. Sopronyi, C. Besleaga, C. Luculescu, M.C. Chifiriuc, M.D. Hussien, O. Marsan, E. Kergourlay, D. Grossin, F. Brouillet, and I.N. Mihailescu. Combinatorial MAPLE deposition of antimicrobial orthopedic maps fabricated from chitosan and biomimetic apatite powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1) :505–515, September 2016.

[24] Jason A. Barron, Bradley R. Ringeisen, Heungsoo Kim, Barry J. Spargo, and Douglas B. Chrisey. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films*, 453-454 :383–387, April 2004.

[25] Yaakov Nahmias and David J Odde. Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing : application to fabrication of hepatic–endothelial sinusoid-like structures. *Nature Protocols*, 1(5) :2288–2296, December 2006.

[26] S. Papazoglou and I. Zergioti. Laser Induced Forward Transfer (LIFT) of nano-micro patterns for sensor applications. *Microelectronic Engineering*, 182 :25–34, October 2017.

[27] Rusong Yang, Lian Wei, Ying Feng, Xiujian Li, and Quan Zhou. Recent progress in making protein microarray through BioLP. page 102501U, February 2017.

[28] A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, A. Palla-Papavlu, J. L. Morenza, and P. Serra. Laser-generated liquid microjets : correlation between bubble dynamics and liquid ejection. *Microfluidics and Nanofluidics*, 16(1-2) :55–63, January 2014.

[29] Zhengyi Zhang, Changxue Xu, Ruitong Xiong, Douglas B. Chrisey, and Yong Huang. Effects of living cells on the bioink printability during laser printing. *Biomicrofluidics*, 11(3) :034120, May 2017.

[30] Bertrand Guillotin, Agnès Souquet, Sylvain Catros, Martí Duocastella, Benjamin Pippenger, Séverine Bellance, Reine Bareille, Murielle Rémy, Laurence Bordenave, Joëlle Amédée, and Fabien Guillemot. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31(28) :7250–7256, October 2010.

[31] A. Doraiswamy, R.J. Narayan, T. Lippert, L. Urech, A. Wokaun, M. Nagel, B. Hopp, M. Dinescu, R. Modi, R.C.Y. Auyeung, and D.B. Chrisey. Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. *Applied Surface Science*, 252(13) :4743–4747, April 2006.

[32] Ruitong Xiong, Zhengyi Zhang, Wenxuan Chai, Douglas B Chrisey, and Yong Huang. Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting. *Biofabrication*, 9(2) :024103, June 2017.

[33] Claudia Unger, Martin Gruene, Lothar Koch, Juergen Koch, and Boris N. Chichkov. Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer. *Applied Physics A*, 103(2) :271–277, May 2011.

[34] Martin Gruene, Claudia Unger, Lothar Koch, Andrea Deiwick, and Boris Chichkov. Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting. *Biomedical engineering online*, 10(1) :19, 2011.

[35] David A. Willis and Vicentiu Grosu. Microdroplet deposition by laser-induced forward transfer. *Applied Physics Letters*, 86(24) :244103, 2005.

[36] Y. Chen, D. Munoz-Martin, M. Morales, C. Molpeceres, E. Sánchez-Cortezon, and J. Murillo-Gutierrez. Laser Induced Forward Transfer of High Viscosity Silver Paste for New Metallization Methods in Photovoltaic and Flexible Electronics Industry. *Physics Procedia*, 83 :204–210, 2016.

[37] J. A. Barron, P. Wu, H. D. Ladouceur, and B. R. Ringeisen. Biological laser printing : a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomedical microdevices*, 6(2) :139–147, 2004.

[38] Theresa B Phamduy, Nurazhani Abdul Raof, Nathan R Schiele, Zijie Yan, David T Corr, Yong Huang, Yubing Xie, and Douglas B Chrisey. Laser direct-write of single microbeads into spatially-ordered patterns. *Biofabrication*, 4(2) :025006, June 2012.

[39] Stephane Petit, Olivia Kérourédan, Raphael Devillard, and Eric Cormier. Femtosecond versus picosecond laser pulses for film-free laser bioprinting. *Applied Optics*, 56(31) :8648, November 2017.

[40] M. Duocastella, J.M. Fernández-Pradas, J.L. Morenza, D. Zafra, and P. Serra. Novel laser printing technique for miniaturized biosensors preparation. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 145(1) :596–600, March 2010.

[41] M. Duocastella, Adrian Patrascioiu, Juan Marcos Fernández-Pradas, J. L. Morenza, and P. Serra. Film-free laser forward printing of transparent and weakly absorbing liquids. *Optics express*, 18(21) :21815–21825, 2010.

[42] A. Patrascioiu, M. Duocastella, J.M. Fernández-Pradas, J.L. Morenza, and P. Serra. Liquids microprinting through a novel film-free femtosecond laser based technique. *Applied Surface Science*, 257(12) :5190–5194, April 2011.

[43] Trillion-frame-per-second video.

[44] Boris N. Chichkov, C. Momma, Stefan Nolte, F. Von Alvensleben, and A. Tünnermann. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A*, 63(2) :109–115, 1996.

[45] Sergei I. Anisimov and Viktor A. Khokhlov. *Instabilities in Laser-Matter Interaction.* CRC Press, March 1995.

[46] Qu'est-ce qu'un plasma, 2001.

[47] Paul K. Kennedy, Daniel X. Hammer, and Benjamin A. Rockwell. Laser-induced breakdown in aqueous media. *Progress in Quantum Electronics*, 21(3) :155–248, January 1997.

[48] C. A. Sacchi. Laser-induced electric breakdown in water. *Josa b*, 8(2) :337–345, 1991.

[49] Alfred Vogel, Kester Nahen, Dirk Theisen, and Joachim Noack. Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd : YAG laser pulses. I. Optical breakdown at threshold and superthreshold irradiance. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 2(4) :847–860, 1996.

[50] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B*, 81(8) :1015–1047, December 2005.

[51] Norbert Linz, Sebastian Freidank, Xiao-Xuan Liang, and Alfred Vogel. Wavelength dependence of femtosecond laser-induced breakdown in water and implications for laser surgery. *Physical Review B*, 94(2), July 2016.

[52] Rose Mary, Debaditya Choudhury, and Ajoy K. Kar. Applications of Fiber Lasers for the Development of Compact Photonic Devices. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 20(5) :72–84, September 2014.

[53] Alfred Vogel and Benjamin A. Rockwell. Roles of tunneling, multiphoton ionization, and cascade ionization for femtosecond optical breakdown in aqueous media. Technical report, LUBECK MEDICAL UNIV (GERMANY) MEDICAL LASER CENTER, 2009.

[54] L. V. Keldysh. Ionization in the field of a strong electromagnetic wave. *Sov. Phys. JETP*, 20(5) :1307–1314, 1965.

[55] John Ready. *Effects of High-Power Laser Radiation.* Elsevier, December 2012. Google-Books-ID : 15GFz3mVCjkC.

[56] A. Kaiser, B. Rethfeld, M. Vicanek, and G. Simon. Microscopic processes in dielectrics under irradiation by subpicosecond laser pulses. *Physical Review B*, 61(17) :11437, 2000.

[57] T. A. Wiggins, R. V. Wick, D. H. Rank, and A. H. Guenther. Stimulated Brillouin Scattering in Liquids. *Applied Optics*, 4(9) :1203_1–1205, 1965.

[58] Carome. Intense ruby-laser-induced acoustic impulses in liquids. *The Journal of the Acoustical Society of America*, pages 1462–1466, 1966.

[59] C. E. Bell and J. A. Landt. Laser-induced high pressure shock waves in water. *Applied Physics Letters*, 10(2) :46–48, January 1967.

[60] E. F. Carome, E. M. Carreira, and C. J. Prochaska. Photographic studies of laser-induced pressure impulses in liquids. *Applied Physics Letters*, 11(2) :64–66, July 1967.

[61] Peter A. Barnes and K. E. Rieckhoff. Laser induced underwater sparks. *Applied Physics Letters*, 13(8) :282–284, October 1968.

[62] Can F. Delale, editor. *Bubble Dynamics and Shock Waves*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013.

[63] F. Docchio, C.A. Sacchi, and J. Marshall. Q-Switched Nd :YAG laser irradiation of the eye and related phenomena : An experimental study. I. Optical breakdown determination for liquids and membranes. *Lasers Ophtalmol.*, 1 :83, 1986.

[64] B. Zysset, J. G. Fujimoto, and T. F. Deutsch. Time-resolved measurements of picosecond optical breakdown. *Applied Physics B*, 48(2) :139–147, 1989.

[65] W. Koechner. *Solid State Laser Engineering*. Springer Berlin, 1988.

[66] R. M. Wood. Laser induced damage thresholds and laser safety levels. Do the units of measurement matter ? *Optics & Laser Technology*, 29(8) :517–522, 1998.

[67] E. W. Van Stryland, M. J. Soileau, Arthur L. Smirl, and W. W. Williams. Pulse-width and focal volume dependence of laser-induced breakdown. *Natl. Bur. Stand.(US) Spec. Publ.*, 620 :375–384, 1980.

[68] Matthias Lenzner, Jörg Krüger, S. Sartania, Z. Cheng, Ch Spielmann, G. Mourou, Wolfgang Kautek, and Ferenc Krausz. Femtosecond optical breakdown in dielectrics. *Physical review letters*, 80(18) :4076, 1998.

[69] B. C Stuart, M. D Feit, S Herman, A. M. Rubenchik, B. W. Shore, and M. D. Perry. Nanosecond to femtosecond laser-induced breakdown in dielectrics. *Physical review B*, 53(4) :1749, 1996.

[70] D. Du, X. Liu, and G. Mourou. Reduction of multi-photon ionization in dielectrics due to collisions. *Applied Physics B*, 63(6) :617–621, 1996.

[71] Vasan Venugopalan, Arnold Guerra, Kester Nahen, and Alfred Vogel. Role of Laser-Induced Plasma Formation in Pulsed Cellular Microsurgery and Micromanipulation. *Physical Review Letters*, 88(7), February 2002.

[72] Daniel X. Hammer. Experimental investigation of ultrashort pulse laser-induced breakdown thresholds in aqueous media. *IEEE journal of quantum electronics*, 32(4) :670–678, April 1996.

[73] Joachim Noack and Alfred Vogel. Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales : calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 35(8) :1156–1167, 1999.

[74] Daniel X. Hammer, Gary D. Noojin, Robert J. Thomas, Candace E. Clary, Benjamin A. Rockwell, Cynthia A. Toth, and W. P. Roach. Intraocular laser surgical probe for membrane disruption by laser-induced breakdown. *Applied optics*, 36(7) :1684–1693, 1997.

[75] E. N. Glezer and E. Mazur. Ultrafast-laser driven micro-explosions in transparent materials. *Applied Physics Letters*, 71(7) :882–884, August 1997.

[76] Chris B. Schaffer, André Brodeur, José F. García, and Eric Mazur. Micromachining bulk glass by use of femtosecond laser pulses with nanojoule energy. *Optics letters*, 26(2) :93–95, 2001.

[77] Tibor Juhasz, George Kastis, Carlos Suarez, Zsolt Bor, and Walter Bron. Time-resolved observations of shockwaves and cavitations bubbles generated by femtosecond laser pulses in water. *Lasers in surgery and medicine*, 19(1) :23–31, 1996.

[78] Chris B. Schaffer, Nozomi Nishimura, Eli N. Glezer, Albert M.-T. Kim, and Eric Mazur. Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds. *Optics express*, 10(3) :196–203, 2002.

[79] Kamal M. Aly and E. Esmail. Refractive index of salt water : effect of temperature. *Optical Materials*, 2 :195–199, July 1993.

[80] Robin M. Pope and Edward S. Fry. Absorption spectrum (380–700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements. *Applied Optics*, 36(33) :8710–8723, November 1997.

[81] Chien-Jen Lai and Franz Kartner. The influence of plasma defocusing in high harmonic generation. page 11, 2011.

[82] Norbert Linz, Sebastian Freidank, Xiao-Xuan Liang, Hannes Vogelmann, Thomas Trickl, and Alfred Vogel. Wavelength dependence of nanosecond infrared laser-induced breakdown in water : Evidence for multiphoton initiation via an intermediate state. *Physical Review B*, 91(13), April 2015.

[83] Christopher G. Elles, Askat E. Jailaubekov, Robert A. Crowell, and Stephen E. Bradforth. Excitation-energy dependence of the mechanism for two-photon ionization of liquid H2o and D2o from 8.3to12.4ev. *The Journal of Chemical Physics*, 125(4) :044515, July 2006.

[84] Martin U. Sander, Mark S. Gudiksen, Klaus Luther, and Jürgen Troe. Liquid water ionization : mechanistic implications of the H/D isotope effect in the geminate recombination of hydrated electrons. *Chemical Physics*, 258(2) :257–265, August 2000.

[85] Francisco Alves Pereira, Fabio Di Felice, and Francesco Salvatore. Propeller Cavitation in Non-Uniform Flow and Correlation with the Near Pressure Field. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(4) :70, November 2016.

[86] Alfred Vogel, Norbert Linz, Sebastian Freidank, and Günther Paltauf. Femtosecond-Laser-Induced Nanocavitation in Water : Implications for Optical Breakdown Threshold and Cell Surgery. *Physical Review Letters*, 100(3), January 2008.

[87] Lord Rayleigh. VIII. *On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 34(200) :94–98, August 1917.

[88] Ruitong Xiong, Zhengyi Zhang, Jianxin Shen, Yafu Lin, Yong Huang, and Douglas B. Chrisey. Bubble Formation Modeling During Laser Direct Writing of Glycerol Solutions. *Journal of Micro and Nano-Manufacturing*, 3(1) :011004, 2015.

[89] Peter Gregorcic, Rok Petkovsek, and Janez Mozina. Investigation of a cavitation bubble between a rigid boundary and a free surface. *Journal of Applied Physics*, 102(9) :094904, 2007.

[90] G. Debregeas. The life and death of bare viscous bubbles. *Science*, 279(5357) :1704–1707, March 1998.

[91] A. Pearson, E. Cox, J.R. Blake, and S.R. Otto. Bubble interactions near a free surface. *Engineering Analysis with Boundary Elements*, 28(4) :295–313, April 2004.

[92] Qianxi Wang, Wenke Liu, A. M. Zhang, and Yi Sui. Bubble dynamics in a compressible liquid in contact with a rigid boundary. *Interface Focus*, 5(5) :20150048, October 2015.

[93] W Lauterborn and W Hentschel. Cavitation bubble dynamics studied by high speed photography and holography : part one. *Ultrasonics*, 23(6) :260–268, November 1985.

[94] Alfred Vogel, Joachim Noack, Kester Nahen, Dirk Theisen, Stefan Busch, Ulrich Parlitz, D. X. Hammer, G. D. Noojin, B. A. Rockwell, and R. Birngruber. Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales. *Applied Physics B : Lasers and Optics*, 68(2) :271–280, 1999.

[95] Joachim Noack, Daniel X. Hammer, Gary D. Noojin, Benjamin A. Rockwell, and Alfred Vogel. Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water. *Journal of Applied Physics*, 83(12) :7488–7495, June 1998.

[96] J.C. Ramirez-San-Juan, E. Rodriguez-Aboytes, A. E. Martinez-Canton, O. Baldovino-Pantaleon, A. Robledo-Martinez, N. Korneev, and R. Ramos-Garcia. Time-resolved analysis of cavitation induced by CW lasers in absorbing liquids. *Optics Express*, 18(9) :8735, April 2010.

[97] J. P. Padilla-Martinez, C. Berrospe-Rodriguez, G. Aguilar, J. C. Ramirez-San-Juan, and R. Ramos-Garcia. Optic cavitation with cw lasers : A review. *Physics of Fluids*, 26(12) :122007, 2014.

[98] Vogel, Lauterborn, and Timm. Optical and acoustic investigations of the dynamics of laser-produced cavitation bubbles near a solid boundary. *J. Fluid. Mech.*, 206 :299–338, 1989.

[99] John R. Blake and D. C. Gibson. Cavitation bubbles near boundaries. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 19(1) :99–123, 1987.

[100] P. B. Robinson, J. R. Blake, T. Kodama, A. Shima, and Y. Tomita. Interaction of cavitation bubbles with a free surface. *Journal of Applied Physics*, 89(12) :8225, 2001.

[101] Michael S. Longuet-Higgins. Bubbles, breaking waves and hyperbolic jets at a free surface. *Journal of Fluid Mechanics*, 127 :103–121, 1983.

[102] Ali Muhammad. *Study of a novel configuration of laser assisted bioprinting.* PhD thesis, Université de Bordeaux, 2014.

[103] Chen, Yu, Su, and J. L. Chen. Exploration of water jet generated by Q-switched laser induced water breakdown with different depths beneath a flat free surface. *Optics express*, 21(1) :445–453, 2013.

[104] Pierre-Gilles de Gennes, Françoise Brochard-Wyart, and David Quéré. *Capillarity and Wetting Phenomena.* Springer New York, New York, NY, 2004.

[105] Martin Gruene, Andrea Deiwick, Lothar Koch, Sabrina Schlie, Claudia Unger, Nicola Hofmann, Inga Bernemann, Birgit Glasmacher, and Boris Chichkov. Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 17(1) :79–87, January 2011.

[106] Jason A. Barron, David B. Krizman, and Bradley R. Ringeisen. Laser Printing of Single Cells : Statistical Analysis, Cell Viability, and Stress. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(2) :121–130, February 2005.

[107] Lothar Koch, Andrea Deiwick, and Boris Chichkov. Laser-Based Cell Printing. In *3D Printing and Biofabrication*, pages 1–27. Springer, 2016.

[108] Bradley R. Ringeisen, Barry J. Spargo, and Peter K. Wu, editors. *Cell and Organ Printing.* Springer Netherlands, Dordrecht, 2010.

[109] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J.C. Fricain, and J. Amédée. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6(7) :2494–2500, July 2010.

# Annexes

# Laser-assisted bioprinting

For some years now, 3D printing has also been developed for biological applications. A laser-assisted process shows advantages over competing technologies.

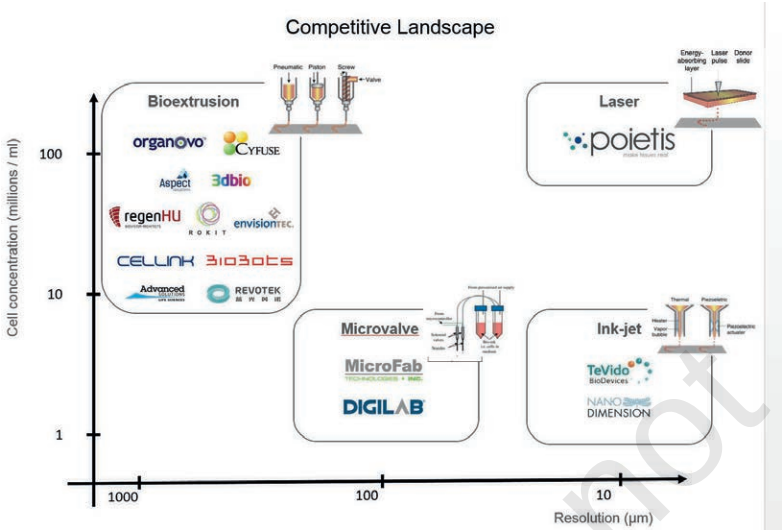



**Figure 1:** Comparison of the performance of the main bioprinting technologies associated with the corresponding bioprinting competitors

**Jerome Bouter[1,2], Fabien Guillemot[2] and Bertrand Viellerobe[2]**
**[1] CELIA (Center for Intense Lasers and Applications), University of Bordeaux / CNRS / CEA**
**[2] POIETIS SAS**

For many years now, additive manufacturing has opened up new possibilities in the industry and has recently paved the way to a paradigm shift in the tissue engineering domain. Indeed, some solutions have been developed to print cells and biomaterials onto specific substrates – the so-called bioprinting domain has evolved from these developments.

Among those different strategies and technologies currently available, laser-assisted bioprinting (LAB) is clearly at the forefront due to its ability to print with single cell resolution and with high accuracy and reproducibility. Engineered tissue constructs can thus be fabricated layer by layer by depositing cells and extra-cellular matrix materials (biomaterials) according to sophisticated patterns. This article aims to underline the performance of laser-based technology to achieve the most relevant tissues in regards to current biological and medical needs.

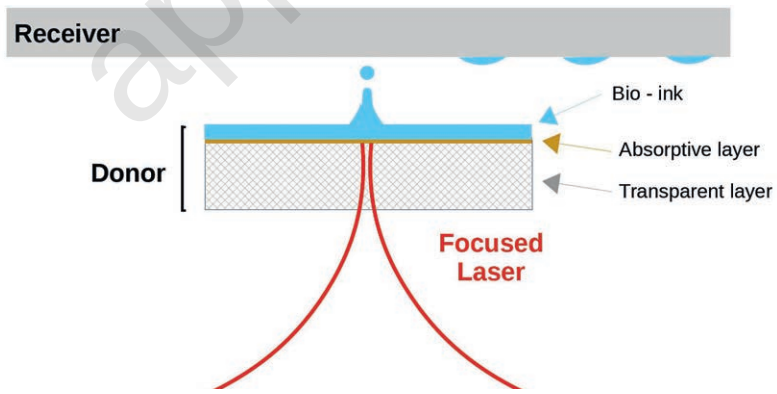



**Figure 2:** Schematic sketch of laser-assisted bioprinting

## General Principles and Solutions

Bioprinting has been defined as "*the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bio-engineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies*" [1]. That is, bioprinting has to be considered as the combination of 3D printing and biology. It is based on both 3D printing principles such as computer design, robotic dispensing or layer-by-layer manufacturing, and on biological requirements such as morphogenesis tissue formations mechanisms (differentiation, migration, etc.) that occur after printing, or non-invasive 3D imaging for tissue characterisation.

Different technologies have been developed over the last decade for that purpose, mainly based on nozzle solutions such as bio-extrusion, inkjet or microvalve [2]. All of them exhibit the same type of limitations as they suffer from inherent issues such as clogging of print heads and from an over-intense shear stress applied to cells when they flow through a nozzle, resulting in a poor cell printing viability. LAB has been developed to circumvent those limitations [3, 4]. It is a complex technology depending on a large number of parameters (laser energy density, laser wavelength, pulse duration, bio-ink viscosity and surface tension, etc.). **Figure 1** illustrates a comparison between the main bioprinting technologies with regards to resolution and cell concentration.

Competition is growing very fast in the bioprinting field, particularly during the last five years (nearly 45 to 50 companies have been identified to date, some of them being cited in figure 1). A large part of those players is composed of young start-ups from all over the world that are developing bioprinting solutions based on nozzle technologies such as extrusion

Images: Poietis

This PDF is not approved for publication

or inkjet. So far, Poietis is the only company dealing with LAB.

## Principle

LAB is a direct writing technique used to remove a small quantity of a liquid containing living cells (the bio-ink) from a donor and move it towards a receiver. A pulsed laser is focused on a donor composed of a transparent substrate usually coated with a thin metallic layer (10 - 100 nm thick) and a bio-ink. In the focal region, the laser energy is largely absorbed by the metallic layer. When the energy within the laser focus is high enough, the metal is ablated and instantaneously converted into a laser plasma that subsequently generates a small cavitation bubble within the fluid. This bubble expands in close proximity to the liquid-air interface until it collapses and creates a liquid jet (**figure 2** and **figure 3**). When the jet is sufficiently extended and close enough to the receiver, a bio-ink droplet is deposited onto the receiver. Thus, each printed droplet contains a defined number of cells, ranging from the single-cell level to larger numbers (several tens of cells) depending on the targeted application.

Controlling droplet shape and organisation on the receiver can ensure high-cellular viability and proliferation capabilities. Finally, translation and scanning of both receiver and donor enable the creation of complex droplet patterns that are needed for the development of complex objects such as biological tissues.

## A multiple parameter process

Several parameters are crucial for cell printing based on LAB to achieve the expected accuracy and quality.

### Laser-matter interaction

To control the entire process, laser parameters such as energy, pulse duration, wavelength, and numerical aperture have been investigated for many years. Some results have shown the dependency of droplet volume deposited on the receiver with energy [5] and pulse duration [6]. The laser-matter interaction is largely influenced by the donor film properties and the presence of the intermediary laser-absorbing layer, the metallic substrate. Different metals as titanium [7] and gold [8] have already been studied as well as the impact of their thickness [9] on 'jet-ability', viability and printing reproducibility.

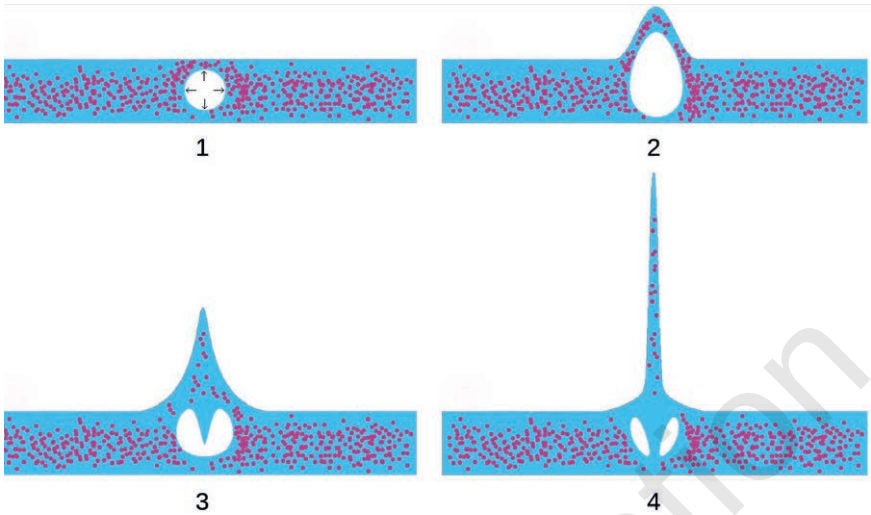



**Figure 3:** Laser-induced cavity dynamics within the bio-ink

### Bio-ink properties

First, cells are extracted from different surgery pieces of tissues and cultured several days before printing. In addition, bio-ink composition and cell concentration need to be adapted to targeted applications. Thus, bio-ink formulation and properties will exhibit a large variability that will have a direct impact on fluid properties during the printing process such as viscosity, wet-ability and surface tension. In addition, metallic layer thickness and nature will have an influence on jet sizes and velocities. Indeed, droplet sizes will be directly dependent on bio-ink and metallic layer properties. For example, a strong dependence exists between laser parameters and liquid volume [9], where weak laser energy applied on thin film of bio-ink will result in printed droplets being too small.

### Critical distance

Laser parameters and bio-ink properties are closely related with regards to >

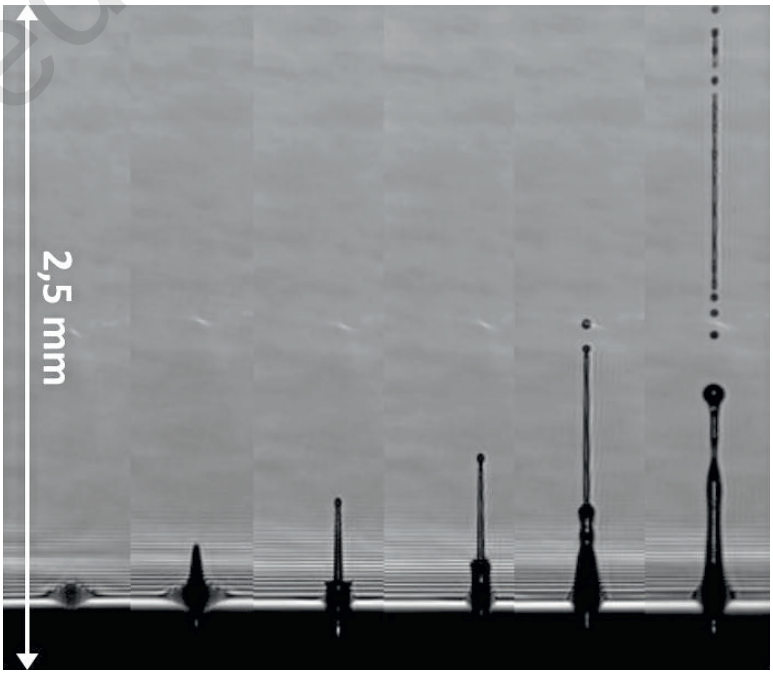



**Figure 4:** Photographs taken from a jet dynamics study of a bio-ink composed of keratinocytes. From left to right: 5µs - 15 µs - 20µs - 40µs - 50 µs and 100 µs after triggering the laser

Images: Poietis

This PDF is not approved for publication

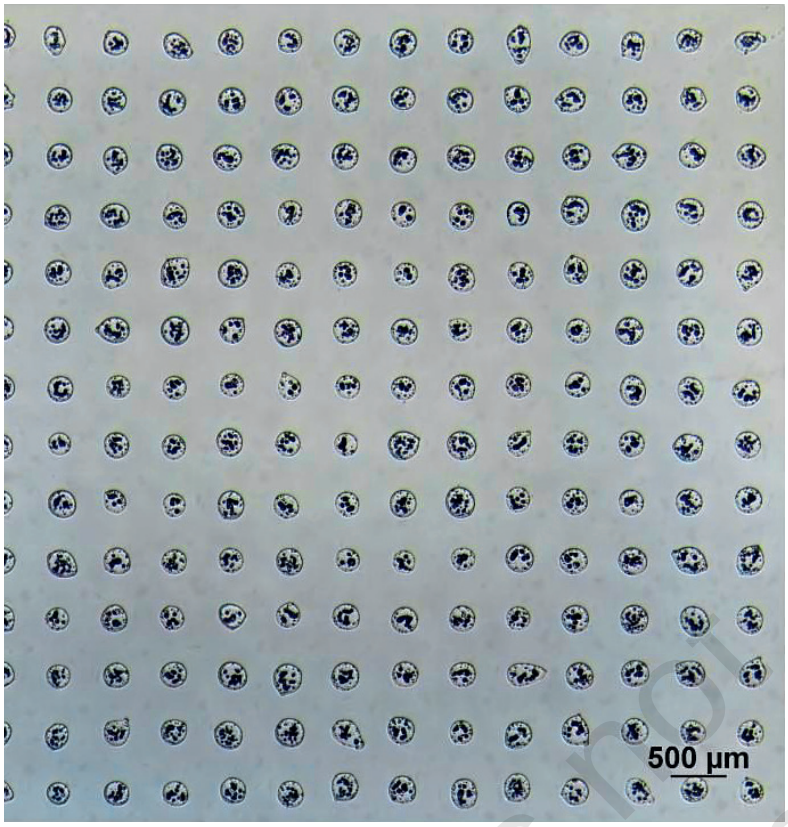



**Figure 5:** Keratinocytes bioprinted by NGB 17.03-Poietis

bioprinting performance. To ensure controlled cell deposition, laser spot size and donor-receiver distance must be optimised. For example, as spot size changes alter the function of the laser focusing depth, the droplet printing size can be adapted by laser autofocus [9]. Similarly, the distance between the liquid-air interface and the receiver has to be controlled to deposit cells with the lowest impact speed to ensure good cell viability (jets can reach easily 1 to 2 mm in height depending on the parameters used).

### Jet study

Jet speed (around 1 - 30 m/s) and tiny objects (100 µm thickness and 1 mm height) require specific systems to observe jet dynamics, such as TRI (Time Resolved Imaging): A pulsed laser illuminates the scene in a very short time during bubble or jet expansion and a synchronised camera takes a picture corresponding to the illumination time. A real-time shadow-graph is then obtained by repeating the same operation at different times, as illustrated on **figure 4**. Thus, such temporal analysis enables very efficient and relevant physical information while dealing with jetting properties such as velocity, volume, height, thickness or shape.

When all critical parameters are well defined and precisely controlled, it is possible to print cellular patterns with high quality and reproducibility, as illustrated in figure 5.

## Applications of LAB

LAB can be considered as the most advanced technology for applying printing strategies (sophisticated printing patterns, biomaterials and bio-ink-specific formulations, etc.), enabling tissue construct fabrications that mimic native constructs as closely as possible. LAB has been tested in a large variety of applications such as dermatology (skin development [10]), angiology (vascularisation development via printing of endothelial cells and mesenchymal stem cells onto a collagen hydrogel [11]), neurology (pattern of dorsal root ganglion neurons and supportive cells for neural outgrowth / network formation [12]) or even oncology (angiogenesis dynamic study via printed cancer cells onto living tissues [13]). All of these results have been obtained on breadboard or prototype systems developed in academic research laboratories. On the industrial side, Poietis remains the sole player developing LAB applications, in particular for skin bioprinting. The skin printing development has been carried out in the last couple of years on a multimodal proprietary bioprinter combining laser for cell printing (at high resolution) and microvalve printing for biomaterial printing (at low resolution). Thus, a full thickness skin made of a dermis (collagen + fibroblasts cells) and an

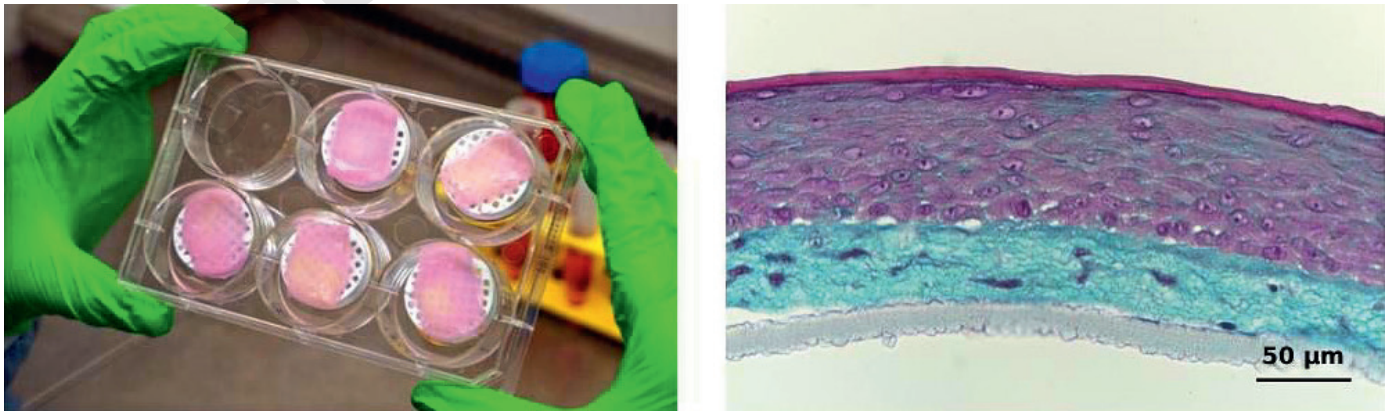



**Figure 6:** Left: Photograph of bioprinted skin products ($cm^2$ in size) Right: Histological view of the full thickness bioprinted skin

Images: Poietis

This PDF is not approved for publication

epidermis (keratinocytes cells) has been obtained and will be commercially available by the end of this year. **Figure 6** illustrates the size and appearance of the bioprinted skin model and its corresponding histologic view.

## Conclusion

LAB is a powerful tool to carry out bioprinting at the cellular level. Numerous applications have already been developed to date. However, LAB is still at the early stages of the broad and newly bioprinting domain. Indeed, this technology still needs to mature for reaching industrial and medical standards in various domains, for example automation optimisation, biomaterials development or even environmental controls. ■


[1] F. Guillemot, V. Mironov & M. Nakamura. Bioprinting is coming of age, Biofabrication, Vol 2, N°1, 010201, (2010)

[2] S.V. Murphy & A. Atal 3D bioprinting of tissues and organs, a, Nature Biotechnology, Vol 32, N°8 (2014)

[3] B. T. Vinson, S.C. Sklare & D.B. Chrisey, Laser-based cell printing techniques for additive biomanufacturing, Current Opinion in Biomedical Engineering, (2017), Vol 2, Pages 14–21, (2017)

[4] F. Guillemot, A Souquet, S Catros & B Guillotin, Nanomedicine, Vol. 5, N°3, p. 507-515 (2010)

[5] Duocastella, M., Colina, M., Fernández-Pradas, J.M., Serra, P., Morenza, J.L., 2007. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. Applied Surface Science 253, 7855–7859. t

[6] Koch, L., n.d. Laser assisted bioprinting at different wavelengths and pulse durations with a metal dynamic release layer: A parametric study

[7] Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., Bareille, R., Rémy, M., Bordenave, L., Amédée, J., Guillemot, F., 2010. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. Biomaterials 31, 7250–7256.

[8] Zhang, Z., Xu, C., Xiong, R., Chrisey, D.B., Huang, Y., 2017. Effects of living cells on the bioink printability during laser printing. Biomicrofluidics 11, 034120.

[9] Pearson, A., Cox, E., Blake, J.R., Otto, S.R., 2004. Bubble interactions near a free surface. Engineering Analysis with Boundary Elements 28, 295–313.

[10] L. Koch, A. Deiwick, S. Schlie, S. Michael, M. Gruene, V. Coger, D. Zychlinski, A. Schambach, K. Reimers, P.M. Vogt & B. Chichkov, Skin Tissue Generation by Laser Cell Printing, in Biotechnology and Bioengineering, Vol 109, N° 7, (2012)

[11] Bourget J, Kérourédan O, Medina M, Rémy M, Thébaud NB, Bareille R, Chassande O, Amédée J, Catros S & Devillard, R, Patterning of endothelial cells and mesenchymal stem cells by laser-assisted bioprinting to study cell migration. BioMed Res Int, 3569843 (2016)

[12] Curley JL, Sklare SC, Bowser DA, Saksena J, Moore MJ & Chrisey DB, Isolated node engineering of neuronal systems using laser direct write. Biofabrication, Vol 8: 015013, (2016)

[13] Sweat RS, Stapor PC & Murfee WL, Relationships between lymphangiogenesis and angiogenesis during inflammation in rat mesentery microvascular networks, Lymphatic Res Biol, Vol 10: 198–207, (2012)


Image: Poietis

## Contact

Bertrand Viellerobe, PhD
Chief Technological Officer
Poietis SAS
Bioparc Bordeaux Metropole
27 Allée Charles Darwin
33600 Pessac
France
Tel. + 33 9 72 52 16 94
bertrand.viellerobe@poietis.com
www.poietis.com


This PDF is not approved for publication

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

**INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 063 931***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **17 52131**

(51) Int Cl[8] : ***B 41 J 2/14*** *(2017.01)*

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

(22) **Date de dépôt :** 15.03.17.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 21.09.18 Bulletin 18/38.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

◯ **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *POIETIS Société par actions simplifiée* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** GUILLEMOT FABIEN, VIELLEROBE BERTRAND, BOUTER JEROME, LE BOUFFANT EVARZEG et VAUCELLE ROMAIN.

(73) **Titulaire(s) :** POIETIS Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** IP TRUST.

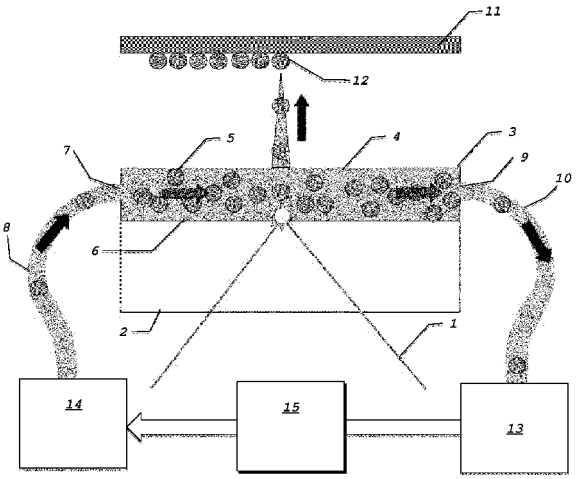
(54) **EQUIPEMENT ET PROCEDE D'IMPRESSION ADDITIVE.**

(57) La présente invention concerne un équipement et un procédé d'impression additive comportant un moyen d'excitation énergétique orientable pour produire une interaction ponctuelle avec un fluide recouvrant une lame (2), afin de provoquer un jet orienté en direction d'une cible (11), ledit fluide étant constitué par un vecteur liquide contenant des inhomogénéités, caractérisé en ce que

ledit fluide forme un film (4) liquide d'une épaisseur inférieure à 500 µm,

sur une lame (2) présentant au moins une zone (3) permettant l'interaction avec le laser dans laquelle débouche au moins une entrée (7), ladite zone d'interaction (3) débouchant dans au moins une sortie (9)

l'équipement comportant en outre des moyens de circulation du fluide entre ladite entrée (7) et ladite sortie (9).




FR 3 063 931 - A1

biowest
The Serum Specialist

***Product code : L0066***
***Product name : DMEM Low Glucose w/ stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate***

| CAS Number | Components | Quantity in g/l |
|---|---|---|
| 10035-04-8 | Calcium Chloride Dihydrate | 0.26500000 |
| 7487-88-9 | Magnesium Sulfate Anhydrous | 0.09767000 |
| 7782-61-8 | Ferric Nitrate Nonahydrate | 0.00010000 |
| 7447-40-7 | Potassium Chloride | 0.40000000 |
| 7647-14-5 | Sodium Chloride | 6.40000000 |
| 7558-80-7 | Sodium Phosphate Monobasic Anhydrous | 0.10900000 |
| 50-99-7 | D-Glucose Anhydrous | 1.00000000 |
| 56-40-6 | Glycine | 0.03000000 |
| 39537-23-0 | L-Alanyl-L-Glutamine | 0.86200000 |
| 1119-34-2 | L-Arginine Monohydrochloride | 0.08400000 |
| 30925-07-6 | L-Cystine Dihydrochloride | 0.06260000 |
| 5934-29-2 | L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate | 0.04200000 |
| 73-32-5 | L-Isoleucine | 0.10500000 |
| 61-90-5 | L-Leucine | 0.10500000 |
| 657-27-2 | L-Lysine Monohydrochloride | 0.14600000 |
| 63-68-3 | L-Methionine | 0.03000000 |
| 63-91-2 | L-Phenylalanine | 0.06600000 |
| 56-45-1 | L-Serine | 0.04200000 |
| 72-19-5 | L-Threonine | 0.09500000 |
| 73-22-3 | L-Tryptophan | 0.01600000 |
| 69847-45-6 | L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate | 0.10379000 |
| 72-18-4 | L-Valine | 0.09400000 |
| 67-48-1 | Choline Chloride | 0.00400000 |
| 137-08-6 | D-Ca Pantothenate | 0.00400000 |
| 59-30-3 | Folic Acid | 0.00400000 |
| 87-89-8 | Myo-Inositol | 0.00720000 |
| 98-92-0 | Nicotinamide (Nicotinic acid amide) | 0.00400000 |
| 58-56-0 | Pyridoxine Hydrochloride | 0.00400000 |
| 83-88-5 | Riboflavin | 0.00040000 |
| 67-03-8 | Thiamine Hydrochloride | 0.00400000 |
| 34487-61-1 | Phenol Red Sodium Salt | 0.01590000 |
| 113-24-6 | Sodium Pyruvate | 0.11000000 |
| 144-55-8 | Sodium Bicarbonate | 3.70000000 |
| WATER | | 985.98734000 |

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Biowest - Rue de la Caille - BP 11- 49340 Nuaillé - France
Tel: +33 2 41 46 42 42 - Fax +33 2 41 46 40 50

Résolution d'une équation du troisième degré
Soit l'équation

$$ax^3 + bx^2 + cx + d = 0$$

avec a,b,c et d des coefficients réels avec a non nul. En divisant par a et en posant

$$x = X - \frac{b}{3a}$$

, l'équation devient,

$$X^3 + pX + q = 0$$

avec

$$p = \frac{c}{a} - \frac{b^2}{3a^2} \text{ et } q = \frac{2b^3}{27a^3} + \frac{d}{a} - \frac{bc}{3a^2}$$

On calcul alors le discriminant D par,

$$D = \frac{q^2}{4} + \frac{p^3}{27}$$

Si $D > 0$, alors il existe une solution unique sous la forme

$$X_1 = \sqrt[3]{\frac{-q}{2} + \sqrt{\frac{q^2}{4} + \frac{p^3}{27}}} + \sqrt[3]{\frac{-q}{2} - \sqrt{\frac{q^2}{4} + \frac{p^3}{27}}}$$

Dans le cas de l'équation

$$V = \frac{1}{6}\pi h(\frac{3}{4}\phi^2 + h^2)$$

on a

$$a = \frac{1}{6}\pi \ b = 0 \ c = \frac{1}{8}\pi\phi^2 \text{ et } d = -V$$

on trouve alors un discriminant sous la forme

$$D = \frac{6V^2}{24} + \frac{\phi^6}{64} > 0$$

donc l'équation a pour solution réelle

$$h = \sqrt[3]{\frac{3V}{\pi} + \sqrt{\frac{-3V}{2\pi} + \frac{\phi^6}{64}}} + \sqrt[3]{\frac{3V}{\pi} - \sqrt{\frac{-3V}{2\pi} + \frac{\phi^6}{64}}}$$