



HAL
open science

Acoustique picoseconde dans une cellule biologique individuelle

Mathieu Ducousso

► **To cite this version:**

Mathieu Ducousso. Acoustique picoseconde dans une cellule biologique individuelle. Physique [physics]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2010. Français. NNT : . tel-00537030

HAL Id: tel-00537030

<https://theses.hal.science/tel-00537030v1>

Submitted on 17 Nov 2010

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

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

N° d'ordre : 4082

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

par **Mathieu DUCOUSSO**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **Mécanique**

Acoustique picoseconde dans une cellule biologique individuelle

Date de soutenance : 22 octobre 2010

Après avis de :

M. B. NONGAILLARD, professeur, IEMN, Valenciennes Rapporteurs

M. A. DEVOS, directeur de recherche - CNRS

Devant la commission d'examen formée de :

M. L. CANIONI, professeur - Université Bordeaux Président

M. B. NONGAILLARD, professeur, IEMN, Valenciennes Rapporteurs

M. A. DEVOS, directeur de recherche – CNRS

M. C. VERDIER, directeur de recherche – CNRS Examineurs

M. B. AUDOIN, professeur - Université Bordeaux

M. C. ROSSIGNOL, chargé de recherche – CNRS

Mme. M.-C. DURRIEU, chargée de recherche – INSERM Invitée

Remerciements :

Je remercie Marc Deschamps, directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli au Laboratoire de Mécanique Physique (LMP) et pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Je tiens aussi à le remercier pour tous les encouragements qu'il a pu me donner, lors des stages où il m'a encadré, alors étudiant de Licence et de Master, pour m'inciter à faire de la recherche.

Ce mémoire est le résultat d'un travail effectué au sein de l'équipe Propagation Acoustique et Ultrasons Laser, coordonnée par Bertrand Audoin.

Je tiens à remercier Bertrand Nongaillard, professeur à l'IEMN et directeur du département d'Opto-Acousto-Electronique de cet Institut, ainsi qu'Arnaud Devos, directeur de recherche au CNRS et Médaille de bronze du CNRS Palmarès 2008 pour ses travaux en acoustique picoseconde de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à Lionel Canoni, professeur à l'université de Bordeaux 1 et coordinateur du SLAM ainsi qu'à Claude Verdier, directeur de recherche au CNRS au Laboratoire de Spectrométrie Physique de l'université Joseph Fourier Grenoble 1 pour avoir accepté de participer au jury de thèse.*

Je suis gré à Bertrand Audoin, professeur à l'université de Bordeaux 1, de m'avoir encadré durant ce travail. Je remercie vivement Clément Rossignol, chargé de recherche au CNRS, pour m'avoir encadré durant ma thèse. Je tiens à le remercier en particulier pour m'avoir fait découvrir les bases expérimentales de la technique d'acoustique picoseconde, pour m'avoir régulièrement encouragé, et même félicité, durant ma thèse, et pour m'avoir remis sur les bons rails lorsque les choses devenaient difficiles. Je remercie aussi sincèrement Marie-Christine Durrieu, chargée de recherche INSERM à l'Unité 577 de Bordeaux 2, Biomatériaux et réparation tissulaire, notamment pour avoir encadré la partie de mes travaux liée à la biologie, pour m'avoir permis de communiquer mes résultats en conférence sur les biomatériaux, en Finlande et pour m'avoir permis de découvrir les joies d'une conférence internationale à l'étranger en équipe. Ce fut un très grand plaisir de travailler avec Marie et de bénéficier de sa gentillesse.

Je remercie chaleureusement Yannick Guillet, maître de conférence au LMP, pour son aide précieuse à de multiples reprises, ainsi que pour les parties de pétanques et d'échecs. Je remercie aussi vivement Thomas Dehoux, chargé de recherche au CNRS, pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir, particulièrement au sujet de la modélisation acousto-optique de ce travail. Je l'encourage aussi vivement à se mettre au port de la moustache. Je tiens à remercier aussi très sincèrement Jean-Michel Rampnoux, maître de conférence au CPMOH, pour m'avoir donné l'occasion d'enseigner à l'IUT, et pour toutes les conversations scientifiques, ou autre, que nous avons pu avoir, du début de cette thèse à la veille de la soutenance, et même après. Ce travail aurait très certainement comporté bien moins de résultats sans son aide précieuse.

* SLAM : Short lasers : applications & materials. (<http://www.cpmoh.cnrs.fr/SLAM/accueil.html>)

Au sein du laboratoire je remercie tout particulièrement Christophe Aristégui, professeur à l'université Bordeaux I, pour m'avoir encouragé à m'inscrire en doctorat, pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir et pour tous les conseils qu'il m'a donné, ainsi que pour son aide précieuse pour utiliser Endnote. Je remercie aussi Eric Ducasse, maître de conférence à l'ENSAM, qui m'a encadré durant mon stage de master recherche et avec qui j'ai appris ce qu'est une fonction de Green. Je remercie aussi les autres membres permanents du laboratoire, en particulier Sasha, Olivier, Michel et Jean-Pierre. Je remercie particulièrement Béatrice Desoudin ainsi que Sandrine Guit sans qui le laboratoire ne pourrait pas fonctionner. Merci également à Cathy Blanchard pour oeuvrer quotidiennement au bien être du laboratoire. Merci à toutes de m'avoir soutenu le jour J.

Je remercie les doctorants du laboratoire. D'abord ceux qui sont partis : je remercie tout particulièrement Damien Ségur, maintenant devenu un ami précieux et compagnon de chanson nocturne (accompagné de sa guitare) et que je rejoins bientôt au CEA, ainsi que Bénédicte Levasseur, Hugues Lourmes, Mahmoud Koabaz, et les autres... Et ceux qui y sont encore : Samuel, devenu un fidèle compagnon de travail, et qui viendra bientôt, du moins je l'espère, nous rejoindre au CEA, ainsi qu'Allaoua et son mini laser, Abder, Emilie, Jérôme, Alban, Jean-Philippe, Frédéric, Djoudi, ... et tous les autres !

Je remercie aussi « mes collègues biologistes » avec qui j'ai énormément interagi, et passé de très bons moments, que ce soit le matin en allant chercher les cellules ou le soir devant un verre... Je pense en particulier à Omar, Céline, Jérôme, Yifeng et Christel. Je remercie aussi Fabien Guillemot, chargé de recherche INSERM, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler lors de ma première année de thèse.

Viens le temps des amis, hors du laboratoire, mais d'un accompagnement au moins tout aussi précieux, par exemple pour aider à ne pas craquer quand la recherche devient trop dure, ou que l'on se sent démuni face à certains soucis de laboratoire. Je pense en premier lieu à Marion, ma formidable colocataire et amie de longue date, et que je peine à quitter pour Paris. Je pense aussi à tous ceux de la bande d'amis que nous formons depuis plus de 12 ans maintenant : Tristan, Romain et Nellie, Eric, Benjamin (mon futur collègue postdoc !), Thomas et Aurélie, Fanny, Hélène, David. Je pense aussi à mes autres amis : Laurie, Antoine, Darthos, Julien, Céline et sa famille, Abelin, David, Mareike, Marion, Sunniva...

Enfin, je tiens finalement à remercier ma famille : mon oncle Hubert, qui le premier m'a appris la mécanique et la démarche scientifique pour comprendre un mécanisme, mes frères et sœurs : Nicolas, Margot, Pauline et Pierre, ainsi que mes parents, Cathy et Yves, pour leur soutien inconditionnel depuis le tout début.

*C'est toujours bon d'avoir quelque chose qu'on
peut imaginer. Il est vrai que des fois ça monte
trop haut et après on se casse la gueule. Moi j'ai
souvent remarqué qu'il y a quelque chose avec
la réalité qui n'est pas encore au point.
Romain Gary, 1979*

Table des matières

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Chapitre 1 : Un contexte biologique | - 7 - |
| 1.1) Généralités sur la cellule..... | - 8 - |
| 1.1.1) Structure et dimensions | - 8 - |
| 1.1.2) Le cytosquelette | - 10 - |
| 1.1.3) Cycle cellulaire | - 10 - |
| 1.2) Adhésion cellulaire et effet des peptides d'adhésion..... | - 11 - |
| 1.2.1) Les contacts focaux et les forces mises en jeu | - 11 - |
| 1.2.2) Mesures d'adhésion | - 12 - |
| 1.2.3) Adhésion cellulaire et substrat | - 14 - |
| 1.2.4) Adhésion cellulaire et peptides | - 14 - |
| 1.2.5) Adhésion cellulaire et apoptose | - 15 - |
| 1.3) Techniques de microscopie pour l'imagerie subcellulaire | - 15 - |
| 1.3.1) La microscopie optique..... | - 15 - |
| 1.3.2) La microscopie électronique | - 17 - |
| 1.3.3) La microscopie acoustique..... | - 17 - |
| 1.3.4) La microscopie à champ proche..... | - 18 - |
| 1.3.5) Comparatif des différentes techniques d'imagerie subcellulaire | - 19 - |
| 1.4) Microscopie acoustique en biologie et potentialités de l'acoustique picoseconde- | 21 - |
| 1.4.1) Viabilité cellulaire et techniques de mesures..... | - 21 - |
| 1.4.2) Microscopie acoustique sur cellule unique | - 22 - |
| 1.4.3) Acoustique picoseconde dans l'eau et les milieux mous | - 23 - |
| 1.5) Conclusion | - 24 - |
| Chapitre 2 : Adaptation et performances du dispositif expérimental pour l'étude du vivant... | - 27 - |
| 2.1) Une première approche de l'acoustique picoseconde..... | - 28 - |
| 2.1.1) Génération optique..... | - 28 - |
| 2.1.2) Détection optique | - 29 - |
| 2.1.3) Signal obtenu en acoustique picoseconde..... | - 30 - |
| 2.1.4) Dispositif expérimental de détection..... | - 33 - |
| 2.2) Développements expérimentaux réalisés pour une étude cellulaire | - 33 - |

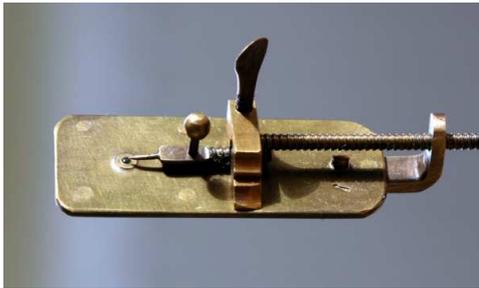
| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.2.1) Un effort de visualisation : MARION | - 33 - |
| 2.2.1.1) Principe de MARION..... | - 33 - |
| 2.2.1.2) Choix du composant optique 50/50..... | - 36 - |
| 2.2.1.3) Résolution optique de l'ensemble du dispositif | - 38 - |
| 2.2.2) Une détection bicolore | - 38 - |
| 2.2.3) Un porte échantillon pour les études <i>in vitro</i> | - 41 - |
| 2.3) Performances du nouveau dispositif expérimental | - 44 - |
| 2.3.1) Visualisation optique | - 44 - |
| 2.3.2) Effet de la détection différentielle..... | - 46 - |
| 2.3.2) Comparaison entre l'ancien montage et le nouveau | - 47 - |
| 2.3.3) Répétabilité et reproductibilité de MARION..... | - 49 - |
| 2.3.4) Détection bicolore | - 51 - |
| 2.3.5) Performances du porte échantillon..... | - 53 - |
| 2.3.5.1) Contraintes biologiques..... | - 53 - |
| 2.3.5.2) Contraintes acoustiques..... | - 54 - |
| 2.4) Conclusion | - 56 - |
| Chapitre 3 : Acoustique picoseconde dans une cellule végétale : un milieu acoustique semi- | |
| infini..... | - 59 - |
| 3.1) Présentation des cellules et du modèle analytique correspondant..... | - 60 - |
| 3.1.1) Présentation des cellules d' <i>allium cepa</i> | - 60 - |
| 3.1.2) Protocole expérimental et principe du modèle associé | - 61 - |
| 3.2) Simulation analytique et ajustement numérique du modèle | - 62 - |
| 3.2.1) Élévation et diffusion de la chaleur aux temps caractéristiques d'acoustique | |
| picoseconde | - 62 - |
| 3.2.2) Propagation acoustique et contrainte mécanique développée..... | - 67 - |
| 3.2.3) Détection optique | - 70 - |
| 3.2.3.1) Réponse fondamentale de la diffraction optique..... | - 70 - |
| 3.2.3.2) Application à un milieu transparent semi-infini..... | - 73 - |
| 3.2.3.3) Prise en compte de l'interaction acousto-optique dans le substrat..... | - 77 - |
| 3.2.4) Vérification expérimentale de la détection d'oscillations Brillouin dans la cellule | |
| d' <i>Allium Cepa</i> | - 79 - |
| 3.2.5) Ajustement du modèle sur des signaux expérimentaux | - 80 - |
| 3.3) Vérification expérimentale de la non invasivité de la méthode..... | - 82 - |
| 3.3.1) Étude expérimentale de l'élévation thermique le temps d'une mesure | - 82 - |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.3.2) Laser impulsif focalisé et dommage à la santé..... | - 84 - |
| 3.3.3) Effet de la contrainte acoustique à l'interface..... | - 85 - |
| 3.3.4) Stabilité en temps d'une acquisition d'acoustique picoseconde..... | - 86 - |
| 3.4) Réponse des constituants subcellulaires à une mesure d'acoustique picoseconde. Vers une différenciation de variétés d'une espèce donnée | - 88 - |
| 3.4.1) Analyse de la vacuole de deux espèces différentes d'oignon | - 88 - |
| 3.4.2) Analyse du noyau de deux espèces différentes d'oignon | - 90 - |
| 3.4.3) Mesure dans la membrane cellulaire par acoustique picoseconde..... | - 92 - |
| 3.5) Vers de l'imagerie cellulaire par acoustique picoseconde..... | - 93 - |
| 3.6) Conclusions et perspectives | - 94 - |
| Chapitre 4 : Acoustique picoseconde dans une cellule animale : une couche mince acoustique | - 97 - |
| 4.1) Présentation des cellules et du modèle analytique correspondant..... | - 97 - |
| 4.1.1) Présentation des cellules animales | - 97 - |
| 4.1.2) Acoustique picoseconde et couches minces transparentes | - 99 - |
| 4.1.3) Présentation du modèle | - 100 - |
| 4.2) Simulation analytique | - 102 - |
| 4.2.1) Élévation et diffusion de la chaleur | - 102 - |
| 4.2.2) Déplacement acoustique et variation d'épaisseur cellulaire | - 103 - |
| 4.2.3) Déformation acoustique | - 107 - |
| 4.2.4) Détection optique | - 108 - |
| 4.2.4.1) Détection de la dynamique des interfaces | - 109 - |
| 4.2.4.2) Détection des champs de perturbation | - 110 - |
| 4.2.4.3) Influence de l'épaisseur de la cellule vis-à-vis de la détection optique .. | - 114 - |
| 4.2.4.4) Vers la résolution du problème inverse à partir de la détection optique dans la lame transparente | - 117 - |
| 4.3) Détection expérimentale réalisée en deux couleurs dans une même cellule MC3T3...- | 118 - |
| 4.3.1) Protocole expérimental | - 118 - |
| 4.3.2) Analyse acoustique de quatre signaux expérimentaux | - 121 - |
| 4.4) Étude de la mécanique cellulaire en fonction de l'ajout de peptides stimulateurs d'adhésion cellulaire | - 124 - |
| 4.4.1) Analyse de quatre résultats | - 124 - |
| 4.4.2) Résultats statistiques | - 128 - |

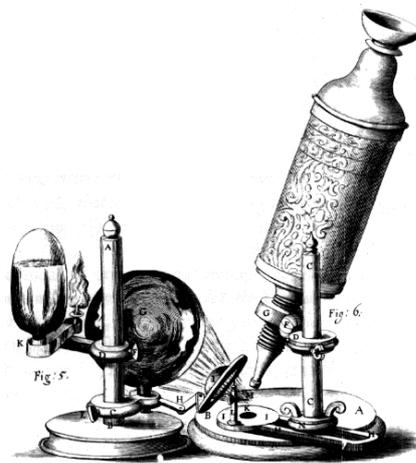
| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 4.4.2.1) Compressibilité..... | - 128 - |
| 4.4.2.2) Viscosité | - 129 - |
| 4.4.2.3) Fréquence de détection acousto-optique | - 131 - |
| 4.4.2.3) Épaisseur | - 132 - |
| 4.4.2.4) Moyennes et probabilité de présence | - 133 - |
| 4.4.3) Discussion des résultats | - 134 - |
| 4.5) Perspectives | - 137 - |
| 4.5.1) Perspectives de modélisation | - 137 - |
| 4.5.2) Perspectives expérimentales | - 140 - |
| 4.6) Conclusion | - 144 - |
| Chapitre 5 : Conclusion générale..... | - 146 - |
| Annexes : | - 149 - |
| A.1) Annexes à la modélisation du problème de la cellule végétale | - 149 - |
| A.1.1) Étude acoustique | - 149 - |
| A.1.2) Étude optique | - 150 - |
| A.2) Détails des calculs pour la résolution du code à deux interfaces..... | - 153 - |
| A.2.1) Résolution thermique | - 153 - |
| A.2.2) Résolution acoustique | - 154 - |
| A.3) Vers une résolution analytique de la détection optique dans le problème bi-interfaces | - 157 - |
| A.3.1) Résolution du problème optique non perturbé..... | - 157 - |
| A.3.2) Résolution du problème optique avec diffraction | - 158 - |
| A.4) Paramètres physiques mesurés dans les cellules trouvés dans la bibliographie .- | - 160 - |
| Bibliographie : | - 161 - |

Introduction

L'homme a appris de longue date à s'équiper d'outils pour regarder les petits objets. Ainsi, l'existence de la lentille optique, instrument le plus simple qui soit pour grossir l'image d'un objet, remonte au moins à -700 (ruines de Ninive). Vers -500, Aristophane fait référence aux « sphères ardentes », en cristal de roche ou en émeraude, et au premier siècle, Sénèque remarque que les objets sont plus gros et distincts lorsqu'ils sont vus au travers d'une sphère remplie d'eau. À la même époque, Pline utilise une lentille de verre pour la mise à feu et, à Rome, les médecins focalisent le soleil à l'aide de lentilles pour cautériser les plaies. Cependant il faudra attendre la fin du XVI^{ème} siècle pour voir apparaître ce qu'on considère aujourd'hui comme le premier microscope. Sa paternité est aujourd'hui débattue ; sa découverte pouvant provenir des Jansen père et fils, figure (a), ou de G. Galilée. Ce premier microscope est très simple, il est composé de deux lentilles convexes, l'une servant d'objectif grossissant et l'autre d'oculaire. Cet objet ne va alors cesser par la suite d'être amélioré, notamment par le hollandais A. Van Leeuwenhoek, généralement considéré comme le père de la microscopie moderne. En 1664, R. Hooke [1] présente dans son traité « Micrographia » un microscope à trois lentilles doté d'une table porte objet, d'un système de mise au point et d'un condensateur d'éclairage fait avec un ballon d'eau, figure (b).



(a)



(b)

(a) Microscope de Van Leeuwenhoek, composé d'une lentille unique servant à la fois d'objectif et d'oculaire. Ce microscope est muni de deux réglages possibles pour positionner l'objet à regarder par rapport à la lentille. (b) Microscope de Hooke, présenté dans son traité « Micrographia ».

Dès lors, les progrès de la microscopie ont permis la découverte du monde de l'infiniment petit dont l'intérêt ne cesse de grandir dans les communautés scientifiques comme industrielles. [2] Aujourd'hui, il existe quatre grandes familles de microscopie : la

microscopie optique, la microscopie électronique, la microscopie à champ proche et la microscopie acoustique.

En 1934, S. Sokolov [3] montre qu'il est possible d'utiliser les ultrasons pour détecter des défauts de la structure interne des matériaux denses et dans les années 1970, sous l'impulsion de C. Quate, [4] la microscopie acoustique voit le jour. En microscopie acoustique, un faisceau d'ultrasons est produit en soumettant un élément piézoélectrique très mince à un signal électrique modulé. Ce faisceau est alors concentré sur l'échantillon à l'aide d'une lentille acoustique focalisante puis recueilli à l'aide d'une lentille acoustique collectrice et converti en signal électrique avec un second élément piézoélectrique. La technique peut être appliquée en réflexion ou transmission, selon que l'on détecte les faisceaux ultrasonores transmis ou réfléchis sur l'échantillon. L'image acoustique est obtenue par un balayage mécanique, en déplaçant la tache de focalisation ultrasonore dans le plan perpendiculaire au faisceau. Pour chaque point du balayage, le signal électrique recueilli en sortie du récepteur est mémorisé et traité pour finalement reconstituer une image sur écran. Un liquide de couplage est utilisé pour favoriser la transmission du signal acoustique entre l'échantillon et les lentilles acoustiques, généralement de l'eau. La limite de la résolution spatiale de l'instrument est proche de la demi-longueur d'onde des ultrasons dans ce liquide de couplage. Pour un microscope acoustique dont l'élément piézoélectrique vibre au GHz, il est difficile d'obtenir une résolution latérale supérieure à la résolution offerte par la microscopie optique, de l'ordre du micron. La résolution tomographique est quant à elle liée à la longueur d'onde ultrasonore dans l'échantillon. L'intérêt majeur de la microscopie acoustique provient non pas de sa résolution mais de ce qu'elle offre la possibilité d'obtenir des images en profondeur de l'échantillon, que celui-ci soit opaque ou non. De plus, l'information apportée est complémentaire des autres méthodes de microscopie : elle peut être sur les propriétés mécaniques de la matière (densité, élasticité, viscosité, porosité, etc.) ou sa structure (relief, micro-fissures, etc.). Les champs d'applications classiques de la microscopie acoustique sont la microélectronique, la métallurgie ou le biomédical. Un intérêt majeur pour le biomédical est que la microscopie acoustique permet l'observation des organes et des tissus vivants sans devoir introduire d'agents de contraste ni perturber leur fonctionnement. De plus, la profondeur de pénétration est bien plus grande en microscopie acoustique qu'en microscopie optique. De tels atouts font qu'aujourd'hui, la microscopie acoustique suscite un grand intérêt en médecine, à tel point qu'elle est entrée dans les salles d'opération pour l'imagerie d'organe pendant les interventions chirurgicales.

En parallèle de la génération d'ultrasons par effet piézoélectrique, on sait depuis A.G. Bell [5] que le son peut être généré avec de la lumière. La base de la physique des ultrasons lasers réside dans cette découverte : il est possible de générer par rayonnement laser des ondes acoustiques. Quarante ans plus tard, L. Brillouin [6] prédit que le son et la lumière peuvent interagir, la vérification expérimentale de cette prédiction étant faite en 1930 par E. Gross. [7] Les ondes générées par laser peuvent alors aussi être détectées par laser. Ne reste plus qu'à attendre les sources de lumière adéquates pour que naisse l'acoustique picoseconde...

En 1960, T. Maiman conçoit le premier laser [8] et, une petite dizaine d'années plus tard, les premières impulsions lasers nanosecondes sont générées. [9] En 1984, [10] suite à l'avènement des sources lasers ultrarapides et de la technique dite pompe-sonde, une révolution dans la génération et la détection d'ultrasons de haute fréquence intervient, l'acoustique picoseconde ou acoustique ultrarapide. En acoustique picoseconde, une première impulsion laser très énergétique, car focalisée et extrêmement brève, est utilisée pour générer un champ de contrainte dans un échantillon. Cette impulsion s'appelle la pompe, sa durée est typiquement de la centaine de femtoseconde. Le champ de contrainte créé résulte de l'absorption de l'énergie lumineuse dans la matière. Cette impulsion utilise donc la découverte de A. G. Bell : une onde mécanique est créée avec de la lumière. Le contenu spectral lié à ce champ de contrainte peut s'étendre jusqu'au térahertz, créant des ondes acoustiques se propageant dans le matériau dont la longueur d'onde peut aller de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres. En utilisant un objectif de microscope, la tache focale de pompe en surface de l'échantillon peut facilement être réduite à un micromètre de diamètre. Les échelles de temps caractéristiques de l'acoustique picoseconde sont alors de la picoseconde à la nanoseconde et les dimensions caractéristiques du nanomètre au micromètre. Pour détecter des perturbations aussi rapides et localisées, on utilise la prédiction de L. Brillouin : l'onde acoustique provoque une perturbation de la densité du matériau, qui crée une modification de son indice optique [6] donc une variation de son coefficient de réflexion. Cette variation d'indice de réflexion, signature optique de la perturbation créée par la pompe, est détectée par les impulsions sondes. Une multitude d'impulsions lasers sont retardées par rapport à l'impulsion pompe, les impulsions sondes, et permettent des mesures successives de la réponse transitoire de l'échantillon à la contrainte créée par la pompe. Un échantillonnage optique de la réponse de l'échantillon à la perturbation créée est ainsi réalisé. Historiquement, les premiers montages permettant cet échantillonnage optique sont les bancs pompe-sonde. Dans un tel montage, les impulsions

pompes et sondes proviennent du même laser, et le retard des impulsions sondes par rapport aux impulsions pompes est obtenu en utilisant une ligne à retard mécanique. Celle-ci permet une variation de chemin optique contrôlée avec une précision inférieure au micromètre, ce qui correspond à un retard optique moindre que la durée de l'impulsion laser, sans modifier le positionnement spatial du pointé de la sonde sur l'échantillon. Retard après retard, la dynamique de la réponse optique de l'échantillon à la perturbation créée par la pompe est finalement obtenue avec une résolution temporelle subpicoseconde. Les très hautes fréquences acoustiques et la résolution temporelle subpicoseconde de l'acoustique picoseconde rendent alors possible l'étude acoustique de la structure interne d'échantillons submicrométriques et la focalisation du laser permet une résolution latérale identique à celle de la microscopie optique.

Historiquement, passé la première expérience d'acoustique picoseconde, de solides bases théoriques sont rapidement posées, [11] et les empilements de structures planes submicrométriques sont étudiés. L'étude des réflexions acoustiques à des interfaces solide/liquide a suivi à partir de 1996, [12] et une première étude dans les matériaux polymères est réalisée cette même année. [13] Ces premiers travaux ont été réalisés avec de faibles focalisations du spot laser par rapport à l'épaisseur des échantillons étudiés, reproduisant ainsi le problème acoustique de rayonnement d'un piston plan en champ proche. L'étude acoustique était alors consacrée aux ondes de polarisations longitudinales uniquement. Les ondes de polarisations transverses ont ensuite été obtenues, d'abord en jouant sur les conversions de modes à la réflexion entre un film isotrope opaque et un substrat anisotrope, [14], puis, selon le même principe mais dans un film transparent. [15] Une autre solution consiste à focaliser fortement l'impulsion laser et observer le problème acoustique en champ lointain. [16] Parallèlement, la génération et la détection d'ondes de surface sont réalisées depuis 2002. [17] Ces premiers défis de génération et détection acoustique résolus, l'étude de structures autres que les matériaux solides, métalliques ou semi-conducteurs, a alors débutée. Ainsi, concernant l'eau, les premières applications à l'étude de la propagation et de la détection de phonons acoustiques dans son volume débutent tard, avec une étude de la célérité acoustique en fonction de la température en 2005 [18] et l'étude dynamique de la solidification est réalisée dans la foulée. [19] Par la suite, une étude de la réflexion des phonons acoustiques à l'interface entre de l'eau et un solide a été proposée, [20] et, récemment, une application pour la mesure de nanostructures par la propagation des phonons acoustiques dans son volume a été publiée. [21] Quelques études ont été réalisées dans les

milieux mous, ou viscoélastiques, dans des films déposés par la technique de Langmuir-Blodgett [22].

Les nombreux progrès réalisés font qu'aujourd'hui l'acoustique picoseconde est appliquée pour l'étude des films minces et des systèmes multicouches, l'étude de nanofilms, [23] de nanoparticules [24] et de microfibres, [25] l'étude des interfaces [26] et les mesures d'adhésion. [27] Elle est appliquée dans les métaux, les métaux liquides [28], y compris en conditions extrêmes, [29] la glace, [19] les liquides, [18] les polymères. [22] En plus de l'acoustique, les champs d'application de l'acoustique ultrarapide sont la thermique, [30] l'électronique [31] ou encore l'optique. [32] En parallèle de ces progrès, le savoir faire acquis pour la focalisation de la génération, et le développement de nouvelles technologies lasers, rendent possible l'imagerie par acoustique picoseconde. Il ne faut plus que quelques secondes pour effectuer une acquisition en un point donné d'un échantillon. [33] Procédant alors de la même manière qu'en microscopie acoustique, l'imagerie par acoustique picoseconde de structures submicrométriques est réalisable.

Il apparaît alors que l'acoustique picoseconde a acquis suffisamment de maturité, et peut aujourd'hui répondre à l'intérêt que montrent les biologistes pour l'imagerie par ultrasons, en appliquant la technique aux cellules biologiques. Les premières applications sont réalisées dans ce manuscrit*. Pour proposer un lien entre les deux disciplines concernées par ce travail, les sciences physiques et du vivant, une présentation sommaire de la cellule sera faite dans le premier chapitre. Cette présentation sera accompagnée d'une revue rapide du contexte d'imagerie cellulaire où l'acoustique picoseconde prétend s'insérer et des concepts biologiques nécessaires à la compréhension des enjeux de ce travail. Le second chapitre est consacré aux développements expérimentaux nécessaires pour l'application de l'acoustique picoseconde à la biologie cellulaire *in vitro*, première étape nécessaire dans la transition d'une technique dédiée à l'étude de la physique du solide vers l'étude de biophysique cellulaire. Ces développements seront d'abord présentés puis une analyse de leurs performances sera effectuée. Le troisième chapitre sera consacré aux premières applications de l'acoustique picoseconde dans un matériau biologique simple : la cellule végétale d'oignon. Cette première présentation sera faite à travers une modélisation analytique et les simulations correspondantes qui seront alors confrontées pour la première fois aux expériences

* Juste avant que ne débute ce travail de thèse, N. Chigarev a, au cours de son travail de post-doctorat au LMP, montré qu'il était expérimentalement possible de détecter un signal d'acoustique picoseconde dans la vacuole d'une cellule d'oignon, dont l'amplitude peut être modifiée par l'ajout d'un peptide en surface du biomatériau.

d'acoustique picoseconde dans une cellule biologique *in vitro*. Le modèle développé et la simplicité expérimentale de cette première application permettront de vérifier le caractère non invasif de la méthode pour les cellules biologiques. Cette première étude permettra de démontrer la sensibilité de la technique pour l'évaluation des propriétés mécaniques de la cellule et son potentiel pour l'imagerie cellulaire. Le quatrième chapitre présentera finalement une seconde étude, sur cellules animales. La cellule animale étudiée étant moins épaisse que celle d'oignon, un nouveau modèle sera développé. Celui-ci permettra une étude de la détection en fonction de la couleur de laser utilisée et de l'épaisseur des cellules, ainsi que l'interprétation et la compréhension des résultats expérimentaux. Cette étude sur cellules animales sera appliquée à mesurer les propriétés mécaniques de la cellule en fonction de l'utilisation de protéines de stimulation de son adhésion sur un biomatériau. L'application immédiate concerne la reconstruction tissulaire.

Chapitre 1

Un contexte biologique

La cellule est l'unité de base d'organisation structurelle des systèmes vivants, elle se situe au plus bas échelon des structures capables d'effectuer toutes les activités de la vie. Elle a été identifiée pour la première fois par R. Hooke, en 1665, [1] qui observait une fine couche de liège à l'aide d'un microscope optique. On définit deux types de cellules, les procaryotes, cellules sans noyau et les eucaryotes, cellules avec noyau. Ce travail sera appliqué à ces dernières. Dans la limite de résolution du microscope optique, toutes les cellules eucaryotes possèdent une substance fondamentale, liquide et transparente, le cytoplasme, et un corps rigide et opaque, le noyau. Le tout est délimité par une membrane cellulaire. Le soutien cellulaire est assuré par une structure filamentaire, le cytosquelette, non visible en microscopie classique, car de diamètre inférieur à la centaine de nanomètres. [34] Cette structure est fondamentale pour tous les événements de la vie cellulaire, notamment pour les processus d'adhésion cellulaire. Ainsi, la cellule est un micro-organisme hétérogène et complexe, fonctionnant de manière autonome mais en étroite relation avec l'organisme auquel elle appartient. Afin de mieux la comprendre et interpréter les mécanismes cellulaires, il est nécessaire pour le biologiste de pouvoir observer à l'échelle subcellulaire, [35] du micromètre au nanomètre. Aussi, les avancées en recherche cellulaire sont intrinsèquement liées aux différentes techniques d'observation et d'étude mises à la disposition des biologistes. Cependant, si l'imagerie cellulaire haute résolution est un défi nécessaire et vital pour la compréhension des mécanismes intracellulaires, un autre enjeu, au moins aussi important pour cette même compréhension, est l'étude des interfaces cellulaires afin de comprendre comment une cellule réagit lorsqu'elle est au contact d'une autre cellule ou d'un substrat. L'adhésion cellulaire sur un substrat externe [36] joue un rôle majeur pour les cellules adhérentes dans leur cycle cellulaire, de leur maturation, à leur différenciation, leur motilité ou leur apoptose*. [37] L'adhésion cellulaire sur biomatériau[†] comprend une cascade de quatre événements : [38] l'attachement cellulaire, son étalement, l'organisation de son cytosquelette et la

* L'apoptose est un processus actif de suicide cellulaire, programmé par la cellule. Ce processus est caractérisé par une modification physiologique reconnaissable de la cellule. Le noyau se désagrège, la cellule se contracte et se fractionne en morceaux entourés d'une membrane.

† Un biomatériau est défini comme étant un matériau non vivant, utilisé dans un appareil médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, quelque soit sa fonction.

formation des contact focaux^{*}. La quantification de l'adhésion cellulaire sur un substrat lors de ces quatre phases est au cœur de nombreux travaux de recherche actuels, motivés par exemple par un besoin croissant d'organe de remplacement en médecine chirurgicale du fait de l'augmentation de la longévité humaine. [39]

Dans ce chapitre, une présentation de différentes notions de bases de la biologie cellulaire nécessaires au physicien pour la compréhension de ce travail sera faite dans un premier temps. La morphologie cellulaire ainsi que les échelles de tailles typiques de la cellule seront évoquées. Par la suite, l'étude de la biomécanique et de l'adhésion cellulaire, sera abordée, en seconde partie de ce chapitre. La présentation des méthodes de mesure d'adhésion illustrera l'intérêt croissant que portent les biologistes pour cette étude, notamment en utilisant des peptides pour stimuler cette adhésion. Une revue non exhaustive des méthodes d'imagerie subcellulaire présentes dans les laboratoires de biologie et ne dégradant pas la morphologie cellulaire, c'est-à-dire les méthodes ne séparant pas les organites entre eux, sera ensuite proposée, en troisième partie de ce chapitre. Les méthodes présentées sont rassemblées selon les quatre grandes familles classiques de microscopie et présentées par ordre chronologique d'apparition : la microscopie optique, la microscopie électronique, la microscopie acoustique et la microscopie à champ proche. Leur intérêt pour la biologie cellulaire sera présenté. En quatrième et dernière partie, une revue des applications de la microscopie acoustique appliquée au domaine biomédical sera faite, ainsi, qu'une revue de l'acoustique picoseconde dans un milieu dont les propriétés mécaniques sont proches de la cellule, un milieu aqueux ou mou. La résolution augmente alors d'un à deux ordres de grandeurs par rapport à celle obtenue en microscopie acoustique conventionnelle.

1.1) Généralités sur la cellule

1.1.1) Structure et dimensions

Le cytoplasme, optiquement transparent, entoure le noyau, les organites et tout autre élément présent dans la cellule. Il forme une substance homogène dans la cellule, visqueuse ou très fluide, et contient de nombreux sels minéraux nécessaires à l'activité biochimique de la cellule. Le noyau est dans la cellule, entouré de cytoplasme, sa forme est fonction de l'état

^{*} Un contact focal est une jonction d'ancrage stable de la cellule sur un substrat non-cellulaire. De nombreux filaments du cytosquelette de la cellule ont une de leur extrémité située sur le contact focal. Les contacts focaux peuvent aussi être appelés plaques d'adhérences, ou plaques focales, surtout si les encrages de la cellule sont très larges.

cellulaire, selon l'activité de la cellule. A l'intérieur du noyau se trouvent les chromosomes composés d'ADN et de protéines. La cellule est délimitée par sa membrane, d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur chez les cellules eucaryotes, [40] et dont la fonction est d'assurer une barrière perméable pour de nombreuses substances dissoutes. Les échanges moléculaires à travers la paroi cellulaire se font par diffusion. Plus la surface de la membrane est grande par rapport au volume de la cellule, plus la quantité des échanges possibles est optimale par rapport aux besoins de la cellule. Ce rapport surface sur volume définit les dimensions microscopiques de la cellule : la vitesse d'absorption de nourriture est proportionnelle à sa surface et la quantité nécessaire est proportionnelle au volume ; la vitesse à laquelle entrent et sortent les déchets est donc inversement proportionnelle à la taille. Les cellules eucaryotes ont typiquement un diamètre de 10 à 100 micromètres, et leur épaisseur varie selon le type de cellule, d'une centaine de nanomètres à quelques micromètres.

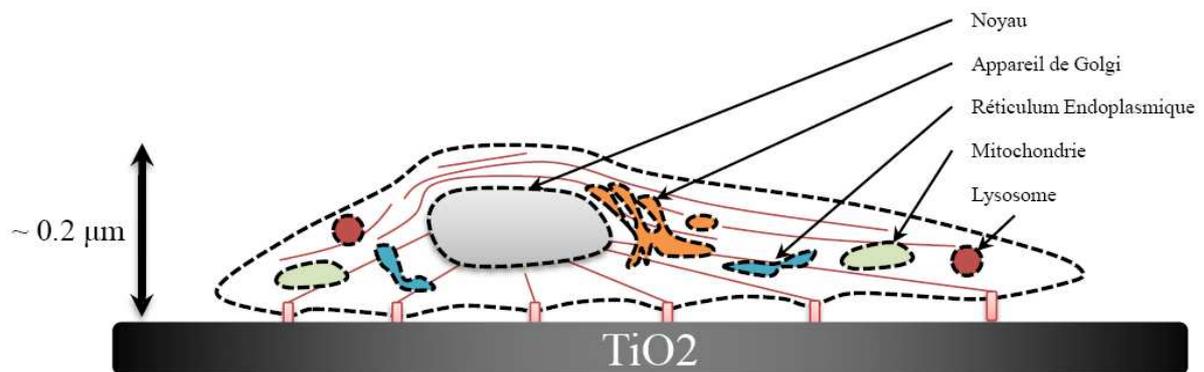


Figure 1-1 : Schéma d'une cellule animale adhérente sur un biomatériau. Le noyau est le plus gros des nombreux organites cellulaires. Les dimensions de la cellule sont micrométriques et son contenu est fortement hétérogène. (Schéma réalisé par O. Zouani, laboratoire Biomatériaux et réparation tissulaire U577, Université Bordeaux 2)

De nombreux autres organites sont présents dans la cellule. Dans la cellule végétale, ces organites sont appelés plastides et assurent, par exemple, la photosynthèse cellulaire. Dans la cellule animale, les éléments subcellulaires sont plus nombreux et plus variés ; la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les lysosomes sont les principaux. La figure 1-1 présente une illustration de cellule animale adhérente sur un biomatériau. Son contenu est fortement hétérogène, dès l'échelle de la centaine de nanomètres, du fait des nombreux organites qui la composent. Son soutien et son adhésion sur le biomatériau sont assurés par le cytosquelette. [41]

1.1.2) Le cytosquelette

La structure mécanique de base de la cellule animale est son cytosquelette, c'est une véritable charpente interne qui lui confère sa forme et joue un rôle essentiel dans son adhésion et éventuellement dans sa mobilité. Il intervient aussi dans la contraction des cellules musculaires et le transport de protéines. Il est très dense et dynamique, il utilise trois types de fibres différentes pour ce soutien et cette dynamique : les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires. Les microtubules sont épais et composés de tubuline. Les microfilaments sont plus fins et composés d'actine^{*}. Les filaments intermédiaires sont fait de molécules qui diffèrent selon le type de cellule et ils sont assez hétérogènes. La valeur caractéristique de leur module d'Young est de quelques GPa et leur diamètre compris entre 5 et 25 nm. [42]. C. Rotsch [43] a montré l'importance du réseau d'actine dans la stabilité mécanique de la cellule vivante en montrant que la désagrégation de ce réseau implique forcément une baisse du module d'Young moyen de la cellule. Ce réseau dense renforce le caractère hétérogène de la cellule animale à l'échelle submicrométrique, puisqu'il faut le rajouter aux nombreux organites subcellulaires. Le cytosquelette est donc à la fois le squelette et le muscle de la cellule, c'est un réseau renouvelé en permanence et à l'origine de nombreuses activités de la cellule ; c'est une structure dynamique, dont la forme et la densité dans la cellule sont intrinsèquement liées à la fonction cellulaire et à l'environnement extracellulaire.

La forme cellulaire est essentiellement assurée chez la cellule végétale par une paroi rigide extérieure à la membrane. De plus, l'environnement extérieur de la cellule végétale étant souvent quasi statique, le cytosquelette ne participe que faiblement à son soutien cellulaire. Il est donc relativement simple et composé essentiellement d'un réseau de microtubules, localisé contre la membrane cellulaire.

1.1.3) Cycle cellulaire

La vie de la cellule est définie par le cycle cellulaire : toute cellule se reproduit par scission en deux descendants, toute cellule mère générant deux cellules filles à la fin de chaque cycle de division, [41] la transmission du génome de la cellule mère à la cellule fille devant être intacte. Pour que les différentes parties d'une plante ou d'un animal croissent, se développent et se régénèrent normalement, la division cellulaire doit absolument se dérouler

^{*} L'actine est une abondante protéine du cytosquelette qui se polymérise en faisceau d'actine, gros câbles de filaments d'actine, serrés, et pontés les uns aux autres qui forment alors le réseau tridimensionnel d'actine.

au moment opportun et au rythme approprié, selon un rythme de régulation lié aux cellules elles-mêmes et à leur environnement extérieur. Des modifications des propriétés mécaniques de la cellule peuvent être le témoin d'un cycle cellulaire perturbé.

Ainsi, pour les cellules adhérentes, s'il y a inhibition de contact sur un substrat, un récipient de culture ou la matrice extracellulaire d'un tissu, les cellules cessent de se diviser car elles perdent leur point d'ancrage, signe que la densité cellulaire n'est pas optimale par rapport à la surface de substrat proposée. Les cellules entrent alors en phase d'apoptose. Durant cette phase, la cellule se détache et se contracte, modifiant ainsi ses propriétés mécaniques. [44]

Lorsque le cycle cellulaire est perturbé, la cellule est dite cancéreuse, et là encore ses propriétés mécaniques sont modifiées. La palpation, qui est un des premiers gestes médicaux pour diagnostiquer un cancer, consiste à rechercher une zone dure au touché et n'est rien d'autre qu'une évaluation manuelle de la rigidité d'un amas cellulaire. Cependant, certaines cellules cancéreuses peuvent *a contrario* manifester une perte de rigidité. [45] Ainsi, la mesure des propriétés mécaniques d'une cellule peut être un indicateur de son état pathogène, ou peut permettre de différencier une maladie d'une autre. [42]

1.2) Adhésion cellulaire et effet des peptides d'adhésion

1.2.1) Les contacts focaux et les forces mises en jeu

L'adhésion cellulaire sur une matrice extracellulaire est réalisée grâce aux contacts focaux, points d'adhérence entre le substrat et la cellule. En ces points d'adhésion, les intégrines, une famille de protéines transmembranaires, forment un lien stable entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. La forme des cellules adhérentes sur un substrat est fortement influencée par l'élasticité de leur cytosquelette. De même, la dimension, la forme des points focaux et la force d'attache qu'ils développent est fonction de la tension du cytosquelette. [46] Ainsi, l'adhésion cellulaire est intimement liée aux propriétés mécaniques de la cellule.

La forme du point d'adhésion focale est fonction des forces appliquées par le cytosquelette en ce point notamment parce qu'une cellule adhérente exerce sur le substrat des forces d'adhésion normales et tangentielles. Les contraintes d'adhésion normales au substrat proviennent des molécules d'adhésion spécifiques ou d'interaction non spécifiques, par exemple les forces de Van der Waals. Les contraintes tangentielles sont liées aux forces exercées par le cytosquelette de la cellule. La quantité de points d'adhésion focaux pour une

cellule donnée est une somme discrète, la dimension de ces points d'adhésion focale est relativement large, de l'ordre du μm^2 . [46]

1.2.2) Mesures d'adhésion

Une mesure quantitative d'adhésion cellulaire implique généralement un décollement de la cellule pour effectuer la mesure, que cette mesure soit faite sur une population cellulaire, on parle alors de méthode globale, ou sur une cellule unique, on parle de méthode de micromanipulation. Cependant il existe aussi des méthodes pour mesurer, au moins qualitativement, l'adhésion cellulaire de manière non invasive.

La microscopie optique de réflexion à contraste de phase permet de transformer des différences de phase en différences d'intensité, elle est particulièrement bien adaptée pour l'étude d'échantillons transparents et fins. Aussi, la première analyse pour comprendre et visualiser l'adhésion cellulaire a été obtenue en adaptant cette technique. Les contacts focaux ont pu être observés et l'espace entre la cellule et son substrat a été mesuré. [47] Par la suite, la méthode a été améliorée pour mesurer quantitativement l'adhésion cellulaire, [48] avec ou sans l'aide de la fluorescence.

Parmi les méthodes globales classiques pour quantifier l'adhésion cellulaire les techniques dites hydrodynamiques, telles que la chambre à flux laminaire, à flux radial ou le disque tournant, sont très utilisées. Le principe consiste à estimer une population cellulaire avant d'enclencher le dispositif d'étude expérimentale puis, que ce soit pendant ou en fin de cycle, à effectuer un bilan des cellules décollées ou restant sur le substrat étudié. Des techniques ultrasonores permettent ce principe d'étude : [49] les cellules sont initialement adhérentes sur un substrat collé à un matériau piézoélectrique qui permet de générer une onde ultrasonore. Il suffit alors de quantifier le nombre de cellules détachées par rapport à l'amplitude de l'onde générée pour obtenir une information globale sur l'adhésion cellulaire. La perturbation acoustique peut aussi bien être une onde longitudinale venant de la profondeur du substrat et se déplaçant vers sa surface qu'une onde de surface se propageant à l'interface entre le substrat et la cellule. [50] En parallèle de cette variation d'amplitude de l'onde ultrasonore générée, la variation de la fréquence ultrasonore peut aussi être utilisée : pour une amplitude donnée de l'onde ultrasonore générée, les cellules semblent moins sensibles aux ondes hautes fréquences. [51]

Concernant les méthodes de micromanipulation, les techniques principales sont l'AFM, la méthode de micropipette ou les pinces optiques. En AFM, le principe consiste à perturber la cellule à l'aide d'une micropointe montée sur levier. Si le déplacement ou la

contrainte exercé par le levier est étalonné, on peut alors remonter à la force nécessaire pour déplacer ou détacher la cellule de son substrat. Le principe est le même pour ce qui concerne le micropipetage. L'idée consiste à « aspirer » la cellule à l'aide d'une micropipette et, connaissant la force de succion appliquée à l'instant où la cellule s'est décollée, on accède à une mesure de son adhésion. Une autre alternative existe avec les microplaques : on laisse adhérer une cellule sur un substrat, puis on en amène un second au contact de la face supérieure de la cellule. La cellule va alors aussi adhérer à ce second substrat. Il suffit ensuite de quantifier la force ou le déplacement nécessaire pour écarter les deux substrats jusqu'à rupture d'adhésion cellulaire pour remonter à l'adhésion globale de la cellule. Les pinces optiques utilisent un faisceau laser fortement focalisé qui piège une particule diélectrique et permet de la déplacer. En faisant le bilan énergétique de la puissance de laser requise pour un déplacement quantifié de la microbille, on peut remonter à certaines propriétés mécaniques de la cellule. Les mesures faites par pinces optiques peuvent être à l'échelle d'un contact focal ou d'une cellule entière. Le même principe peut être utilisé avec des billes magnétiques, où cette fois le déplacement de la bille est imposé par une force magnétique. [39]

Enfin, une autre méthode, non invasive pour la cellule, existe depuis peu. [52] Elle consiste à placer les cellules sur un substrat de micro-pilier, un « tapis de fakir », et à mesurer la déflexion des micro-piliers induite par les forces tangentielles exercées par les cellules sur chaque micro-pilier.

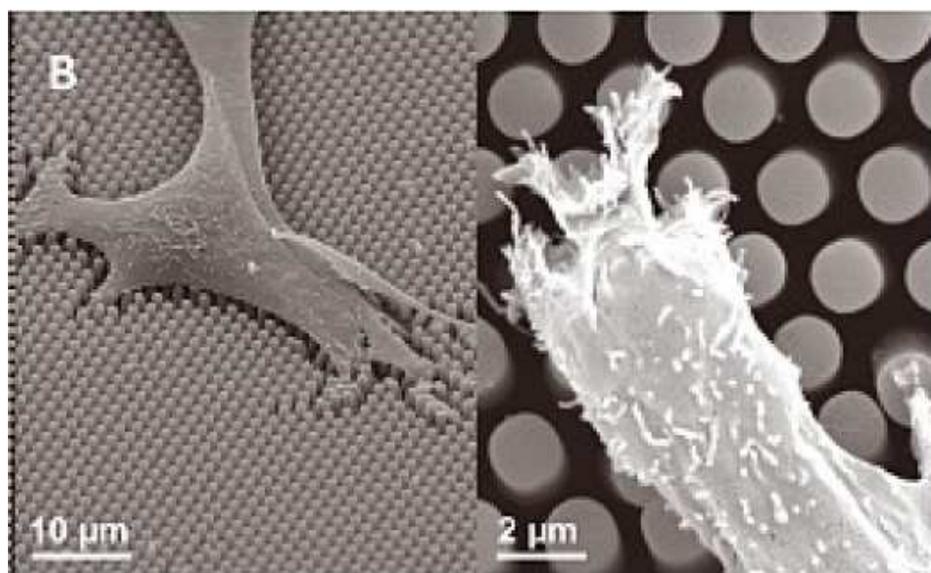


Figure 1-2 : Clichés de microscopie électronique à balayage de cellule cultivées sur les réseaux de micro-piliers déformables. Les cellules reposent sur le haut des piliers sans pénétrer entre les plots et exercent des forces détectées par la déflexion des plots. Image et légende tirées de [53].

Cette méthode permet de quantifier localement la force dynamique exercée par la cellule lorsqu'elle se déplace sur le substrat. La figure 1-2 présente des images de microscopie électronique à balayage illustrant la technique du « tapis de Fakir ». Grâce à cette expérience il a été possible de montrer que les forces centripètes d'adhésions tangentielles sont nettement plus élevées en périphérie de la cellule qu'au centre. [52]

1.2.3) Adhésion cellulaire et substrat

L'intensité de la force d'adhésion sur un substrat est liée au type de substrat ; la cellule sonde son environnement extérieur et s'adapte en fonction de celui-ci. Ainsi, il a été montré que sur une surface rigide la cellule aura tendance à former des points d'adhésion larges et permanents alors que posée sur un substrat mou ses points d'adhésion seront petits et temporaires. [46] Il a même été démontré, par la méthode du tapis de fakir, que non seulement les forces développées par la cellule sont plus importantes sur substrat rigide, mais qu'elles sont même proportionnelles à la raideur du substrat. Une conclusion importante en a été tirée, ce n'est pas la force d'attache exercée sur le substrat qui est importante dans l'adhésion cellulaire, mais la déformation du substrat qu'elle entraîne, [54] cette déformation étant fortement corrélée à la formation des contacts focaux de la cellule. De plus, sur substrat lisse, les points d'adhésion focale sont distribués uniformément sur toute la membrane en contact avec le substrat, alors que sur surfaces rugueuses ces points d'adhésion sont uniquement visibles aux extrémités des extensions cellulaires où la membrane est en contact avec le substrat. [55]

1.2.4) Adhésion cellulaire et peptides

Dans le cadre de l'adhésion cellulaire sur alliage biocompatible de titane, une voie visant à favoriser l'intégration du biomatériau par le système biologique consiste à ajouter des peptides en surface du matériau, donc à l'interface entre la cellule et le titane. Ce processus est connu sous le terme de fonctionnalisation de matériau, le but étant d'obtenir, par modification chimique de la surface du biomatériau, des interactions spécifiques et contrôlées entre la cellule et le matériau. Les peptides agissent tous différemment sur la cellule. Ainsi, le peptide RGD* greffé en surface du biomatériau interagit avec les intégrines de la cellule et favorise l'adhésion cellulaire. Depuis sa découverte en 1984, [56] cette séquence est de loin la séquence la plus employée et la plus efficace pour favoriser l'adhésion cellulaire sur un

* RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique

biomatériau. [57], [58] Elle agit sur l'adhésion cellulaire essentiellement en améliorant la qualité de la jonction entre la cellule et le substrat, c'est-à-dire la qualité de la liaison au niveau du point d'adhésion focale. La présence de RGD densifie le nombre de contacts focaux que forme la cellule, cette densification étant fonction de la concentration surfacique sur le biomatériau de la séquence RGD. [59] Une autre manière de stimuler l'adhésion cellulaire peut se faire en contrôlant la différenciation cellulaire. Par exemple, la protéine de BMP-2* influe dans la différenciation cellulaire, ce qui modifie l'organisation et la composition du cytosquelette cellulaire. [60] Les protéines de BMP sont actuellement testées cliniquement en tant que protéines d'adhésion. [61] Par ailleurs, la BMP-2 peut aussi conduire une lignée cellulaire à se différencier en une autre, les cellules ostéoblastes peuvent ainsi être amenées à se changer en cellule ostéoclastes. [62]

1.2.5) Adhésion cellulaire et apoptose

Au cours de leur développement, les cellules ont tendance à former et à renouveler de nombreux points d'adhésion focale afin de se lier à un substrat. Cette tendance s'inverse en fin de cycle cellulaire ou bien lorsque la densité de cellule devient trop élevée en surface du substrat : dans ces conditions, les cellules enclenchent un cycle d'apoptose, ou suicide cellulaire (cf. section 1.1.3). L'apoptose cellulaire se caractérise notamment par une relaxation de l'adhésion, [44] la cellule adhérente sur un substrat se désolidarise de celui-ci. Il en résulte un changement de sa morphologie, d'un état étalé et laxé sur le biomatériau, la cellule se contracte et rompt les points d'ancrage entre sa membrane et son environnement. En fin d'apoptose, la cellule est totalement détachée de son substrat, elle se fragmente [63] et est phagocytée par les cellules environnantes.

1.3) Techniques de microscopie pour l'imagerie subcellulaire

1.3.1) La microscopie optique

Du fait des dimensions micrométriques de la grande majorité des cellules, l'instrument de base permettant d'examiner une cellule est le microscope. Les cellules ont d'ailleurs été découvertes 75 ans après le premier microscope, créé par les Jansen en 1590. De nombreuses variantes de microscopie optique ont depuis été inventées. En microscopie en lumière directe, les différentes parties de l'échantillon absorbent ou réfléchissent différemment toutes les

* BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein-2

longueurs d'onde du spectre de la lumière, l'image obtenue comporte alors la signature optique des constituants de l'échantillon. La microscopie en contraste de phase est possible sur les échantillons transparents. Les différentes structures de l'échantillon ayant un indice optique différent créent un déphasage entre les rayons. On image alors ces différences de phase avec des niveaux de gris différents, témoins des hétérogénéités à l'intérieur de l'objet observé. La microscopie de fluorescence utilise les propriétés de la fluorescence pour sélectionner en visualisation certaines couleurs définies au préalable. La fluorescence, découverte en 1852 par G. Stokes, [64] est l'émission lumineuse par une substance d'une couleur spécifique après qu'elle ait absorbé un rayonnement électromagnétique. Si l'échantillon ne possède pas de propriétés intrinsèques de fluorescence, des fluorochromes peuvent alors lui être ajoutés. L'ajout de fluorochromes peut être ciblé sur un élément subcellulaire spécifique et plusieurs fluorochromes différents peuvent être ajoutés simultanément sur différents éléments subcellulaires ciblés spécifiquement. La microscopie de fluorescence constitue une des avancées majeures de l'imagerie cellulaire, elle est appliquée à la biologie depuis les années 1930. Les applications essentielles sont le marquage de structures subcellulaires, la mesure de modifications métaboliques ou physiologiques rapides dans les cellules vivantes, le suivi d'objet individuel ou les études dynamiques sur cellules vivantes par exemple. Une avancée particulièrement innovante dans la microscopie de fluorescence a été le développement de la microscopie confocale, qui permet de faire de la tomographie, c'est-à-dire de faire des images dans des plans de coupes de l'échantillon étudié et ainsi de créer une image tridimensionnelle de l'échantillon. Si cette tomographie est obtenue avec l'aide d'un laser, on parlera de tomographie optique cohérente. Outre la localisation optique de la structure, l'utilisation de la dynamique de fluorescence permet de pouvoir remonter à certaines informations quantitatives sur des paramètres physiques locaux de la cellule, tels que son indice optique [65], la mesure du pH ou des mesures de viscosité. [66] Enfin, la microscopie à deux photons est une technique non-invasive, innovante et puissante pour l'imagerie d'échantillons épais ou de tissus vivants. Son principe consiste à associer deux photons de faible énergie, qui équivalent dans le plan focal de l'objectif de microscope à un seul photon d'énergie deux fois plus grande, et qui permettent d'obtenir une image en fluorescence. Cette technique permet une faible irradiation en dehors du plan focal de l'objectif et une augmentation de la profondeur de pénétration. Elle utilise généralement des lasers pulsés et focalisés pour obtenir une densité photonique suffisante pour générer un signal de fluorescence détectable. [39] Toutes ces techniques de microscopie optique ont un pouvoir de résolution limité par la diffraction de la lumière, autour de 200 nm.

1.3.2) La microscopie électronique

Le microscope électronique utilise un faisceau de particules et d'électrons pour l'observation des échantillons. Comme pour le microscope optique, la limite de résolution est imposée par la longueur d'onde du rayonnement utilisé. Cependant, la longueur d'onde d'un électron, déterminée par L. de Broglie en 1924 durant son travail de thèse, [67] ce qui lui vaudra de recevoir le prix Nobel en 1929, est beaucoup plus petite que celle de la lumière. La résolution de la microscopie électronique est alors suffisante pour visualiser les atomes. Les premiers microscopes électroniques ont été réalisés par Ruska dans les années 1930. Les résolutions atteintes par les microscopes électroniques actuels permettent une détection en dessous de l'échelle du nanomètre. [68] Longtemps, une des limitations de la microscopie électronique est qu'elle n'a pu être utilisée que sous vide d'air et donc seuls les éléments non volatils pouvaient être imagés. Les cellules devaient donc classiquement être fixées* afin de consolider leur structure avant visualisation par microscopie électronique. Cette limitation est maintenant résolue par l'utilisation de la microscopie électronique environnementale, qui n'impose plus de vide d'air dans son protocole expérimental. [69] De plus, la pénétration des électrons dans les échantillons, biologiques notamment, dépasse difficilement la centaine de nanomètres, aussi seuls les objets biologiques très fins peuvent être étudiés, surtout pour un mode d'observation en transmission. [70] Le MEB, ou microscope électronique à balayage, forme une image par microscopie électronique en balayant et collectant, point par point sur un échantillon, une information électronique de l'échantillon. Ce type de microscope permet alors d'étudier l'anatomie des cellules et de leurs constituants.

1.3.3) La microscopie acoustique

La microscopie acoustique est née dans les années 1970 sous l'impulsion de C. Quate. [4] Le principe de la méthode consiste à étudier la propagation des ondes acoustiques dans l'échantillon pour en former une image. La microscopie acoustique permet alors de recueillir des images des propriétés mécaniques d'un matériau sans être destructive. [71] Les applications de la microscopie acoustique sont l'imagerie de matériaux microcomposites, de matériaux de la microélectronique ou de la biologie ; dans les domaines civils, militaires ou hospitaliers. La microscopie acoustique permet de déterminer des vitesses acoustiques,

* La fixation cellulaire consiste à figer la cellule dans le temps par procédé chimique (solution formaldéhyde ou paraformaldéhyde) ou en utilisant de l'azote liquide. Cette technique permet de pouvoir étudier la cellule *ex vivo*, tout en conservant sa structure morphologique.

densités, épaisseurs ou même atténuation acoustique à l'intérieur du matériau. [72] Son utilisation est relativement simple et rapide. Les ultrasons sont générés par un élément piézoélectrique, focalisés à l'aide d'une lentille acoustique et se propagent jusqu'à l'échantillon *via* un liquide de couplage. La résolution dans le plan *xy* de l'échantillon est alors déterminée par la longueur d'onde des ultrasons dans ce liquide de couplage, conformément à la limite de résolution des rayonnements ondulatoires. Le liquide de couplage classiquement utilisé est l'eau, celle-ci permet une résolution latérale de 400 nm pour une fréquence ultrasonore de 4 GHz. [73] Cette résolution peut être améliorée en augmentant la fréquence ultrasonore, mais l'eau a le désavantage d'être très atténuante pour les ultrasons. La limitation causée par l'absorption acoustique peut être particulièrement critique si les coefficients d'impédance acoustique à l'interface entre le liquide de couplage et l'échantillon ne permettent pas une bonne transmission de l'énergie acoustique dans celui-ci. Pour s'affranchir des problèmes d'atténuation ultrasonore et augmenter la résolution latérale atteignable, la microscopie acoustique est utilisée avec des méthodes de cryogénie. Une résolution latérale de 15 nm a été atteinte en opérant à plus de 15 GHz et moins de 1° K dans de l'hélium superfluide pressurisé à plus de 20 bar. [74] La détection du faisceau ultrasonore est réalisée à l'aide d'une lentille acoustique puis sa signature électrique est mesurée à l'aide d'un élément piézoélectrique. La microscopie acoustique peut être utilisée en mode de réflexion ou de transmission, dans tous les cas l'image est obtenue en balayant la surface de l'échantillon avec le faisceau ultrasonore et en mesurant la signature acoustique de chaque point du balayage. L'information acoustique peut être détectée dans les domaines temporels ou fréquentiels. Pour chaque point de l'acquisition, on peut faire varier la hauteur du point focal par rapport à l'échantillon ou la fréquence d'excitation ultrasonore. Le potentiel de cette technique d'imagerie pour la caractérisation des propriétés mécaniques en biologie sera le sujet de la dernière section de ce chapitre.

1.3.4) La microscopie à champ proche

Le microscope à champ proche est une autre famille de microscope que les microscopes optiques, dont le principe consiste, comme pour la microscopie acoustique, à balayer la surface d'un échantillon avec une sonde et à déterminer, point par point, une grandeur physique. Ce principe de microscopie est encore très récent, les premières applications ayant été faites par G. Binning en 1982, [75], [76] ce qui lui vaudra le prix Nobel en 1986. La mesure de la grandeur physique détectée est possible en approchant une pointe métallique fine près d'une surface et en mesurant une différence de potentiel. La famille des

microscopes à champ proche comprend le microscope à effet tunnel (STM), à force atomique (AFM), à champ proche optique, à force magnétique et à flux d'ions. Le STM permet d'imager à l'échelle atomique, étudier une structure électronique et même de manipuler des objets individuels ou une chimie locale. [77]

L'AFM est un microscope à champs de force, dont la résolution peut être atomique s'il est utilisé dans le vide sur des échantillons cristallins. Mais un de ses intérêts majeurs est qu'il peut aussi être utilisé en milieu liquide, sur cellules vivantes, avec une résolution subnanométrique. Ceci en fait le microscope à sonde locale le plus utilisé dans les laboratoires d'étude cellulaire. Comme tout microscope à sonde locale, un capteur miniaturisé est déplacé au voisinage de la surface de l'échantillon pour effectuer la mesure de la grandeur physique désirée. Il peut être utilisé en mode de contact, de frottement, résonant ou contact intermittent. Ce dernier mode est plus lent mais moins traumatisant pour les surfaces fragiles puisqu'il supprime les forces de friction créées lorsque la pointe reste au contact. L'AFM permet l'imagerie, mais aussi la dissection et la manipulation à l'échelle moléculaire. Utilisé en imagerie, une quantification des propriétés mécaniques locales telles que l'élasticité, la topographie ou l'adhérence, des propriétés magnétiques ou électriques peut être obtenue. Appliqué sur cellules, ses propriétés mécaniques locales peuvent être évaluées, [78] ainsi que la forme de la surface, [79] ou les forces d'adhésion entre cellules ou entre la cellule et son substrat. [80] La limite de l'AFM réside essentiellement dans la force de contact appliquée par la sonde sur la structure cellulaire qui doit être suffisante pour faire une mesure sans pour autant endommager la cellule si ce n'est pas voulu.

Le microscope à champ proche optique permet de dépasser les limites classiques de résolution dues à la diffraction optique en utilisant comme sonde locale une fibre monomode taillée en pointe. Les résolutions obtenues peuvent être de la dizaine de nanomètres en laboratoire, cette technique d'imagerie commence à être utilisée en biologie cellulaire pour obtenir des images de protéines uniques en fluorescence. [81] Les microscopies à force magnétique et à flux d'ions sont quant à elles adaptées à l'étude des solutions.

1.3.5) Comparatif des différentes techniques d'imagerie subcellulaire

Une revue de différentes méthodes d'analyse du vivant est proposée en figure 1-3, cette revue ayant été réalisée par R. Tsien. [35] Les échelles de cette figure sont logarithmiques, l'axe des abscisses définit la résolution dans le plan xy de l'échantillon et celle des ordonnées la résolution en profondeur. Les limites de résolutions des différentes

techniques d'imagerie identifiées sur cette figure sont des estimations. Cependant, cette représentation met en évidence le faible nombre de techniques expérimentales d'observation cellulaire en dessous de l'échelle micrométrique. Ainsi, seules la microscopie électromagnétique et la microscopie à force atomique permettent de descendre amplement sous cette résolution pour ce qui est de la dimension latérale et seules la microscopie à force atomique, la microscopie électromagnétique et quelques techniques particulières de tomographie par fluorescence peuvent descendre sous cette échelle pour ce qui est de la tomographie cellulaire. Parmi toutes les techniques d'imagerie à l'échelle submicrométrique, la technique opérationnelle non invasive et sans contact en biologie est donc la tomographie optique de fluorescence.

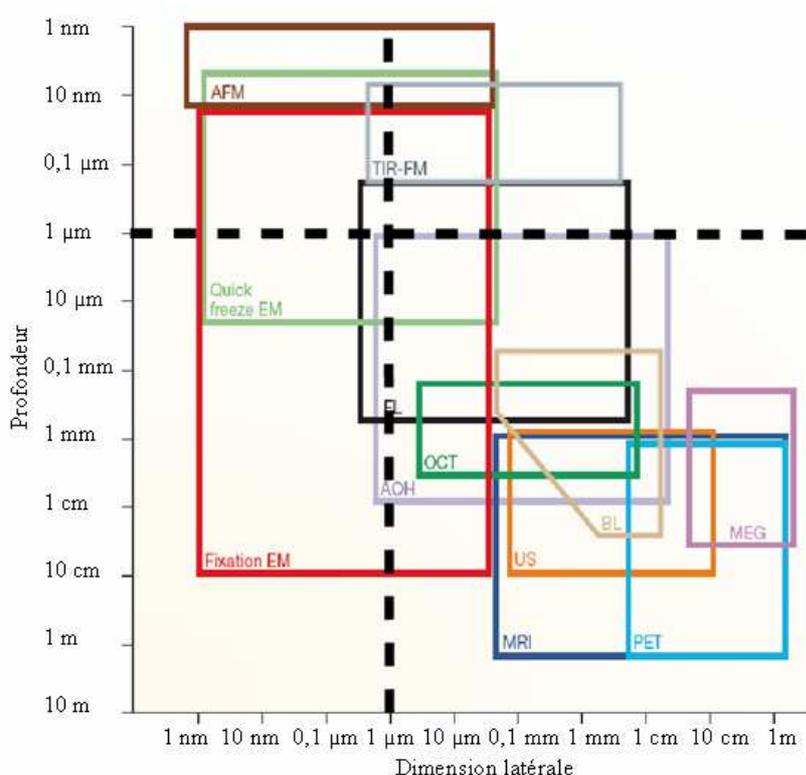


Figure 1-3 : Différentes méthodes d'analyses du vivant, présentation proposée par Tsien. [35] Lexique : FL : Microscopie de fluorescence, EM : Microscopie électronique, AFM : Microscopie à force atomique, PET : Tomographie par émission de positrons, OCT : Tomographie en optique cohérente, BL : Bioluminescence, MRI : Imagerie par résonance magnétique, AOH : Histologie tout optique, TIR-FM : Microscopie de fluorescence par réflexion interne totale, MEG : Magnétoencéphalographie, US : Ultrasons. Les carrés présentés sont donnés à titre indicatif et les échelles sont logarithmiques.

D'autres techniques d'imagerie sont actuellement le sujet de recherche intense dans le concours de l'imagerie haute résolution et prometteuses de nouvelles images pour la biologie,

certaines commençant déjà à être utilisées. [82] [83] Le but à atteindre est une résolution nanométrique sur des cellules en conditions *in vitro*. Cependant ces méthodes sont encore des sujets d'étude et n'ont pas encore été transportées dans les laboratoires de biologie.

1.4) Microscopie acoustique en biologie et potentialités de l'acoustique picoseconde

1.4.1) Viabilité cellulaire et techniques de mesures

Avant de pouvoir être utilisé comme outil médical, le caractère non invasif de la microscopie acoustique en biologie doit être vérifié. Les effets nuisibles que peuvent produire son utilisation sur le vivant peuvent résulter de l'élévation de température créée par l'absorption dans l'échantillon de l'énergie ultrasonore utilisée pour faire la mesure. Cette élévation de température peut, si une forte puissance acoustique et une forte focalisation sont utilisées, être supérieure à la dizaine de degrés Celcius, ce qui implique alors que la technique devient invasive pour la cellule. En revanche, il n'est pas forcément nécessaire d'utiliser de fortes puissances moyennes si l'acquisition est obtenue en mode impulsif et l'élévation de température devient négligeable pour l'échantillon. [84] De plus, la génération d'ondes ultrasonores hautes fréquences, typiquement dans le domaine du gigahertz, permet d'un point de vue acoustique d'être non-invasive car cette onde n'a pas d'influence sur le matériau biologique. [85] La microscopie acoustique peut être particulièrement bien adaptée comme outil de diagnostic médical non invasif. Son champ d'utilisation s'étend de l'échantillon cellulaire à l'organe entier, y compris *in situ* pour ce dernier.

Le signal généré en microscopie acoustique peut être analysé soit dans le domaine fréquentiel, soit dans le domaine temporel. Dans tous les cas, le principe consiste à balayer un échantillon dans son plan avec le faisceau d'onde ultrasonore et, point par point, à faire une acquisition. L'ensemble des acquisitions est ensuite collecté dans un fichier de données, puis traité afin de construire une image des propriétés mécaniques de l'échantillon. Les mesures peuvent être réalisées en changeant la position du point focal du faisceau ultrasonore par rapport à l'échantillon, on obtient alors une signature acoustique de mesure $V(z)$, ou en changeant la fréquence ultrasonore de l'élément piézoélectrique générateur de l'excitation acoustique, la signature acoustique est alors $V(f)$. Le signal ultrasonore peut être généré soit avec un élément piézoélectrique soit avec un laser impulsif. [86] Les paramètres mécaniques de l'échantillon influençant le signal sont l'épaisseur, la densité, la célérité et l'atténuation acoustique dans l'échantillon. Les mesures en $V(z)$ et $V(f)$, les mesures résolues en

temps et les mesures quantitatives de phase et d'amplitude du signal acoustique permettent théoriquement la détermination de l'ensemble de ces paramètres. En revanche les temps d'acquisition peuvent être longs, et, à température ambiante, les résolutions en profondeur de chaque point d'acquisition descendent difficilement en dessous du micromètre pour les techniques les plus performantes.

1.4.2) Microscopie acoustique sur cellule unique

Dès les premières applications de la microscopie acoustique, les mesures réalisées ont montré le potentiel non invasif d'évaluation des propriétés mécaniques à une échelle locale dans la cellule ainsi que des applications à l'imagerie cellulaire. [4], [87] De nombreuses études sur les cellules épithéliales et épidermiques ont été menées par T. Kundu dès les années 1990. [88], [89] Les techniques proposées sont des mesures quantitatives du signal recueilli sur l'élément piézoélectrique détecteur. La résolution complète du problème inverse est systématiquement proposée, le raffinement de la procédure de résolution ayant évolué simultanément avec la compréhension des signaux et les performances de calculs offertes par les ordinateurs. Les valeurs numériques des mesures obtenues sont données en annexe A.4, avec les propriétés mécaniques de la cellule issues de la bibliographie. Les études sur cellules endothéliales HeLa (voir annexe A.4) ont aussi été proposées par E. Weiss. [90] Les ordres de grandeurs des mesures faites par E. Weiss sont les mêmes que ceux obtenus par T. Kundu. Dans tous les cas, les mesures sont proposées sur cellules de plusieurs microns d'épaisseur.

Le potentiel de la microscopie acoustique pour l'étude de l'adhésion cellulaire a été très vite remarqué, même si la compréhension de l'image des contacts focaux était délicate. [71] B. Tittmann a proposé des mesures d'adhésion de cellules MC3T3-E1 pré-ostéoblastes en fonction de la présence de cellules cancéreuse MDA-MB-231 dans leur voisinage. Les mesures proposées ne sont pas quantitatives mais permettent de dire si les cellules adhèrent ou non, et de donner une idée qualitative de cette adhésion : la présence de cellules cancéreuses avec les cellules ostéoblastes dégrade l'adhésion de ces dernières. Cette dégradation de l'adhésion semble liée à une perte de surface de contact de la cellule sur le substrat. [91] L'adhésion cellulaire a aussi été étudiée en fonction de la contraction cellulaire par J. Bereither-Hahn en microscopie acoustique, [92] sur cellules épithéliales fixées. Les conclusions montrent que la perturbation des microtubules entraîne une rigidification de la cellule accompagnée d'une modification de sa morphologie. La rigidité maximale ne pouvant pas être dépassé lors de cette perturbation cellulaire semble être liée à une force maximale de

contraction que peut développer la cellule et à une force d'adhésion de la cellule sur le substrat.

Cependant l'application de la microscopie acoustique sur cellules uniques est encore délicate car les limites de résolution à température ambiante de cette technique sont de la dimension des cellules, voire en dessous. L'acoustique picoseconde, permettant d'obtenir des images très haute résolution dans la profondeur de l'échantillon, semble alors être une alternative à l'étude acoustique des cellules.

1.4.3) Acoustique picoseconde dans l'eau et les milieux mous

L'acoustique picoseconde permet de générer des ondes acoustiques dont le contenu fréquentiel peut facilement s'étendre jusqu'à plusieurs dizaines de GHz. [93] Son application est essentiellement en physique du solide ou en contrôle non destructif à l'échelle nanométrique. [23] La technique, exposée en détail dans la suite de ce travail, est à présent sortie des laboratoires de recherche pour être utilisée dans l'industrie*, dans la caractérisation mécanique de couches ultra-minces par exemple. En revanche, en dépit de son potentiel unique d'étude mécanique aux très petites échelles, peu d'études ont été réalisées sur l'eau ou sur matériaux viscoélastiques. En 1997, H.J. Maris a proposé une première étude de la réflexion de phonons acoustiques, de fréquences variant entre 100 et 300 gigahertz, aux interfaces solide/liquide, [12] les liquides utilisés étant des composés de la famille des glycols. En 2005, la première, et unique, étude de la propagation et détection d'acoustique picoseconde dans le volume d'un échantillon d'eau a été réalisée, toujours par l'équipe de H.J. Maris. [18] L'étude proposée a consisté en une mesure de célérité et atténuation acoustique dans de l'eau pure en fonction de sa température. Le contenu fréquentiel de la propagation acoustique était alors de quelques dizaines de gigahertz, permettant une mesure précise des propriétés mécaniques de l'eau dans un échantillon d'épaisseur inférieure à 5 micromètres. En 2007, H.J. Maris a de nouveau proposé une étude de la réflexion acoustique à une interface solide/liquide où cette fois le liquide était de l'eau pure. [20]. En 2008, O.B. Wright a appliqué l'acoustique picoseconde à la propagation et à la détection de phonons acoustiques très haute fréquence (supérieurs à 10 GHz) dans le mercure liquide. [28]

En parallèle de ces études sur les liquides, la propagation acoustique dans les milieux viscoélastique en acoustique picoseconde a été un peu plus étudiée. C'est à nouveau H.J. Maris qui a ouvert la voie en étudiant l'atténuation acoustique à très haute fréquence dans

* Sociétés Rudolph Technologies Inc. (www.rudolphtech.com) et MENAPIC (www.menapic.com)

différents polymères amorphes. [94] B. Bonello s'est intéressé à déterminer l'élasticité des films de Langmuir-Blodgett. [22] [95] T. Pezeril a récemment mesuré l'atténuation acoustique dans un milieu fortement atténuant, le glycerol. [96]

H.J. Maris travaille actuellement sur une combinaison de la microscopie acoustique et de l'acoustique picoseconde. Ce dispositif aurait alors des résolutions latérales et en profondeur dans l'échantillon sans concurrence en évaluation acoustique. Quelques applications commencent à émerger. [21]

1.5) Conclusion

La cellule est un élément biologique vivant, de dimensions micrométriques, composé de nombreux éléments subcellulaires fortement dynamiques qui participent et interviennent tous dans son cycle de vie. La mécanique et l'adhésion de la cellule sont aujourd'hui un sujet prometteur en recherche cellulaire car la mécanique de la cellule peut être le témoin de sa vitalité et de son état de santé et l'adhésion cellulaire est au coeur de beaucoup des processus et des cycles qui règlent sa vie.

Cependant l'étude cellulaire est fortement dépendante des avancées techniques permettant l'observation et la mesure des nanostructures. L'essentiel des méthodes permettant l'observation et la mesure à des échelles nanométriques font appel à des techniques optiques ou électroniques et de ce fait l'exploration de la mécanique cellulaire à ces échelles est particulièrement délicate. Dans ce contexte, la microscopie à force atomique a permis une révolution de la mécanique cellulaire aux échelles nanométriques mais cette compréhension est corrélée à la perturbation imposée à la cellule, comme toute les techniques de micromanipulation cellulaire. Face à cela, les ondes acoustiques fournissent un atout de taille, en ne perturbant pas la matière par leur propagation mais en fournissant tout de même de nombreuses informations sur ses propriétés mécaniques. Ainsi, les techniques acoustiques sont nombreuses pour fournir des informations biologiques, de l'échelle centimétrique, avec l'échographie par exemple, à l'échelle micrométrique, avec la microscopie acoustique. Cependant, aujourd'hui, les limites techniques de cette dernière semblent atteintes, et en conditions d'études *in vitro* pour une cellule humaine, elle ne semble pas la mieux adaptée à la mécanique cellulaire.

En parallèle, l'acoustique picoseconde, même si elle n'a aujourd'hui que 25 ans, a permis une révolution dans l'étude mécanique des matériaux aux échelles submicrométriques. D'un point de vue mécanique, ses applications s'étendent de la mesure d'épaisseur à la mesure de rigidité, en passant par la mesure d'adhésion ou de viscosité. Dans les matériaux

solides, le savoir faire acquis a atteint suffisamment de maturité pour qu'elle commence à être appliquée industriellement. Dans les matériaux liquides ou viscoélastiques, son application semble prometteuse, notamment dans les études de l'interface solide/liquide, même si peu d'études ont été réalisées sur ce sujet.

Il semble donc que l'acoustique picoseconde puisse présenter de nombreux atouts pour l'étude de la mécanique cellulaire. C'est en effet la seule technique de mesure acoustique qui permette la génération et la détection d'ondes acoustiques de fréquence allant jusqu'au THz, et qui puisse donc permettre d'obtenir des images acoustiques dont la résolution soit nettement inférieure à l'épaisseur des cellules. De plus cette technique commence à présent à être suffisamment bien connue et maîtrisée pour être appliquée aux sciences du vivant. Ainsi, H.J. Maris, père de l'acoustique picoseconde, disait dès 1998 : « Maintenant que l'acoustique picoseconde a fait ses preuves pour l'étude des circuits intégrés, nous cherchons à l'utiliser pour étudier des systèmes plus compliqués. Les médecins utilisent déjà des échographies pour surveiller le bon développement des foetus, *in utero*. A l'aide des ultrasons picosecondes nous espérons sonder l'intérieur d'une cellule vivante. Nous voudrions créer des images acoustiques de cellules et analyser leur fonctionnement. Notamment nous cherchons à réaliser des images fines du cytosquelette (le réseau qui soutien l'ensemble de la cellule), afin de réaliser l'équivalent des radiographies, mais à l'échelle microscopique. » [97]

Ce désir d'application de l'acoustique picoseconde à l'étude et l'imagerie de cellule est d'autant plus fort que l'ensemble de la communauté scientifique des biologistes cellulaires est demandeur d'outils non invasifs pour étudier la mécanique et l'adhésion de la cellule. Le prochain chapitre de ce mémoire sera consacré aux adaptations techniques nécessaires pour cette application de l'acoustique picoseconde à l'étude d'une cellule unique *in vitro*.

Chapitre 2

Adaptation et performances du dispositif expérimental pour l'étude du vivant

Comme cela a été évoqué au cours de l'introduction générale de ce manuscrit, l'acoustique picoseconde est une technique d'étude acoustique historiquement liée à la physique du solide, et qui commence depuis quelques années à être appliquée aux liquides et aux films viscoélastiques. Concernant les études de films de polymères minces, le substrat est couramment posé de telle sorte qu'il protège l'échantillon de la radiation laser de pompe et de sonde du montage optique afin de ne pas dégrader l'échantillon avec l'énergie du laser impulsif. De la même manière, une application expérimentale non invasive de l'acoustique picoseconde en biologie cellulaire nécessite des adaptations et des solutions techniques pour les besoins spécifiques de cette activité. En effet, l'étude cellulaire *in vitro* impose des contraintes drastiques pour respecter l'intégrité de la cellule : le suivi de nombreuses règles d'hygiène élémentaires mais contraignantes est nécessaire pour éviter toute contamination bactériologique ; la nécessité d'une atmosphère contrôlée en température et en pH pour l'échantillon biologique sont nécessaires pour conserver son intégrité biologique. De même, l'étude cellulaire impose aussi des besoins techniques adaptés pour pouvoir observer et étudier la cellule et ses constituants, l'instrument de base étant le microscope optique. L'adaptation du banc expérimental à ces contraintes est le sujet de ce chapitre. L'adaptation d'un microscope d'épi-fluorescence, développé pour permettre son utilisation avec le montage pompe-sonde du dispositif expérimental, sera détaillée. Parallèlement à ce développement nécessaire à la visualisation optique des cellules, une adaptation du système de détection pour l'étude cellulaire en acoustique picoseconde a été faite. La modification consiste à pouvoir faire des acquisitions en utilisant différentes couleurs de sonde laser. Enfin, une enceinte cellulaire étanche et thermostatée, minimum nécessaire pour la survie des cellules animales lors des expériences *in vitro*, a été construite.

Parce que l'ajout de nouveaux composants dans un montage expérimental est une étape délicate, une validation expérimentale ainsi qu'une estimation de leur qualité intrinsèque sera par la suite proposée.

Pour que les enjeux et l'intérêt des développements proposés puissent être entendus par les personnes extérieures à la communauté scientifique de l'acoustique picoseconde, les notions de bases de l'acoustique picoseconde seront évoquées dans un premier temps, de son

principe de génération à celui de sa détection. Cette étape est nécessaire pour la bonne compréhension des développements expérimentaux présentés par la suite.

2.1) Une première approche de l'acoustique picoseconde

2.1.1) Génération optique

L'acoustique picoseconde permet de générer de très hautes fréquences acoustiques dans un échantillon car cette génération se fait par voie optique. En effet, la génération acoustique résulte de l'absorption d'une impulsion laser ultrabrève dans un matériau optiquement absorbant à la longueur d'onde de cette impulsion laser. Cette impulsion est appelée pompe. Le volume de dépôt de l'énergie laser dans l'échantillon est dicté par la tache focale de la pompe en surface du matériau et par le coefficient d'absorption optique du matériau. Suite à l'absorption de cette énergie laser dans le matériau, des perturbations électroniques au sein de son réseau cristallin sont créées. [31] La perturbation de la distribution électronique dans le matériau provoque des collisions électrons-électrons et électrons-phonons, ce qui chauffe le réseau cristallin. Le temps caractéristique de relaxation de cette perturbation cristalline est typiquement celui des premières picosecondes qui suivent l'impulsion pompe. [98] Cette relaxation de la perturbation électronique provoque une contrainte mécanique générant une onde acoustique dont le contenu spectral peut être supérieur à la dizaine de THz. A une échelle plus macroscopique, l'énergie laser déposée dans le volume d'absorption de la pompe est convertie en énergie thermique. Dans les premières picosecondes suivant cette impulsion, une élévation thermique pouvant être de moins de un degré à quelques dizaines de degrés Kelvin résulte du dépôt d'énergie laser dans la matière. Par effet de dilatation thermomécanique, cette énergie thermique est ensuite relaxée en énergie mécanique, avec un temps caractéristique de quelques picosecondes à plusieurs nanosecondes, selon le substrat utilisé. Le contenu spectral de la propagation acoustique résultant de la perturbation thermique est dicté principalement par le produit de l'absorption optique dans le matériau et sa célérité acoustique. En considérant des caractéristiques classiques de matériaux métalliques utilisés en acoustique picoseconde, ce contenu spectral est alors de plusieurs dizaines de GHz. [93] Les longueurs d'ondes acoustiques ainsi générées peuvent aller de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètre. En utilisant un objectif de microscope, la tache focale de la pompe peut théoriquement être réduite en surface de l'échantillon à la limite de résolution optique, la demi-longueur d'onde optique de la pompe. Cependant, expérimentalement, cette tache focale est classiquement de un à quelques

micromètres de diamètres. Ainsi, l'acoustique picoseconde permet de générer des trains d'ondes dont le contenu fréquentiel peut s'étendre au dessus de la centaine de GHz avec une résolution spatiale micrométrique.

Les perturbations électroniques, thermiques et mécaniques créées par la pompe laser, provoquent des modifications de l'indice optique de l'échantillon. La perturbation acoustique se propageant dans l'échantillon peut aussi générer un déplacement mécanique de ses interfaces. La détection optique de ces phénomènes transitoires est rendue possible par la modification de l'indice optique et par le déplacement des interfaces de l'échantillon.

2.1.2) Détection optique

La détection des perturbations transitoires produites par l'impulsion pompe est réalisée en acoustique picoseconde par une multitude d'impulsions sondes, retardées temporellement par rapport à l'impulsion pompe. L'impulsion sonde a usuellement la même durée d'impulsion que la pompe. Elle peut être focalisée en surface du matériau à l'aide du même objectif de microscope que celui qui focalise la pompe. La résolution latérale de détection est alors déterminée par la convolution spatiale des dimensions des taches focales de la pompe et de la sonde. Le montage optique le plus commun en acoustique picoseconde pour réaliser l'échantillonnage temporel de la réponse transitoire à la perturbation créée est le montage pompe-sonde. La paternité du principe de montage pompe-sonde revient à A. Töpler, créant ce type de montage notamment pour visualiser une onde sonore grâce à la lumière d'une étincelle. [99] Afin de retarder les impulsions sondes par rapport à l'impulsion pompe, un montage pompe-sonde est doté d'une ligne à retard mécanique sur laquelle est inséré un rétro réflecteur. Ce montage permet de faire varier la distance optique parcourue par la sonde par rapport à celle parcourue par la pompe créant ainsi l'échantillonnage optique désiré. Si la variation de parcours optique permis par la ligne à retard est supérieure à 4 mètres avec une précision de positionnement de l'ordre du micromètre, ce qui est le cas sur le banc expérimental du laboratoire, l'échantillonnage obtenu a une précision de quelques femtosecondes sur une fenêtre temporelle supérieure à l'écart de temps entre deux impulsions laser, 12,5 ns.

Depuis quelques années, une alternative à cet échantillonnage temporel obtenu mécaniquement est apparue. Il s'agit des montages optiques hétérodynes. Dans un montage hétérodyne, deux lasers distincts sont utilisés, l'un sert de pompe et l'autre de sonde. Ces deux lasers génèrent des impulsions semblables temporellement mais la fréquence de répétition des deux lasers est différente, celle de la sonde étant légèrement inférieure à celle de la pompe.

Cette différence de fréquence de répétition, appelée fréquence de battement, permet le retard temporel entre les impulsions pompes et sonde et donc l'échantillonnage désiré. [100] La ligne à retard mécanique n'est alors plus nécessaire, ce qui permet un gain de temps considérable lors des acquisitions expérimentales. Là où une dizaine de minutes, voire plus, sont nécessaires pour obtenir un signal expérimental en utilisant un montage pompe-sonde, quelques dizaines de secondes sont nécessaires pour obtenir le signal équivalent avec un montage hétérodyne. Le temps d'acquisition d'un point est alors comparable, voire plus rapide, qu'en microscopie acoustique et la microscopie acoustique picoseconde devient réalisable.

2.1.3) Signal obtenu en acoustique picoseconde

Le fait que la détection soit optique est possible car une interaction entre la lumière et la matière se produit. Selon la nature optique du matériau, différents mécanismes sont révélés dans cette interaction lumière matière. De plus c'est la compréhension séparée de différents phénomènes physiques qui permet l'interprétation du signal obtenu.

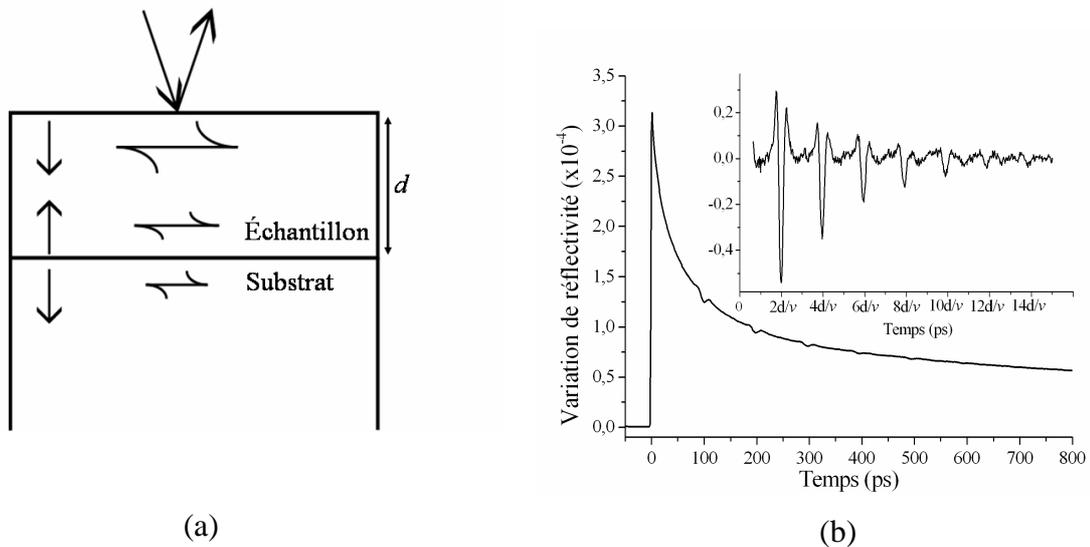


Figure 2-1 : (a) Principe de la détection optique en acoustique picoseconde pour un échantillon opaque : les ondes acoustiques font des aller-retour dans l'échantillon et sont détectées en surface par la sonde (flèches au dessus de l'échantillon). (b) Signal expérimental pour un échantillon opaque. L'encart présente le signal où le fond thermique de la détection a été retranché, les échos correspondent aux déformations acoustiques de l'interface supérieure de l'échantillon.

L'effet thermique d'une impulsion pompe est usuellement mesuré en réflexion, avec les faisceaux lasers pompe et sonde superposés. La variation soudaine de température suite à cette impulsion crée un changement brutal de réflectivité. Ce changement brutal permet de

situer la coïncidence temporelle des impulsions pompe et sonde et donc le temps initial de la perturbation créée par la pompe. Ensuite, une lente décroissance continue est la signature optique de la relaxation thermique dans l'échantillon. Un profil type de cette lente décroissance thermique, est visible sur la figure 2-1(b). Ce signal est obtenu sur un échantillon de 255 nm de tungstène adhérent sur un substrat semi-infini de silicium.

Lorsque l'échantillon est opaque, la sonde optique ne pénètre pas, ou peu, dans le matériau aussi ceux sont les variations de réflectivité de la surface de l'échantillon qui sont mesurées. Le principe de la détection des phénomènes acoustiques se propageant dans un matériau opaque est présenté sur la figure 2-1(a). La sonde optique, représentée par les flèches obliques, est réfléchiée en surface de l'échantillon et permet la mesure des variations de réflectivité de cette interface ainsi que le déphasage optique à la réflexion lorsque celle-ci se déplace. Ainsi, seuls les allers retours acoustiques sont détectés pour les matériaux opaques.

La figure 2-1(b) présente un signal expérimental obtenu sur un échantillon opaque. L'encart correspond au signal expérimental où l'on a retranché la signature optique de la relaxation thermique et donc seule reste la contribution de la détection acoustique. Sur cet encart, l'échelle des temps a été convertie en fonction du temps de vol acoustique dans le matériau sondé, c'est-à-dire en fonction de son épaisseur d et de sa vitesse acoustique v . Connaissant l'un des deux paramètres, une évaluation du second est possible. Par contre si aucun des deux paramètres n'est connu, une infinité de couples de valeurs v et d satisfait le problème. L'atténuation acoustique dans l'échantillon peut aussi être déterminée grâce à l'amplitude des échos si l'on connaît le coefficient de réflexion acoustique à l'interface substrat/échantillon et un des deux paramètres d ou v .

Lorsque l'échantillon est transparent, ou semi-transparent, le faisceau pompe traverse l'échantillon et la focalisation laser est réalisée à l'interface échantillon/substrat. La perturbation acoustique se propage dans l'échantillon depuis l'interface, créant une modification transitoire de ses propriétés optiques et formant ainsi une interface optique qui se déplace dans le cœur du matériau à la vitesse de l'onde acoustique. Une partie de la sonde est réfléchiée sur cette interface. Une cavité de Fabry-Pérot est créée entre l'interface substrat/échantillon et la perturbation acoustique, son épaisseur correspondant à la distance entre la perturbation acoustique et l'interface substrat/échantillon. C'est donc une cavité dynamique qui est créée. Tous les faisceaux réfléchis sur les différentes interfaces interfèrent et ces interférences sont à l'origine des oscillations Brillouin.

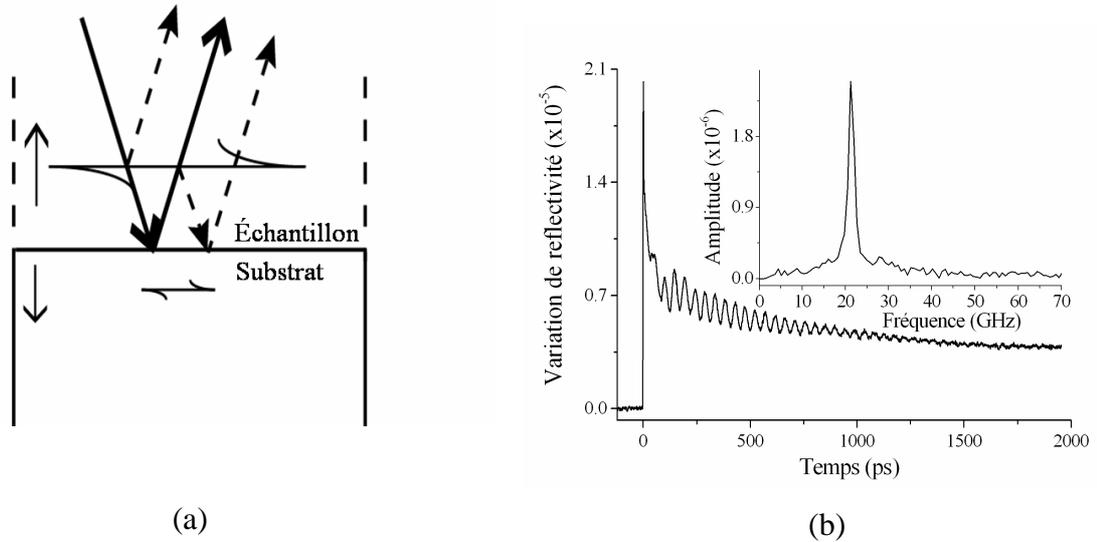


Figure 2-2 : (a) Principe de la détection optique en acoustique picoseconde d'un échantillon transparent. La flèche de gauche est le faisceau laser incident et l'autre flèche en trait plein est le rayon réfléchi sur l'interface échantillon/substrat. Les rayons en pointillés sont les rayons réfléchis sur la perturbation acoustique. (b) Signal expérimental obtenu sur un échantillon transparent : la décroissance continue est dictée par le signal thermique et les oscillations hautes fréquences par le signal acoustique dans l'échantillon transparent. L'encart est le module de la transformation de Fourier du signal Brillouin.

La figure 2-2(a) présente le principe des réflexions optiques à l'origine des interférences donnant naissance aux oscillations Brillouin. La flèche de gauche correspond au faisceau sonde incident. Les flèches en pointillés représentent les faisceaux optiques réfléchis sur la perturbation acoustique et la dernière flèche en traits pleins modélise le faisceau laser réfléchi sur l'interface entre l'échantillon et le substrat. La figure 2-2(b) est une acquisition obtenue dans un alliage de chrome, du CrSiO₂, transparent pour la longueur d'onde de sonde, 800 nm. L'encart est le module de la transformation de Fourier temporelle du signal des oscillations Brillouin. La relation fréquentielle des oscillations Brillouin f_B peut se déduire directement des principes de conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement : [101]

$$f_B = \frac{2nv}{\lambda_0} \cos(\theta), \quad (1.1)$$

avec n , v , λ_0 et θ qui sont respectivement l'indice optique et la célérité acoustique du matériau, la longueur d'onde de la sonde dans le vide et l'angle entre la direction de propagation acoustique et le faisceau sonde optique.

Pour A. Kastler, [102] l'effet Brillouin fournit un des plus beaux exemples pour illustrer la dualité onde-corpuscule. Les photons et les phonons, formes quantifiées de

l'énergie lumineuse et élastique, réagissent entre elles et conduisent à l'annihilation ou la création d'un nouveau quantum d'énergie.

Si l'on connaît l'indice optique de l'échantillon pour la longueur d'onde de la sonde laser, la célérité acoustique dans l'échantillon peut alors être directement mesurée grâce aux oscillations Brillouin. La précision de la mesure de célérité est fonction de la précision de la mesure de la fréquence du signal détecté. Cette précision est fonction du temps de vie du signal Brillouin, lequel est dicté par les atténuations acoustiques et optiques au sein de l'échantillon.

2.1.4) Dispositif expérimental de détection

En complément de la ligne à retard mécanique, un montage pompe-sonde d'acoustique picoseconde nécessite l'emploi d'une modulation et d'une détection synchrone. La modulation sert à créer une fréquence de référence pour la détection synchrone, ainsi cette détection n'est sensible qu'aux phénomènes répétés à cette fréquence de modulation. En installant cette modulation sur le bras optique pompe, les phénomènes détectés sont alors uniquement ceux créés par cette pompe. Des variations aussi faibles que 10^{-7} de variation relative peuvent être mesurées en acoustique picoseconde. De plus, l'asservissement à la référence fréquentielle de la modulation étant plus haute fréquence que les bruits dus aux fluctuations d'air ou aux vibrations mécaniques, ceux-ci sont filtrés. [103] Les nouveaux bancs d'acoustique picoseconde, les bancs dotés d'un dispositif laser hétérodyne (cf. paragraphe 2.1.2), ne nécessitent pas de modulation ni de détection synchrone. Ceci vient du fait que l'absence de ligne à retard mécanique permet un échantillonnage temporel beaucoup plus rapide, le signal peut alors être obtenu avec beaucoup plus d'impulsions lasers, et le moyennage de toutes ces impulsions permet d'extraire l'information voulue du bruit de mesure.

2.2) *Développements expérimentaux réalisés pour une étude cellulaire*

2.2.1) Un effort de visualisation : MARION*

2.2.1.1) *Principe de MARION*

Des premières parties du premier chapitre de ce mémoire se sont dégagées deux idées maîtresses : la cellule est un organisme dont le contenu est fortement hétérogène, de l'échelle

* MARION : Microscope Acoustique en Réflexion pour Imager et Observer le Nanomonde.

micrométrique à l'échelle nanométrique, et l'outil d'imagerie cellulaire de base est la microscopie optique, depuis quelques années de fluorescence.

L'idée d'utiliser un microscope de fluorescence dans le dispositif expérimental s'est donc rapidement imposée, motivée par la nécessité d'avoir la meilleure image optique possible de la cellule avant et après acquisition acoustique, et par les nombreuses possibilités d'analyse cellulaire qu'offre la fluorescence. De plus, la fluorescence peut aider pour le pointé laser de certains organites cellulaires. Les contraintes auxquelles doit pouvoir répondre le dispositif sont :

1) d'avoir la qualité d'imagerie des microscopes commerciaux classiquement utilisés dans les laboratoires d'analyse cellulaire, pour la visualisation des cellules comme pour celle du pointé laser,

2) d'être un microscope optique de réflexion, puisque les cellules sont posées sur substrat opaque,

3) d'être utilisable dans un montage d'acoustique picoseconde, c'est-à-dire d'être compatible avec un montage pompe-sonde équipé d'un laser femtoseconde.

Pour respecter les contraintes 1 et 2, le microscope conçu est l'adaptation d'un microscope commercial d'épi-fluorescence*. La compatibilité avec la troisième fonctionnalité requise pour ce microscope est obtenue en insérant un second bras d'imagerie : en plus d'un bras d'imagerie optique, le microscope est équipé d'un bras d'imagerie « acoustique », c'est-à-dire d'un bras dédié à l'injection du laser du montage pompe-sonde dans le microscope optique. La seconde contrainte implique que ce bras acoustique soit lui aussi au dessus de l'échantillon, comme le bras de visualisation. Les bras acoustique et optique sont donc placés l'un au dessus de l'autre. Cependant, pour que les fonctionnalités 1 et 3 soient respectées, c'est-à-dire pour que le microscope ait une haute qualité d'imagerie tout en étant adapté à une utilisation dans le montage pompe-sonde du banc acoustique, la superposition des deux bras est telle que c'est le bras d'imagerie optique qui est placé au dessus du bras acoustique. Ainsi, à aucun moment le montage optique pompe-sonde n'est perturbé par les optiques de fluorescence puisque ceux-ci n'en font pas parti. La jonction optique entre les deux bras est faite à l'aide d'un composant optique large bande 50/50 intégré dans le bras acoustique, fixé sur une platine de translation de précision. Ce composant est compatible avec le montage femtoseconde et c'est la capacité de travail en transmission et en réflexion de cet optique qui

* Un microscope d'épi-fluorescence est un microscope autorisant l'imagerie par fluorescence et fonctionnant en réflexion, l'illumination et l'observation de l'échantillon se font alors par le même objectif grossissant.

fait que l'on peut étudier simultanément l'échantillon à l'aide du montage pompe-sonde et du microscope d'épi-fluorescence. En revanche, cette propriété de composant optique 50/50 crée des pertes de puissance optique pour le montage laser et le montage de fluorescence par rapport à des montages classiques. Pour le montage laser, la puissance de pompe, qui fait un trajet unique dans le microscope, est diminuée de 50% et la puissance de la sonde détectée en photodiode est diminuée de trois quarts : la moitié est perdue lors du trajet optique incident, et la moitié de l'intensité du faisceau réfléchi est perdue lors du trajet réfléchi de l'échantillon. Cependant, n'étant pas limité par la puissance totale disponible du laser sur le montage, il suffit d'augmenter d'un facteur 2 la puissance de la pompe et de sonde pour compenser ces pertes de puissance laser totale sur l'échantillon. La génération est alors totalement compensée, et la sonde ne perd que 50 % de son intensité réfléchie lors de la détection en photodiode. Il est cependant facilement possible d'utiliser le microscope avec une détection d'acoustique picoseconde en transmission, auquel cas il n'y a plus de perte d'intensité du laser sonde. Pour le montage de fluorescence, le principe est le même que pour la pompe laser : il suffit d'augmenter d'un facteur 2 l'illumination incidente pour créer autant de fluorescence que dans un montage où il n'y a pas l'optique 50/50 et la détection perd 50% de la fluorescence émise. En revanche, en dehors de ces deux pertes de 50% de la puissance de la détection de fluorescence et de la détection de la sonde, le composant optique choisi ne perturbe pas le rayonnement de fluorescence détecté. Pour limiter les effets de la perte d'intensité de fluorescence, la caméra numérique est équipée d'une possibilité d'utilisation avec binning*. Finalement, les études de fluorescence et d'acoustique picoseconde peuvent être réalisées simultanément, avec cependant une perte de 50% de puissance des deux modes de détection. Pour ne limiter cette perte qu'aux situations où c'est nécessaire, le composant optique 50/50 peut aussi être ôté du trajet optique du laser et de la fluorescence, auquel cas le microscope redevient un microscope classique d'épi-fluorescence. Le principe de conception du microscope est représenté sur la figure 2-3.

La visualisation est réalisée à l'aide d'une caméra numérique CCD placée à la verticale de l'objectif de microscope, ainsi le microscope fonctionne en réflexion. Celle-ci

* Binning : possibilité pour une caméra CCD de regrouper les charges de plusieurs puits de potentiels de la caméra CCD en un seul pixel pendant l'acquisition. La vitesse d'acquisition et le rapport signal sur bruit de la détection sont alors améliorés. Pour un binning de 2 (4 pixels n'en forment plus qu'un), le rapport signal sur bruit est amélioré d'un facteur 4.

permet de visualiser simultanément la cellule, en mode de fluorescence ou pas, et le pointé laser dans la cellule.

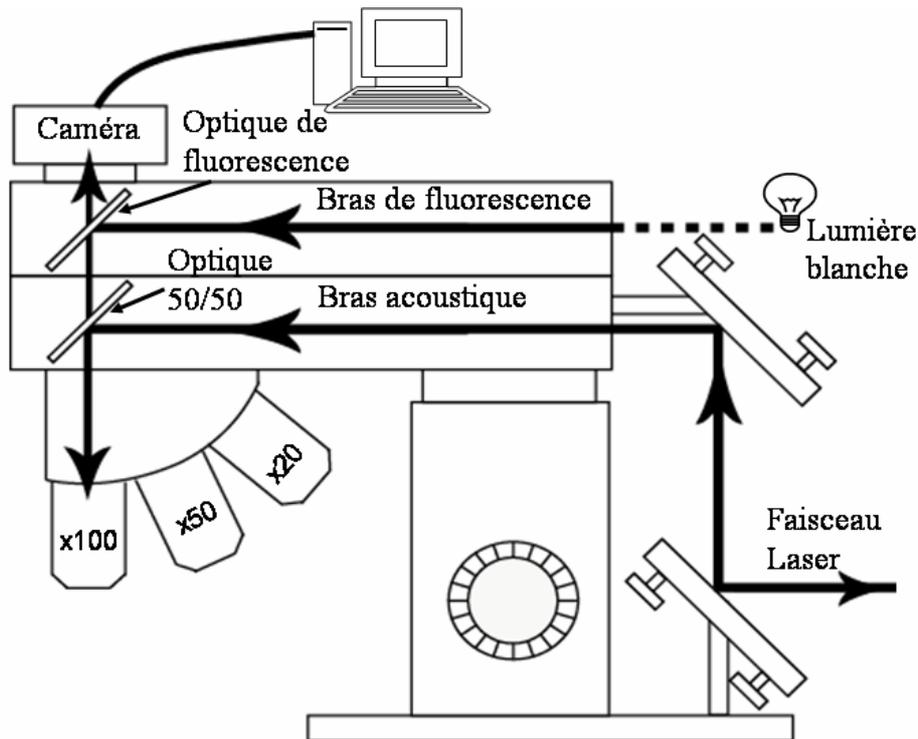


Figure 2-3 : Principe optique de MARION. Le bras optique permet une visualisation des cellules par épifluorescence. La source de lumière blanche est injectée par fibre optique et la visualisation est faite *via* une caméra numérique. Le bras acoustique permet par l'ajout du composant optique 50/50 sur le trajet du laser de le focaliser sur l'échantillon. Les deux composants optiques peuvent être indépendamment insérés sur les trajets optiques. La caméra permet de visualiser la cellule et le pointé laser dans la cellule.

Le microscope ainsi créé a été baptisé : Microscope Acoustique en Réflexion pour Imager et Observer le Nanomonde, d'où son acronyme MARION.

2.2.1.2) Choix du composant optique 50/50

Le composant optique permettant la jonction entre les deux systèmes optiques, le banc acoustique pompe-sonde et la visualisation de fluorescence, doit permettre le fonctionnement simultané des deux systèmes et donc être simultanément adapté aux contraintes imposées par les deux systèmes. Pour permettre une visualisation optique dans le domaine visible et être adapté à plusieurs couleurs de visualisation en fluorescence, ce composant doit être large bande. Étant donné le positionnement de la caméra, il doit fonctionner en transmission pour la détection de la fluorescence et en réflexion pour la génération et la détection acoustique. Cependant, comme on veut aussi visualiser le pointé laser dans la cellule, une partie de la

réflexion laser depuis l'échantillon doit être transmise par l'optique 50/50 et suivre le même trajet que la fluorescence.

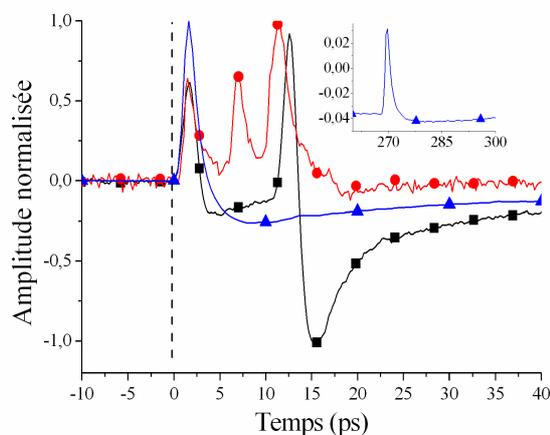


Figure 2-4 : Exemple de signaux d'acoustique picoseconde dégradés par l'utilisation d'un optique 50/50 dans le microscope non adapté aux contraintes expérimentales. Des multiples pics parasitent le signal, ces pics sont dus à des réflexions optiques non désirées. L'encart montre un pic parasite dû à un cube séparateur épais ($t=270$ ps). Les multiples pics sur temps courts (<15 ps) correspondent à des composants plus fins, des fenêtres à lames parallèles.

La figure 2-4 présente des signaux dégradés par une adaptation insuffisante du composant aux contraintes expérimentales du laser. Différents essais ont dû être réalisés pour trouver l'optique qui soit suffisamment adaptée aux deux couleurs du laser impulsif. Ces essais ont été réalisés avec des cubes séparateurs large bande et à bande sélective et avec des fenêtres à faces parallèles. La figure 2-4 illustre une difficulté rencontrée : dans le cas présent, alors qu'un unique pic est désiré à la coïncidence des temps, des multiples pics dus à des réflexions optiques non désirées de l'impulsion pompe parasitent le signal. Les écarts temporels entre ces pics correspondent au temps de vol de la lumière pour faire des aller retour sur les bords du composant optique.

Le choix retenu, celui permettant une mesure d'acoustique picoseconde sans double pic de coïncidence, est un cube séparateur large bande non-polarisant pour laser impulsif. Un second choix a aussi été envisagé, celui d'un film séparateur pelliculaire, ce type de séparateur optique éliminant pratiquement toutes les réflexions optiques généralement associées aux séparateurs de faisceau en verre. Ce choix n'a cependant pas été retenu car, à cause de son épaisseur micrométrique, ce type de séparateur est fortement sensible aux vibrations environnantes, ce qui introduit alors une source de bruit de fond non négligeable dans la mesure. De plus, ce type de séparateur limite énormément la puissance laser utilisable car il supporte très mal les puissances crêtes aussi élevées que celle que l'on

obtient avec un laser femtoseconde. Dans le cadre de l'activité sur cellule biologique, cette limite n'étant pas atteinte avec les faibles fluences utilisées ce n'est pas gênant, par contre cela peut le devenir pour d'autres études utilisant ce nouveau montage expérimental.

2.2.1.3) Résolution optique de l'ensemble du dispositif

Des objectifs achromatiques à longue distance de travail, certains étant aussi corrigés pour travailler en milieu biologique, ont été ajoutés dans le montage. La résolution optique de ces objectifs, c'est-à-dire leur pouvoir séparateur, est fonction de leur ouverture numérique. A une longueur d'onde donnée λ leur pouvoir séparateur est déterminé par la relation suivante : [104]

$$\delta_{xy} = 0.61 \frac{\lambda}{ON}, \quad (1.2)$$

où ON est l'ouverture numérique de l'objectif.

| Grossissement | Distance de travail (mm) | Ouverture numérique | Résolution (nm) |
|---------------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| 5x | 23,5 | 0,15 | 2170 |
| 10x | 10,5 | 0,25 | 1220 |
| 20x | 4,5 | 0,45 | 677 |
| 50x | 1,0 | 0,8 | 381 |
| 63x | 2,6-1,8 | 0,7 | 435 |
| 100x | 1,0 | 0,9 | 338 |

Tableau 2-1 : Grossissement, distance de travail, ouverture numérique et résolution optique pour une longueur d'onde de 500 nm des objectifs de microscope insérés dans le banc optique.

Le tableau 2-1 permet de quantifier la résolution optique des objectifs utilisés pour une longueur d'onde de 500 nanomètres*, c'est-à-dire en couleur bleue. Il est à noter que, pour une image numérique obtenue avec une caméra CCD, la taille des pixels de la caméra numérique peut devenir un facteur limitant de la résolution de l'image aux forts grossissements. [104]

2.2.2) Une détection bicolore

Il a été dit au début de ce chapitre que, dans un échantillon transparent, la détection optique en acoustique picoseconde de la perturbation mécanique se propageant dans celui-ci est une interaction acousto-optique pouvant donner naissance à des oscillations Brillouin. La

* Cette longueur d'onde est celle classiquement utilisée pour évaluer les performances optiques des objectifs.

détection optique résultant de la propagation acoustique générée par acoustique picoseconde dans une cellule doit donc *a priori* être des oscillations Brillouin. Si cet *a priori* semble justifié, il est cependant nécessaire de le vérifier expérimentalement, ce principe de vérification d'*a priori* étant d'ailleurs un lieu commun en sciences expérimentales. Il existe trois protocoles expérimentaux qui permettent de vérifier la détection d'oscillations Brillouin en acoustique picoseconde. Un premier protocole de vérification est lié à la détection : sur un échantillon transparent, lorsque la détection optique est réalisée en réflectométrie puis en interférométrie, les oscillations Brillouin des deux modes de détection sont en quadrature de phase. [105] La détection en interférométrie nécessite en revanche un échantillon très stable, homogène et avec une très faible rugosité de surface. Les cellules biologiques ne correspondant pas à ces critères, la validation expérimentale souhaitée n'a pas été réalisée selon ce procédé. Les deux autres principes de vérification expérimentale sont associés à la mesure de la fréquence Brillouin. Il est possible de faire varier cette fréquence en changeant l'angle d'incidence de la sonde par rapport à la propagation acoustique. [32] Cependant, pour détecter une variation de fréquence Brillouin en fonction de l'angle d'incidence de la sonde, il est nécessaire d'utiliser deux optiques de focalisation laser. Aussi, les objectifs de microscopes utilisés dans cette étude doivent, pour des raisons d'encombrement, avoir une faible ouverture numérique. La résolution latérale de la détection est alors dégradée et devient faible comparativement aux dimensions d'une cellule et les organites cellulaires ne peuvent être étudiés séparément. Cette seconde solution n'a donc pas été retenue pour cette étude cellulaire. Finalement, la dernière solution consiste à faire varier la longueur d'onde de la sonde optique pour vérifier expérimentalement que la détection correspond bien à des oscillations Brillouin. [106] C'est ce dernier principe de vérification expérimentale qui a été retenu.

Il est possible de faire varier la longueur d'onde de la sonde laser en agissant sur la fente de l'oscillateur laser. Expérimentalement, avec ce procédé, on peut aisément faire varier la radiation laser de 730 à 860 nanomètres sur le banc optique disponible au laboratoire. Cependant, ce choix n'a pas été retenu car, la modification de la radiation de sortie de l'oscillateur nécessite ensuite un réglage intégral du banc optique. Ce réglage est délicat et peut prendre du temps ; au niveau biologique de nombreuses variations peuvent survenir, ce qui empêche une bonne comparaison des résultats. Le changement de longueur de sonde de la détection n'est alors pas réalisé avec l'oscillateur laser mais avec un cristal de Beta Barium Borate (BBO) qui, par génération d'harmonique, [107] permet de diviser par deux la longueur d'onde incidente du laser. Ce montage présente un double intérêt : le premier est que, si l'on

suppose que l'indice optique ne varie pas entre les deux couleurs de détection, la fréquence doit varier d'un facteur deux avec ces deux couleurs de détection. Le second est que, l'amplitude des oscillations Brillouin étant fonction de la couleur de sonde utilisée pour un matériau donné, avoir deux couleurs de détection utilisables sur le dispositif permet de pouvoir étudier plus d'échantillons qu'avec une seule couleur. [108] Le montage réalisé est présenté sur la figure 2-5. La couleur rouge initiale du laser est convertie en bleu par le BBO sur un des bras optiques du montage. Ainsi un bras optique est en couleur rouge alors que l'autre est en bleu. Pour que les deux couleurs puissent être indifféremment utilisées en pompe ou en sonde, deux modulations acousto-optique sont installées sur le banc, une par bras optique. Lors des acquisitions, les deux modulations acousto-optiques sont sous tension, les deux modulations diffractent donc la lumière, en revanche une seule modulation acousto-optique reçoit une fréquence de référence. Lorsque la modulation acousto-optique est sous tension, il n'y a pas de variation de pointé laser, qu'on lui impose une fréquence de référence ou pas. Les deux faisceaux lasers sont superposés spatialement grâce à un miroir dichroïque puis injectés dans MARION et focalisés sur l'échantillon.

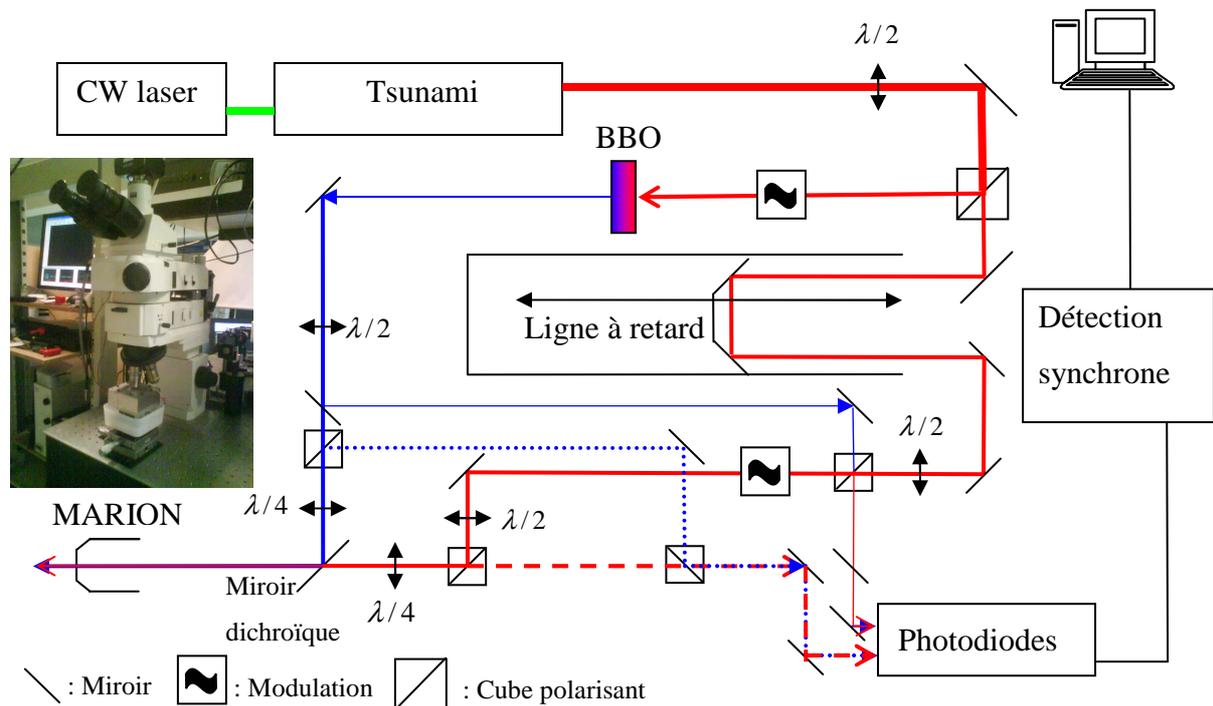


Figure 2-5 : Schéma de principe du montage expérimental. Les deux bras, le bras fixe et le bras retardé, peuvent être modulés et utilisés avec le montage différentiel. La ligne à retard permet une exploration temporelle de 13 ns. Les traits en pointillés représentent les trajets optiques du faisceau laser réfléchi depuis l'échantillon. La double entrée laser en photodiode permet la détection différentielle.

Le bras dont le faisceau laser est modulé à la fréquence de référence est celui qui sert de pompe, l'autre bras est utilisé en sonde. Les fluences des faisceaux pompe et sonde sont réglées indépendamment en jouant sur la polarisation des faisceaux avant qu'ils ne traversent des cubes séparateurs polarisants. Le montage optique du banc est tel que les deux couleurs lasers peuvent être réfléchies depuis l'échantillon jusqu'aux photodiodes. Pour ne détecter que le faisceau sonde, il suffit de bloquer le faisceau pompe réfléchi de l'échantillon en plaçant un écran sur son trajet optique pour qu'il ne soit pas détecté en photodiode. De plus, un filtre adapté à la couleur de la sonde est placé devant les photodiodes afin d'empêcher toute détection non désirée. Finalement, on peut, sans faire de réglages optiques intermédiaires et sans avoir de déviation du pointé laser sur l'échantillon, sonder un même point de l'échantillon en deux couleurs distantes d'un rapport deux en longueur d'onde. Les deux couleurs de sonde peuvent être chacune utilisées en montage différentiel afin de minimiser les sources de bruits dues aux fluctuations du laser. [103]

En modulant les deux bras optiques du banc expérimental à des fréquences différentes et en le dotant de deux détections synchrones, chacune dédiée à la détection d'une couleur de sonde, il serait possible avec ce montage de réaliser simultanément la détection associée aux deux longueurs d'onde du banc optique.

2.2.3) Un porte échantillon pour les études *in vitro*

Si les cellules végétales peuvent être étudiées *in vitro* sans nécessiter un contrôle drastique de leur environnement extérieur, il n'en est pas de même pour les cellules animales. Pour être non perturbées, les cellules animales doivent être dans un milieu biologique aqueux qui permet une atmosphère nutritive et contrôlée, en pH notamment, le tout devant être thermostaté. De plus, les substrats utilisés ne sont pas tous de la même épaisseur aussi le porte échantillon doit être conçu pour autoriser ces variations. Enfin, il doit être doté de réglages de précisions de deux degrés de libertés en translation pour son positionnement dans le plan horizontal xy et de deux degrés de liberté supplémentaires pour son positionnement azimutal par rapport à l'objectif.

Un schéma du dispositif conçu est présenté sur la figure 2-6. Le porte-échantillon est composé de trois parties principales liées à chaque fonction requise. La partie basse est vissée à la table du banc optique. Elle sert au positionnement de l'ensemble du porte échantillon dans le plan xy et à son inclinaison azimutale. Le positionnement du pointé laser sur la cellule est réalisé grâce à cette partie du porte échantillon. Sa précision absolue est submicrométrique. La partie médiane du porte échantillon est attribuée au contrôle de la

température. Ce contrôle de température est réalisé en utilisant un asservissement thermique composé d'un dispositif Peltier et d'ailettes de refroidissement, d'un thermocouple et d'une centrale de contrôle. Le dispositif Peltier est placé entre l'enceinte biologique et des ailettes de refroidissement thermique. De la colle thermique est utilisée pour assurer la jonction entre les différents éléments. Le thermocouple est étanche, il est placé dans l'enceinte biologique, à 2 mm des cellules. Le module Peltier et le thermocouple sont connectés au contrôleur thermique. L'ensemble a une précision de mesure au centième de degré et la stabilité thermique du dispositif est déterminée par le réglage de son PID*. Le contrôleur thermique peut être piloté par ordinateur et un historique des températures mesurées durant son fonctionnement peut être enregistré.

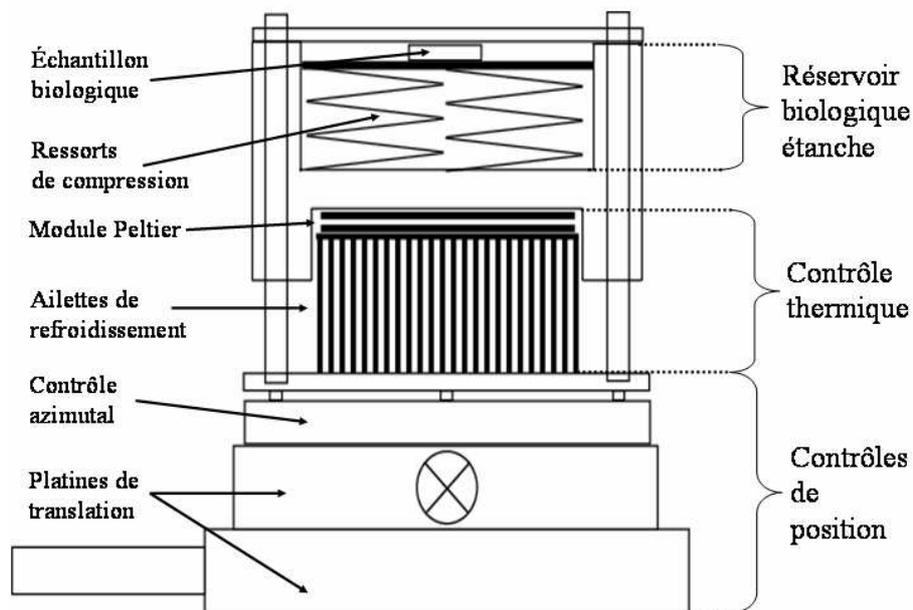


Figure 2-6 : Schéma de principe du porte échantillon biologique. Trois étages définissent le porte échantillon : l'étage du bas sert au positionnement de précision, celui du milieu à l'asservissement thermique et celui du haut aux conditions biologiques. L'échantillon de titane avec les cellules, dans le réservoir biologique, est maintenu en position en étant bloquée par la plaque fermant le réservoir et les ressorts de compression.

La partie haute du porte échantillon contient le réservoir biologique où sont placées les cellules. Le réservoir biologique est étanche et tous les matériaux le composant sont fait d'un

* PID : Proportionnel Intégral Dérivé. C'est l'organe de contrôle d'un asservissement en boucle fermée. Un PID bien réglé doit être robuste, rapide et précis. Cependant le régulateur idéal n'existe pas, c'est à l'utilisateur de trouver le bon compromis de réglage qu'il souhaite en fonction de sa demande vis-à-vis de l'asservissement. Les paramètres de rapidité et de stabilité sont en concurrence.

alliage biocompatible, de l'inox 316L. Ce réservoir s'ouvre et se ferme par le haut. Le couvercle est percé en son centre et recouvert d'une vitre biologique de 170 μm d'épaisseur, l'ensemble formant une ouverture optique étanche. A l'intérieur, la pastille avec les cellules est posée sur une passerelle supportée par des ressorts de compression. La pastille est alors maintenue par compression entre la passerelle et le couvercle du réservoir. Le centre de la pastille est situé sous l'ouverture optique du couvercle et les cellules sont alors visibles avec MARION. Il y a une épaisseur d'un millimètre de milieu de culture entre la surface de la pastille de titane avec les cellules et l'ouverture optique du couvercle.

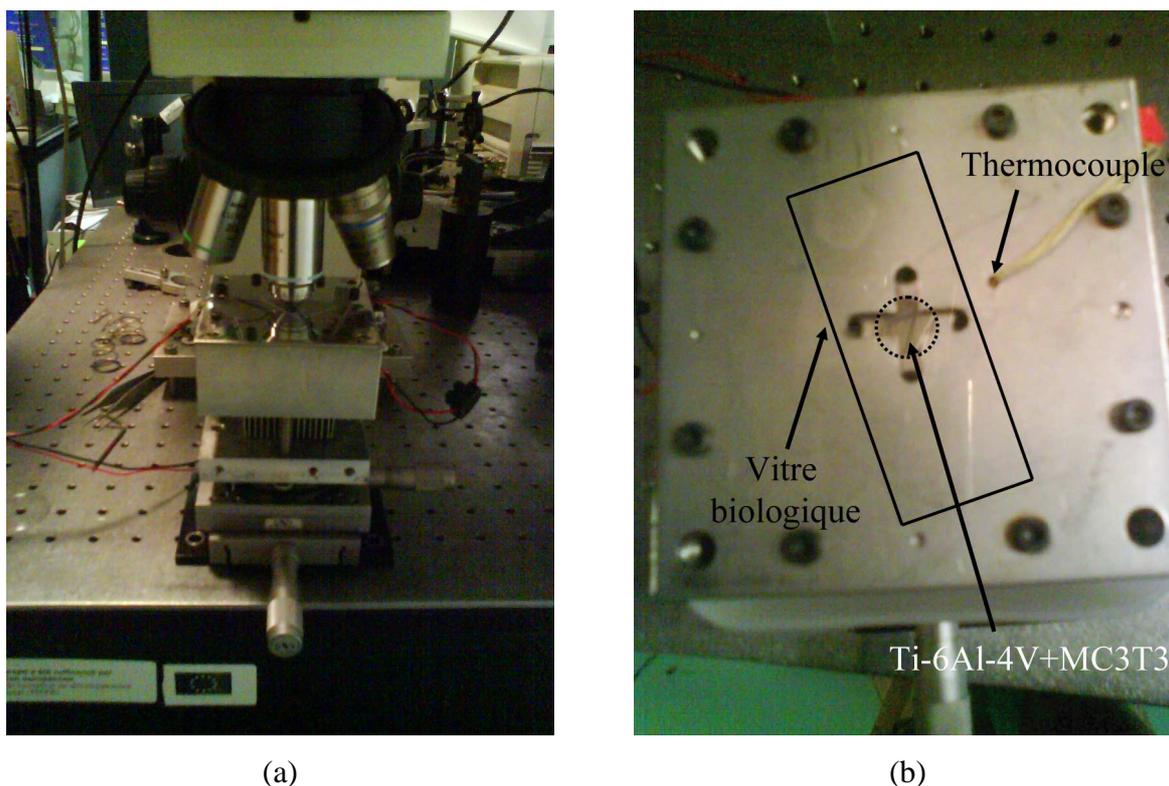


Figure 2-7 : (a) Photographie du porte échantillon en fonctionnement. (b) photographie vue de dessus du porte échantillon. La pastille avec les cellules est sous la croix centrale et la vitre biologique, dans la cuve thermostatée à 37°C. Le thermocouple de l'asservissement thermique contrôle la température à coté des cellules.

La figure 2-7(a) est une photographie du porte échantillon en fonctionnement lors d'une acquisition expérimentale, on peut aussi voir les objectifs de MARION sur le haut de la photographie, et la photographie figure 2-7(b) est une vue de dessus du porte échantillon. L'ouverture du couvercle est en croix, la pastille est située sous celle-ci, et une vitre recouvre l'ensemble, formant ainsi une fenêtre optique étanche. Du milieu de culture remplit la cuve et 1 mm de ce liquide recouvre les cellules, sous la fenêtre optique. L'ensemble est thermostaté, le thermocouple est placé à coté des cellules et relié au contrôleur thermique qui agit sur le

module Peltier sous la cuve. Les ailettes de refroidissement de l'asservissement thermique sont visibles sur la photographie 2-7(a), sous la cuve biologique.

Finalement, avec ce porte échantillon, un environnement aqueux, étanche et nutritif pour les cellules est obtenu. Cet environnement est maintenu à température contrôlée avec une stabilité de ce contrôle inférieure au demi degré kelvin à quelques millimètres des cellules, lesquelles sont visibles et positionnées sous le microscope avec une précision submicrométrique dans le plan latéral.

2.3) Performances du nouveau dispositif expérimental

2.3.1) Visualisation optique

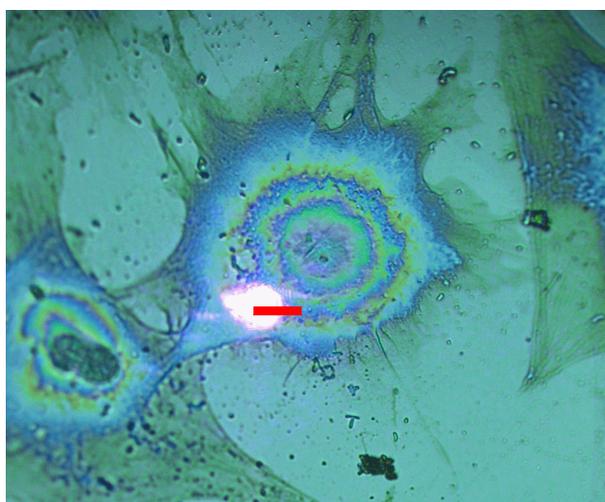


Figure 2-8 : Photographie réalisée avec MARION d'une cellule pré-ostéoblastique MC3T3-E1 fixée adhérente sur un substrat de Ti-6AL-4V. Cette photographie est réalisée en utilisant un objectif X50. Le laser du dispositif pompe-sonde est focalisé en surface du substrat, sous la cellule. La barre d'échelle représente 10 µm.

Le gain de visualisation créé par l'insertion de MARION est illustré dans cette section. Que la visualisation soit réalisée avec ou sans l'aide de la fluorescence, les échantillons, quels qu'ils soient, peuvent être à présent observés avec une grande qualité de visualisation optique. Ainsi, concernant l'observation des cellules, une illustration typique de la visualisation optique des cellules fixées et placées à l'air libre est proposée sur la figure 2-8. Le laser et la cellule sont imagés simultanément sur cette figure. La cellule est observée en détail, avec une résolution optique de quelques centaines de nanomètres et le laser peut ensuite être focalisé à l'endroit désiré dans celle-ci, grâce à un positionnement de précision submicrométrique du porte échantillon sur lequel est placée la cellule. L'objectif utilisé est ici un objectif 50x et le diamètre du laser focalisé a été mesuré avec cet objectif à 2µm. Sur cette photographie le

diamètre apparent du laser est de $10\mu\text{m}$, ceci est dû à une saturation des puits de potentiels de la caméra CCD qui détectent le faisceau laser et les charges de ces puits « bavent » sur les puits voisins.

Sur la figure 2-8, le fait que la cellule soit à l'air libre et bien isolée spatialement des autres cellules adhérentes sur la pastille permet de l'imager sans difficulté. En revanche, lorsque les cellules sont à confluence sur le substrat, l'observation de celles-ci est bien plus délicate car on image alors un échantillon homogène optiquement puisque les cellules sont bord à bord. Cette difficulté est décuplée si la cellule est étudiée en conditions *in vitro*.

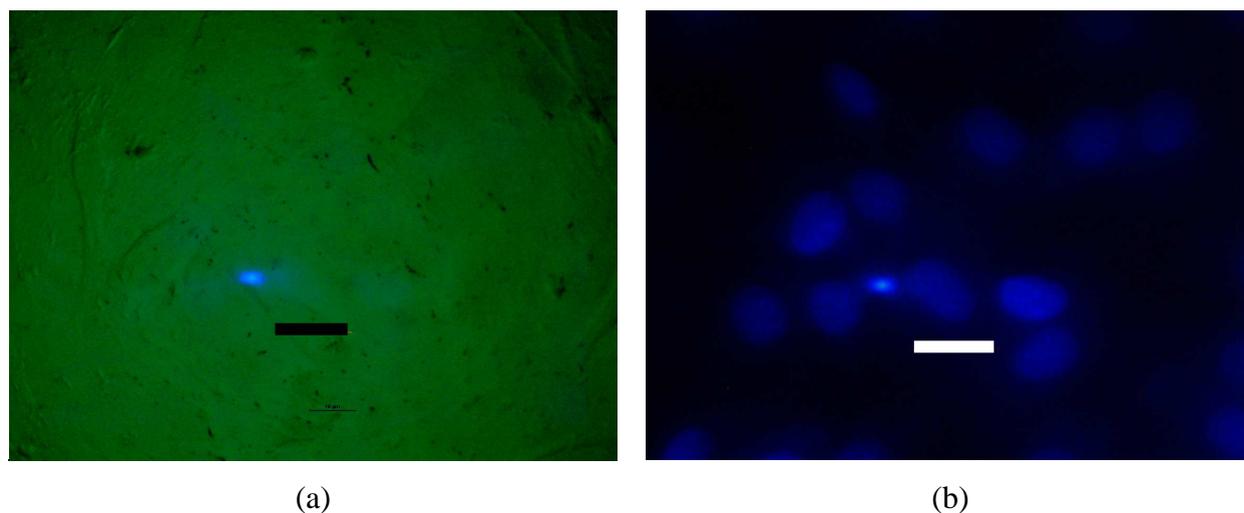


Figure 2-9 : Visualisation d'un même échantillon, au même lieu de cet échantillon en épi-microscopie classique, figure (a), et en épi-microscopie de fluorescence, figure (b). Le marquage de fluorescence est réalisé sur le noyau des cellules. Le faisceau laser est situé au même point sur l'échantillon dans les deux situations. Ces deux observations sont réalisées avec un objectif de grossissement 50x et la barre d'échelle est de $10\mu\text{m}$.

La figure 2-9(a) illustre ce propos : des cellules à confluence sont imagées sur le substrat en conditions *in vitro*, le contraste d'image est faible et les cellules sont difficilement visibles sur cette image. Le point bleu est le laser focalisé sur les cellules. Son intensité est réduite afin de ne pas éblouir la caméra. Il est délicat dans cette situation de bien situer le lieu que l'on inspecte dans la cellule. Les cellules étudiées ayant eu un marquage de fluorescence du noyau, on les visualise ensuite grâce à ce marquage de fluorescence, figure 2-9(b). Sur cette figure, le filtre dichroïque impose la couleur bleue détectée avec la caméra numérique. Le faisceau laser est toujours focalisé au même point sur l'échantillon. Son intensité n'a pas été modifiée, cependant, comme le temps d'acquisition en caméra est plus long lorsque l'on visualise en fluorescence que lorsque l'on visualise sans, son intensité paraît plus forte. Dans cette situation, la détection de fluorescence permet de situer le pointé laser par rapport au

noyau de la cellule que l'on inspecte. Il est dans le cas présent situé à quelques micromètres de deux noyaux de deux cellules différentes qui n'avaient pas été vues avec la visualisation de microscopie classique.

Le marquage de fluorescence présenté dans ce paragraphe a été réalisé sur le noyau des cellules mais, bien entendu, il peut être réalisé sur d'autres éléments de la cellule, tels le cytosquelette ou les points d'adhésion focale. Dans cette dernière éventualité, on peut alors étudier par acoustique picoseconde un point d'adhésion focale unique d'une cellule en condition *in vitro*, ce qui n'est pas réalisable si l'on ne possède pas de détection de fluorescence.

2.3.2) Effet de la détection différentielle

De nouvelles photodiodes ont été insérées dans le montage, elles permettent une grande sensibilité de mesure dans le rouge et le bleu. Ces photodiodes ont aussi une double entrée, ce qui permet une détection électronique effectuant la soustraction de deux intensités lumineuses. On les utilise pour avoir une détection différentielle : une partie du faisceau laser est prélevée sur le chemin optique du bras sonde et est focalisée sur une des deux entrées des photodiodes afin que la soustraction électronique entre ce faisceau et le faisceau réfléchi par l'échantillon soit ajustée à zéro. Ce prélèvement est réalisé le plus tard possible sur le montage, ceci permettant de minimiser le plus possible les bruits créés par les différents composants du banc expérimental. Une partie des bruits dus aux fluctuations du laser peut alors être supprimée électroniquement. [103]

Si le bras sonde est le bras retardé, le montage différentiel permet aussi de réduire les bruits qui peuvent être créés par le déplacement mécanique de la ligne à retard.

Afin de quantifier le gain du montage différentiel, des acquisitions comparatives de signaux expérimentaux obtenus avec et sans détection différentielle sont faites sur un échantillon de tungstène de 255 nanomètres d'épaisseur, déposé sur substrat semi-infini. Cet échantillon est utilisé car il est très facile de réaliser de bons réglages optiques sur cet échantillon aussi cela permet de quantifier l'effet de la détection différentielle dans une situation expérimentale de référence. Les conditions des expériences et les paramètres d'acquisitions sont les mêmes pour les deux acquisitions comparatives. Les signaux expérimentaux sont obtenus en faisant peu de moyennage expérimental pour que l'acquisition soit rapide et qu'il y ait donc un minimum de fluctuations expérimentales.

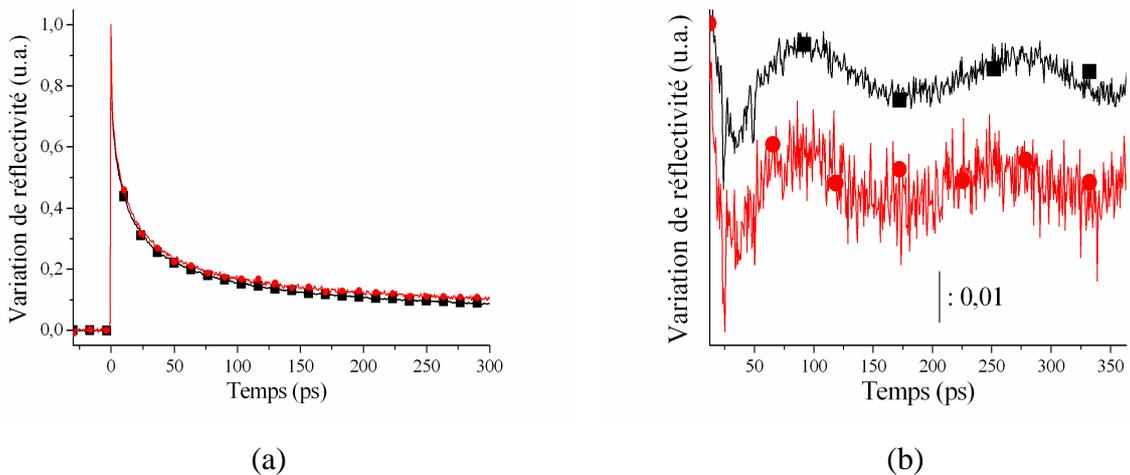


Figure 2-10 : Signaux obtenus sur un échantillon de tungstène de 255 nanomètres d'épaisseur avec (carrés) et sans (ronds) montage différentiel. (a) Signal temporel normé des signaux obtenus. (b) Signaux de la figure (a) sur lesquels un retranchement polynomial a été réalisé. L'oscillation basse fréquence est créée par le retranchement polynomial et le signal haute fréquence est créé par le bruit de la mesure. Un gain de 12% environ est obtenu avec le montage différentiel.

Les résultats sont confrontés en normant les signaux, ceux-ci sont présentés sur la figure 2-10(a). Le bruit de la mesure est quantifié en retranchant un polynôme de même degré aux deux signaux et en comparant l'amplitude du bruit sur les retranchements obtenus. Le principe est présenté sur la figure 2-10(b). Le signal basse fréquence est créé par le retranchement polynomial et le signal haute fréquence correspond au bruit de la mesure. Le montage différentiel permet un gain de rapport signal sur bruit de 12% environ.

2.3.2) Comparaison entre l'ancien montage et le nouveau

Afin de s'assurer que MARION n'introduit pas de nouvelles sources de bruit dans la mesure, des expériences comparatives entre l'ancien et le nouveau montage ont été réalisées. Le principe est ici de se placer avec les deux dispositifs, le dispositif précédent et le nouveau, et qu'un même opérateur effectue des acquisitions comparatives avec les deux montages, sur le même échantillon de tungstène que précédemment.

La quantification du niveau de bruit est faite en normant les signaux détectés puis en leur appliquant la fonction d'autocorrélation. La fonction d'autocorrélation permet de quantifier le bruit de la mesure par l'amplitude du Dirac à $t=0$ du signal autocorrélé. [109] Les résultats sont présentés sur la figure 2-11. Pour chaque comparaison entre les deux dispositifs, deux objectifs différents ont été utilisés : un 50x, signaux avec les carrés sur la figure 2-11, et un 63x, signaux avec les ronds. On évalue la différence d'amplitude du signal des fonctions

d'autocorrélation à $t=0$, donc la différence de puissance de bruit du signal, en fonction de l'objectif et du dispositif utilisé. Les fonctions d'autocorrélations des acquisitions faites avec le montage de référence sont tracées avec les symboles pleins, et les fonctions d'autocorrélations des signaux obtenus avec MARION sont tracées avec les symboles creux.

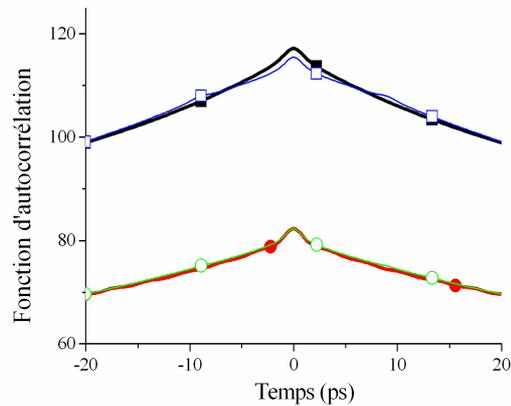


Figure 2-11 : Autocorrélation de résultats expérimentaux obtenus sur le montage classique (symboles pleins) et avec le microscope (symboles creux). Deux objectifs ont été utilisés à chaque fois, un objectif 50x (carrés) et 63x (ronds).

A puissance égale, le pic concentré autour du temps nul des fonctions d'autocorrélations des signaux obtenus avec l'objectif 63x est plus grand que celui des signaux obtenus avec le 50x, il apparaît donc que la puissance de bruit du signal obtenu avec l'objectif 63x est plus grande que celle obtenue avec l'objectif 50x. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cette variation de puissance de bruit en fonction de l'objectif utilisé. En effet, les deux objectifs ne focalisent pas pareillement la pompe et la sonde car ils n'ont pas la même ouverture numérique et le même grossissement, et, de plus, ils ne sont pas de la même marque. En revanche, la puissance du bruit des signaux n'est pas, ou très peu, fonction du dispositif ; les amplitudes aux temps nul des pics concentrés autour de $t=0$ des fonctions d'autocorrélations des signaux obtenus avec le même objectif mais un dispositif différent étant quasiment identiques.

2.3.3) Répétabilité et reproductibilité de MARION

Une évaluation de la répétabilité* du nouveau dispositif a été effectuée sur un échantillon d'arsénure de gallium (GaAs) [106] en réalisant 25 acquisitions en sonde rouge sans réglages intermédiaires. Le GaAs étant semi-transparent pour cette couleur de sonde, des oscillations Brillouin sont la signature du signal acoustique détecté. Pour chaque signal, le fond thermique est retranché et la fréquence Brillouin a été mesurée par une procédure d'ajustement numérique d'une fonction sinusoïdale amortie sur le signal expérimental. La fonction d'ajustement numérique est :

$$A \sin(2\pi ft + \varphi) e^{-\alpha t}, \quad (1.3)$$

où A , f , t , φ et α sont respectivement l'amplitude, la fréquence, le temps, la phase à l'origine et l'atténuation des signaux mesurés. Une étude de répétabilité est faite directement sur le signal Brillouin expérimental, et une seconde étude est réalisée après qu'il ait été débruité par une fonction d'autocorrélation.

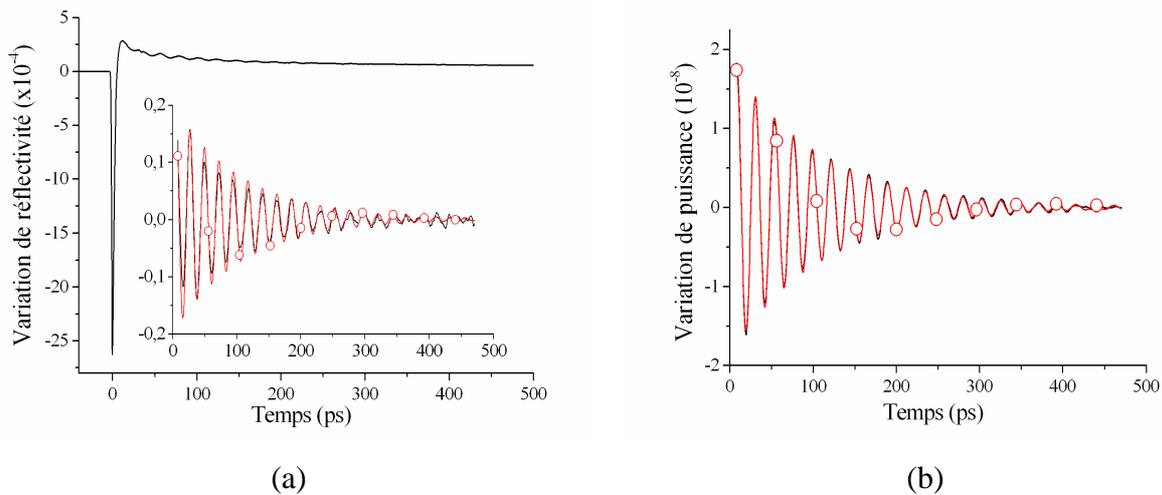


Figure 2-12 : (a) Un des signaux expérimentaux obtenus sur du GaAs pour quantifier la répétabilité de la mesure acoustique sur le banc pompe-sonde. La répétabilité du banc expérimental est quantifiée en utilisant la contribution acoustique du signal (encart). (b) Une procédure d'autocorrélation est proposée pour filtrer le bruit blanc présent dans la mesure acoustique avant l'ajustement numérique.

* D'après le vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, la répétabilité et la reproductibilité sont des notions proches mais différentes. La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats de mesures successifs du même mesurande, mesures effectuées avec l'application de la totalité des mêmes conditions de mesures. La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures du même mesurande, mesures effectuées en perturbant puis reproduisant la même mesure.

Une illustration du principe de l'étude est proposée sur la figure 2-12 : sur la figure 2-12(a) sont présents le signal expérimental puis, dans l'encart, seule la contribution acoustique est étudiée (ligne) avec une procédure d'ajustement numérique définie par la fonction (1.3) (ronds). Sur la figure 2-12(b), le signal Brillouin expérimental (ligne) et la fonction (1.3) (ronds) sont autocorrélés avant d'utiliser la procédure d'ajustement numérique.

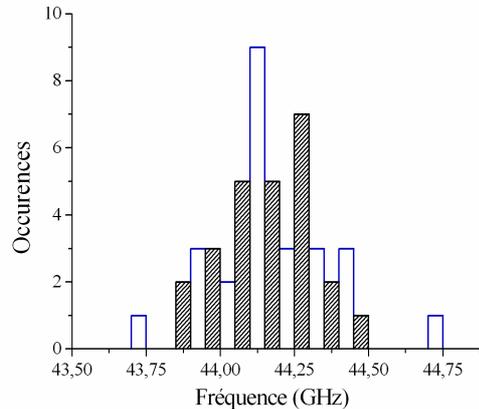


Figure 2-13 : Diagramme représentant les 25 mesures de fréquence Brillouin obtenues lors du test de répétabilité de MARION. Les bâtons pleins représentent les mesures obtenues après débruitage par autocorrélation et les bâtons creux représentent les mesures obtenues sans utiliser de traitement de signal.

Les valeurs des fréquences Brillouin mesurées sont présentées sur la figure 2-13. Il apparaît clairement que la gaussienne de distribution des mesures faites est plus resserrée lorsque le signal expérimental est débruité par la procédure d'autocorrélation. Pour chaque variable d'ajustement de la procédure numérique, une incertitude numérique est quantifiée par la procédure. [110]

Le tableau 2-2 présente la moyenne des résultats obtenus par la procédure d'ajustement numérique pour chaque variable de la fonction (1.3), avec la moyenne des incertitudes numériques associées à chaque ajustement. L'écart-type lié à l'ensemble des mesures est donné en écart-type relatif afin de pouvoir par la suite le comparer avec les mesures qui seront faites sur matériel biologique. L'autocorrélation fait perdre l'information sur la phase d'un signal donné, ce qui se retrouve dans les résultats comparatifs. Par contre les autres résultats sont nettement améliorés avec la procédure d'autocorrélation, par exemple le gain d'incertitude sur la mesure fréquentielle est supérieur à un ordre de grandeur. Ces résultats sont très probants, avec ou sans autocorrélation sur les acquisitions, les écarts-type relatifs des résultats en fréquence sont de 0,33% avec autocorrélation et de 0,52% sans autocorrélation. Les écarts-types des amplitudes mesurées sont élevés, cela provenant sûrement de ce que cette quantification expérimentale a nécessité une journée entière de

mesure sans qu'aucun réglage intermédiaire soit effectué en cours de journée. Aussi, sur cette longue plage de temps, il est fort possible qu'il y ait eu des fluctuations de l'intensité du laser, du positionnement du bâti de microscope, etc...

| | Avec Autocorrélation | | Sans Autocorrélation | |
|-----------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | Moyenne | écart-type relatif | moyenne | écart-type relatif |
| A | 1,32 +/- 0,033 | 20,4% | 1,47 +/- 0,07 | 27,1% |
| f (GHz) | 44,13 +/- 0,015 | 0,33% | 44,34 +/- 0,6 | 0,52% |
| φ (rad) | 2,58 +/- 0,4 | 20,9% | 3,22 +/- 0,04 | 12,7% |
| α (GHz) | 8,1 +/- 0,1 | 13,8% | 8,52 +/- 0,43 | 18,9% |

Tableau 2-2 : Moyennes et écarts-type des variables d'ajustement numérique obtenues avec et sans autocorrélation pour traiter les signaux. La phase a perdu sa signification physique par l'utilisation de la fonction d'autocorrélation dans la procédure d'ajustement numérique par rapport à la phase initiale de l'ajustement (cases grisées).

2.3.4) Détection bicolore

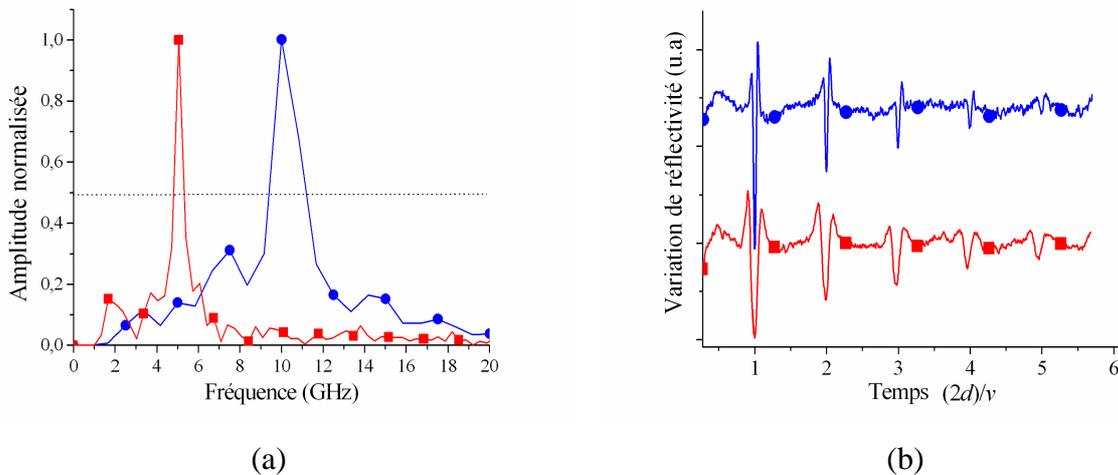


Figure 2-14 : (a) Spectre normé des fréquences Brillouin obtenues pour des couleurs de sonde rouge (carrés) et bleue (ronds) dans un échantillon d'eau. La fréquence mesurée en sonde bleue est le double de la fréquence mesurée en sonde rouge. (b) (expérimentation réalisée par T. Dehoux) Variation de réflectivité détectées sur un échantillon de tungstène en couleurs de sonde rouge (carrés) et bleue (ronds). Le temps de détection des échos acoustiques est inchangé entre les deux détections.

Le montage de la détection bicolore a été testé en effectuant des mesures comparatives pour un échantillon opaque et pour un échantillon transparent, en conservant le même pointé laser pour les deux échantillons. Pour l'échantillon opaque, la détection acoustique est celle d'arrivées d'échos acoustiques, dont le temps d'arrivée de ces échos est uniquement fonction

de la vitesse acoustique dans le film et de son épaisseur. Les temps d'arrivées doivent donc être conservés entre les deux couleurs de détection. En revanche, la forme de ces échos peut être modifiée par la couleur de détection. [111] Pour l'échantillon transparent, l'étude est réalisée sur la fréquence des oscillations Brillouin. Le BBO du banc acoustique divise la longueur d'onde du laser par deux, aussi si deux acquisitions comparatives d'un même échantillon transparent sont effectuées et que l'on suppose que l'indice optique de l'échantillon ne varie pas ou peu en fonction de la longueur d'onde, les fréquences Brillouin mesurées doivent avoir un rapport deux entre elles, équation (1.1).

De l'eau est utilisée pour tester la détection bicolore sur échantillon transparent. Les résultats expérimentaux de l'étude sont présentés dans le domaine fréquentiel sur la figure 2-14(a). L'intérêt de l'étude comparative étant dans la localisation fréquentielle des raies Brillouin, leur amplitude est normée pour la comparaison. Les signaux avec symboles carrés sont obtenus en sonde rouge ($\lambda=790$ nm) et les signaux avec symboles ronds en sonde bleu ($\lambda=395$ nm). Dans l'eau, la fréquence Brillouin obtenue est de 5,5 GHz avec une largeur de pic à mi-hauteur de 0,5 GHz pour une sonde rouge et de 10,2 GHz avec une largeur à mi-hauteur de 2 GHz. Ainsi, on détecte un rapport 2 des fréquences Brillouin, ce qui indique que pour la résolution de la détection présenté ici, l'indice optique de l'eau ne varie pas entre la couleur bleue et la couleur rouge.

En supposant un indice optique dans l'eau $n=1,3$, la célérité acoustique mesurée dans l'eau est de 1,6 nm/ps avec la sonde rouge et de 1,5 nm/ps avec la sonde bleue. L'incertitude de mesure de vitesse est associée à la largeur à mi-hauteur des raies du spectre Brillouin, elles même liées au temps de vie du signal acoustique. La détection en sonde bleue étant plus haute fréquence qu'en sonde rouge, le temps de vie du signal détecté en bleu est plus court que celui détecté en sonde rouge. Les incertitudes sont de 0,1 nm/ps pour la détection rouge et de 0,3 nm/ps pour la détection bleue. Les valeurs de la littérature sont retrouvées pour la mesure de vitesse acoustique. [112] En considérant un modèle où l'atténuation acoustique est proportionnelle au carré de la fréquence Brillouin et en déterminant le rapport α / f^2 , [113] on obtient des coefficients d'absorption à 20°C de $6,5 \times 10^{-15}$ ps²/nm pour la détection en sonde bleue et de $5,6 \times 10^{-15}$ ps²/nm pour la détection en sonde rouge en utilisant la célérité acoustique de l'eau de la littérature. [112] Les valeurs déterminées sont du même ordre de grandeur que la littérature [20].

On utilise ensuite comme échantillon opaque un film de 250 nm de tungstène, déposé sur substrat semi-infini, figure 2-14(b). Le temps d'arrivée des échos acoustiques est inchangé entre les deux couleurs de détection, ce qui valide finalement le montage expérimental réalisé.

2.3.5) Performances du porte échantillon

Le porte échantillon devant permettre des études par acoustique picoseconde des cellules biologiques en conditions *in vitro*, il est nécessaire de vérifier qu'il est apte à répondre aux contraintes imposées par les deux disciplines. Au niveau biologique, un contrôle de l'asservissement thermique et de l'étanchéité sont nécessaires, et au niveau acoustique il faut vérifier que l'on peut bien sonder par acoustique picoseconde la cellule, posée sur une pastille de titane, située sous 1 mm de milieu de culture rouge et une vitre biologique.

2.3.5.1) Contraintes biologiques

Le milieu de culture contient un indicateur de pH, le rouge phénol. Il est rouge lorsqu'il est en condition de pH biologique, pH acide, et il change de couleur lorsque le pH change. Aussi, pour vérifier l'étanchéité du porte échantillon, du milieu de culture a été placé dans le porte échantillon et un contrôle de sa couleur sur une durée de 48 heures a été réalisé. Aucun changement de couleur n'ayant été observé, il n'y a pas eu de variation de pH durant cette plage de temps, le porte échantillon est donc étanche.

Le protocole optimum trouvé pour utiliser le porte échantillon est le suivant : dans un premier temps, il est rempli uniquement de milieu de culture puis asservit à la température biologique souhaitée, 37°C. Ensuite on l'ouvre, on place les cellules dans l'enceinte et on le referme. Ce protocole permet de minimiser l'écart de température pour les cellules entre le moment où elles sont dans leur incubateur et le moment où elles sont placées *in vitro* dans le porte échantillon. Cependant, le fait de devoir ouvrir le porte échantillon pour placer les cellules perturbe l'équilibre thermique établi.

La rapidité du retour à cet équilibre est fonction de l'asservissement du thermocontrôleur. Plus l'asservissement de rééquilibre est rapide moins la stabilité de cette asservissement est bonne, et inversement. Il s'agit donc de trouver un compromis stabilité/rapidité pour le dispositif. Les performances du réglage retenu sont présentées sur la figure 2-15. Indépendamment du réglage choisi, le fait d'ouvrir l'enceinte pour y placer les cellules fait chuter la température de 1°C : à $t=0$, début de rallumage de l'asservissement thermique, la température dans l'enceinte descend de 37°C à 36°C. Ensuite pendant 90 secondes, la température continue de chuter d'environ 1°C pour ensuite revenir à 37°C au bout de 4 minutes environ. A partir de ce moment, la température reste très stable. Un asservissement plus rapide n'a pas été choisi car la température peut alors monter au dessus de 40°C lors de la stabilisation. Un contrôle visuel des cellules par microscopie optique montre que les cellules semblent non perturbées par la stabilisation thermique du dispositif.

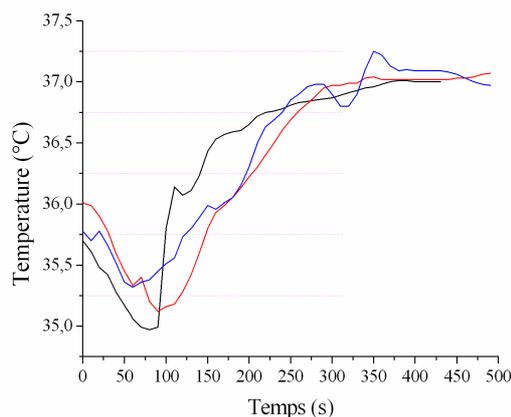


Figure 2-15 : Réponse en température liée à l'asservissement thermique du porte échantillon dans des conditions d'utilisation. Le porte échantillon a été stabilisé à 37°C puis ouvert pour y introduire l'échantillon cellulaire et refermé. Le temps $t=0$ correspond au moment où l'asservissement est réenclenché, une fois qu'il est refermé.

2.3.5.2) Contraintes acoustiques

Le fait que les cellules soient sous une vitre biologique et sous 1 mm de sérum biologique coloré impose de vérifier expérimentalement que la détection acoustique est bien celle de la propagation acoustique proche de l'interface du biomatériau et qu'aucun phénomène parasite n'éblouit la détection.

En effet, si l'on suppose que l'épaisseur d'échantillon que l'on inspecte est de 1 μm , le rapport de la distance entre la surface du titane et la surface supérieure de la vitre biologique et l'épaisseur de la zone inspectée est le même que le rapport entre la hauteur de la tour Eiffel et la hauteur d'une feuille de format A4 (30 cm). De même, si l'on souhaite une résolution nanométrique dans l'épaisseur du milieu sondé, le rapport entre l'épaisseur du dispositif et la résolution attendue est comparable à celui entre la hauteur de la Tour Eiffel et l'épaisseur de papier à lettre. Ainsi, ce dispositif peut être comparé à un dispositif voulant étudier une rame de papier de 30 cm d'épaisseur noyée sous une colonne d'eau de la hauteur de la tour Eiffel et où la résolution attendue serait celle d'une des feuilles de la rame. L'inspection serait faite depuis le haut de la colonne d'eau. Ce dispositif a donc une résolution de détection dans l'épaisseur comparable aux techniques de microscopies de champs proches mais, comparativement, opère à très longue distance.

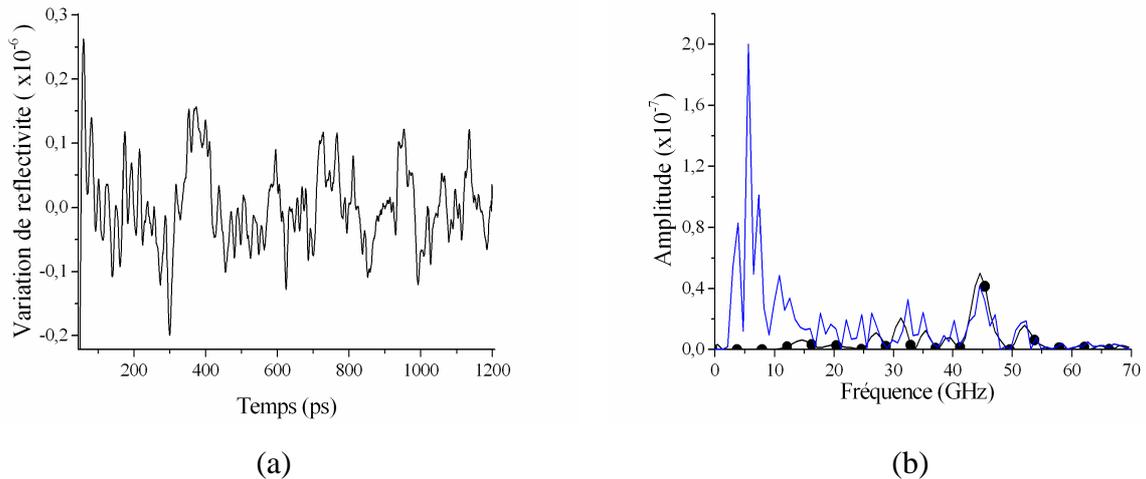


Figure 2-16 : Signal temporel (a) et la densité spectrale de puissance (b) d'une acquisition obtenue dans du GaAs immergé sous du sérum biologique dans le porte échantillon biologique. Figure (b) : En trait fin, le calcul de la densité spectrale est réalisé sur tout le signal de la figure (a) alors que la densité spectrale avec les ronds décrit uniquement les 350 premières ps du signal de (a). La raie de fréquence à 5 GHz correspond aux oscillations Brillouin obtenues dans le liquide et la raie de fréquence à 44 GHz aux oscillations Brillouin dans le GaAs.

Pour vérifier que le signal obtenu est bien celui de l'échantillon placé sous un millimètre de milieu de culture, un échantillon de GaAs a été immergé dans l'enceinte biologique, à la place des cellules. L'immersion a été réalisée sous de l'eau pure, incolore, et sous du sérum biologique, coloré en rouge. Les signatures du signal Brillouin détecté dans de l'eau pure et dans du rouge biologique sont les mêmes. Dans chaque cas, plusieurs acquisitions ont été réalisées en sonde rouge. Le GaAs est opaque en couleur bleue aussi la génération acoustique a lieu au voisinage de l'interface entre le GaAs et le liquide mais coté GaAs. Deux fronts acoustiques sont générés dans cette expérience, un dans le GaAs et un autre dans le liquide. Le front acoustique se propageant dans le GaAs crée des oscillations Brillouin à 44 GHz et le front acoustique se propageant dans le liquide utilisé, que ce soit l'eau ou le milieu de culture, crée des oscillations Brillouin à 5 GHz. Le signal temporel détecté est présenté sur la figure 2-16(a). Sa densité spectrale de puissance est présentée sur la figure 2-16(b). Le tracé en trait fin correspond au calcul de la densité spectrale de puissance de la mesure réalisée sur la figure (a). Les raies Brillouin des deux milieux dans l'échantillon sont identifiées, l'eau ou le milieu de culture et le GaAs, respectivement à 5 et 44 GHz. Le tracé avec les ronds correspond à la densité spectrale des 350 premières picosecondes du signal temporel de la figure (a). Seule la raie Brillouin de GaAs est identifiée. L'amplitude de cette raie étant la même pour les deux fenêtres temporelles étudiées, le signal Brillouin dans le

GaAs à un temps de vie maximum de 350 picosecondes, ce qui correspond aux résultats obtenus précédemment, présentés au paragraphe 2.3.3. Le niveau de bruit est élevé entre 10 GHz et 40 GHz, cela provient certainement d'une dégradation du GaAs en milieu liquide, dégradation observée au microscope, et du fait qu'il faut utiliser de très faibles puissances de laser pompe et sonde pour ne pas ablater ce matériau dégradé par le liquide. De même, l'amplitude de la raie Brillouin du GaAs est nettement plus faible que celle de l'eau, sans doute à cause des coefficients piézo-optiques des deux matériaux, l'explication détaillée sera faite lors des deux prochains chapitres.

2.4) Conclusion

Dans ce chapitre, les développements expérimentaux nécessaires à l'étude par acoustique picoseconde d'une cellule vivante ont été décrits. Un microscope d'épi-fluorescence, compatible avec l'utilisation du laser femtoseconde du banc optique pompe-sonde, a été développé. Ainsi, il devient possible d'observer par microscopie de fluorescence une cellule unique et certains de ses constituants en conditions *in vitro*, puis, avec le faisceau laser focalisé à la surface du substrat sur lequel elle adhère, d'étudier par acoustique picoseconde ses propriétés mécaniques locales. La résolution optique du dispositif conçu est proche de la limite de diffraction optique. Ce microscope permettant une utilisation simultanée du banc d'acoustique picoseconde avec la fluorescence optique, des études combinant les deux techniques complémentaires peuvent alors être menées. Au niveau cellulaire, la fluorescence peut aider à quantifier l'état de santé ou la densité du réseau de son cytosquelette par exemple. Plus généralement, la détection optique de fluorescence permet par exemple la localisation d'objets en dessous des dimensions de la limite de résolution optique, par la détection de leur émission de fluorescence, lesquels peuvent ensuite être étudiés par acoustique picoseconde. Le banc optique a aussi été modifié de manière à permettre les études par acoustique picoseconde avec deux couleurs de sonde et de pompe différentes sans changer le pointé laser, une dans le proche infrarouge et une dans le bleu. Cette modification permettra de vérifier l'hypothèse de détection d'oscillation Brillouin dans les cellules biologiques. Plus généralement, elle permet aussi d'étudier plus de matériaux qu'auparavant, certains échantillons, comme le verre par exemple, ayant une réponse optique en sonde bleue mais pas en sonde rouge. Enfin, une enceinte pour l'étude cellulaire *in vitro* a été développée. Cette enceinte est étanche, thermostatée et entièrement conçue en matériau biocompatible, de l'inox 316L. Elle est dotée d'un mécanisme de positionnement de précision submicrométrique dans le plan *xy*.

Les performances des développements réalisés ont été quantifiées afin de pouvoir par la suite appréhender la pertinence et la sensibilité des résultats sur échantillons dont la réponse et la variabilité de réponse opto-acoustique en acoustique ne sont pas connues. La comparaison des performances du nouveau dispositif avec le dispositif plus ancien a été réalisée, les conclusions montrent qu'il n'y a pas de perturbations de la mesure détectée.

Ces développements réalisés, il devient à présent techniquement possible de commencer l'étude sur matériel biologique vivant de manière non invasive, en ayant l'outil adéquat pour sa bonne visualisation optique. La vérification expérimentale du signal attendu, la détection d'oscillations Brillouin, pourra être réalisée. Ce travail sera l'objet de la suite de ce manuscrit, en commençant par un matériel biologique relativement simple, la cellule biologique végétale.

Chapitre 3

Acoustique picoseconde dans une cellule végétale : un milieu acoustique semi-infini

On propose dans ce chapitre la première application de l'acoustique picoseconde à une cellule unique, en condition *in vitro*. Aucune activité d'acoustique picoseconde n'ayant auparavant été faite pour l'étude du vivant, les enjeux de ce premier travail sont multiples. Dans un premier temps, une modélisation des phénomènes physiques mis en jeu lors des expériences sera proposée. Cette modélisation repose sur une géométrie simple, ceci étant autorisé par les conditions expérimentales. Malgré son jeune âge, les phénomènes macroscopiques mis en jeu en acoustique picoseconde sont bien connus [23] et leur principe général a été décrit conceptuellement dans le chapitre 2. Dans ce chapitre, les équations fondamentales de ces phénomènes macroscopiques seront systématiquement résolues analytiquement. Ces équations fondamentales sont l'équation de diffusion de la chaleur, l'équation d'onde acoustique, et les équations d'ondes de la lumière. L'élévation thermique, qui résulte d'un dépôt d'énergie laser dans la matière, et la propagation acoustique, créée par cette élévation thermique, seront couplées grâce à l'introduction de termes sources dans les équations fondamentales. La détection optique de l'élévation thermique et de la propagation acoustique sera étudiée en résolvant analytiquement l'équation d'onde optique non linéaire, la source de non linéarité provenant du milieu matériel perturbé. Cependant les solutions des équations fondamentales permettent la modélisation des phénomènes physiques dans un milieu infini, et ceux sont les conditions aux limites qui permettent l'application de ces modélisations à un problème particulier aussi une attention particulière leur sera accordée dans la résolution proposée. Cette modélisation servira de base de travail pour les études expérimentales. Dans un second temps, et en s'aidant du travail de modélisation fourni, une étude expérimentale de l'acoustique picoseconde dans une cellule biologique végétale sera réalisée. Cette étude expérimentale permettra dans un premier temps de vérifier le caractère non invasif de l'acoustique picoseconde pour les cellules biologiques, puis en utilisant des cellules provenant de deux variétés d'une même plante la sensibilité de l'acoustique picoseconde à une cellule donnée sera étudiée ainsi que la sensibilité aux différents organites présents dans la cellule. La possibilité d'imagerie cellulaire par acoustique picoseconde sera finalement démontrée.

3.1) Présentation des cellules et du modèle analytique correspondant

3.1.1) Présentation des cellules d'*allium cepa*

La cellule végétale, en plus de contenir le cytoplasme et un noyau, contient quelques organites spécifiques à son état végétal appelé les plastes. Ceux-ci participent notamment à la photosynthèse nécessaire au développement de la plante. Beaucoup de cellules végétales, et particulièrement les cellules matures, contiennent une seule grande vacuole centrale, qui occupe approximativement 90% du volume cellulaire. Les plantes étant pratiquement immobiles et fixées dans le sol, elles sont tributaires du milieu qui les entoure et elles ont donc appris à s'adapter à celui-ci. Cette remarquable résistance se retrouve jusqu'à leur plus petit constituant, la cellule, ce qui permet de les étudier dans des conditions *in vitro* simples, sans avoir à contrôler leur environnement extérieur le temps des acquisitions expérimentales.

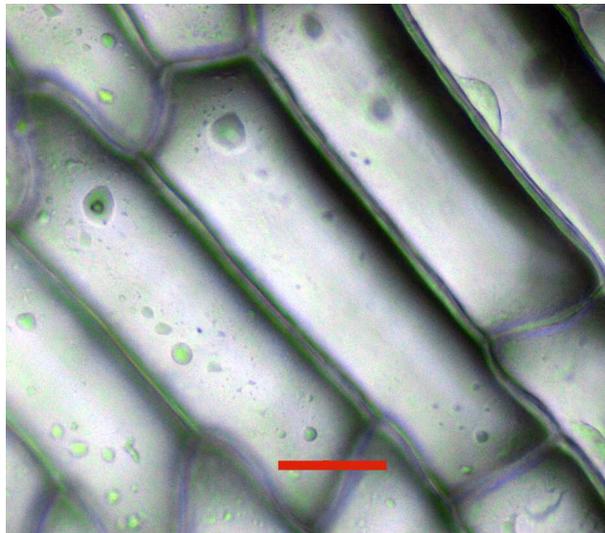


Figure 3-1 : Photographie de cellule d'oignon blanc *in vitro* prise en microscopie optique de réflexion. La barre d'échelle représente 50 μm . Les noyaux des cellules sont clairement visibles, ce sont les plus grosses hétérogénéités à l'intérieur des cellules. L'épaisse paroi délimite les cellules entre elles et confère à la cellule sa forme parallélipédique. La vacuole, transparente et homogène, occupe la très grande majorité du volume des cellules. Différents plastes sont aussi visibles à l'intérieur des cellules.

L'étude proposée sur cellules végétales est réalisée sur cellules d'*allium cepa*, c'est-à-dire l'oignon commun. Deux variétés d'oignon seront étudiées, les oignons blancs et les oignons jaunes, ce qui permettra une première approche de la sensibilité de l'acoustique picoseconde appliquée à l'étude des cellules biologiques. Les dimensions des cellules d'oignon sont de quelques centaines de micromètres pour leur longueur, une cinquantaine de micromètre pour leur largeur et autour de dix micromètres pour l'épaisseur. [114] Une photographie de cellules d'oignon blanc est présentée sur la figure 3-1. Cette photographie est

prise avec un objectif de microscope de grossissement 20x aussi la barre d'échelle rouge représente 50 μm . La paroi cellulaire, qui définit le contour des cellules, le noyau, plus gros organe sphérique dans la cellule, et la vacuole centrale sont clairement visibles.

3.1.2) Protocole expérimental et principe du modèle associé

L'extraction cellulaire est réalisée en prenant la fine pellicule présente entre les écailles d'un bulbe d'oignon. Cette pellicule est monocouche. Les cellules sont posées sur un substrat de Ti-6Al-4V, un alliage de titane biocompatible. Ce substrat mesure en moyenne 1 millimètre d'épaisseur, il est donc semi-infini du point de vue de l'acoustique picoseconde. Un polissage de la face de ce substrat en contact avec la cellule est systématiquement fait avant expérience. Le protocole de polissage est le même que celui proposé par G. Forget dans son travail de doctorat. [115] Une surface de substrat avec une rugosité de l'ordre du nanomètre est obtenue. La cellule étant optiquement transparente, le laser passe au travers de la cellule sans perdre d'énergie de rayonnement dans la cellule et sa focalisation est localisée en surface du substrat, à incidence normale par rapport à ce dernier. Un objectif de microscope 50x est utilisé pour la focalisation. La tache focale du faisceau laser est alors mesurée à 2 micromètres de diamètre. La fluence de pompe est réduite avant focalisation laser à 0,5 picojoule par impulsion laser et la fluence de sonde est moitié moindre.

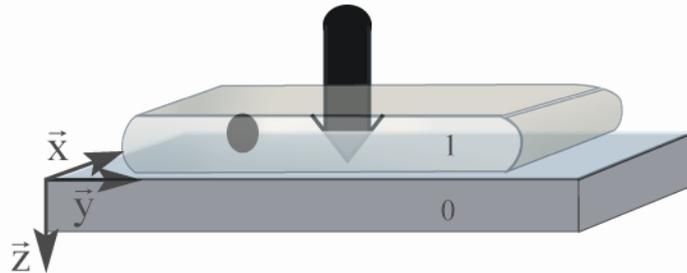


Figure 3-2 : Principe géométrique de la modélisation proposée. Le substrat correspond au milieu semi-infini indicé 0, la cellule au milieu indicé 1. L'interface entre les deux milieux est située dans le plan $z=0$. Le dépôt d'énergie laser a lieu au voisinage de l'interface, coté substrat.

Le principe expérimental du travail proposé est présenté sur la figure 3-2 : le laser pompe, représenté par la flèche noire, passe à travers la cellule, définie comme le milieu 1, et est focalisé en surface du substrat, milieu 0. L'absorption du laser a lieu dans le substrat, au voisinage de l'interface. Ce matériau est vu comme étant semi-infini.

La cellule étant un matériau viscoélastique, [89] la distance de propagation acoustique à l'intérieur de celle-ci est inférieure à celle parcourue dans l'eau avec le même protocole

expérimental. Or, la distance de propagation acoustique mesurée en acoustique picoseconde dans l'eau est de l'ordre de 5 micromètres, [18] soit moins que l'épaisseur d'une cellule d'oignon. La cellule d'oignon est donc vue comme un matériau semi-infini du point de vue de l'acoustique picoseconde. [116]

La géométrie du modèle analytique proposé correspond à l'étude de deux milieux semi-infinis. Les distances de diffusion thermique et de propagation acoustique étant inférieures ou du même ordre de grandeur que la zone excitée, et la cellule d'oignon étant supposée isotrope sur la zone étudiée, le problème correspond à l'étude du rayonnement d'un piston plan dans un milieu isotrope en champ proche. On considère alors une géométrie unidimensionnelle dont la variable d'espace est celle de la direction de propagation de la perturbation, \vec{z} . Le plan défini par $z=0$ correspond à l'interface entre le substrat et la cellule. Chaque demi-espace est indicé, le demi espace d'abscisses positives est celui défini par le substrat, $i=0$, et le demi espace d'abscisses négatives correspond à la cellule, $i=1$. Les équations fondamentales proposées seront systématiquement résolues analytiquement dans l'espace de Fourier. Les simulations dans l'espace temporel seront obtenues en utilisant une transformation inverse numérique. On utilisera comme définition de la transformation directe de Fourier la convention suivante :

$$f(z, \omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(z, t) e^{-j\omega t} dt, \quad (3.1)$$

3.2) Simulation analytique et ajustement numérique du modèle

3.2.1) Élévation et diffusion de la chaleur aux temps caractéristiques d'acoustique picoseconde

Afin de prendre en compte dans le modèle les transferts thermiques et leur diffusion, on résout l'équation de diffusion de la chaleur pour les deux milieux semi-infinis. Celle-ci s'écrit dans l'espace temporel comme suit :

$$\rho_i C_{pi} \frac{\partial T_i(z, t)}{\partial t} - \kappa_i \frac{\partial^2 T_i(z, t)}{\partial z^2} = Q_i(z, t), \quad (3.2)$$

où $T_i(z, t)$ et $Q_i(z, t)$ sont les champs de température et les termes sources de l'équation de diffusion dans le milieu i . ρ_i , C_{pi} et κ_i représentent respectivement la densité, la chaleur spécifique et la conductivité thermique dans le milieu i . La cellule étant considérée comme transparente, il n'y a pas d'absorption d'énergie laser dans la cellule et donc pas de terme source dans l'équation de diffusion indiquée $i=1$. En revanche, concernant le substrat, une partie de l'énergie du laser incidente est absorbée dans sa zone de pénétration optique. Dès

lors, le terme source de l'équation de diffusion, indiquée $i=0$, est non nul. Ce dernier est défini par le produit de deux fonctions. L'une définit le volume d'absorption de la source, il est donc lié aux propriétés optiques du substrat à la longueur d'onde de la pompe laser, et l'autre modélise le profil temporel de l'impulsion. Le terme source thermique dans le substrat s'écrit comme suit :

$$Q_0(z,t) = I_1(1 - R_{10})\beta_0 f(t)e^{-\beta_0 z}, \quad (3.3)$$

I_1 , R_{10} , β_0 traduisent respectivement la fluence laser incidente traversant la cellule, le coefficient de réflexion optique en puissance à l'interface cellule/substrat et la pénétration optique dans le substrat à la longueur d'onde de la pompe laser. La forme temporelle de l'impulsion pompe du laser est définie par la fonction $f(t)$. Cette forme temporelle d'impulsion est modélisée par une gaussienne normalisée en imposant l'intégrale unité sur son support. Sa largeur à mi-hauteur τ_p correspond à la largeur temporelle de l'impulsion laser, 100 fs. L'écriture analytique de cette gaussienne est : [117]

$$f(t) = \frac{1}{\tau_p} \sqrt{\frac{4 \ln 2}{\pi}} e^{-\frac{(4 \ln 2)t^2}{\tau_p^2}}. \quad (3.4)$$

Dans l'espace de Fourier, l'équation (3.2) se réécrit comme suit :

$$\frac{\partial^2 T_i(z, \omega)}{\partial z^2} - \frac{j\omega}{\chi_i} T_i(z, \omega) = -\frac{Q_i(z, \omega)}{\kappa_i}, \quad (3.5)$$

où :

$$\chi_i = \frac{\kappa_i}{\rho_i C_{pi}}, \quad (3.6)$$

est la diffusivité thermique du milieu i , propriété intrinsèque de transport de l'énergie thermique du matériau. Pour les ondes thermiques, la longueur de diffusion thermique $\Lambda_i(\omega)$ est :

$$\Lambda_i(\omega) = \sqrt{\frac{2\chi_i}{\omega}}. \quad (3.7)$$

Cette longueur de diffusion thermique permet de faire apparaître le nombre d'onde complexe de diffusion thermique, $\Gamma_i(\omega) = (1+j)/\Lambda_i(\omega)$. Dans l'espace des fréquences, le nombre d'onde de diffusion est complexe et ses parties réelle et imaginaire sont égales. Il suit une loi en racine carrée par rapport à la fréquence. Ces remarquables propriétés affectent considérablement le comportement des ondes thermiques aux interfaces, comparativement aux ondes acoustiques ou électromagnétiques. Ainsi, les ondes de diffusion thermique obéissent plus à des lois d'accumulation ou de diminution plutôt qu'à des lois de réflexion ou

transmission aux interfaces. [118] La modélisation proposée prend en compte cette éventuelle discontinuité de la température à l'interface entre le substrat et la cellule par l'introduction d'une résistance thermique d'interface, R , qui permet de modéliser un saut de température à l'interface entre les deux milieux :

$$T_0(0,t) - T_1(0,t) = R\Phi_0(0,t). \quad (3.8)$$

On suppose en revanche que la continuité du flux thermique Φ_i est respectée :

$$\Phi_0(0,t) = \Phi_1(0,t), \quad (3.9)$$

La résistance thermique d'interface modélisée peut être assimilée à une résistance de Kapitza. [119] Elle permet de prendre en compte la qualité de transmission d'énergie thermique à l'interface entre deux milieux, c'est-à-dire la quantité d'accumulation ou de transmission d'énergie calorifique à l'interface. Expérimentalement, cette transmission d'énergie thermique à l'interface est fonction de nombreux paramètres, comme la rugosité qui modifie la surface d'interface pour une zone d'éclairement laser donnée. Pour une interface définie entre un solide et un liquide, on définit la résistance thermique par $R=1/h$, où h est la longueur de Kapitza, $h=C_{p10}/G$, avec C_{p10} qui est la conductivité thermique d'interface par unité de surface de la résistance d'interface et G est sa conductance thermique. Pour ce type d'interface solide/liquide, le caractère hydrophobe ou hydrophile du solide modifie la valeur de cette distance de Kapitza et des rapports de longueur 2 à 3 peuvent être mesurés par des techniques expérimentales de thermoréflexance picoseconde. [120] La modification de cette affinité du substrat à l'eau est facilement obtenue par voie chimique, par fonctionnalisation du substrat, ce qui peut arriver lorsque l'adhésion cellulaire sur biomatériau est stimulée par ajout de protéines par exemple.

Depuis l'interface le champ thermique associé à chaque milieu i est supposé unidirectionnel, les solutions du champ d'onde thermique sont :

$$\begin{aligned} T_0(z, \omega) &= A_0(\omega)e^{-\Gamma_0 z} + F_0(\omega)e^{-\beta_0 z} \\ &= \frac{\beta_0 I f(\omega)}{(\beta_0^2 - \Gamma_0^2) K_0} \left(\frac{(K_1 \Gamma_1 (1 + \beta_0 R K_0) + \beta_0 \Gamma_0)}{(K_1 \Gamma_1 (1 + K_0 R \Gamma_0) + K_0 \Gamma_0)} e^{-\Gamma_0 z} - e^{-\beta_0 z} \right), \end{aligned} \quad (3.10)$$

dans le substrat et :

$$\begin{aligned} T_1(z, \omega) &= B_1(\omega)e^{\Gamma_1 z} \\ &= \frac{\beta_0 I f(\omega)}{(\beta_0 + \Gamma_0)(K_1 \Gamma_1 (1 + R K_0 \Gamma_0) + K_1 \Gamma_1)} e^{\Gamma_1 z}, \end{aligned} \quad (3.11)$$

dans le milieu 1.

Les propriétés thermiques d'une cellule étant très difficiles à obtenir dans la littérature et une cellule étant essentiellement composée d'eau, les simulations pour quantifier l'élévation thermique seront proposées sur la base d'un modèle titane/eau. Les paramètres thermiques utilisés pour les simulations de l'élévation thermique dans le titane et dans l'eau sont donnés dans le tableau 3-1 :

| | C_{pi} [J.Kg ⁻¹ .K ⁻¹] | κ_i [W.m ⁻¹ .K ⁻¹] | ρ_i [kg.m ⁻³] | β_i [m ⁻¹] | χ_i 10 ⁻⁷ [m ² .s ⁻¹] | $A_i(100 \times 10^{-12} \text{s})$ 10 ⁻⁹ [m] |
|--------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Eau | 4190 | 0,6 | 1000 | - | 1,43 | 6,7 |
| Titane | 500 | 21,9 | 4507 | 5,2 x 10 ⁷ | 97,1 | 44,1 |

Tableau 3-1 : Valeurs physiques de l'eau et de l'alliage de titane utilisées pour simuler l'étude thermique.

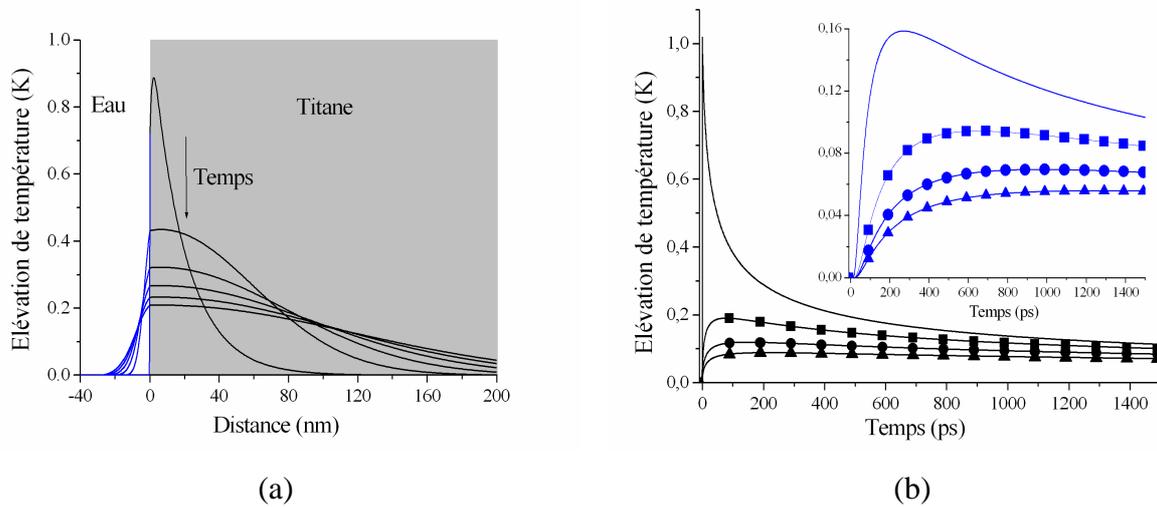


Figure 3-3 : Élévation de température au voisinage de l'interface suite à une impulsion laser. (a) Élévation pour une résistance thermique nulle, $R=0 \text{ K.W}^{-1}$, et des temps allant de $t=0$ à 100 ps par incréments de 20 ps en fonction de la distance à l'interface. (b) Élévation de température à l'interface et à 10 nm de l'interface coté liquide (encart) pour $R=[0 \text{ (lignes)}, 10 \text{ (carrés)}, 20 \text{ (ronds)}, 30 \text{ (triangles)}] 10^{-9} \text{ K.W}^{-1}$. [121]

La figure 3-3 présente l'élévation de température créée par une impulsion laser pour la fluence utilisée en expérience sur les cellules d'oignon, $0,5 \text{ pJ}$ par impulsion laser focalisée sur une tache de $2 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. La figure (a) correspond à l'élévation de température pour des temps de 0 à 100 picosecondes par pas de 20 picosecondes en fonction de la distance à l'interface, pour une résistance thermique d'interface nulle. [121] La figure (b) présente l'élévation de température en fonction du temps, à l'interface et à 10 nm de l'interface, coté cellule (encart). Quatre valeurs de résistance thermique sont simulées, de $R=0$ à $R=30 \times 10^{-9} \text{ K.W}^{-1}$ par pas de 10^{-9} K.W^{-1} .

L'élévation thermique maximale est située à l'interface, à $t=0$. Du côté du liquide, le saut de température maximal est simulé pour $R=0 \text{ K.W}^{-1}$ et son amplitude est autour de 1°K , comme dans le substrat*. Pour un point fixe dans la cellule, l'amplitude de l'élévation thermique dans la cellule décroît et est retardée lorsque la résistance thermique augmente, figure 3-3(b). *A contrario*, dans le substrat, l'élévation thermique augmente avec l'augmentation de la résistance thermique : la résistance thermique modélisant une difficulté pour la chaleur à être relaxée depuis le titane vers la cellule, l'accumulation thermique à cette interface augmente lorsque la résistance de Kapitza augmente. Le modèle asymptotique correspondant à l'augmentation de la résistance thermique est une interface isolée thermiquement. La diffusion thermique est approximativement 70 fois plus élevée dans le titane que dans le milieu aqueux, la longueur de diffusion sur 100 ps est de moins de 10 nm dans la cellule et 45 nm dans le titane, figure 3-3(a) et tableau 3-1. La relaxation thermique se fait donc essentiellement dans le titane. On peut déduire de ces simulations que l'effet thermique d'un tir laser est négligeable pour la cellule, l'élévation maximale de température étant au maximum de l'ordre du degré Kelvin si l'on néglige les effets de la résistance thermique et la diffusion thermique se faisant essentiellement dans le titane. B. Perrin propose une quantification de l'élévation thermique due à une impulsion laser dans un film de titane. [122] En appliquant une règle de proportionnalité sur la fluence laser utilisée, l'ordre de grandeur d'élévation de température à la surface du matériau est retrouvé avec cependant un rapport 3 qui peut être expliqué par la différence des matériaux, alliage de titane *versus* titane, par la différence des modèles, modèle avec diffusion thermique *versus* modèle sans diffusion, par la configuration géométrique, interface solide/liquide *versus* film simple.

L'effet thermique de la répétition des impulsions lasers pompes n'a pas été simulé avec le modèle présenté. Celui-ci ne prendrait pas suffisamment en compte la réalité physique de la diffusion thermique car la géométrie unidimensionnelle proposée ne permet pas la modélisation des effets de diffusion thermique latérale qui deviennent non négligeables aux temps longs. Ainsi, un modèle unidimensionnel décrivant une élévation thermique suite à un apport continu d'énergie est divergeant avec le temps alors que dans la réalité une température d'équilibre doit être atteinte. Une étude bibliographique a cependant permis d'estimer cette élévation thermique. L'élévation thermique stationnaire dans un matériau semi-infini, isotrope

* On néglige dans ce calcul d'élévation thermique dans le substrat les températures électroniques qui, sur un temps bien plus court, peuvent s'élever de plusieurs dizaines de degrés.

thermiquement, due à une source énergétique ponctuelle située à une interface air/matériau peut être évaluée asymptotiquement par la relation suivante : [123]

$$\Delta T_i = \frac{A}{2\sqrt{\pi w_0 \kappa_i}}, \quad (3.12)$$

où A est l'intensité de la source thermique, w_0 est la surface de dépôt, κ_i est la conductivité thermique du matériau. Appliquée sur le temps de modulation acousto-optique, la fluence équivalente du laser est de $50 \mu\text{W}$, ce qui implique alors une élévation thermique de $0,5 \text{ K}$. Sur le temps d'une acquisition expérimentale, la fluence équivalente est $100 \mu\text{W}$, on trouve alors une élévation thermique de 1 K . On notera que cette estimation majore la réalité car la diffusion thermique dans la cellule n'est pas prise en compte. Ce calcul permet aussi de prendre en compte la fluence laser apportée par la sonde. En supposant que celle-ci est absorbée pareillement que la pompe par le substrat, et considérant que sa fluence est moitié moindre que celle de la pompe, les élévations thermiques quantifiées doivent être multipliées par un et demi. La vérification expérimentale de cette estimation sera réalisée au paragraphe 3.3.1.

3.2.2) Propagation acoustique et contrainte mécanique développée

Suite à l'élévation thermique créée par la pompe, une contrainte mécanique due à la dilatation thermique des matériaux est générée. Cette contrainte est la source de la propagation acoustique étudiée. L'équation d'onde dans l'espace temporel régissant la propagation acoustique et prenant en compte l'effet de la dilatation thermique comme source acoustique est :

$$C_i \frac{\partial^2 u_i(z,t)}{\partial z^2} - \rho_i \frac{\partial^2 u_i(z,t)}{\partial t^2} = C_i \alpha_i \frac{\partial T_i(z,t)}{\partial z}, \quad (3.13)$$

où u_i est le déplacement mécanique dans le milieu i . La rigidité du matériau i est notée C_i et α_i représente sa dilatation thermique linéaire.

Une des caractéristiques remarquables de la cellule concerne ses propriétés viscoélastiques, [124] aussi l'onde acoustique est elle fortement atténuée lors de sa propagation. Les sources essentielles de l'atténuation acoustique sont des transferts d'énergie mécanique en énergie thermique lors de la propagation acoustique et sont liées au mécanisme d'Akhieser. Le transfert d'énergie mécanique en énergie thermique est créé par une conduction irréversible de la chaleur de la zone de compression vers la zone de dépression lors de la propagation d'une onde acoustique longitudinale. Les ondes traverses ne sont donc pas soumises à cette source d'atténuation. Le mécanisme d'Akhieser [125] est lié à une

perturbation de l'état d'équilibre thermique d'un matériau, défini par un certain phonon thermique, lors du passage d'une onde acoustique. En revenant à leur équilibre, les phonons thermiques interagissent avec l'onde acoustique, ceci ayant pour effet de dissiper l'énergie de l'onde acoustique. Il s'agit donc d'un couplage réciproque entre les phénomènes de diffusion thermique et de propagation acoustique. [125] Ces deux mécanismes d'atténuation acoustique peuvent intervenir en acoustique picoseconde selon la température de l'échantillon étudié et de la longueur d'onde des phonons acoustiques générés. [126] Cependant, si les mécanismes physiques de ces deux processus physiques sont distincts, l'atténuation acoustique qui en résulte est, pour les deux contributions, classiquement considérée comme étant proportionnelle au carré de la pulsation acoustique. Afin de prendre en compte cette atténuation acoustique pour les deux matériaux considérés, leur rigidité est supposée complexe. Leur partie réelle est constante et leur partie imaginaire évolue linéairement avec la fréquence. L'atténuation modélisée ainsi évolue avec le carré de la pulsation de propagation acoustique. [125]

En considérant les expressions de la diffusion thermique pour les deux milieux matériels et l'équation (3.13), trois sources de génération acoustique apparaissent dans le modèle considéré : une source thermique par milieu et une source liée à l'absorption optique dans le substrat. En effectuant une transformation de Fourier sur la variable temporelle de l'équation (3.13), celle-ci se réduit à une équation linéaire du second ordre qui permet de faire apparaître les nombres d'onde acoustiques : $k_i = \omega \sqrt{\rho_i / C_i}$ et les expressions des champs de déplacement dans l'espace fréquentiel du problème acoustique sont :

$$U_0(z, \omega) = G_0(\omega) e^{-jk_0 z} + I_0(\omega) e^{-\Gamma_0 z} + L_0(\omega) e^{-\beta_0 z}, \quad (3.14)$$

pour le substrat, et

$$U_1(z, \omega) = H_1(\omega) e^{jk_1 z} + J_1(\omega) e^{\Gamma_1 z}, \quad (3.15)$$

pour le milieu cellulaire. Dans les expressions des champs de déplacements, équations (3.14) et (3.15), apparaissent les solutions de l'équation homogène, équation sans terme source, et les trois solutions de l'équation inhomogène. Le détail du calcul prenant en compte les conditions limites pour déterminer l'amplitude des constantes d'intégration de l'équation d'onde acoustique homogène, les termes d'amplitude G_0 et H_1 , est fourni en annexe A.1.1. Ces conditions limites sont la continuité des déplacements et des contraintes à l'interface. La continuité de la contrainte à l'interface prend en compte les sources de contraintes mécanique

et thermique. L'expression des champs de propagation de la déformation s'obtient en dérivant spatialement les expressions du champ de déplacement.

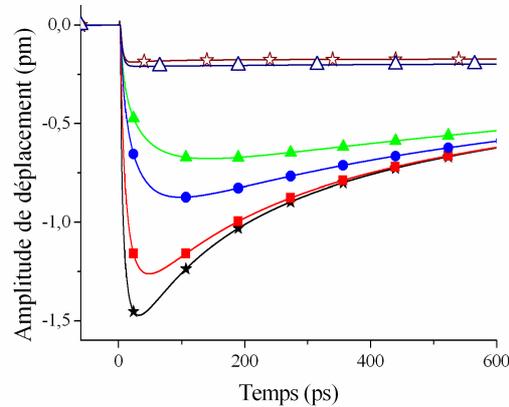


Figure 3-4 : Simulation du déplacement acoustique dans la cellule (propriétés mécaniques données dans le tableau 3-3, section 3.2.5), à 5 nm de l'interface, en fonction du temps et de la résistance thermique. Les symboles pleins correspondent aux modélisations où le terme source de l'équation d'onde dans la cellule est pris en compte, les symboles vides aux simulations où il est égal à zéro. Les résistances thermiques simulées sont de $R=[0$ (étoile), 1 (carrés), 5 (ronds), 10 (triangles)] 10^{-9} K.W^{-1} .

Le déplacement à 5 nm de l'interface est simulé en fonction de la résistance R et de la source acoustique dans la cellule sur la figure 3-4. Les tracés sans prise en compte du terme source sont ceux avec un symbole vide, et les tracés avec symbole plein sont ceux où le terme source acoustique est pris en compte. Deux valeurs de résistances thermiques sont supposées lorsque le terme source acoustique de la cellule est négligé, une résistance thermique nulle et une résistance thermique non nulle, $R=10^{-8} \text{ K.W}^{-1}$. Le signal acoustique dans la cellule est de plus forte amplitude lorsque la résistance thermique est augmentée. Ceci vient du fait que lorsque la valeur de la résistance thermique augmente, l'élévation thermique dans le titane augmente, ce qui a pour effet d'augmenter le déplacement créé par la dilatation thermique, seule source acoustique dans la cellule générée par les conditions de continuité de déplacement à l'interface. Lorsque le terme source acoustique de la cellule est pris en compte, l'augmentation de la valeur de la résistance thermique diminue l'amplitude du signal acoustique. Ceci vient du fait que lorsque la résistance de Kapitza augmente, le gradient spatial thermique dans la cellule diminue, ce qui diminue la contribution du terme source de l'équation (3.13) et diminue donc la contribution de cette source.

La contrainte créée par une impulsion laser à l'interface entre les deux milieux est quantifiée en fonction de la résistance thermique et présentée sur la figure 3-5. [121]

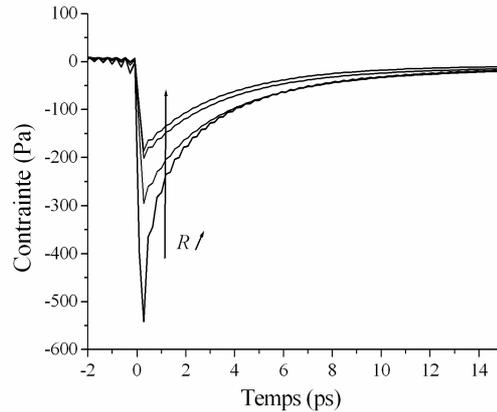


Figure 3-5 : Simulation de la contrainte générée à interface entre du titane et de l'eau pour une fluence laser de 16 mJ/m^2 en fonction du temps et de la résistance thermique d'interface. Les valeurs des résistances de Kapitza considérées dans cette simulation sont $R=[0, 1, 5, 10] 10^{-9} \text{ K.W}^{-1}$. [121]

Comme attendu, la résistance thermique joue un rôle important dans l'amplitude de cette contrainte. La contrainte maximale est divisée par deux si on modélise la résistance thermique avec une valeur de $R = 1 \text{ K.W}^{-1}$, ensuite cette diminution atteint un plateau. Ce plateau correspond à la contrainte créée par le déplacement mécanique dû à l'absorption optique uniquement, lorsque la contribution de la contrainte mécanique tend vers zéro. Le signe de cette contrainte indique que c'est une contrainte de compression qui est créée dans la cellule, ceci étant dû à la dilatation thermique positive du substrat.

3.2.3) Détection optique

3.2.3.1) Réponse fondamentale de la diffraction optique

La détection optique de l'élévation thermique et de la propagation acoustique créées par l'impulsion pompe du laser et détectées par l'impulsion sonde est maintenant abordée. Cette détection étant optique, on résout l'équation d'onde optique de Maxwell où les perturbations d'origine thermique et mécanique de la propagation électromagnétique sont prises en compte. Ces deux perturbations transitoires créent dans la cellule des fluctuations de densité, très faibles, lesquelles produisent une variation proportionnelle de la constante diélectrique ϵ_i . [6] On suppose alors que la variation de permittivité diélectrique du matériau ϵ_i^s est linéaire avec les sources de perturbations et peut être écrite comme suit : [127]

$$\epsilon_i^s(z) = \frac{\partial n_i}{\partial T} T_i(z) + \frac{\partial n_i}{\partial \eta} \eta_i(z), \quad (3.16)$$

où η est la déformation acoustique. L'équation d'onde non-linéaire de Maxwell d'un milieu amagnétique dont la permittivité est fonction de l'espace est : [128]

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_i(z, \omega_0)}{\partial z^2} + q^2 \varepsilon_i(z) \vec{E}_i(z, \omega_0) = 0, \quad (3.17)$$

où $E_i(z, \omega_0)$ est le champ électrique dans le milieu i et q et ω_0 sont la norme du nombre d'onde optique et sa pulsation dans le vide. L'inhomogénéité spatiale de la permittivité diélectrique est supposée faible, aussi une approximation par un développement au premier ordre de cette inhomogénéité est réalisée :

$$\varepsilon_i(z) = \varepsilon_i^h + \varepsilon_i^s(z). \quad (3.18)$$

Les notations h et s décrivent respectivement les termes homogènes et les termes perturbés. Cette inhomogénéité spatiale de la permittivité diélectrique crée une source de diffraction optique lorsqu'un rayon lumineux la traverse. En supposant que la perturbation optique est faible, le champ électrique total dans le milieu i est développé au premier ordre comme étant la somme de deux contributions, l'une est homogène, c'est-à-dire qu'elle est insensible à la source de perturbation, et l'autre est perturbée par les sources de variation de permittivité de la cellule :

$$\vec{E}_i(z, \omega_0) = \vec{E}_i^h(z, \omega_0) + \vec{E}_i^s(z, \omega_0), \quad (3.19)$$

En injectant les relations (3.19) et (3.18) dans l'équation (3.17), cette dernière peut être réécrite en un système couplé de deux équations d'onde. La première équation d'onde décrit la propagation du champ électrique homogène dans le milieu homogène :

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_i^h(z, \omega_0)}{\partial z^2} + q^2 \varepsilon_i^h \vec{E}_i^h(z, \omega_0) = 0. \quad (3.20)$$

La seconde équation décrit la propagation du champ électrique perturbé par les fluctuations de densité :

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_i^s(z, \omega_0)}{\partial z^2} + q^2 \varepsilon_i^h \vec{E}_i^s(z, \omega_0) = -q^2 \varepsilon_i^s(z) \vec{E}_i^h(z, \omega_0). \quad (3.21)$$

Ces deux équations régissent la propagation optique totale dans la cellule. La solution de l'équation (3.20) décrit la propagation du champ optique homogène dans la cellule, donc la contribution de la détection sans diffraction optique. La solution particulière de l'équation (3.21) permet d'obtenir l'expression analytique de la contribution optique diffractée par la perturbation. Cette équation n'ayant de sens que s'il y a une source de perturbation optique, traduite mathématiquement par le terme source de (3.21), la solution homogène de l'équation (3.21) est la solution de l'équation d'onde optique sans perturbation, équation (3.20), elle n'est donc pas recalculée. La polarisation du champ électrique est orthogonale au champ de

propagation, elle peut être indifféremment définie selon \bar{x} ou \bar{y} . En utilisant la relation de Maxwell, $\epsilon_i^h = (n_i^h)^2$, la solution générale de l'équation (3.20) est :

$$\vec{E}_i^h(z, \omega_0) = \left(M_i^h e^{-jqn_i^h z} + N_i^h e^{jqn_i^h z} \right) \bar{x}. \quad (3.22)$$

Cette solution décrit la propagation de deux rayons optiques de direction opposée en milieu homogène infini. La référence des phases de ces rayons est déterminée en utilisant les conditions aux limites de la modélisation. La solution particulière de l'équation (3.21) est : [129]

$$\vec{E}_i^s(z, \omega_0) = \frac{-jq}{2n_i^h} \left(\begin{array}{l} \left(M_i^h \int \epsilon_i^s(z') dz' + N_i^h \int \epsilon_i^s(z') e^{2jqn_i^h z'} dz' \right) e^{-jqn_i^h z} \\ - \left(M_i^h \int \epsilon_i^s(z') e^{-2jqn_i^h z'} dz' + N_i^h \int \epsilon_i^s(z') dz' \right) e^{jqn_i^h z} \end{array} \right) \bar{x}. \quad (3.23)$$

L'expression (3.23) décrit la réponse de la diffraction optique au premier ordre créée par une source de diffraction optique du premier ordre. [130] Elle est connue sous le terme d'équation de potentiel de diffraction. [128] Aux quatre termes différents de l'expression (3.23) correspondent quatre rayons optiques différents. L'amplitude, la phase et la direction de propagation permettent d'identifier ces rayons. L'amplitude des termes, M_i^h ou N_i^h , permet d'identifier la source optique homogène du rayon diffracté, c'est-à-dire le rayon optique homogène, décrit par la relation (3.22), dont est issue la diffraction optique. Les termes où un déphasage de $\pm 2qn_i^h z'$ apparaît correspondent aux rayons réfléchis sur la source de diffraction optique et les termes sans déphasage correspondent aux rayons transmis sur cette même source de diffraction.

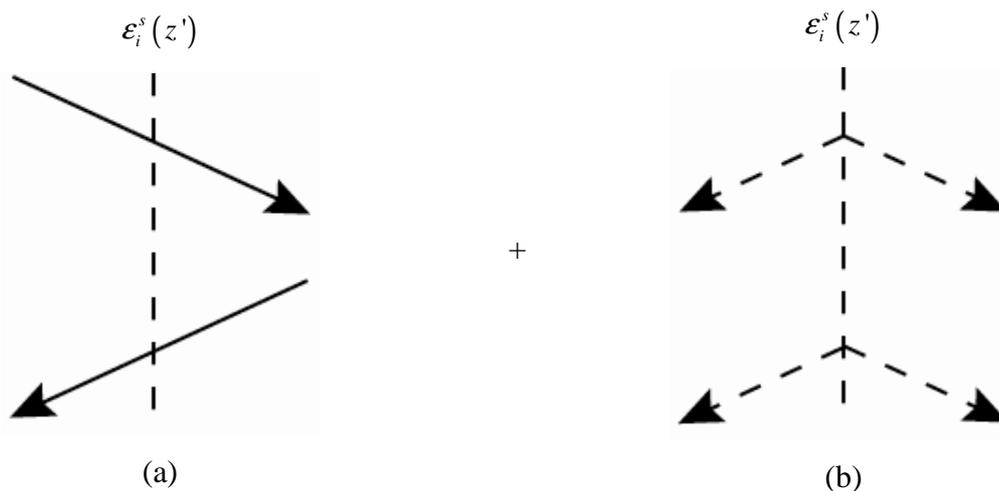


Figure 3-6 : représentation en optique géométrique de la propagation électromagnétique dans un milieu dont la permittivité diélectrique est légèrement perturbée en un plan de l'espace. La majeure partie du champ électromagnétique est aveugle à la perturbation (a) et le reste est diffracté sur cette perturbation (b). Les diffractions optiques sont en réflexion et en transmission.

Indépendamment du signe des amplitudes M_i^h ou N_i^h des rayons homogènes, défini par les conditions limites, les rayons issus d'un même rayon porteur homogène et diffracté en réflexion et en transmission sur la perturbation sont déphasés entre eux de π . Une représentation des rayons identifiés par les relations (3.22) et (3.23) est proposée sur la figure 3-6. La source de diffraction optique est représentée par la ligne pointillée localisée en z' . Aux flèches en traits pleins correspondent les rayons non perturbés, les rayons optiques définis par la relation (3.22) et aux flèches en pointillés correspondent les rayons optiques perturbés sur la variation de densité du milieu, les rayons définis par la relation (3.23). La figure 3-6(a) est une représentation du champ électrique non diffracté sur la variation de densité alors que la figure 3-6(b) représente les rayons optiques sensibles à cette fluctuation, identifiés à l'aide de la solution (3.23). Chaque rayon optique représenté sur la figure 3-6(a) est la source de deux rayons diffractés sur la perturbation, l'un en transmission et l'autre en réflexion, présentés sur la figure 3-6(b). Le champ optique total solution de l'équation (3.17) est la somme de tous les rayons identifiés.

3.2.3.2) Application à un milieu transparent semi-infini

Les conditions limites sont appliquées sur tout le champ électrique, équations (3.22) et (3.23). Les développements analytiques sont donnés en annexe A.1.2. Ces conditions limites sont la continuité du champ magnétique et électrique à l'interface, dont le déplacement mécanique dû à la propagation acoustique doit être pris en compte. Le rayon optique homogène incident est défini comme étant la sonde laser, aussi son amplitude est supposée connue par la mesure de sa puissance sur le banc expérimental. Un seul rayon optique transmis est considéré dans le substrat et la diffraction optique dans ce milieu n'est pas prise en compte. Une justification de cette approximation sera fournie dans la prochaine section. L'expression (3.24), obtenue après prise en compte des conditions limites, correspond au champ électrique détecté, c'est-à-dire le champ réfléchi. Deux contributions sont alors identifiées. Le champ optique homogène est sensible au déplacement de l'interface et le champ optique diffracté dans la cellule est à l'origine de la détection acousto-optique.

$$\vec{E}_1(z, \omega_0) = M_1^h \left[r_{10} e^{-2jqn_1^h u_0} + \frac{jq}{4n_1^h} \left(\int \epsilon_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' - r_{10}^2 e^{-4jqn_1^h u_0} \int \epsilon_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' \right) \right] e^{jqn_1^h z} \vec{x}. \quad (3.24)$$

Ces deux processus de détection peuvent facilement être compris à partir des explications données précédemment sur la solution fondamentale, équations (3.22) et (3.23), et du schéma proposé, figure 3-7. Sur cette figure, on présente la détection optique correspondant au cas d'un milieu transparent semi-infini accolé à un substrat opaque semi-

infini lui aussi. Le déplacement de l'interface, créé par le champ acoustique, est représenté par la ligne horizontale en pointillés.

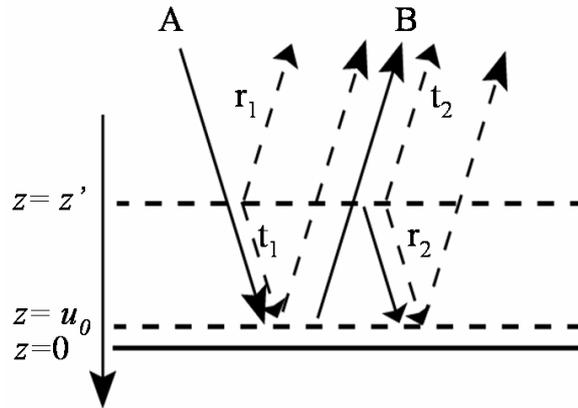


Figure 3-7 : Schéma en optique géométrique des rayons contribuant à la détection optique réalisée en expériences sur cellule d'oignon. Les traits pleins sont les rayons non perturbés par la variation de permittivité diélectrique localisée en z' . L'interface est en $z=0$ et son déplacement est symbolisé par la droite en pointillés. Les flèches en pointillés représentent les rayons optiques diffractés sur la source.

Les flèches en trait pleins sont les porteuses optiques, c'est-à-dire les rayons optiques non sensibles à la perturbation acoustique dans le milieu 1, dont sont issus les rayons diffractés. Les rayons diffractés sont représentés par les flèches en traits pointillés, leur source de perturbation optique est représentée par la droite horizontale tracée en pointillés. Le rayon en trait plein de gauche, noté A, correspond au faisceau sonde incident. Le rayon noté B est le rayon réfléchi du rayon sonde incident sur l'interface cellule/substrat. La référence des phases du champ optique est définie à l'interface, en l'absence de déplacement acoustique. Le rayon B est insensible à la source de perturbation optique dans le milieu 1, mais étant réfléchi sur l'interface, il peut être déphasé lorsque la perturbation acoustique crée un déplacement mécanique u_0 . Il correspond au premier terme de l'expression analytique (3.24). Le signe négatif de sa phase traduit l'avance de phase optique due à la réflexion sur l'interface lorsque celle-ci vibre. Ce rayon permet donc uniquement la détection du déplacement de l'interface. Les rayons notés r_i et t_i , $i=1,2$, correspondent aux rayons perturbés par la variation de permittivité diélectrique de la cellule. La notation r est réservée aux rayons perturbés en réflexion et la notation t aux rayons perturbés en transmission. L'indice i se réfère à la chronologie de la perturbation du rayon, les rayons indicés 1 sont donc les rayons diffractés de la porteuse optique A et les rayons indicés 2 sont les rayons diffractés de la porteuse optique B. La première perturbation se fait sur le rayon porteur A. Deux rayons sont diffractés, l'un en transmission et l'autre en réflexion. Le second terme de l'expression

analytique (3.24) correspond à ce rayon réfléchi. Il est en avance de phase de deux fois le trajet optique entre le lieu de la perturbation et la référence de phase. Comme ce rayon ne se réfléchit pas sur l'interface, son amplitude est indépendante du coefficient de réflexion optique à l'interface. Le rayon noté r_2 est réfléchi deux fois sur l'interface, ce qui implique que son amplitude est proportionnelle au carré du coefficient de réflexion optique à cette interface. Sa contribution apparaît dans le dernier terme de l'expression (3.24). De plus, cette double réflexion, combinée au fait que la propagation acoustique est vue comme étant statique vis-à-vis de la propagation optique, implique que le déphasage optique dû au mouvement de l'interface est égal à quatre fois le trajet optique de ce mouvement mécanique. Le déphasage de ce rayon optique est un retard de phase par rapport à la référence puisque le trajet optique de ce rayon est supérieur au trajet optique de référence. L'amplitude des rayons diffractés en transmission est la même en valeur absolue puisque les événements optiques qui déterminent cette amplitude sont les mêmes pour les deux rayons : une réflexion sur l'interface avec le substrat et une diffraction en transmission sur la permittivité diélectrique perturbée. Ces deux rayons ayant la même amplitude et étant en opposition de phase, ils interfèrent destructivement et leur contribution n'apparaît pas dans l'expression analytique du champ électrique réfléchi, équation (3.24).

L'expression de la détection optique obtenue équation (3.24), est finalement utilisée pour simuler la détection thermique et acoustique en exprimant la variation de permittivité diélectrique comme formulée équation (3.16) où l'expression (3.15) est insérée. L'intégration spatiale permet de sommer toutes les réponses fondamentales de diffraction sur l'épaisseur du matériau 1, un réseau de diffraction acoustique est ainsi créé et la contribution acousto-optique de la détection dans la cellule semi-infinie est finalement :

$$\vec{E}_1(z, \omega_0) = M_1^h \left[r_{10} + \frac{jq}{4n_1^h} \frac{\partial n_1}{\partial \eta} \left(\frac{H_1(\omega) e^{jk_1 u_0}}{k_1} \left(\frac{r_{10}^2}{k_1 + 2qn_1^h} - \frac{1}{k_1 - 2qn_1^h} \right) + \frac{J_1(\omega) e^{\Gamma_1 u_0}}{\Gamma_1} \left(\frac{1}{\Gamma_1 - 2jqn_1^h} - \frac{r_{10}^2}{\Gamma_1 + 2jqn_1^h} \right) \right) \right] e^{jqn_1^h(z-2u_0)\vec{x}}. \quad (3.25)$$

La propagation acoustique dans la cellule prend en compte la propagation libre et la propagation due à la relaxation de l'énergie thermique en énergie acoustique aussi ces deux contributions apparaissent explicitement dans l'équation (3.25). Les termes où apparaît le nombre d'onde acoustique sont associés à la propagation libre dans la cellule. Le nombre d'onde acoustique de cette propagation est réel, comme le nombre d'onde optique. Les deux peuvent alors interagir entre eux, ce qui se traduit mathématiquement par l'apparition d'un pôle dans le spectre de l'expression analytique de la détection :

$$k_1 \pm 2qn_1^h = 0. \quad (3.26)$$

Ces deux pôles correspondent aux modes de diffraction de Stokes et d'Anti-Stokes. [101] Le mode de Stokes correspond à la création d'un nouveau quantum d'énergie, signe + dans l'expression (3.26), et le mode Anti-Stokes à son annihilation, signe – dans l'expression (3.26). [131] L'expression (3.26) traduit la conservation des vecteurs d'onde lors de l'interférence acousto-optique et permet d'obtenir la relation fréquentielle des oscillations Brillouin à incidence normale :

$$f_B = \frac{2n_1^h v_1}{\lambda}. \quad (3.27)$$

On notera, d'après l'équation (3.25), que les modes Stokes et Anti-Stokes sont en opposition de phase. Aussi, l'amplitude maximale de la détection acousto-optique est maximale pour une configuration ne permettant qu'un seul mode d'interférence acousto-optique. Cette configuration expérimentale est obtenue si le coefficient de réflexion à l'interface est nul, auquel cas seul le mode Anti-Stokes apparaît. A l'inverse, si le coefficient de réflexion à l'interface substrat/cellule est unitaire, les modes de Stokes et d'Anti-Stokes sont de même amplitude et aucune interaction acousto-optique ne peut être détectée, il se passe alors la même interférence destructrice que pour les rayons diffractés transmis. [132]

Étant donné que la fréquence Brillouin est fonction du produit de l'indice optique et de la célérité acoustique, les deux valeurs sont corrélées dans la détection et il est nécessaire de connaître la valeur de l'un pour déterminer l'autre à partir de la mesure de cette fréquence. Le temps de vie du signal Brillouin est fonction des absorptions acoustique et optique de la cellule, déterminés par ses propriétés viscoélastique et l'indice d'absorption optique ainsi que de la longueur d'onde laser utilisée, équation (3.25). Comme pour la fréquence Brillouin, il n'est pas possible de quantifier séparément la contribution de l'un vis-à-vis de l'autre dans l'atténuation du signal Brillouin. Les termes de l'équation (3.25) où apparaît le nombre d'onde thermique sont associés à la source thermique de propagation acoustique dans la cellule. L'atténuation thermique étant très rapide, le réseau de diffraction ne peut pas être formé spatialement sur suffisamment d'épaisseur vis-à-vis des longueurs d'onde optiques mises en jeu, aussi il n'y a pas d'interférence optique due à cette contribution.

Les coefficients piézo-optiques $\partial n_i / \partial \eta$ et thermo-optiques $\partial n_i / \partial T$ sont estimés à partir des travaux de C. Saubade. [133] Le coefficient piézo-optique du milieu viscoélastique transparent est calculé selon la loi de Gladstone-Dale, $\partial n_i / \partial \eta = 1 - n_i$. Le coefficient thermo-optique est estimé à partir des relations qu'il propose dans son article. L'amplitude du terme

M_1^h doit aussi être pondérée par le coefficient de transmission optique à l'interface entre l'air et la cellule. En effet, lors des acquisitions expérimentales, la mesure de la puissance de sonde est réalisée à l'air libre, or la sonde optique a traversé deux fois l'interface cellule/air avant la détection en photodiodes aussi les coefficients de transmission air/cellule et cellule/air doivent pondérer la relation (3.25). De plus, la mesure détectée en photodiode est une variation relative de puissance, déduite de l'expression du champ électrique par :

$$P = \frac{|E_1 \bar{E}_1| - |E_1^h \bar{E}_1^h|}{|E_1^h \bar{E}_1^h|}. \quad (3.28)$$

Les simulations présentées par la suite sont donc obtenues après ce dernier calcul, équation (3.28), afin que celles-ci soient comparables au signal expérimental détecté.

3.2.3.3) Prise en compte de l'interaction acousto-optique dans le substrat

La modélisation optique proposée précédemment ne prend pas en compte la détection acousto-optique dans le substrat. Celle-ci peut facilement être ajoutée à partir de l'étude réalisée précédemment pour la cellule semi-infinie. En effet, les équations (3.22) et (3.23) décrivent aussi la détection optique perturbée dans le substrat, l'intégration spatiale de l'équation (3.23) devant par contre être considérée sur son épaisseur d'absorption optique. En revanche, du fait que la perturbation se propage depuis la source de génération dans la direction opposée aux photodiodes (vers les z positifs) et que la détection modélisée se limite à la diffraction au premier ordre uniquement, un seul mode de diffraction, le mode Stokes, est détecté. La figure 3-8 présente la détection optique perturbée.

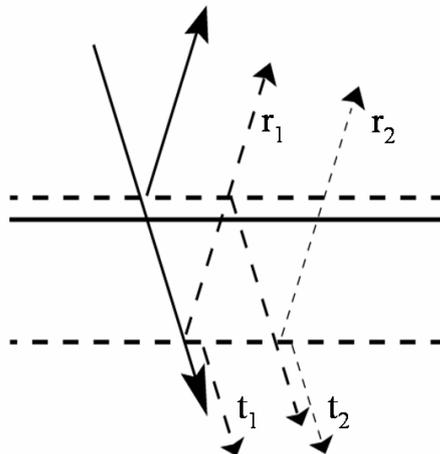


Figure 3-8 : Présentation en optique géométrique de la détection acousto-optique dans le substrat. La flèche en trait plein présente le rayon porteur non diffracté. Les rayons indicés r_i sont les rayons diffractés en réflexion et les rayons indicés t_i sont les rayons diffractés en transmission. L'indice $i=1$ ou $i=2$ correspond à l'ordre de diffraction du rayon.

La flèche en trait plein présente le rayon porteur source de la diffraction optique. Les flèches notées r_i et t_i représentent respectivement les rayons perturbés en réflexion et en transmission. La valeur de l'indice, $i=1,2$, représente, comme sur la figure 3-7, la chronologie de la diffraction mais dans le cas présent cette valeur correspond aussi à l'ordre de diffraction. Ainsi, le rayon r_2 est perturbé au second ordre car il se réfléchit deux fois sur la perturbation du premier ordre. Seul le rayon r_1 est diffracté au premier ordre. L'écriture analytique de sa diffraction optique dans le substrat est donnée par la relation (3.29). L'amplitude est pondérée par les coefficients de transmission de l'interface cellule/titane, et ce rayon subit deux déphasages : un déphasage dû au déplacement mécanique de l'interface, et un déphasage créé par la propagation de la source de diffraction optique.

$$\bar{E}_1(z, \omega_0) = \frac{M_1^h j t_{10} q t_{01} e^{-2jqn_1^h u_0}}{4n_0^h} \int \epsilon_0^s(z') e^{2jqn_0^h z'} dz' e^{jqn_1^h z} \bar{x}. \quad (3.29)$$

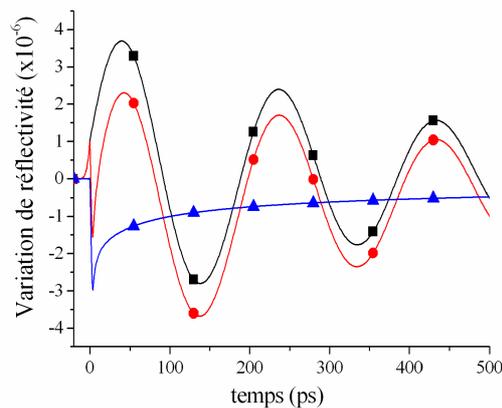


Figure 3-9 : Simulation de la détection acousto-optique dans de l'eau (carrés), et dans le substrat biocompatible (triangles). La simulation avec les ronds somme les deux contributions.

La figure 3-9 présente une simulation de la détection acousto-optique en fonction du temps. Le tracé avec les symboles carrés est obtenu en utilisant uniquement la détection acousto-optique dans la couche transparente, composée d'eau, et le tracé avec les triangles est obtenu en utilisant uniquement la détection acousto-optique dans le substrat de Ti-6Al-4V. La détection où les deux contributions sont simultanément utilisées est simulée sur le tracé avec les ronds. L'absorption optique dans le substrat est trop forte pour que le nouveau réseau de diffraction acousto-optique modélisé dans le substrat crée une nouvelle fréquence d'interaction acousto-optique. Sur le signal de la détection acousto-optique dans le titane uniquement, la concurrence entre cette détection et l'absorption se voit : aux temps très courts, inférieurs à 40 ps, la détection acousto-optique contribue avec un début d'interactions acousto-optique, cependant l'absorption optique étant d'une vingtaine de nanomètre dans le

substrat, elle s'éteint au bout du temps de vol acoustique de cette distance, un peu moins de 35 ps. Passé ce temps, la déformation acoustique est au-delà de l'épaisseur d'absorption optique du substrat et la sonde ne peut plus la détecter, il n'y a plus de contribution de la détection acousto-optique dans le substrat. Finalement, la modélisation de cette détection n'est contributive qu'aux temps très courts et nécessite une excellente qualité de signaux expérimentaux pour qu'une information sur les propriétés mécaniques du substrat puisse être obtenue grâce à celle-ci.

3.2.4) Vérification expérimentale de la détection d'oscillations Brillouin dans la cellule d'*Allium Cepa*

Afin de vérifier la prédiction de détection expérimentale d'oscillations Brillouin, le montage d'acoustique picoseconde permettant une détection en deux couleurs différentes pour un même point est utilisé. D'après la relation fréquentielle des oscillations Brillouin, équation (3.27), les oscillations détectées avec la sonde bleue doivent être deux fois plus haute fréquence que les oscillations détectées avec la sonde rouge si la prédiction de signal Brillouin est juste et que l'on suppose un même indice optique pour les deux couleurs de détection.

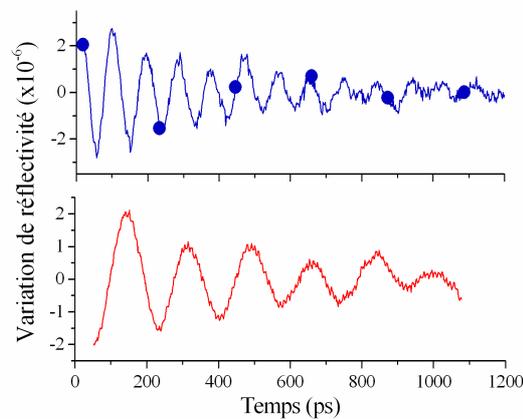


Figure 3-10 : Vérification expérimentale de la détection d'oscillations Brillouin dans la cellule d'*Allium Cepa*. Le signal expérimental est obtenu en un unique point de la cellule, dans la vacuole d'une cellule d'oignon, en deux couleurs de sonde différentes, en rouge (lignes) et en bleu (ronds).

La figure 3-10 présente le résultat d'une acquisition expérimentale obtenue en deux couleurs de sonde laser en un même point de la vacuole d'un oignon blanc. [121] Le signal présenté en bas de la figure a été détecté avec une sonde rayonnant à 790 nm, il a une fréquence d'oscillation mesurée à 5,5 GHz. Le signal présenté en haut de la figure a été mesuré avec une sonde rayonnant à 395 nm, il a une fréquence d'oscillation mesurée à 11 GHz. La variation de fréquence mesurée correspond à la variation attendue au vue des

deux couleurs de sonde laser utilisées, si l'on suppose que l'indice optique est inchangé entre les deux couleurs de détection laser, ce qui permet de conclure que la détection optique du signal acoustique créé en acoustique picoseconde dans une cellule d'oignon est bien des oscillations Brillouin. Considérant un indice optique de la cellule de $n_1=1,4$, la célérité acoustique mesurée dans cette cellule d'oignon est de 1550 m/s, un peu plus élevée que dans l'eau pure où elle est à température ambiante de 1480 m/s.

3.2.5) Ajustement du modèle sur des signaux expérimentaux

Le modèle de simulation développé depuis le début du chapitre 3 permet de prédire numériquement, en fonction des matériaux utilisés, la détection optique des acquisitions expérimentales dans un échantillon semi-infini, transparent optiquement, sur un substrat opaque. Cette modélisation correspond au problème direct de l'étude des phénomènes de génération et de diffusion thermique ainsi que de la propagation acoustique qui résultent de l'impulsion pompe puis de leur détection par la sonde optique. Afin d'exploiter au mieux ce modèle de simulation, il est utilisé pour simuler le problème direct, mais aussi pour évaluer les propriétés viscoélastiques des cellules, il s'agit alors d'un outil de résolution du problème inverse. Pour ce faire, une procédure numérique visant à déterminer la valeur optimum de certains paramètres physiques de la cellule pour que la simulation soit ajustée au mieux sur les résultats expérimentaux est implémentée. Les résultats obtenus par cette procédure inverse sont déterminés avec l'incertitude numérique liée à la procédure d'ajustement.

L'intérêt de ce développement est notamment que, si l'on suppose que l'information recherchée est aussi bien dans le signal expérimental que dans la simulation, les mesures sont obtenues avec une précision inatteignable sans cet outil. En effet, sans outil de simulation, l'utilisation et les mesures faites des signaux expérimentaux sont assujetties aux lois classiques de traitement du signal. Ainsi, l'incertitude de la mesure fréquentielle d'un signal obtenu sur une fenêtre temporelle de deux nanosecondes ne peut pas dépasser le demi gigahertz. En utilisant la procédure inverse développée, l'incertitude numérique de l'ajustement est alors essentiellement fonction du rapport signal sur bruit du signal expérimental. Pour une même plage de temps de signal, des incertitudes dans la mesure fréquentielle de 0,01 GHz sont alors atteignables.

Une confrontation entre les simulations numériques et une acquisition expérimentale sur une cellule d'oignon est présentée sur la figure 3-11, la variable d'ajustement numérique étant la compressibilité complexe de la cellule et le coefficient thermo-optique de la cellule. Les autres variables thermiques sont ajustées manuellement. Cet ajustement est manuel pour

limiter le nombre de variable d’ajustement, on n’en introduit pas plus que 4, pour limiter les temps de calcul et parce qu’il est délicat de faire converger la procédure d’ajustement si les paramètres thermiques servent aussi de variable d’ajustement. L’ensemble des valeurs des paramètres thermiques, mécaniques et optiques utilisés pour simuler le signal dans l’oignon pour cette confrontation sont présentés dans le tableau 3-3. [121]

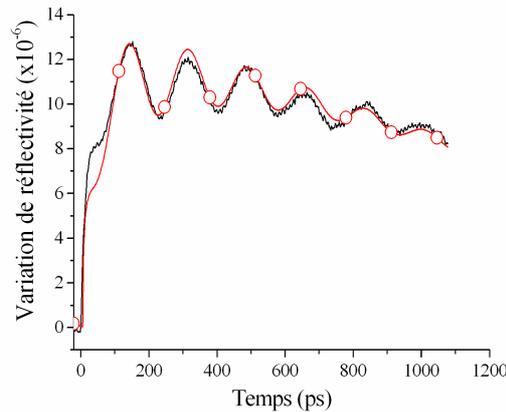


Figure 3-11 : Acquisition expérimentale (ligne) obtenue dans la vacuole d’une cellule d’oignon et confrontation avec une simulation numérique (cercles).

Aux temps très courts, le signal expérimental et le signal simulé présentent un accord médiocre, ceci vient très certainement du fait que la détection acousto-optique dans le titane n’a pas été implémentée dans la procédure de résolution du problème inverse. Le coefficient piézo-optique utilisé pour cette simulation suit la loi de Gladstone-Dale, il est donc égal à -0,4 et le coefficient thermo-optique évalué par la procédure numérique est égal à $-7 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$. Il est proche des valeurs de la littérature. [133]

| Capacité thermique C_{p1} [J kg ⁻¹ K ⁻¹] | Conductivité thermique κ_1 [W m ⁻¹ K ⁻¹] | Densité ρ_1 [m ⁻³] | Indice optique n_1 | Rigidité C_1 [GPa] | Résistance thermique [10 ⁻⁹ K W ⁻¹] |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 9460* | 0,7* | 1000 | 1,4+j4x10 ⁻³ | 3,1+j0.3* | 1* |

Tableau 3-3 : Constantes physiques utilisées pour simuler le signal de la figure 3-10. Les variables marquées d’une étoile sont déterminées en ajustant le signal simulé sur le signal expérimental. L’ajustement acousto-optique est obtenu numériquement.

3.3) Vérification expérimentale de la non invasivité de la méthode

3.3.1) Étude expérimentale de l'élévation thermique le temps d'une mesure

Dans cette section, on estime expérimentalement l'élévation thermique de la cellule créée par le dépôt d'énergie laser pompe et sonde sur l'échantillon. Cette estimation est réalisée par la mesure en acoustique picoseconde de la célérité acoustique de l'eau pure dans des conditions expérimentales proches de celles d'une acquisition sur cellule d'oignon. La vitesse acoustique dans l'eau étant fonction de sa température, [112] une mesure indirecte de la température est obtenue par acoustique picoseconde. Le volume de la goutte d'eau est de quelques microlitres, elle est placée sur un substrat de Ti-6Al-4V et couverte par une vitre biologique. La mesure de l'élévation de température est faite sur un temps de 90 minutes, une première acquisition est réalisée à un temps $t=0$ et une seconde à un temps $t=90$ minutes. Les faisceaux pompe et sonde du laser sont constamment focalisés sur l'échantillon durant les 90 minutes. La puissance de la pompe et de la sonde sont respectivement de 100 et de 50 μW . La détection acousto-optique est composée d'oscillations Brillouin sur lesquelles la procédure d'ajustement numérique décrite précédemment est utilisée. Ce principe de mesure optique de température de l'eau en fonction de la fréquence d'un signal diffusé acousto-optique est un sujet de recherche très porteur, la mesure faite résultant classiquement d'une diffusion Raman ou Brillouin. Les enjeux principaux de cette mesure sont militaires, le but étant la détection à distance d'engins submersibles. Les mesures réalisées en diffusion Brillouin peuvent atteindre une précision de célérité acoustique inférieure au mètre par seconde et les mesures en diffusion Raman une précision de température inférieure au degré Celsius. [134]

Indépendamment de ces enjeux, H.J. Maris a récemment proposé une première application de l'acoustique picoseconde à l'eau, [18] en effectuant des mesures de célérité acoustique en fonction de la température. Si le principe de l'étude est le même, la variation de température qu'il utilise est de 60°C alors que dans le cas présent la première estimation d'élévation de température déterminée analytiquement grâce à la relation (3.12) suggère une variation de l'ordre du kelvin. Ceci implique une variation de célérité acoustique dans l'eau très faible, de l'ordre de quelques mètres par seconde si l'on suppose une température initiale égale à la température ambiante de la salle d'expérience, 20°C. [112] Le signal thermique des acquisitions est retranché pour avoir une plus grande sensibilité au signal acoustique et la procédure de résolution du problème inverse est appliquée sur la fonction d'autocorrélation

des signaux expérimentaux et simulés pour filtrer le bruit blanc des acquisitions expérimentales.

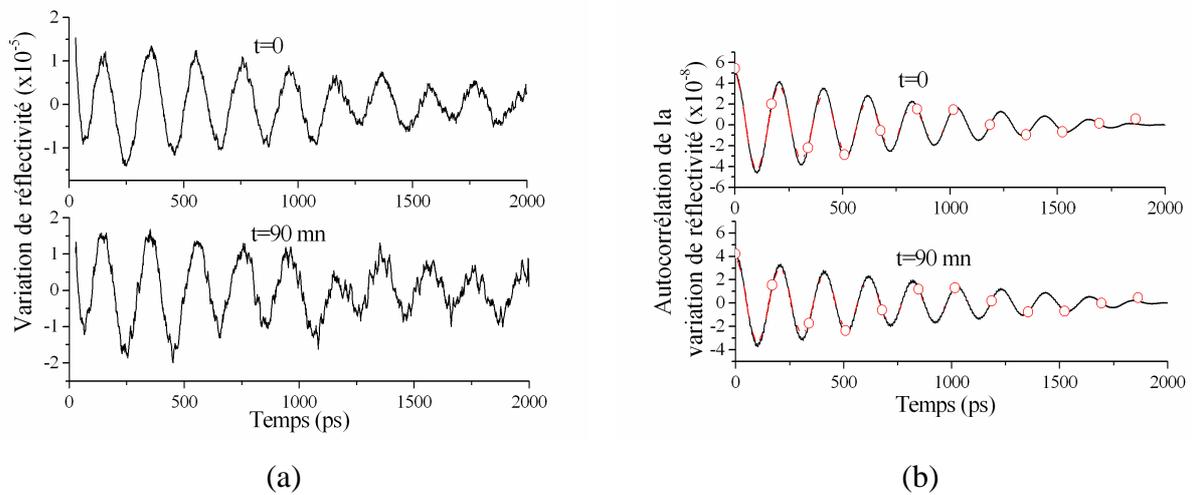


Figure 3-12 : (a) Signaux expérimentaux obtenus dans l'eau pour la mesure de l'élévation de température et (b) leur autocorrélation avec l'ajustement numérique correspondant (cercles).

Les signaux expérimentaux sont présentés sur la figure 3-12(a), et l'ajustement numérique du modèle sur les signaux autocorrélés est présenté sur la figure 3-12(b). L'indice optique de l'eau utilisé pour cette application est tiré de la bibliographie, [135] $n_1=1,33$, et la longueur d'onde de la radiation laser de sonde est mesurée à $\lambda=810$ nm. Aucune variation de puissance ou de longueur d'onde du laser n'a été observée durant l'expérience aussi les incertitudes liées à ces éventuelles variations sont négligées. De même on néglige toute variation de l'indice optique de l'eau liée à l'évolution de température durant cette étude, cette variation étant négligeable au vu de la sensibilité de la mesure. [136] La célérité mesurée pour le signal à $t=0$ est de 1,476 nm/ps et la célérité mesurée à $t=90$ mn est de 1,483 nm/ps. Les incertitudes de mesure de célérité liées à l'ajustement numérique sont de 6×10^{-4} nm/ps, soit une incertitude relative de 0,04%. Cette incertitude est un ordre de grandeur sous l'écart-type de répétabilité expérimentale déterminé au chapitre 2 aussi l'incertitude de la mesure sera considérée en utilisant cet écart type expérimental. On obtient alors une incertitude de mesure de 4×10^{-3} nm/ps. A partir de la célérité de la première mesure, la température initiale de l'eau pure est évaluée à $18 \pm 1^\circ\text{C}$. La mesure faite 90 minutes après nous permet ensuite de mesurer la température de l'eau à $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Ainsi, la prédiction obtenue dans un premier temps à l'aide de la relation (3.12) est confirmée, l'élévation de température suite à l'apport d'énergie laser durant une acquisition est de 1 à 2 degré kelvin. [116] L'élévation thermique sur l'échelle de temps d'une acquisition suite au dépôt d'énergie laser est alors supposée sans effet notable pour la cellule.

3.3.2) Laser impulsif focalisé et dommage à la santé

Si le dépôt d'énergie laser crée une élévation thermique trop faible pour être préjudiciable aux cellules, d'autres formes de stress cellulaire peuvent être créées. Il est possible avec un laser femtoseconde de former des ondes de choc et des microbulles de cavitation dans la cellule. En effet, lorsqu'une cellule est soumise à une irradiation lumineuse, une partie de cette irradiation est absorbée par la cellule. La quantité d'irradiation absorbée est alors notamment fonction de l'indice d'absorption optique à la longueur d'onde lumineuse. Avec les lasers femtosecondes, des puissances crêtes extrêmement élevées peuvent être atteintes du fait de la durée des impulsions et de la focalisation laser. Aussi, les électrons et groupes d'atomes dans la zone d'irradiation sont excités. Cette énergie d'excitation est alors rapidement transmise aux molécules par vibration mécanique. Dans les milieux liquides, une onde de choc peut naître de cette vibration, et après sa propagation, elle crée une dépression mécanique dans la cellule formant finalement une bulle de cavitation. Le contrôle de cet effet est classiquement fait par microscopie optique : une tache sombre apparaît sur le lieu de la focalisation laser si le phénomène a eu lieu. [137] Un contrôle optique par microscopie optique est donc systématiquement réalisé avant et après chaque acquisition expérimentale afin de vérifier que ce stress cellulaire n'est pas apparu durant l'expérience.

En parallèle de ces effets mécaniques nuisibles possibles créés par le laser, une autre source de dommage cellulaire liée à l'utilisation du laser est celui des effets photochimiques faisant suite à l'irradiation lumineuse de la cellule. [138] Si la phototoxicité d'une source lumineuse sur un organisme est connue de longue date, l'effet des excès de soleil sur la peau en est un exemple, le phénomène est mal connu et source de nombreux travaux de recherche actuels car très complexe. En effet, la phototoxicité d'un laser est fonction de la longueur d'onde laser utilisée, de sa fluence et de son mode de fonctionnement, continu ou impulsif, auquel cas la durée des impulsions lasers devra être prise en compte. Bien entendu, l'effet phototoxique est aussi fonction de la cellule irradiée, et aussi du temps d'exposition de la cellule au laser. [139] Les normes lasers définissent le seuil maximal d'exposition en fonction de la couleur laser, du temps d'exposition total et du taux de répétition laser pour des cellules de peau et d'oeil. [140] La cellule oculaire étant par nature très sensible à la lumière, les cellules utilisées lors de ce travail de thèse doivent avoir une photosensibilité plus proche de celle de la peau que de celle des yeux. Dans les couleurs bleues et rouge, et pour des impulsions de 1 à 100 nanosecondes, le taux maximal admis est de 20 mJ/cm^2 . Dans ce travail, la fluence de pompe et de sonde utilisées sont trois décades

inférieures à cette limite. Ainsi, même en additionnant les fluences des deux faisceaux laser, on reste alors en dessous du seuil maximal d'irradiation laser autorisé.

Des études empiriques portant sur l'effet d'un laser focalisé sur une cellule unique ont aussi été menées sur cellules animales [141] et végétales [142]. Ces études sont essentiellement motivées par l'accroissement de l'utilisation des techniques de microscopie à deux photons qui nécessitent une forte irradiation laser. Cependant l'utilisation de laser impulsionnel permet dans ce cadre de générer une forte fluorescence grâce à une forte puissance crête des impulsions, tout en minimisant l'irradiation moyenne des cellules, ce pourquoi les lasers impulsionnels sont de plus en plus utilisés dans cette technique de microscopie. K. Koenig et I. Chen emploient dans leur étude un laser Ti :saphire dont les caractéristiques sont très semblables à celle utilisées dans ce travail, de même que les focalisations lasers réalisées. Cependant seul l'effet lié à une irradiation proche infrarouge est étudié dans les deux travaux. Dans les deux cas, le seuil de puissance laser à ne pas dépasser pour éviter tout dommage cellulaire est proche. Les puissances crêtes maximales évaluées sont de 10^{12} W/cm² et de 4×10^{11} W/cm² dans les cellules animales et végétales respectivement. La fluence utilisée de la radiation laser rouge lors des expériences de ce travail, est typiquement de 0,25 à 0,5 pJ selon qu'elle est utilisée en sonde ou pompe. Elle est focalisée sur une tache de 2 micromètres de diamètres aussi la puissance crête est inférieure à 10^{11} W/cm². Nous n'avons su trouver d'étude équivalente pour une irradiation dans le bleu, cependant il semblerait que les seuils d'ablation cellulaire dans la fenêtre de radiation ultraviolette soient, pour un laser femtoseconde, trois ordres de grandeur sous les seuils d'ablation en radiation proche infra-rouge. [138] La puissance de la pompe, de l'ordre de 10^{11} W/cm², serait alors suffisante pour ablater par effet photochimique la cellule aussi un contrôle visuel est-il systématiquement fait lors des acquisitions et une étude de la stabilité de la réponse mesurée a été réalisée et sera présentée section 3.3.4.

3.3.3) Effet de la contrainte acoustique à l'interface

La contrainte acoustique à l'interface entre la cellule et le substrat provoquée par une impulsion laser a été simulée, et est présentée sur la figure 3-5. Cette contrainte est orientée vers la cellule aussi est-il nécessaire de s'assurer qu'elle ne détache pas la cellule de son substrat. D'après la simulation présentée sur la figure 3-5, l'amplitude maximale de cette contrainte à l'interface, coté cellule, est de 550 Pa si la valeur de la résistance thermique est nulle et, si la résistance thermique est non nulle, cette contrainte décroît très rapidement. Cette mesure de contrainte à l'interface a alors été confrontée à des mesures de forces d'adhésion

cellulaire sur biomatériaux trouvées dans la littérature. Une attention particulière a été menée sur les études de cellules MC3T3, car ces cellules seront étudiées dans le prochain chapitre. Leur force d'adhésion sur verre est estimée à $1 \mu\text{N}$, [49] cette valeur correspondant alors à une contrainte d'adhésion de quelques kPa. [121] La contrainte de détachement provoquée par une impulsion laser est donc largement inférieure à la contrainte d'adhésion cellulaire sur biomatériau, ceci étant d'autant plus vrai que les cellules adhèrent beaucoup mieux et avec plus d'intensité sur titane que sur verre.

L'effet répété des impulsions lasers a été contrôlé en comparant l'amplitude des signaux détectés en début et en fin d'acquisition expérimentale. En effet, lors d'une acquisition expérimentale, l'accumulation des signaux permet de réduire le bruit de la mesure mais ne doit pas influencer sur l'amplitude des signaux détectés, qui doit théoriquement être la même pour chaque acquisition. Le contrôle réalisé a permis de vérifier que l'amplitude des signaux détectés est la même pour chaque acquisition. La transmission de l'énergie acoustique dans la cellule est donc restée la même durant toute l'acquisition, il n'y a pas eu de dégradation d'adhésion cellulaire durant l'acquisition expérimentale.

3.3.4) Stabilité en temps d'une acquisition d'acoustique picoseconde

Un contrôle de l'effet de l'irradiation laser est proposé en réalisant une étude comparative des signaux obtenus pour un même point inspecté dans une cellule durant une longue plage de temps. La cellule d'oignon semblant plus sensible que la cellule animale à la radiation laser (paragraphe 3.3.2), ce travail a été réalisé sur cellule d'oignon. Cette étude étant faite à l'aide de la mesure des oscillations Brillouin obtenues dans la cellule, elle permet de contrôler la stabilité des propriétés optiques et mécaniques de la cellule. Le principe consiste à laisser les faisceaux laser pompe et sonde focalisés à l'interface entre la cellule et le substrat durant deux heures et à effectuer une acquisition toutes les demi-heures. Dans cette étude, l'effet cumulé de la pompe et de la sonde est pris en compte. La pompe est choisie de couleur bleue afin d'être dans la situation la plus critique, c'est-à-dire lorsque c'est le laser bleue qui est le plus intense. Sa fluence est de $0,5 \text{ pJ}$ par impulsion, celle de la sonde est deux fois moindre, et les taches focales des deux lasers sont de $2 \mu\text{m}$ de diamètre. Durant le temps d'expérience la cellule est à l'air libre, aucune intervention extérieure n'est faite pour la réhydrater. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3-13. Sur la figure 3-13(a) apparaissent les valeurs mesurées de la fréquence Brillouin du signal (carrés) et de sa phase (rond). Sur la figure 3-13(b) sont présentés l'atténuation des oscillations Brillouin, donnée en gigahertz (losange), et son amplitude (triangle). L'autocorrélation des signaux n'a pas été

utilisée dans cette étude afin de conserver l'information sur la phase du signal. L'influence d'une variation d'indice optique et/ou de célérité acoustique ne pouvant pas être discriminés dans la mesure, et les deux pouvant être sujet à des variations durant cette expérience, l'étude est fréquentielle et on ne cherche pas à supposer une valeur de l'un pour en déduire l'autre. L'amplitude, la phase et l'atténuation du signal Brillouin sont aussi les variables mesurées ici.

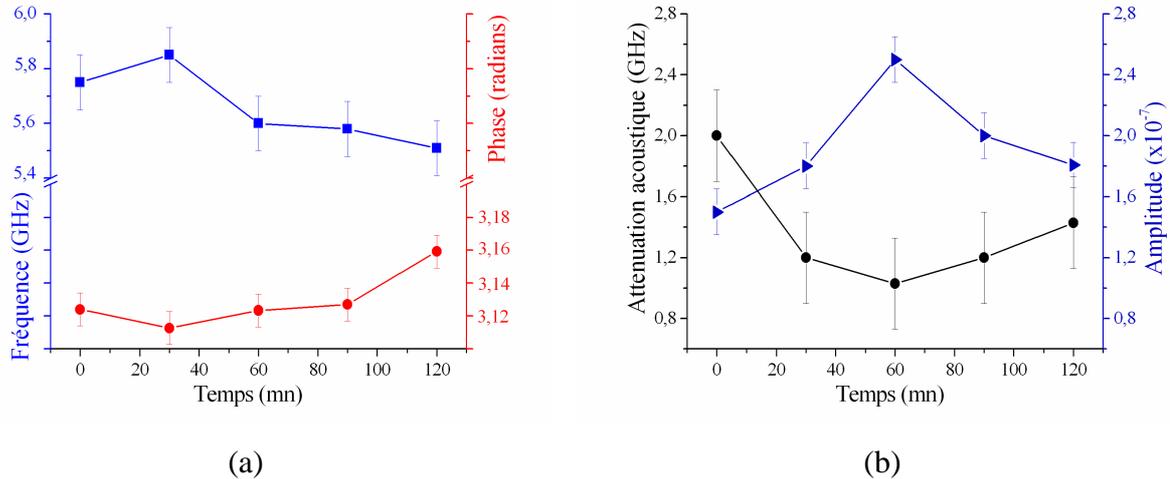


Figure 3-13 : (a) : Fréquence (carré) et phase (rond), (b) : atténuation (losange) et amplitude (triangle) mesurées dans une étude de stabilité de signal menée durant deux heures sur un même point de la vacuole d'une cellule d'oignon.

La moyenne de chaque variable de mesure est déterminée et son écart-type est calculé, les résultats sont donnés dans le tableau 3-4. L'écart-type relatif lié à la mesure de la fréquence du signal Brillouin est une décade au dessus de l'écart-type relatif de la sensibilité du dispositif mis en place. Il y a donc une variation de la fréquence Brillouin qui est mesurée dans cette étude, cependant l'origine n'en est pas connue. La variation mesurée peut être causée par une variation aussi bien optique qu'acoustique, les raisons pouvant être liées à la fois à l'irradiation laser, à une modification d'état biologique, à une déshydratation cellulaire, ...

| | Fréquence (GHz) | Phase (radians) | Atténuation (GHz) | Amplitude ($\times 10^{-7}$) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Moyenne | 5,62 | 3,12 | 1,4 | 1,9 |
| Écart-type relatif | 2,1% | 0,3% | 21% | 16% |

Tableau 3-4 : Moyennes de la fréquence, la phase, l'atténuation et l'amplitude des signaux obtenus durant l'étude de stabilité en temps avec leur écart-type associé.

L'écart-type relatif de la phase des signaux obtenus dans cette étude est une décade inférieure à celui obtenu dans l'étude de sensibilité du dispositif. Les écarts-type relatifs d'amplitude et d'atténuation de signal sont de l'ordre de grandeur de ceux mesurés dans l'évaluation de sensibilité du dispositif. Finalement, une légère modification des propriétés mécaniques ou optiques de la cellule sont mesurées à travers l'évolution de la fréquence Brillouin. Ainsi, sur un temps très long par rapport au temps d'irradiation laser nécessaire pour une acquisition, la cellule semble peu perturbée par le laser même si une légère baisse de la fréquence Brillouin a été mesurée dans cette étude.

3.4) Réponse des constituants subcellulaires à une mesure d'acoustique picoseconde. Vers une différenciation de variétés d'une espèce donnée

3.4.1) Analyse de la vacuole de deux espèces différentes d'oignon

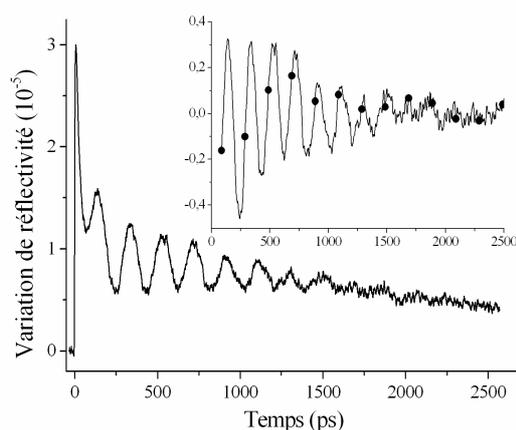


Figure 3-14 : Signal expérimental détecté dans la vacuole d'une cellule d'oignon avec une couleur de détection rouge (ligne), et contribution des oscillations Brillouin dans ce signal (ronds).

Certains organites subcellulaires sont suffisamment larges pour que l'on puisse focaliser le faisceau laser uniquement sur eux. Il devient donc particulièrement intéressant d'évaluer leur réponse intrinsèque, première étape avant l'imagerie par acoustique picoseconde d'une cellule unique. L'élément le plus volumineux de la cellule d'oignon, sa vacuole, est étudié dans un premier temps. L'étude est proposée sur deux variétés différentes d'oignon, les oignons blancs et les oignons jaunes. Plusieurs acquisitions sont réalisées pour chaque variété d'oignon, pour chaque acquisition la cellule provient d'un oignon différent. 5 cellules d'oignon blanc et 6 cellules d'oignon jaunes sont étudiées. La démarche de l'étude est alors de faire de nombreuses acquisitions pour chaque variété puis ensuite de comparer la

contribution acousto-optique des signaux obtenus afin d'évaluer les similitudes ou les différences entre eux. La recherche des similitudes du signal concerne la contribution acoustique du signal. Un exemple de signal expérimental obtenu avec une sonde rouge dans la vacuole d'une cellule d'oignon est présenté sur la figure 3-14. Le tracé en ligne est le signal expérimental détecté et le signal avec les ronds est uniquement la contribution acoustique du signal, c'est-à-dire les oscillations Brillouin détectées dans la vacuole d'une cellule d'oignon. Les résultats de l'étude sur la reproductibilité de la mesure d'acoustique picoseconde dans la vacuole d'une cellule d'oignon sont présentés sur la figure 3-15.

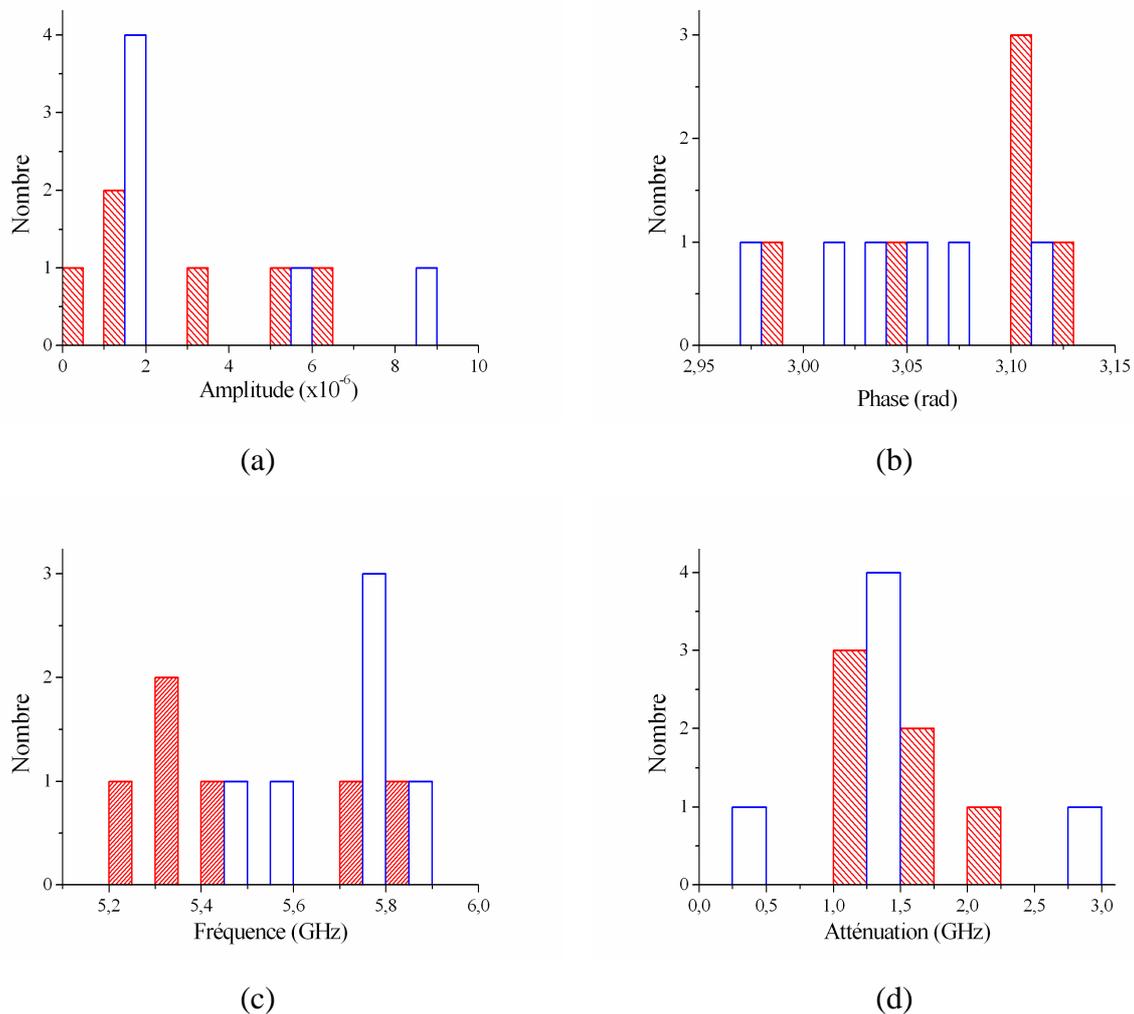


Figure 3-15 : Mesures des oscillations Brillouin obtenues dans la vacuole de cellules d'oignon blanc (barres vides) et jaunes (barres pleines). 6 et 5 cellules différentes sont étudiées, respectivement dans des oignons jaunes et blanc. [121]

Même si la même puissance de pompe et de sonde a systématiquement été utilisée, l'amplitude des oscillations Brillouin varie d'un ordre de grandeur, toutes variétés confondues. Cette amplitude de signal peut dépendre de l'adhésion de la cellule sur le

substrat. La phase et l'atténuation ne sont pas fonction de la variété d'oignon. La phase à l'origine est proche de π . Cette phase est dictée par le coefficient de réflexion optique de l'interface cellule/substrat, le caractère optiquement transparent de la vacuole de la cellule d'oignon et la phase de la déformation acoustique. L'atténuation est voisine du gigahertz dans toutes les acquisitions. Par contre, la fréquence du signal est corrélée à la variété d'oignon utilisée. En effet, la fréquence centrale mesurée de l'oignon jaune est autour de 5,3 GHz en sonde rouge alors que pour la même couleur de sonde elle est à 5,7 GHz dans l'oignon blanc. Il y a donc une variation relative de fréquence centrale de 7%. Cependant l'écart-type des mesures est proche de cette variation aussi il faudrait un grand nombre de mesures pour chaque variété d'oignon pour conclure significativement sur cette variation. De plus, il n'est pas possible de savoir si cette variation de fréquence centrale est la signature d'une variation d'indice optique et/ou de célérité acoustique entre les deux variétés d'oignon. Si l'on suppose cependant un indice optique égal à $n_1=1,4$, les célérités obtenues dans la vacuole d'oignons blancs et jaunes sont respectivement égales à 1,6 nm/ps et 1,5 nm/ps.

3.4.2) Analyse du noyau de deux espèces différentes d'oignon

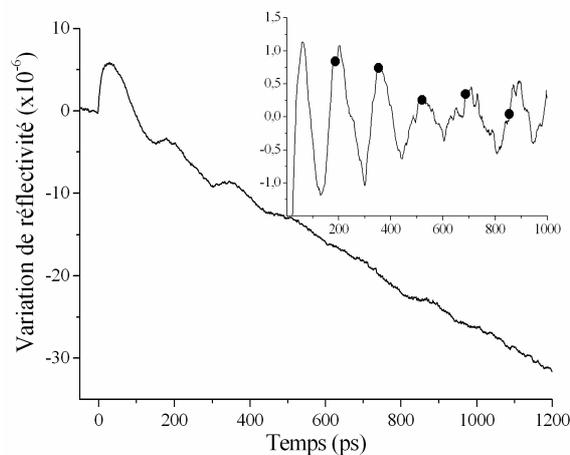


Figure 3-16 : Signal expérimental détecté dans le noyau d'une cellule d'oignon avec une couleur de détection rouge (ligne), et contribution des oscillations Brillouin dans ce signal (ronds).

La centralisation des informations génétiques de la cellule est dans son noyau. Comme il est suffisamment gros pour être vu en microscopie optique, nous avons réalisé la même étude que précédemment sur ce dernier. La démarche expérimentale est la même que celle utilisée pour caractériser les vacuoles des deux variétés d'oignon. Un exemple de résultat expérimental obtenu avec une couleur de détection rouge dans le noyau d'une cellule est présenté sur la figure 3-16. L'atténuation du signal est beaucoup plus forte dans le noyau que

dans la vacuole aussi l'exploration temporelle du signal est divisée par deux par rapport à celle du signal obtenu dans la vacuole. Les résultats de l'étude systématique réalisée sur des noyaux de différentes cellules de différents bulbes d'oignon, présentés pareillement que sur la figure 3-15, sont illustrés sur la figure 3-17. Pour chaque variété, oignons jaunes et blancs, 5 noyaux de cellules différentes sont étudiés.

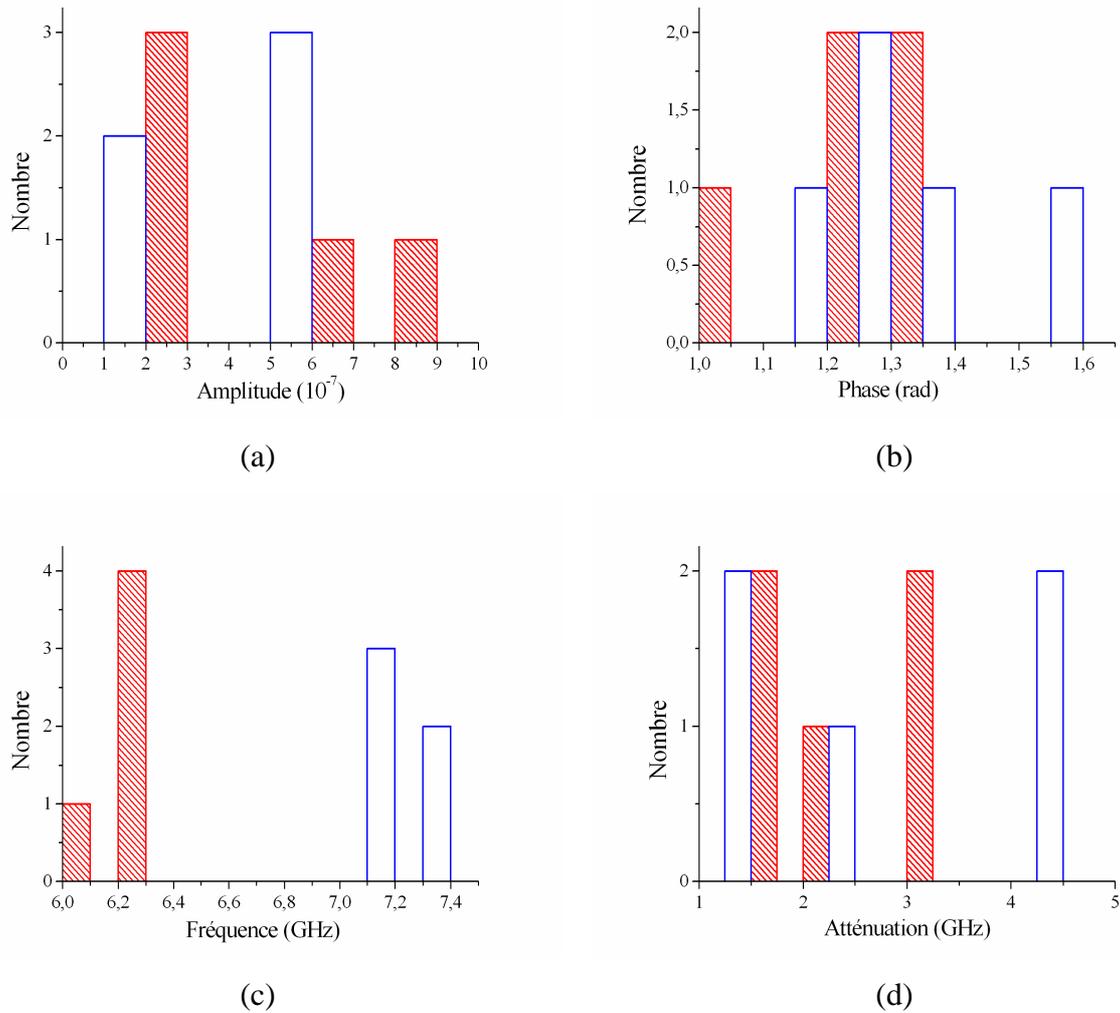


Figure 3-17 : Mesures des oscillations Brillouin obtenues dans le noyau de cellules d'oignon blanc (barres vides) et jaunes (barres pleines). [121]

À nouveau, la phase et l'atténuation ne semblent pas être fonction de la variété d'oignon inspectée. En revanche, la phase des oscillations Brillouin du noyau cellulaire est en quadrature avec celle de la vacuole, cette quadrature étant liée au caractère semi transparent du noyau cellulaire par rapport à la vacuole qui est transparente. Ce caractère semi-transparent implique aussi que l'atténuation des oscillations soit plus forte dans le noyau que dans la vacuole. De même, cela implique que l'amplitude des oscillations soit plus faible puisque moins de lumière est réfléchi et interfère. Cependant, l'amplitude des signaux est en

moyenne d'un ordre de grandeur sous l'amplitude des signaux obtenus dans la vacuole aussi d'autres explications peuvent intervenir pour expliquer une telle différence. La valeur du coefficient acousto-optique et le fait que le noyau ne soit pas en contact direct avec le substrat, ce qui implique moins de transmission d'énergie acoustique dans le noyau, donc une amplitude de signal inférieure, peuvent expliquer une telle variation.

La fréquence des oscillations mesurées est à nouveau fonction de la variété d'oignon, avec cette fois une variation relative de fréquence de 15% environ : la fréquence centrale mesurée dans le noyau de cellule d'oignon blanc est de 7,3 GHz alors que dans l'oignon jaune elle est de 6,2 GHz. A présent les intervalles de mesures sont totalement disjoints, contrairement aux intervalles de mesures obtenus dans la vacuole des cellules d'oignon.

3.4.3) Mesure dans la membrane cellulaire par acoustique picoseconde

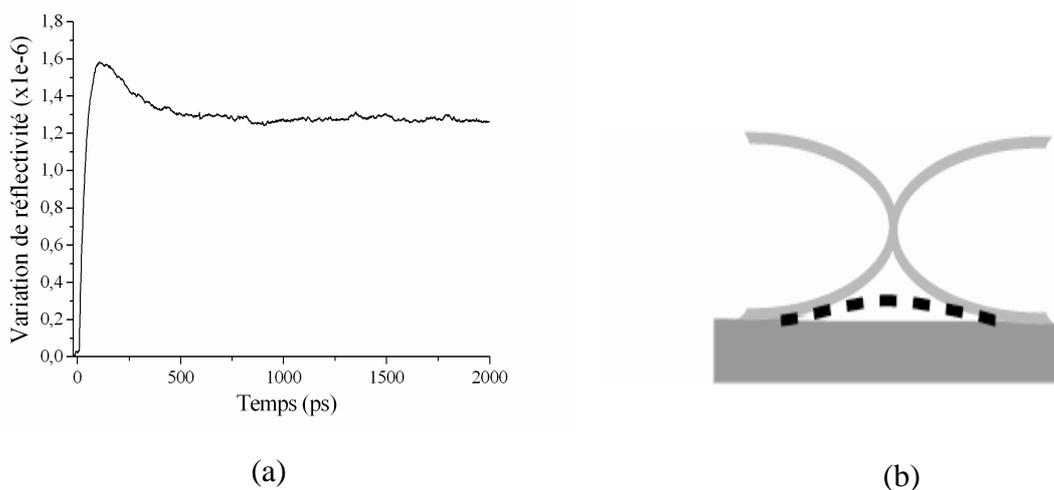


Figure 3-18 : Détection expérimentale de la membrane de cellule d'oignon (a) et schéma d'une explication possible de l'absence de contribution acoustique dans la détection : la membrane n'est pas en contact direct avec le substrat, le déplacement mécanique de celui-ci est insuffisant pour transmettre une déformation acoustique dans la membrane.

Un autre élément de la cellule d'oignon très visible en microscopie optique est sa paroi cellulaire. La réponse acoustique de cet élément en acoustique picoseconde a aussi été mesurée. En revanche, aucun signal acoustique n'a pu être mesuré mais seulement une contribution thermique, comme présenté sur la figure 3-18(a). [143] L'absence de contribution acoustique dans la détection du signal de la membrane peut être expliquée par les conditions limites mécaniques en bordure de cellule. En effet, il est possible que la continuité des déplacements ne soit pas respectée en ce point du fait de la forme de la cellule, figure 3-

18(b). Si cette continuité n'est pas assurée, il n'y a alors pas de propagation acoustique dans la membrane de la cellule. Pour vérifier cette hypothèse, il pourrait être intéressant de faire adhérer les cellules sur une pastille où un peptide d'adhésion, tel le RGD (voir section 1.2.4), serait présent à l'interface substrat/cellule. Ce dernier pourrait alors remplir la zone où la continuité mécanique n'est pas assurée, et jouer le rôle d'agent de couplage. Dans cette hypothèse, le signal acoustique détecté correspondrait à la contribution du peptide dans un premier temps puis la somme de la contribution du peptide et de la membrane dans un second temps. Les coefficients de réflexion et transmission acoustique et optiques pondéreraient ces deux contributions. Avec les échos temporels, il serait alors possible d'accéder à une mesure de la distance entre le substrat et la membrane. Cependant, il est aussi possible que le coefficient acousto-optique de la paroi de cellule d'oignon soit trop faible pour que l'on puisse détecter des oscillations Brillouin dans celle-ci.

3.5) Vers de l'imagerie cellulaire par acoustique picoseconde

Le fort contraste de signature opto-acoustique des organites cellulaires permet d'envisager l'imagerie cellulaire par acoustique picoseconde. La taille de pixel d'une telle image correspondant à la surface d'éclairement du spot laser, un cercle de deux micromètres de diamètre, et la surface de contact de la cellule avec le substrat étant d'environ 50x150 micromètres, le nombre de pixel associés à cette image peut être supérieur à 2000. En utilisant un objectif 100x, ce nombre peut même monter à 10^4 par cellule. Le dispositif pompe-sonde actuel ne permet pas de réaliser en un temps raisonnable une telle image car le temps d'acquisition de chaque pixel est supérieur au quart d'heure, aussi de trop grandes variations d'état cellulaire et de laser seraient associées à l'image acquise. La faisabilité d'une telle image a été démontrée en parcourant une ligne de 30 micromètres dans la cellule et en effectuant une acquisition tout les 5 micromètres. [143] Cette ligne part du bord de la cellule, de sa membrane, passe ensuite par le noyau, puis parcourt la vacuole. La figure 3-19 présente les résultats de cette acquisition. Comme attendu, il n'y a pas de contribution acoustique dans l'acquisition faite en bord de cellule, $x=0$. La réponse spécifique du noyau positionnée en $x=5$ μm est très reconnaissable par sa faible amplitude, son déphasage, sa haute fréquence et sa forte atténuation. Les mesures de fréquence et de phase du signal acousto-optique de la vacuole sont quasi identiques et présentées sur les diagrammes pour les abscisses supérieures à 7 μm . En revanche, les variations d'amplitude peuvent être le témoin d'une adhésion locale de la cellule différente en chaque point sondé. Les variations d'atténuation mesurées ne sont actuellement pas expliquées.

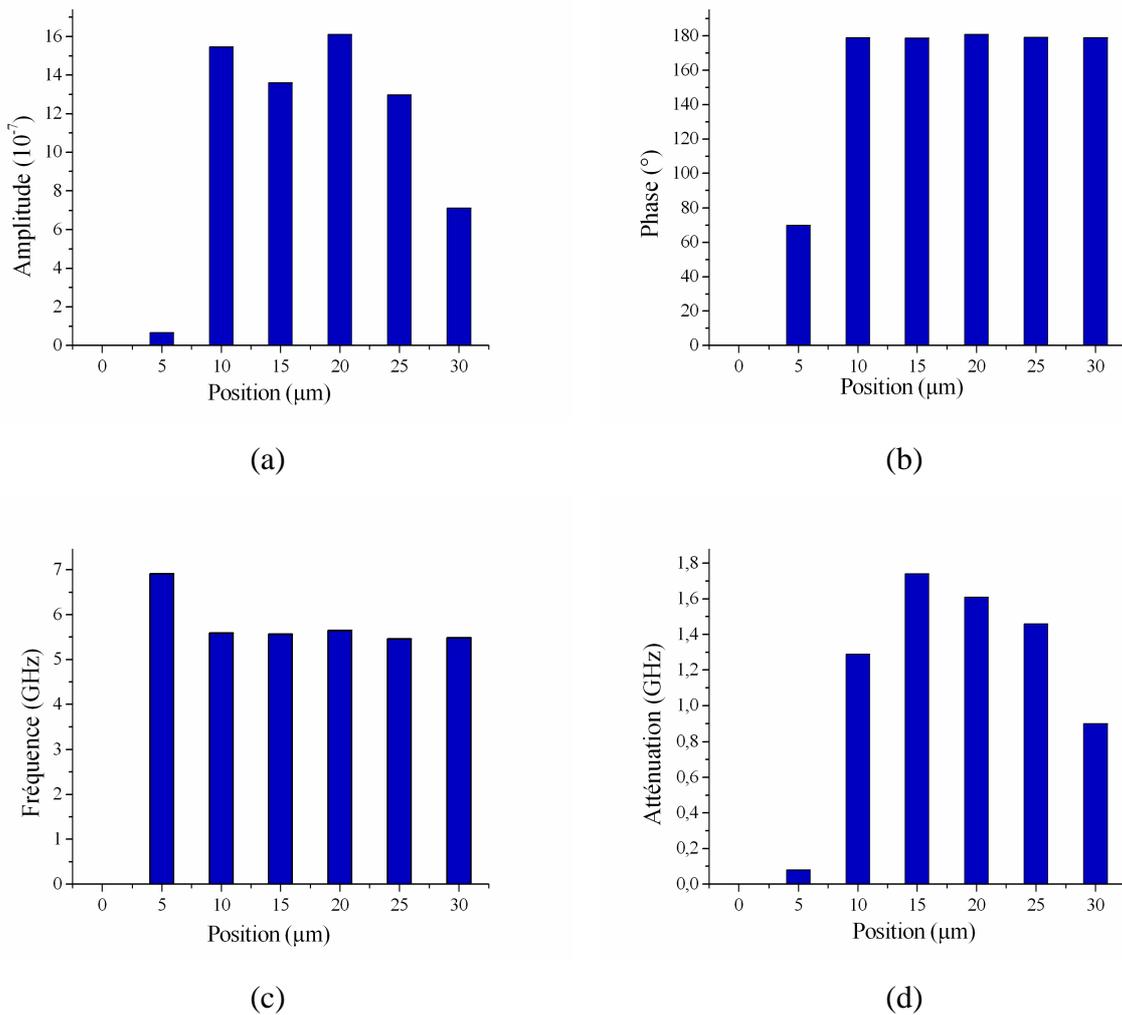


Figure 3-19 : 7 mesures effectuées le long d’une ligne de 30 μm de long, à l’intérieur d’une cellule d’oignon blanc. Chaque graphe correspond à une mesure des oscillations Brillouin : (a) : Amplitude, (b) : Phase ($^{\circ}$), (c) : Fréquence (GHz), (d) : Atténuation (GHz). Le premier point correspond à une acquisition de la membrane cellulaire, le second à une acquisition du noyau de la cellule, et enfin les autres mesures sont obtenues dans la vacuole de la cellule. L’échelle entre la dimension du scan et l’épaisseur des barres, représentant un pixel, est respectée. [143]

3.6) Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, un modèle, de géométrie simple mais incluant l’essentiel des phénomènes physiques mis en jeu en acoustique picoseconde, a été présenté. Les phénomènes de diffusion thermique, de propagation acoustique et d’interaction acousto-optique ont été étudiés en détail en résolvant analytiquement les équations fondamentales auxquels ils sont liés, ceci permettant une modélisation avec le minimum de présupposés de départ. Une attention particulière a été portée sur les conditions aux limites et les matériaux utilisés : une résistance de Kapitza est introduite dans l’étude thermique et un milieu à forte atténuation

viscoélastique est utilisé pour définir les propriétés viscoélastiques des éléments cellulaires. La détection optique a été résolue progressivement, en partant de son étude dans un milieu infini, il a été possible de comprendre la diffraction dans un milieu semi-infini. Les simulations ont permis de vérifier que la contribution du substrat dans le signal acousto-optique détecté est négligeable par rapport au travail acoustique mené. Finalement, l'ensemble de la simulation créée a été implémenté dans une procédure d'ajustement numérique pour résoudre le problème inverse acoustique. Ceci a permis l'analyse des signaux expérimentaux et leur utilisation avec une sensibilité inatteignable sans cet outil. La prédiction de la détection d'oscillations Brillouin a été validée en utilisant deux couleurs différentes de sonde laser, ce qui a permis de générer un signal acoustique à 11 GHz dans une cellule unique. A notre connaissance, cette détection constitue actuellement un record de mesure de fréquence acoustique dans une cellule en condition *in vitro*.

Le caractère non invasif de la technique d'acoustique picoseconde a ensuite été étudié grâce à ce code de simulations, grâce à des études bibliographiques et grâce à des études expérimentales sur cellules d'oignon. L'intérêt de la méthode pour l'étude cellulaire a été prouvé en montrant qu'elle est assez sensible pour que l'on puisse différencier deux cellules d'un même type cellulaire mais provenant de deux variétés différentes et en montrant que les organites cellulaires peuvent être étudiés et différenciés indépendamment les uns des autres au sein d'une même cellule. La première étape vers de l'imagerie cellulaire a finalement été franchie.

Les limitations essentielles de l'acoustique picoseconde appliquée à une cellule biologique sont qu'il est nécessaire de connaître les propriétés optiques de la cellule inspectée pour faire une mesure précise de la célérité acoustique et de son atténuation viscoélastique et la faible fluence laser que l'on peut utiliser pour réaliser les acquisitions expérimentales.

La limitation de la méthode liée à l'indice optique pourrait être levée en installant sur le banc expérimental une détection de fluorescence résolue en temps. En utilisant la détection temporelle du montage pompe-sonde, cette détection serait relativement simple et peu onéreuse à mettre en place [144] et, en utilisant le temps de vie du signal de fluorescence suite à une impulsion laser, il est possible de remonter aux propriétés optiques locales dans la cellule. [145] Une autre piste pour déterminer la célérité acoustique et l'indice optique dans un milieu liquide transparent et semi-infini consiste à déterminer l'indice piézo-optique du milieu en fonction de son indice optique, [133] à l'aide de la relation de Gladstone-Dale par exemple, ce qui permet d'obtenir deux relations distinctes où l'indice optique apparaît : une sur l'amplitude du signal Brillouin et une sur sa fréquence. Cependant, le protocole

expérimental pour que toutes les quantifications d'amplitudes soient correctement évaluées est particulièrement délicat, surtout sur cellules biologiques.

Afin de limiter les risques liés à la fluence laser, il serait intéressant de réaliser les acquisitions acoustiques en utilisant une pompe qui serait focalisée sur la face opposée du substrat biologique. La cellule serait ainsi soumise à un seul rayonnement laser. Une autre solution consiste à défocaliser le laser en utilisant un objectif de moins fort grossissement, ainsi les sources d'ablation cellulaire par effet photochimique et absorption du laser sont moins intenses.

Chapitre 4

Acoustique picoseconde dans une cellule animale : une couche mince acoustique

4.1) Présentation des cellules et du modèle analytique correspondant

4.1.1) Présentation des cellules animales

Par rapport à la cellule végétale, la cellule animale est plus complexe, plus variée en terme de quantité d'espèces cellulaires et aussi plus fragile pour la culture *in vitro*. Le cadre de ce travail est réalisé sur cellules animales pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 adhérentes sur un substrat mimant une prothèse d'os, le même substrat qu'utilisé précédemment pour étudier la cellule d'oignon, un alliage de titane Ti-AL6-4V. Les cellules ostéoblastes sont les cellules capables de produire une matrice minéralisée et donc de régénérer l'os. [38] Les cellules étudiées sont de lignée*. Le fait de travailler sur des cellules de lignée permet de s'affranchir de paramètres non maîtrisés tels que l'historique de vie et l'état de santé du donneur cellulaire.

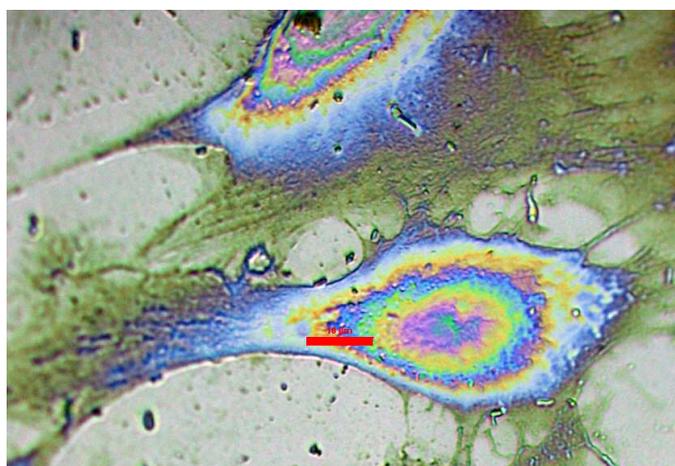


Figure 4-1 : Photographie de cellule animale MC3T3 fixée. La cellule est adhérente sur un biomatériau. Son l'épaisseur maximale, à la verticale du noyau, est de quelques centaines de nanomètres. La barre d'échelle mesure 10 µm.

* Lignée cellulaire : population homogène de cellules qui en théorie continue de proliférer indéfiniment. Les cellules MC3T3-E1 appartiennent à une lignée cellulaire non modifiée issue de la calvaria de nouveaux-nés de souris.

Les dimensions latérales des cellules ont été estimées par microscopie optique, celles-ci sont de quelques dizaines de micromètres, comme le montre la figure 4-1. Le noyau de la cellule est au centre de la cellule, le cytoplasme occupe un faible volume dans la cellule par rapport à la cellule végétale. Le cytosquelette formé des microtubules, du réseau d'actine et des microfilaments est discernable sur les périphéries cellulaires par les zones de tensions qu'il crée. L'ensemble forme une structure hétérogène et complexe.

Une mesure par interférométrie optique a ensuite permis de mesurer l'épaisseur de ces cellules. Cette épaisseur varie fortement sur une même cellule, et peu aussi varier d'un rapport au moins 4 entre les cellules d'un même échantillon.

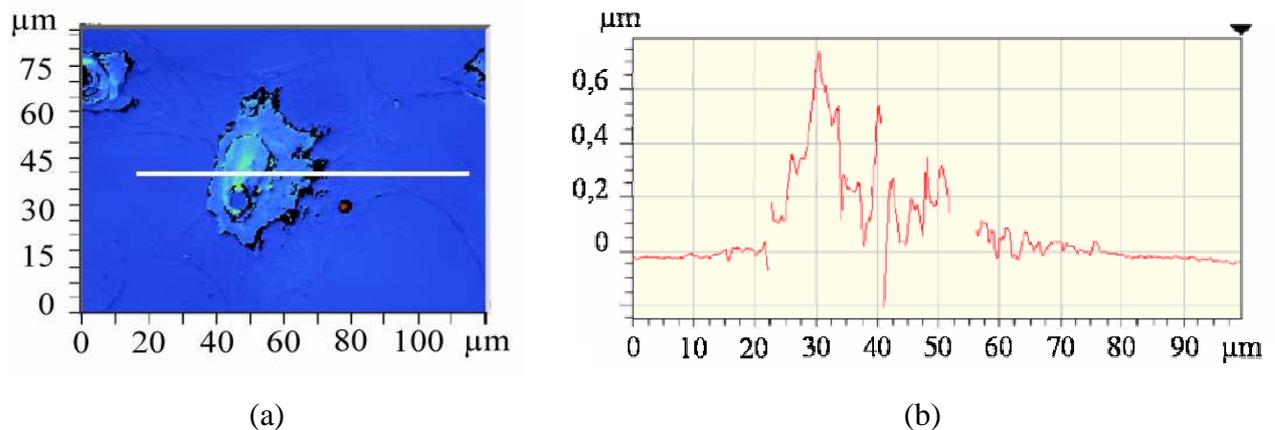


Figure 4-2 : (a) Photographie d'une cellule MC3T3 sur substrat de Ti-6Al-4V et (b) mesure par profilométrie optique de l'épaisseur de cette cellule, le long de la ligne blanche.

La figure 4-2 présente une mesure de profilométrie optique d'une cellule MC3T3 adhérente sur un substrat de Ti-AL6-4V. L'épaisseur et la rugosité de l'échantillon sont mesurées avec cette technique. La figure 4-2 illustre le principe de la technique. La mesure est obtenue sur la cellule de la figure 4-2(a), le long de la ligne blanche. Les mesures sont présentées sur la figure 4-2(b). L'épaisseur maximale se situe au niveau du noyau de la cellule. Il est délicat de donner une mesure précise de cette épaisseur au vue de l'irrégularité du profil d'épaisseur, cependant une valeur centrale de 350 nm d'épaisseur au dessus du noyau parait correcte. En dehors du noyau, l'épaisseur cellulaire descend rapidement sous la barre de la centaine de nanomètre voir des 50 nm sur la périphérie cellulaire.

Ce travail s'inscrivant dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire de reconstruction tissulaire*, l'enjeu de l'étude concerne l'adhésion cellulaire sur biomatériau. Une évaluation de la sensibilité de l'acoustique picoseconde pour cette mesure sera proposée dans ce chapitre en étudiant un même type de cellules, des cellules MC3T3, dont les conditions d'adhésion sur un même substrat, du Ti-6AL-4V, seront modifiées par l'ajout de protéines et de peptides d'adhésion. La condition de référence est définie par une mesure des propriétés des cellules MC3T3 sur l'alliage de titane lorsque aucun élément actif n'est ajouté. Les modifications biologiques sont réalisées à l'aide des protéines de BMP-2 et de peptide RGD (section 1.2.4). Le greffage du RGD en surface du titane induit une adhésion spécifique des cellules sur cette dernière. [38] La BMP-2, quant à elle, induit une différenciation cellulaire agissant sur la maturation des contacts focaux et sur l'organisation du cytosquelette, à l'intérieur de la cellule. [60]

Les cellules sont étudiées après fixation en surface du biomatériau. Après fixation, les cellules sont mortes mais préservent leurs caractéristiques telles que l'étalement ou l'adhésion focale. Ce protocole permet plusieurs aller retour des cellules entre les deux laboratoires si nécessaire, de les étudier à l'air libre sans qu'il y ait dégradation de la cellule et sans qu'elles se déplacent durant l'acquisition acoustique.

4.1.2) Acoustique picoseconde et couches minces transparentes

Les films minces ont été très étudiés en acoustiques picoseconde, une des applications classiques étant le contrôle d'épaisseur ou d'adhésion des couches métalliques absorbantes formant les transistors des circuits intégrés utilisés en micro-informatique. Pour ces études, l'échantillon est opaque et le signal expérimental est similaire à celui présenté sur la figure 2-1(b) de la section 2-1-2 : une succession d'échos acoustiques. Lorsque la couche inspectée est optiquement transparente, deux techniques expérimentales existent. L'inspection acoustique peut être réalisée via l'utilisation un film opaque adhérent au film mince transparent, [13] auquel cas la détection expérimentale est sensiblement similaire à celle décrite précédemment, une succession d'échos acoustiques. Cette inspection peut aussi être réalisée en sondant directement dans le volume du film mince transparent, auquel cas la détection optique est

* Laboratoire Biomatériaux et Réparation Tissulaire, INSERM U577, Université Victor Segalen, Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, Équipe Ingénierie de surfaces biofonctionnelles, coordonnée par M.-C. Durrieu.

composée des échos acoustiques mais aussi de l'interaction acousto-optique qui a lieu dans le cœur de la matière, [146] à l'origine des oscillations Brillouin.

Dès 1992, O.B. Wright s'est intéressé à la modélisation de la détection optique en acoustique picoseconde dans un film mince transparent. [147] Cette étude a été réalisée selon une approche d'optique géométrique. Par la suite l'expression analytique de la détection optique en acoustique picoseconde dans une structure multicouche transparente a été obtenue. [148] A. Devos a proposé en 2006 une étude analytique et expérimentale de la détection optique en acoustique picoseconde dans une couche mince transparente, où il étudie en détail l'interaction acousto-optique et la détection du déplacement des interfaces en fonction de la couleur de détection du laser. [149]

Expérimentalement, en sondant directement dans son volume la perturbation acoustique picoseconde se propageant, B. Bonello s'est intéressé à l'altération, sur une échelle temporelle de plusieurs semaines, des propriétés mécaniques de films organiques minces transparents déposés par la technique de Langmuir-Blodgett en surface d'un substrat métallique. [150] Il s'est par la suite, selon le même procédé expérimental, attaché à comprendre les propriétés mécaniques de films organiques en fonction de leur épaisseur, ces films étant toujours déposés selon la technique de Langmuir-Blodgett. [95] Selon un protocole similaire, en sondant directement dans le volume d'un film mince de diamant la perturbation acoustique picoseconde se propageant, B. Perrin a mesuré expérimentalement la vitesse acoustique, l'épaisseur et le profil de rugosité du film mince. [105] Par la suite, A. Devos a déterminé les épaisseurs, les vitesses acoustiques et les indices optiques de plusieurs films minces transparents en utilisant le même principe de détection optique, mesurée pour plusieurs angles d'incidence par rapport à l'échantillon. [32] En suivant la dynamique de formation du film mince transparent, O.B. Wright a, quant à lui, mesuré épaisseurs, vitesse et atténuation acoustique, indice optique et coefficient piezo-optique d'un film de glace, d'une dizaine de nanomètre à un peu moins de 800 nm d'épaisseur. [19] V. Gusev a, pour sa part, étudié le gradient spatial de propriétés élastiques de structures nanoporeuses de matériaux à faible constante de permittivité formant un film mince transparent. [151]

4.1.3) Présentation du modèle

L'épaisseur des cellules MC3T3 utilisées est de quelques centaines de nanomètres et la distance de propagation de l'impulsion acoustique générée par acoustique picoseconde peut être typiquement de quelques micromètres. Dans les cellules MC3T3, l'impulsion acoustique peut donc atteindre sans difficulté la membrane supérieure de la cellule, sur laquelle elle se

réfléchi, et fait ensuite des allers et retours à l'intérieur de la cellule. Le modèle de simulation utilisé précédemment pour interpréter les expériences d'acoustique picoseconde dans les cellules végétales, considérées comme étant semi-infinies, ne peut plus être appliqué à cette étude puisque cette possibilité d'allers et retours dans la cellule n'y est pas modélisée. Un nouveau modèle de simulation est alors développé pour cette étude. Celui-ci s'inspire fortement du précédent, la géométrie unidimensionnelle est conservée, ainsi que les mêmes équations fondamentales de diffusion thermique et de propagation acoustique, toujours résolues analytiquement. Les conditions limites à l'interface entre le substrat, milieu 0, et la cellule, milieu 1, seront inchangées. Cependant, une seconde interface est introduite, cette interface séparant la cellule de son environnement extérieur, milieu 2. La cellule a donc une épaisseur finie, notée d . Le milieu 2 est considéré comme étant transparent et semi-infini. Les conditions limites thermiques supposeront une continuité de la température et du flux de chaleur et les conditions limites mécaniques modéliseront la continuité du déplacement et des contraintes acoustiques à l'interface. Le milieu 2 pourra être défini comme étant de l'air pour les études réalisées sur cellules fixées et du milieu de culture pour les cellules étudiées en conditions *in vitro*. La modélisation de la détection optique sera proposée selon une approche d'optique géométrique, plus intuitive qu'avec une résolution des équations de Maxwell dont le formalisme devient particulièrement lourd. Lorsque cela est nécessaire, et afin de différencier les deux modèles de simulations, les expressions des termes du second modèle seront distinguées par l'exposant II .

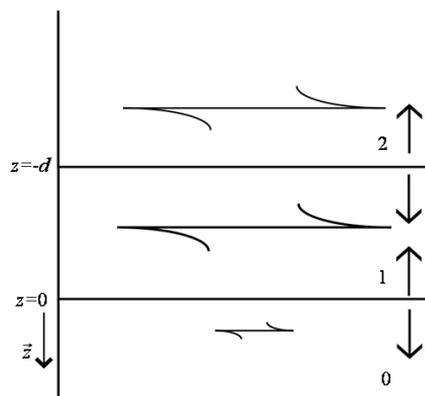


Figure 4-3 : Principe géométrique de la modélisation proposée. Le substrat correspond au milieu semi-infini indicé 0, la cellule au milieu indicé 1. L'interface entre la cellule et le substrat est située dans le plan $z=0$, et l'interface entre la cellule et son environnement extérieur est située dans le plan $z=-d$. Le dépôt d'énergie laser se situe dans le substrat, au voisinage de son interface avec la cellule. Le milieu 2 définit l'environnement extérieur. Note : l'onde acoustique se propageant dans le substrat est bipolaire alors que les ondes acoustiques se propageant dans les milieux transparents sont monopolaires. [149]

4.2) Simulation analytique

4.2.1) Élévation et diffusion de la chaleur

L'équation de diffusion de la chaleur (3.2) est à nouveau résolue analytiquement pour ce nouveau modèle. Seul le substrat absorbe l'énergie de l'impulsion laser pompe, aussi seule l'équation de diffusion de la chaleur dans le substrat a un terme source, écrit pareillement que pour le modèle à une interface. Le profil temporel de l'impulsion est conservé. Les conditions aux limites pour l'interface 0/1 sont inchangées, une résistance thermique d'interface est modélisée pour prendre en compte une éventuelle discontinuité de température entre les deux milieux, équation (3.8), et la seconde condition limite modélise la conservation du flux thermique à cette interface, équation (3.9). L'épaisseur de la cellule étant finie, la solution générale de l'équation de la chaleur dans celle-ci est la somme de deux termes de diffusion thermique, chacun définissant une direction de diffusion. Cependant, en vertu du principe de diffusion de la chaleur uniquement du corps chaud vers le corps froid, cette double direction de diffusion ne permet de modéliser qu'un éventuel confinement thermique qui peut apparaître dans une couche thermiquement mince, en fonction des conditions limites aux interfaces. Cet éventuel confinement thermique ne peut apparaître que si la longueur de diffusion thermique pour un temps caractéristique donné est supérieure à l'épaisseur de la couche mince et si les conditions aux limites de la couche mince limitent l'évacuation de la chaleur dans celle-ci. Par exemple, à partir des résultats du tableau 3-1, pour un temps caractéristique de 100 ps, et pour un matériau dont les propriétés thermiques seraient similaires à celles de l'eau, un éventuel confinement thermique ne peut apparaître dans la couche mince que si celle-ci mesure moins de 7 nm d'épaisseur. La distance de diffusion thermique peut aussi être déterminée pour la fréquence caractéristique du temps de vie de signal acoustique dans la cellule d'oignon, 0,5 GHz, à l'aide de la relation (3.7). Cette distance est alors de 30 nm. La température engendrée par une impulsion laser diffuse donc très peu dans la cellule comparativement à son épaisseur aussi elle devient négligeable lorsqu'elle atteint l'interface entre la cellule et le milieu 2 et il ne devient pas nécessaire de modéliser une résistance thermique au niveau de cette interface. Les conditions limites sont donc la continuité de la température,

$$T_1''(z = -d, \omega) - T_2''(z = -d, \omega) = 0, \quad (4.1)$$

et du flux thermique,

$$\Phi_1''(z = -d, \omega) = \Phi_2''(z = -d, \omega). \quad (4.2)$$

Les paramètres de diffusion thermique, $\Lambda_i(\omega)$ et $\Gamma_i(\omega)$ sont définis pareillement que dans le chapitre 3, section 3.2.1, et les solutions générales décrivant les champs de diffusion thermique dans les trois milieux sont donnés par les trois relations suivantes :

$$T_0''(z, \omega) = A_0''(\omega)e^{-\Gamma_0 z} + F_0''(\omega)e^{-\beta_0 z}, \quad (4.3)$$

pour le substrat,

$$T_1''(z, \omega) = A_1''(\omega)e^{-\Gamma_1 z} + B_1''(\omega)e^{\Gamma_1 z}, \quad (4.4)$$

pour la cellule,

$$T_2''(z, \omega) = B_2''(\omega)e^{\Gamma_2 z}, \quad (4.5)$$

pour le milieu 2.

Le détail des expressions des constantes des termes de la solution particulière et des solutions générales est fourni en annexe A.2.1.

4.2.2) Déplacement acoustique et variation d'épaisseur cellulaire

L'équation d'onde acoustique (3.13) est à présent résolue pour les trois milieux considérés. Les conditions aux limites modélisent, comme précédemment, la continuité des déplacements et des contraintes thermo-mécaniques pour les deux interfaces. Une unique direction de propagation acoustique, solution de l'équation d'onde acoustique sans terme source, apparaît par milieu semi-infini, ces deux directions étant opposées dans les deux milieux. En revanche, dans la cellule, les deux directions apparaissent puisque l'onde acoustique subit des réflexions multiples aux interfaces et donc des allers et retours de trajets acoustiques apparaissent. Les solutions des champs de déplacements dans les trois milieux sont alors :

$$U_0''(z, \omega) = G_0''(\omega)e^{-jk_0 z} + I_0''(\omega)e^{-\Gamma_0 z} + L_0''(\omega)e^{-\beta_0 z}, \quad (4.6)$$

pour le substrat,

$$U_1''(z, \omega) = G_1''(\omega)e^{-jk_1 z} + H_1''(\omega)e^{jk_1 z} + I_1''(\omega)e^{-\Gamma_1 z} + J_1''(\omega)e^{\Gamma_1 z}, \quad (4.7)$$

pour la couche mince, et

$$U_2''(z, \omega) = H_2''(\omega)e^{jk_2 z} + J_2''(\omega)e^{\Gamma_2 z}, \quad (4.8)$$

pour le milieu 2. Les nombres d'ondes k_i sont définis pareillement que dans la section 3.2.2.

La résolution du système formé par les conditions limites permet d'obtenir les expressions de l'amplitude de chaque terme des expressions des champs acoustiques. Cette résolution, et les solutions calculées, sont données en annexe A.2.2.

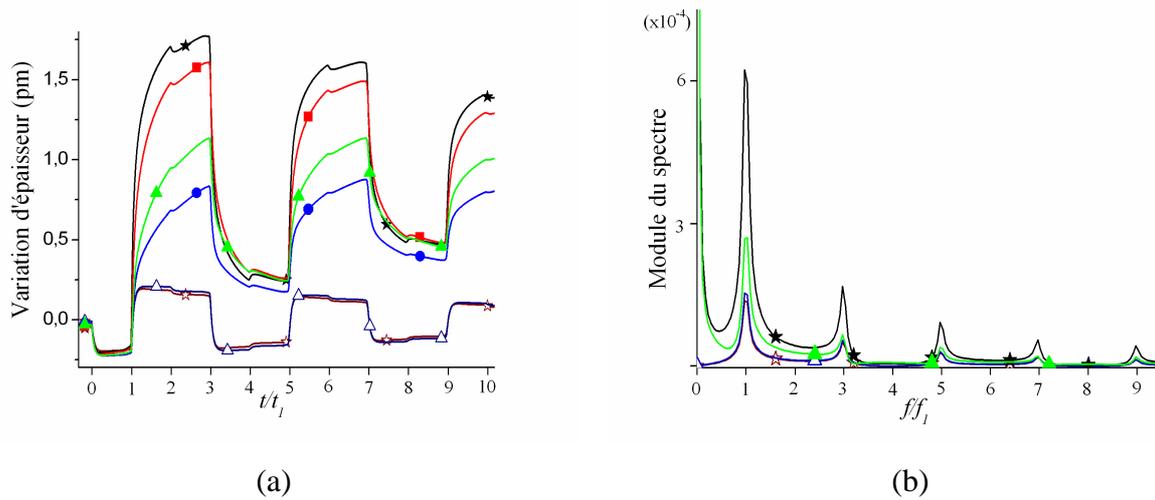


Figure 4-4 : (a) variation de l'épaisseur de la cellule en fonction du temps t , de la résistance thermique d'interface R et de la dilatation thermique dans la cellule. Les symboles pleins correspondent aux modélisations où la dilatation thermique est prise en compte et les symboles vides aux simulations où elle est négligée. Les valeurs des résistances thermiques pour les simulations sont $R=[0$ (étoiles), 1 (carrés), 5 (ronds), 10 (triangles)] 10^9 K.W $^{-1}$. (b) Module du spectre des signaux simulés lorsque $R=[0, 10]$ 10^9 K.W $^{-1}$.

A partir de l'expression du champ acoustique dans la cellule, sa variation d'épaisseur est calculée en effectuant la différence du déplacement des deux interfaces. Le déplacement de l'interface substrat/cellule est noté u_0 et le déplacement de l'interface cellule/milieu 2 est noté u_1 . La variation d'épaisseur de la cellule est alors u_0-u_1 . [147] La représentation graphique de la figure 4-4(a) présente cette variation d'épaisseur cellulaire en fonction du temps, de la dilatation thermique dans la cellule et de la résistance thermique d'interface. [130] L'axe des abscisses du graphique de la figure (a) est adimensionné par rapport au temps de vol acoustique dans la cellule, $t_1=d/v_1$ où v_1 correspond à la célérité acoustique dans la cellule et quatre valeurs de résistances thermiques sont simulées, $R=[0, 1, 5, 10]$ 10^9 K.W $^{-1}$. En première approximation, la cellule est modélisée avec les propriétés mécaniques de la vacuole d'une cellule d'oignon (voir tableau 3-3, section 3.2.5) et placée entre le substrat de titane, milieu 0, et de l'air, milieu 2.

Le front d'onde acoustique se propageant dans la cellule est dicté au premier ordre par la génération optique dans le substrat. Le temps caractéristique lié à cette génération acoustique dans le substrat est $\tau=(v_0\beta_0)^{-1}$, c'est-à-dire le temps que met le front d'onde acoustique pour parcourir la longueur d'absorption optique dans le substrat. Ce temps caractéristique est de quelques picoseconde pour un substrat de titane et une détection optique de couleur rouge ou bleue, il correspond au temps de passage du signal de $t=0$ au premier plateau, situé à -0,25 pm. Le coefficient de dilatation thermique du substrat est positif, ce qui

signifie que lorsqu'il subit l'élévation thermique due à l'impulsion pompe du laser, il se dilate. Il provoque alors une onde de compression dans la cellule, ce qui implique que la première variation d'épaisseur de la cellule soit négative. L'onde de compression qui se propage dans la cellule subit ensuite de multiples réflexions aux deux interfaces. Un signal acoustique périodique dans la cellule apparaît, dont la fréquence fondamentale f_1 est dictée par les conditions aux limites de la cellule, son épaisseur et la célérité acoustique dans son volume ; dans le cas présent $f_1 = v_1/4d$. Les harmoniques de la cavité acoustique sont des multiples impairs de ce mode fondamental. La phase du front d'onde après réflexion acoustique sera discutée dans la prochaine section. La figure 4-4(b) représente le module du spectre fréquentiel des signaux simulés sur la figure 4-4(a) avec une résistance thermique R nulle et égale à 10^{-9} K.W^{-1} . L'abscisse des graphiques a été normée par rapport au mode de résonance fondamental. Le mode fondamental de la cavité acoustique correspond donc à la raie fréquentielle d'abscisse 1 et, ensuite, apparaissent les multiples impairs de ce mode fondamental.

Les signaux avec symboles creux sont calculés en négligeant la dilatation thermique dans la cellule. La variation d'épaisseur de la cellule est alors centrée autour de zéro et l'amplitude du signal est essentiellement fonction de l'élévation thermique dans le titane. Si la valeur de la résistance thermique d'interface est augmentée, l'énergie apportée par le laser est moins bien relaxée dans la cellule et l'élévation thermique dans le titane augmente. La dilatation du titane est aussi augmentée, et l'amplitude du signal acoustique dans la cellule est de plus forte amplitude. Sur la figure 4-4(a), le signal de plus faible amplitude, avec étoiles, est calculé en supposant une résistance thermique nulle alors que le signal avec triangles est calculé en supposant une résistance thermique d'interface de 10^{-8} K.W^{-1} .

La dilatation linéaire dans l'eau est égale à $\alpha_1 = 2,5 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$, [152] elle est donc presque 40 fois supérieure à celle du titane, $\alpha_1 = 9 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$. Le terme source de l'équation d'onde acoustique lié à la dilatation thermique dans la cellule, équation (3.13), ne peut donc, en réalité, pas être négligé pour simuler correctement la variation d'épaisseur de la cellule ; d'autant plus que ce terme source évolue linéairement avec le gradient spatial de diffusion thermique qui est bien plus important dans la cellule que dans le titane, figure 3-3(a). Les signaux avec symboles pleins sont calculés en supposant que la dilatation thermique dans la cellule est égale à celle de l'eau. L'amplitude du signal mécanique est augmentée et le signal n'est plus centré autour de zéro. Ce décalage positif autour de la valeur nulle provient du signal lié à la diffusion thermique, il est positif car la dilatation thermique de la cellule est positive. Aussi, au fur à mesure que la température diffuse dans la cellule, son épaisseur

augmente et un signal dont la fréquence est liée à la diffusion thermique dans la cellule apparaît. Sa contribution fréquentielle apparaît en comparant le spectre des signaux avec symboles creux et pleins sur la figure 4-4(b). Ce signal basse fréquence provoque une forte pente entre les sauts d'amplitude de variation d'épaisseur de la cellule. Lorsque la valeur de la résistance thermique est modifiée, l'élévation et la relaxation thermique dans la cellule le sont aussi. La contribution du terme de relaxation thermique dans la cellule est donc elle aussi modifiée. Les signaux avec symboles pleins permettent de visualiser cette variation : lorsque l'amplitude de la résistance augmente, l'amplitude du signal décroît et sa fréquence tend vers zéro. Le cas asymptotique d'une forte résistance thermique correspond aux simulations où la dilatation thermique de la cellule n'est pas modélisée.

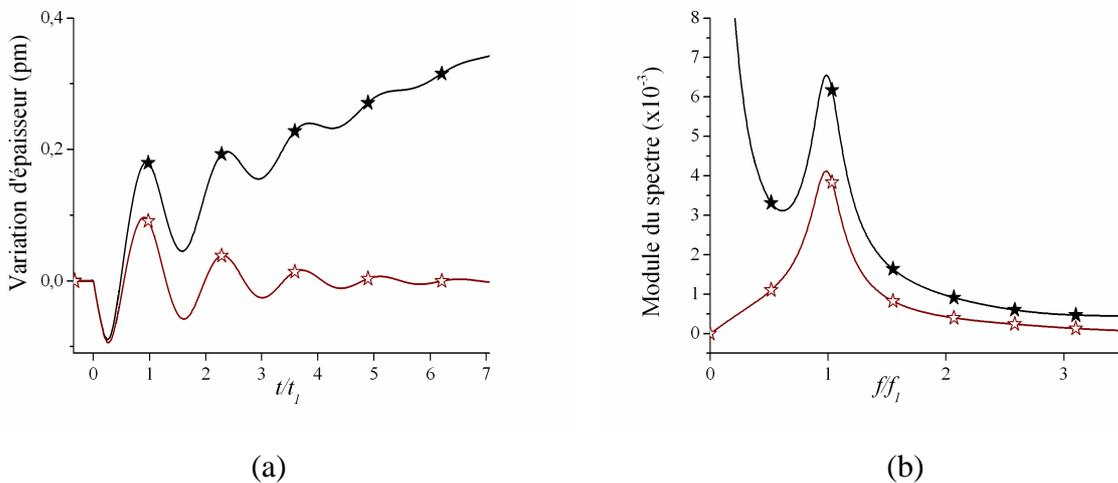


Tableau 4-5 : (a) variation de l'épaisseur de la cellule dont l'épaisseur est inférieure à la longueur d'onde acoustique en fonction du temps t et du terme source thermo-acoustique de la cellule. Les symboles pleins correspondent aux modélisations où le terme source thermo-acoustique de la cellule est pris en compte et les symboles vides aux simulations où il est négligé. (b) Module du spectre des signaux simulés lorsque la figure (a).

Le temps caractéristique de variation initiale de l'épaisseur de la cellule, τ , et la célérité acoustique dans la cellule dictent la longueur d'onde acoustique minimale générée et se propageant dans la cellule. Les simulations présentées sur la figure 4-4 sont réalisées pour des épaisseurs de cellule supérieures à cette longueur d'onde acoustique se propageant dans la cellule, 5 nm environ. Ceci correspond à l'essentiel du profil d'épaisseur des cellules, figure 4-2(b). Cependant, en périphérie cellulaire, l'épaisseur des cellules MC3T3 adhérentes sur alliages de titane peut descendre en dessous de la dizaine de nanomètre, auquel cas l'épaisseur du milieu sondé peut devenir comparable ou inférieure à cette longueur d'onde acoustique. La figure 4-5(a) présente des simulations de la dynamique de la variation d'épaisseur d'une lame

acoustique dont l'épaisseur est inférieure à la longueur d'onde acoustique générée, $v_1\tau$. Une résonance de la couche mince sur son mode fondamental est alors excitée dont la longueur d'onde est imposée par l'épaisseur de la lame. Cette longueur d'onde est, étant donné les conditions limites de la lame acoustique, égale à 4 fois l'épaisseur de la lame.

La lame acoustique est modélisée avec les paramètres mesurés de la vacuole d'une cellule d'oignon. Le signal temporel de la variation d'épaisseur de la cellule présente alors une forme sinusoïdale. Comme dans les simulations précédentes, la prise en compte de la dilatation thermique dans la cellule amplifie le signal acoustique dans son volume et rajoute un signal basse fréquence, lié à la diffusion thermique dans la cellule, simulations avec étoiles pleines, par rapport à lorsque cette dilatation est négligée, signaux avec étoiles creuses.

4.2.3) Déformation acoustique

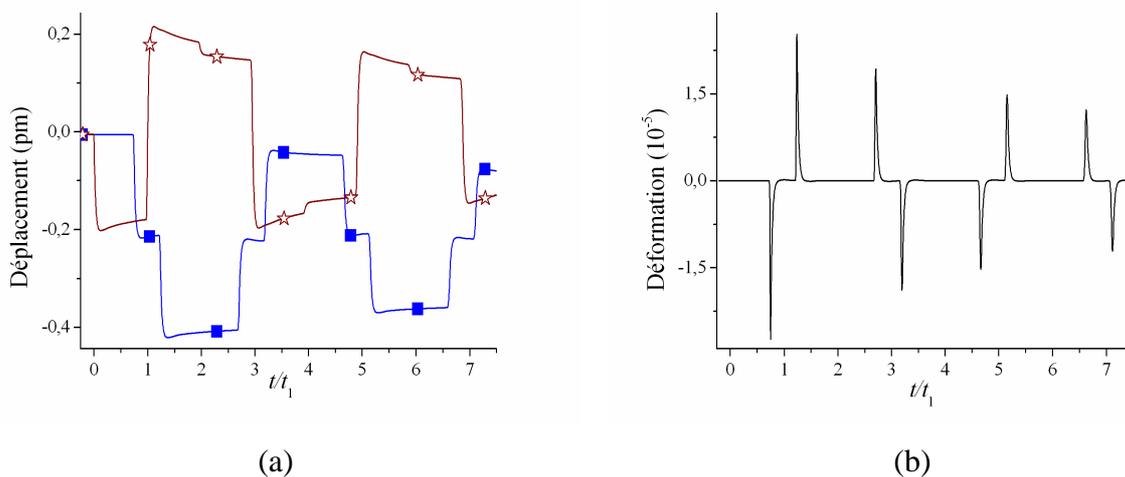


Figure 4-6 : (a) variation d'épaisseur en fonction du temps de la cellule en fonction du temps (étoiles creuses) et déplacement acoustique dans la cellule, en $z=-3/4d$ (carrés). (b) Déformation en fonction du temps dans la cellule créée par le déplacement acoustique simulé sur la figure 4-6(a). Les axes des abscisses sont adimensionnés par rapport au temps de vol acoustique dans la cellule. Les milieux simulés 0, 1 et 2 sont respectivement du Ti-6AL-4V, une cellule d'oignon et de l'air. La dilatation thermique de la cellule est négligée pour plus de simplicité.

La déformation acoustique est calculée à partir du déplacement acoustique. La figure 4.6(a) présente la variation d'épaisseur de la cellule déjà présentée sur la figure 4.4(a), signal avec étoiles, et le front d'onde du déplacement acoustique dans la cellule, calculé en $z=-3/4d$, signal avec carrés. La figure 4-6(b) est la déformation correspondante du déplacement acoustique présenté sur la figure (a). Pour plus de simplicité, les simulations présentées ne prennent pas en compte la contribution de la dilatation thermique dans la cellule et l'axe

temporel a , à nouveau, été adimensionné par rapport au temps de vol acoustique dans la cellule.

L'onde initiale qui se propage dans la cellule est une onde de compression, aussi le premier déplacement dans la cellule est négatif. La phase de l'onde acoustique, après réflexion sur les interfaces, est dictée par les coefficients de réflexion acoustique. L'impédance de la cellule est quatre décades au dessus de l'impédance de l'air, le rapport d'impédance entre les deux milieux tend alors vers 0 et, lors de la réflexion acoustique sur l'interface cellule/air, l'onde acoustique se réfléchit à l'identique sur l'interface. Sur la figure 4-6(a), cette réflexion à l'identique est visible en observant les fronts d'onde situés autour des abscisses impaires du déplacement acoustique en $z=3/4d$, signaux avec les carrés. Les rapports d'impédance étant très différents, l'amplitude de l'onde réfléchie est quasiment identique à celle de l'onde incidente, ce qui explique que le signal de la variation d'épaisseur soit centré autour de zéro. Si l'onde acoustique est réfléchie à l'identique sur cette interface, la déformation, dérivée spatiale du champ de déplacement, est sensible au sens de la propagation acoustique. Les ondes incidente et réfléchie étant de direction de propagation opposées, la déformation de l'onde réfléchie sur l'interface cellule/air est en opposition de phase avec l'onde incidente, figure 4-6(b).

Le rapport entre les impédances de la cellule et du substrat tend vers 1, l'onde incidente est alors réfléchie sur l'interface cellule/titane avec un saut de π de sa phase. Ce saut de phase est visible en comparant la phase des fronts d'onde centrés autour des abscisses de valeurs paires, figure 4-6(a). A nouveau, les impédances étant très différentes, l'onde incidente transmet très peu d'énergie acoustique dans le substrat, et l'amplitude de l'onde réfléchie est comparable à l'amplitude de l'onde incidente. Les déformations des ondes incidentes et réfléchies sur l'interface cellule/substrat sont de même signe puisque le changement de phase du déplacement créé par la réflexion est compensé par le changement de direction de propagation, figure 4-6(b).

4.2.4) Détection optique

Il est possible de modéliser la détection optique en ayant une démarche similaire à celle qui a été proposée dans la paragraphe 3, en appliquant formellement la relation de diffraction optique en milieu infini, équations (3.22) et (3.23), au problème considéré. Il suffit alors de résoudre le système à quatre équations, formé à partir des conditions aux limites, pour établir la relation de détection optique. Cependant, cette modélisation devient particulièrement lourde et la physique de la détection est cachée derrière la résolution mathématique délicate

du problème. Le principe de résolution est présenté en annexe A.3 pour illustrer ces propos. Une modélisation plus intuitive, basée sur une approche d'optique géométrique est proposée pour cette étape de calcul. Afin de pouvoir appréhender la détection selon une approche d'optique géométrique, le champ lumineux est étudié en fonction de l'espace et du temps. L'étude proposée est faite sur une approche similaire à celles de R. Côte [153] ou de T. Dehoux [154] et adaptée au cadre de ce travail. La modélisation de la détection optique des déplacements mécaniques de la lame optique sera réalisée dans un premier temps puis, dans un second temps, la modélisation de la détection de la contribution acousto-optique sera réalisée. Les termes de propagation de l'onde optique seront omis dans cette étude, seuls les amplitudes et le déphasage des rayons présentant un intérêt. La référence des phases sera considérée en $z=0$.

4.2.4.1) Détection de la dynamique des interfaces

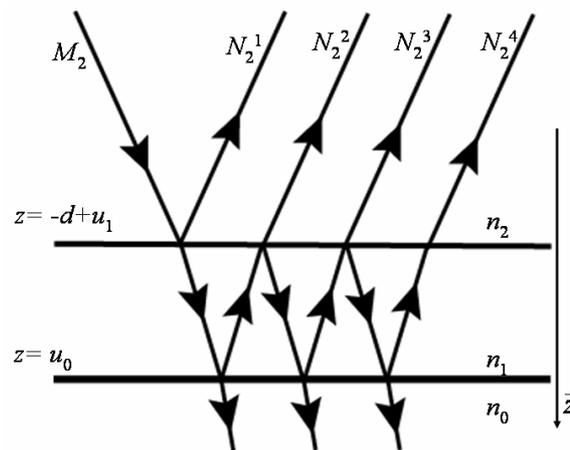


Figure 4-7 : Représentation des transmissions et réflexions optiques aux interfaces entre les milieux 0, 1 et 2. Le faisceau optique incident M_2 correspond à la sonde laser, celle-ci est en partie réfléchi et transmise au niveau de l'interface entre les milieux 1 et 2. La partie transmise à l'interface est ensuite à l'intérieur d'une lame optique et, si le rayon incident est normal aux interfaces, une infinité de réflexions et de transmissions optiques surviennent. L'origine des phases est choisie en $z=0$.

Lorsque l'onde optique incidente arrive à l'interface 2/1, une partie de cette onde optique est réfléchi et l'autre partie est transmise, jusqu'à l'interface 1/0 où les mêmes phénomènes physiques surviennent. L'onde optique réfléchi à cette interface subit à nouveau des réflexions et transmissions lorsqu'elle arrive de nouveau à l'interface 1/2. Un schéma de principe de ces réflexions et transmissions aux interfaces est proposé sur la figure 4-7. Soit M_2 l'amplitude de l'onde incidente, connaissant les coefficients de réflexion et de transmission d'un milieu i vers un milieu j , notés respectivement r_{ij} et t_{ij} et déterminés par les relations de

Fresnel, les amplitudes des rayons réfléchis, ainsi que leur déphasage, sont alors facilement obtenus. [128] La référence des phases est prise en $z=0$.

$$N_2^1 = r_{21} e^{2jq(n_1 d - n_2 u_1)} M_2, \quad (4.9)$$

$$N_2^2 = t_{21} r_{10} t_{12} e^{2jq(u_1(n_1 - n_2) - n_1 u_0)} M_2, \quad (4.10)$$

$$N_2^3 = t_{21} r_{10}^2 r_{12} t_{12} e^{2jq(-dn_1 + 2u_1(n_2 + n_1) - 2n_1 u_0)} M_2, \dots \quad (4.11)$$

Les termes u_0 et u_1 correspondent aux déplacements des interfaces entre les milieux, respectivement entre les milieux 0 et 1 et les milieux 1 et 2. Leur introduction dans les termes de déphasage permet de calculer le déphasage optique de la sonde laser créée par le mouvement des interfaces décrit précédemment, dans la section 4.2.2. Si le rayon optique incident est à incidence normale par rapport à l'interface entre le milieu 1 et le milieu 2, le nombre de rayons réfléchis par cette lame à face à parallèle est infini. Cependant, seuls les rayons N_2^1 et N_2^2 seront utilisés dans cette étude, la prise en compte des rayons suivants conduisant à des instabilités de calcul numérique du fait de leur faible amplitude. La détection du déplacement des interfaces de cette lame optique peut être vue comme la détection optique d'un interféromètre de Fabry-Perot dont l'épaisseur varierait dans le temps autour d'une position d'équilibre.

4.2.4.2) Détection des champs de perturbation

La détection des champs de perturbation est à présent étudiée. Le principe de base pour modéliser cette détection consiste à déterminer dans un premier temps le champ optique se propageant dans un milieu dont la permittivité est perturbée selon un profil spatial de type Heaviside localisé en z' . Le symbole Δ sera utilisé pour symboliser ce profil spatial de perturbation. Cette considération permet de modéliser dans un premier temps la détection des champs de perturbation selon une approche très similaire à celle de la détection du mouvement des interfaces. [154] Considérant que les indices optiques de part et d'autre de l'interface optique virtuelle sont n_i^h et $n_i^h + n_i^s$, on définit le coefficient de réflexion optique de part et d'autre du saut d'indice optique en différenciant la relation $\varepsilon_i = n_i^2$:

$$\Delta r_i^s = \frac{n_i^h - (n_i^h + n_i^s)}{2n_i^h + n_i^s} = -\frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} + \vartheta \left(\frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} \right)^2, \quad (4.12)$$

$$\Delta \bar{r}_i^s = \frac{(n_i^h + n_i^s) - n_i^h}{2n_i^h + n_i^s} = \frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} + \vartheta \left(\frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} \right)^2. \quad (4.13)$$

De même les coefficients de transmission sont :

$$\Delta t_i^s = \frac{2n_i^h}{2n_i^h + n_i^s} = 1 - \frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} + \vartheta \left(\frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} \right)^2, \quad (4.14)$$

$$\Delta \bar{t}_i^s = \frac{2(n_i^h + n_i^s)}{2n_i^h + n_i^s} = 1 + \frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} + \vartheta \left(\frac{\varepsilon_i^s}{4(n_i^h)^2} \right)^2. \quad (4.15)$$

La notation sans barre est réservée aux évènements optiques survenant lorsque l'onde incidente est dans le milieu dont l'indice est non perturbé et, au contraire, la notation avec barre est réservée à lorsque l'onde optique incidente est dans le milieu perturbé. L'amplitude du terme de perturbation optique est la même en valeur absolue $\varepsilon_i^s/4(n_i^h)^2$, et le signe de la perturbation est dicté par la direction incidente du rayon optique vis-à-vis du saut d'indice. On retrouve alors ce qui a été remarqué au cours de la résolution optique faite dans le premier modèle, équation (3.23) : pour une amplitude de rayon donnée, l'amplitude des rayons diffractés en transmission et en réflexion sur la source de perturbation optique est la même, et, le signe du terme de diffraction optique est dicté par la direction du rayon optique incident.

La modélisation de la détection optique des champs de perturbation est réalisée pour chaque milieu transparent en considérant uniquement les rayons optiques qui permettent d'aller jusqu'au rayon optique N_2^2 dans la détection du déplacement des interfaces de la section précédente. La détection optique des champs de perturbations dans la cellule est présentée sur la figure 4-8.

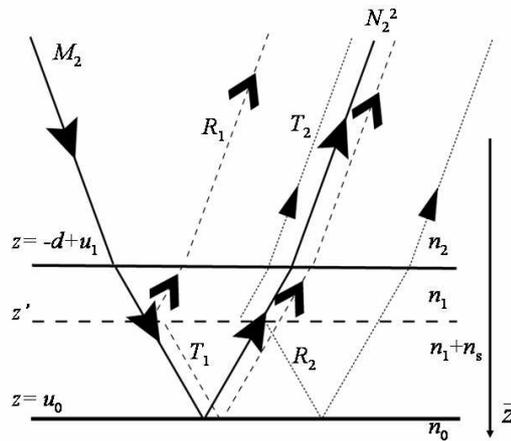


Figure 4-8 : Réflexions et transmissions optiques apparaissant lorsque le milieu matériel de la couche 1 est modélisé avec une perturbation de son indice optique selon un profil spatial de type Heaviside.

Les champs électriques perturbés par le saut d'indice optique dans le milieu 1, les rayons R_1 , T_1 , R_2 et T_2 , s'écrivent respectivement :

$$\Delta R_1 = t_{21} \Delta \bar{r}_1^s(z') t_{12} e^{2jq(n_1^h - n_2^h)u_1} e^{-2jqn_1^h z'} M_2, \quad (4.16)$$

$$\Delta T_1 = t_{21} \Delta \bar{r}_1^s(z') r_{01} t_{12} e^{2jq(u_1(n_1^h - n_2^h) - n_1^h u_0)} e^{2jqn_1^s(z' - u_0)} M_2, \quad (4.17)$$

$$\Delta R_2 = t_{21} r_{10}^2 \Delta r_1^s(z') t_{12} e^{2jq(u_1(n_1^h - n_2^h) - 2u_0(n_1^h + n_1^s))} e^{2jq(n_1^h + 2n_1^s)z'} M_2, \quad (4.18)$$

$$\Delta T_2 = t_{21} r_{01} \Delta t_1^s(z') t_{12} e^{2jq(u_1(n_1^h - n_2^h) - n_1^h u_0)} e^{2jqn_1^s(z' - u_0)} M_2 = -\Delta T_1. \quad (4.19)$$

Les exponentielles fonctions du lieu de l'interface optique virtuelle, située en z' , traduisent le déphasage optique créé par la différence de marche optique entre le lieu de la référence des phases, située en $z=0$, et le saut d'indice optique provoqué par l'interface virtuelle. De la même manière, les termes en exponentielles où apparaît le déplacement des interfaces traduisent la différence de phase des rayons créée par ce déplacement d'interface. Le déphasage des rayons transmis sur le saut d'indice optique est le même, et l'amplitude de ces rayons est la même en valeur absolue, mais de signe opposé. Les rayons transmis sur l'interface virtuelle s'annulent entre eux, conformément à ce qui avait été remarqué lors de la résolution faite avec les équations de Maxwell, équation (3.24). Dans la cellule, la détection optique des champs de perturbation dus à une perturbation de l'indice optique selon un profil spatial de type Heaviside est alors :

$$\begin{aligned} \Delta E_1 &= \Delta R_1 + \Delta R_2 \\ &= t_{21} t_{12} e^{2jq(n_1^h - n_2^h)u_1} \left(\Delta \bar{r}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} + r_{10}^2 e^{-4jq u_0(n_1^h + n_1^s)} \Delta r_1^s(z') e^{2jq(n_1^h + 2n_1^s)z'} \right) M_2. \end{aligned} \quad (4.20)$$

La réponse impulsionnelle à un Dirac spatial, symbolisé par le graphème δ , s'obtient en dérivant spatialement cette dernière relation par rapport à la variable z' . Seul les termes de diffraction au premier ordre sont conservés.

$$\delta E_1 = \frac{-jq t_{21} t_{12} e^{2jq(n_1^h - n_2^h)u_1}}{2n_1^h} \left(\delta \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} + r_{10}^2 e^{-4jq u_0(n_1^h + n_1^s)} \delta \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jq(n_1^h + 2n_1^s)z'} \right) M_2. \quad (4.21)$$

La somme de toutes les contributions sur l'espace est obtenue en intégrant la réponse impulsionnelle à un Dirac spatial, équation (4.21), cette intégration pouvant être considérée comme la convolution de la réponse optique à une perturbation impulsionnelle avec la forme spatiale de l'impulsion acoustique. [154]

$$E_1 = \frac{-jq t_{21} t_{12} e^{2jq(n_1^h - n_2^h)u_1}}{2n_1^h} \left(\int_{u_0}^{-d+u_1} \delta \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' + r_{10}^2 e^{-4jq u_0(n_1^h + n_1^s)} \int_{u_0}^{-d+u_1} \delta \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jq(n_1^h + 2n_1^s)z'} dz' \right) M_2. \quad (4.22)$$

Les termes de diffraction de Stokes et d'Anti-Stokes apparaissent à nouveau dans l'expression de la détection optique. Ces deux modes sont sensibles au déphasage optique du déplacement de l'interface u_1 . Si l'épaisseur de la cellule tend vers l'infini, l'épaisseur de la lame optique devient infinie, et il convient alors de comparer l'expression obtenue avec

l'expression de la détection obtenue dans le paragraphe 3, équation (3.24). Cette modélisation de la détection optique ne permet pas de retrouver l'expression obtenue en résolvant les équations de Maxwell dans le cas de la détection optique dans une lame transparente semi-infinie du paragraphe 3. Il y a en effet une différence d'un facteur 2 entre les amplitudes des deux champs optiques diffractés par la perturbation acoustique, et les modes de Stokes et Anti-Stokes sont ici de même signe alors que ces modes ont été évalués de signe opposés avec la résolution basée sur la solution de l'équation de diffraction de Maxwell. Cette différence apparaît à partir du moment où le profil spatial de la perturbation est de type Dirac. Auparavant, les deux modes sont de signe opposés, comme lorsque la résolution est résolue à l'aide de l'équation de Maxwell, qui ne suppose pas de profil spatial pour la perturbation. Il est donc possible qu'il y ait, selon cette approche, une erreur lors de la transition du profil spatial selon un Heaviside vers un profil de Dirac.

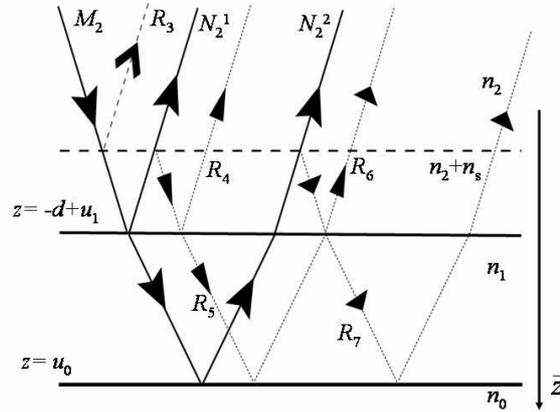


Figure 4-9 : Réflexions et transmissions optiques apparaissant lorsque le milieu matériel de la couche 2 est modélisé avec une perturbation de son indice optique selon un profil spatial de type Heaviside. Les rayons transmis sur l'interface virtuelle ne sont pas représentés pour plus de simplicité du schéma.

Le champ de perturbation dans le milieu 2 est à présent résolu de la même manière, un saut d'indice selon un profil spatial de type Heaviside est considéré dans un premier temps. Les rayons perturbés en transmission s'annulent à nouveau entre eux et ne sont pas considérés dans cette modélisation. Les rayons perturbés en réflexion par le saut d'indice optique sont présentés sur la figure 4-9 et s'écrivent :

$$\Delta R_3 = e^{2jq(n_1^h - n_2^h)d} \Delta \bar{r}_2^s(z') e^{-2jqn_2^h z'}, \quad (4.23)$$

$$\Delta R_4 = r_{21}^2 e^{2jq(d(n_2^h + 2n_2^s) - 2(n_2^h + n_2^s)u_1 + n_1 d)} \Delta r_2^s(z') e^{2jq(n_2^h + 2n_2^s)z'}, \quad (4.24)$$

$$\Delta R_5 = r_{21} t_{21} r_{01} t_{12} e^{2jq((n_2^h + 2n_2^s)d - 2(n_2^h + n_2^s)u_1 + n_1^h(u_1 - u_0))} \Delta r_2^s(z') e^{2jq(n_2^h + 2n_2^s)z'}, \quad (4.25)$$

$$\Delta R_6 = t_{21} r_{01} t_{12} r_{12} e^{2jq((n_2^h+2n_2^s)d-2(n_2^h+n_2^s)u_1+n_1^h(u_1-u_0))} \Delta r_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'}, \quad (4.26)$$

$$\Delta R_7 = t_{21}^2 r_{01}^2 t_{12}^2 e^{2jq((n_2^h+2n_2^s)d-2(n_2^h+n_2^s)u_1-n_1^h d+2n_1^h(u_1-u_0))} \Delta \bar{r}_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'}. \quad (4.27)$$

Les réponses à une perturbation indicielle sont ensuite obtenues en dérivant ces expressions et la variation spatiale du coefficient de réflexion sur tout le milieu 2 est obtenue en intégrant les réponses indicielles :

$$\Delta R_3 = -\frac{jqe^{2jq(n_1^h-n_2^h)d}}{2n_2^h} \int_{-d+u_1}^{-\infty} \delta \mathcal{E}_2^s(z') e^{-2jqn_2^h z'} dz', \quad (4.28)$$

$$\Delta R_4 = -\frac{jqr_{21}^2 e^{2jq(d(n_2^h+2n_2^s)-2(n_2^h+n_2^s)u_1+n_1^h d)}}{2n_2^h} \int_{-d+u_1}^{-\infty} \delta \mathcal{E}_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'} dz', \quad (4.29)$$

$$\Delta R_5 = -\frac{jqr_{21} t_{21} r_{01} t_{12} e^{2jq((n_2^h+2n_2^s)d-2(n_2^h+n_2^s)u_1+n_1^h(u_1-u_0))}}{2n_2^h} \int_{-d+u_1}^{-\infty} \delta \mathcal{E}_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'} dz', \quad (4.30)$$

$$\Delta R_6 = -\frac{jqt_{21} r_{01} t_{12} r_{12} e^{2jq((n_2^h+2n_2^s)d-2(n_2^h+n_2^s)u_1+n_1^h(u_1-u_0))}}{2n_2^h} \int_{-d+u_1}^{-\infty} \delta \mathcal{E}_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'} dz', \quad (4.31)$$

$$\Delta R_7 = -\frac{jqt_{21}^2 r_{01}^2 t_{12}^2 e^{2jq((n_2^h+2n_2^s)d-2(n_2^h+n_2^s)u_1-n_1^h d+2n_1^h(u_1-u_0))}}{2n_2^h} \int_{-d+u_1}^{-\infty} \delta \mathcal{E}_2^s(z') e^{2jq(n_2^h+2n_2^s)z'} dz'. \quad (4.32)$$

Finalement, la somme de toutes les contributions ainsi écrites, dans les milieux 1 et 2, permet de modéliser la détection optique de l'ensemble des champs de perturbation dans les deux milieux. Si l'on considère une réflexion totale à l'interface entre les milieux 1 et 2, seules la contribution des rayons 3 et 4 apparaît dans cette modélisation de la perturbation et l'on retrouve l'expression de la détection de la perturbation obtenue dans le milieu 1 lorsque celui-ci tend vers une épaisseur infinie, relation (4.22).

La détection dans le titane peut être ajoutée à la détection à partir de l'expression obtenue au chapitre 3, équation (3.29).

Pour modéliser la détection thermique et acoustique on utilise à nouveau la relation (3.16) et les expressions des champs thermiques et acoustiques dans chaque milieu.

4.2.4.3) Influence de l'épaisseur de la cellule vis-à-vis de la détection optique

Les résultats sur cellules animales présentés dans ce manuscrit sont obtenus sur des cellules fixées. Les cellules fixées n'ont pas besoin d'être immergées dans du milieu de culture lors des acquisitions expérimentales, elles sont placées à l'air libre. Pour comparer les

résultats expérimentaux aux simulations numériques le milieu 2 est modélisé par de l'air, la détection acousto-optique dans ce milieu est nulle. La modélisation proposée est alors celle de la détection du mouvement des interfaces de la lame acoustique ainsi que la contribution acousto-optique de la détection dans celle-ci.

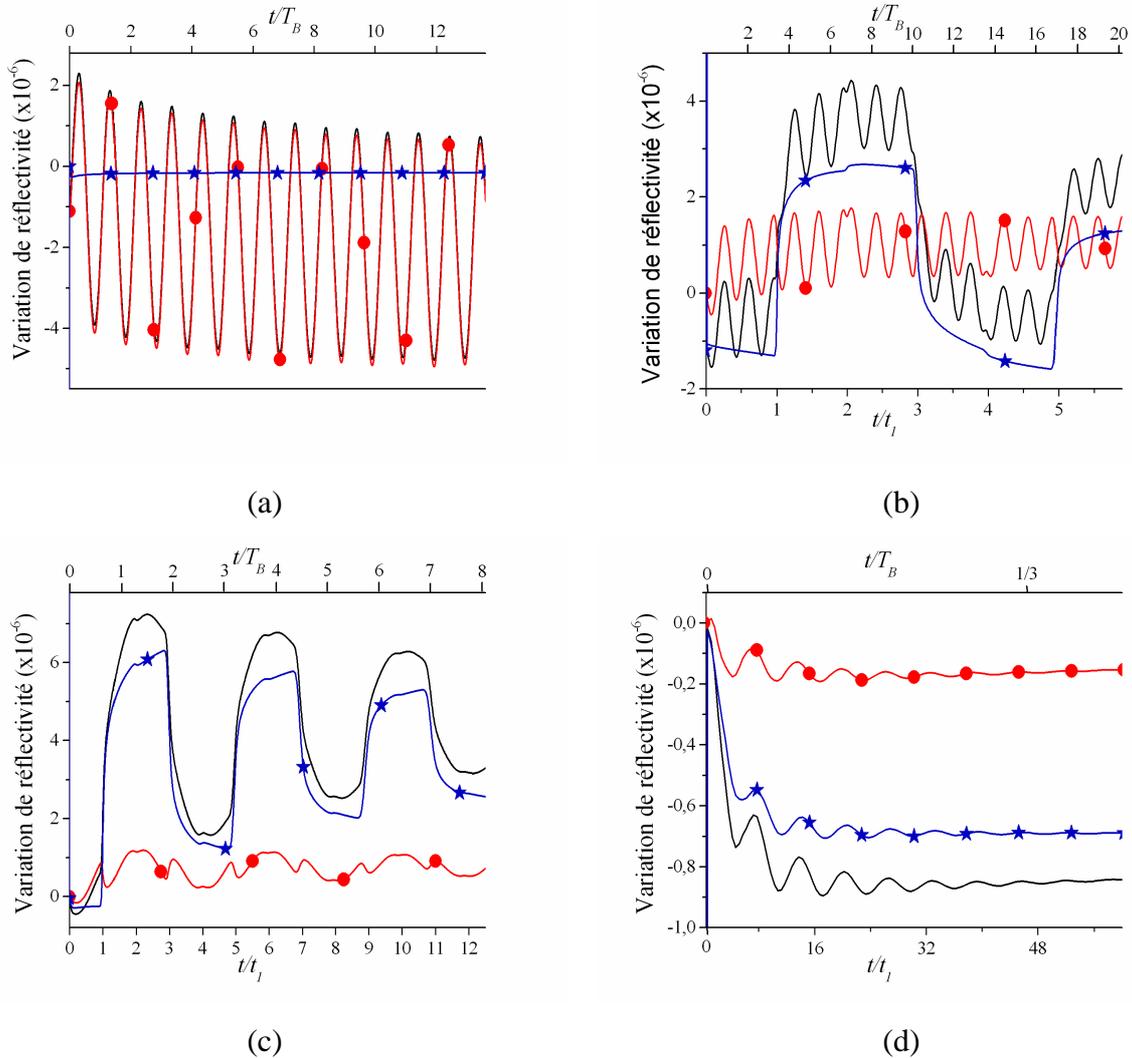


Figure 4-10 : Variation de réflectivité en fonction du temps simulée dans une lame mince placée entre deux milieux semi-infinis, un d'air et un de titane. Quatre épaisseurs de lame d sont simulées : (a) : $d \rightarrow \infty$, (b) : $d_A < d_0 < d$, c : $d_A < d < d_0$, (d) : $d < d_A < d_0$ Pour chaque simulation la contribution de la détection acousto-optique est représentée sur les simulations avec les cercles, la détection du mouvement des interfaces est représentée sur les signaux avec les étoiles et la somme des deux contributions est représentée sur les signaux sans symbole.

La figure 4-10 présente des simulations de la détection acousto-optique en fonction du temps adimensionné par rapport au temps de vol acoustique dans la lame t_1 , présenté sur les abscisses basses des graphiques, et par rapport à la période de la contribution acousto-optique dans la lame transparente,

$$T_B = \frac{\lambda}{2n_1v_1}, \quad (4.33)$$

sur les abscisses hautes des graphiques.

Quatre épaisseurs de lame acoustique sont simulées ; pour chaque épaisseur, les contributions de variation de réflectivité de la détection de la dynamique des interfaces, de la détection acousto-optique et de l'ensemble des deux contributions sont représentées. [130] Les signaux simulés avec les ronds modélisent l'interaction acousto-optique dans la cellule et les signaux avec les étoiles modélisent la contribution de la dynamique de ses interfaces. Les signaux sans symboles correspondent à la totalité de la détection optique. Sur la figure 4-10(a), l'épaisseur de la lame est semi-infinie, la géométrie du modèle de simulation correspond alors à celle du modèle présenté dans le paragraphe 3 et l'adimensionnement par rapport au temps de vol dans la lame ne peut pas être proposé. L'onde acoustique n'est pas piégée dans la lame, il n'y a pas de réflexion acoustique et la contribution du déplacement de l'interface 0/1 à la détection optique est uniquement au temps très courts, de $t=0$ à τ . La détection optique du signal acoustique est ensuite uniquement composée de la contribution acousto-optique de la détection, les oscillations Brillouin.

La longueur d'onde du phonon acoustique interagissant avec la lumière et créant les oscillations Brillouin correspond à la demi-longueur d'onde de la radiation optique dans le milieu sondé :

$$d_o = \frac{\lambda}{2n_1}, \quad (4.34)$$

cette distance est donc uniquement fonction des paramètres optiques du support matériel de l'interaction acousto-optique.

Sur la figure 4-10(c) l'épaisseur de la lame acoustique est inférieure à cette distance optique d_o , la contribution de la détection acousto-optique ne peut alors pas apparaître sur une période entière de signal mais cette interaction ayant lieu, elle contribue dans la détection totale du signal. Cette contribution est visible sur le tracé avec les ronds. Le changement de signe de la déformation lors des réflexions acoustiques sur l'interface cellule/air, figure 4-6, est visible autour des sauts d'amplitude de la détection au niveau des abscisses impaires de l'axe temporel adimensionné par rapport au temps de vol dans la cellule. La réflexion de la déformation sans changement de signe à l'interface cellule/titane, abscisses paires sur le même axe, est aussi clairement observée. Le déphasage optique créé par le déplacement acoustique des interfaces intervient dans les deux processus de détection. Et, de plus, le déplacement de l'interface avec l'air est plus important que celui de l'interface avec le

substrat, le déphasage optique créé par le déplacement de l'interface avec l'air est donc supérieur à celui créé par le déplacement de l'interface avec le substrat. La détection optique du déplacement des interfaces présente un profil très semblable à celui de la variation d'épaisseur de la cellule, figure 4-4(a). La signature de la contribution basse fréquence du terme source thermo-acoustique dans la cellule apparaît dans les deux processus de détection. La détection totale est finalement la somme des deux contributions de la détection optique, simulation représentée sans symbole.

La figure 4-10(b) correspond à une simulation où l'épaisseur de la lame est supérieure à la distance optique d'interaction Brillouin d_o . La détection acousto-optique est alors plus haute fréquence que la détection du déplacement des interfaces, et la détection totale du signal est la somme des oscillations Brillouin et de la détection du mouvement des interfaces. Sur la figure 4-10(d), la lame acoustique est inférieure à la longueur d'onde acoustique générée par la pénétration optique dans le substrat, la longueur d'onde acoustique dans la cellule est égale à 4 fois l'épaisseur de la lame acoustique (paragraphe 4.2.2). La perturbation de la permittivité diélectrique dans la lame acoustique est homogène sur l'épaisseur de cette lame. La contribution de la détection acousto-optique est réduite à la détection du mouvement des interfaces de la lame acoustique résonante.

4.2.3.4) Vers la résolution du problème inverse à partir de la détection optique dans la lame transparente

C. Rossignol a présenté un protocole de mesure de célérité acoustique et d'épaisseur de couches minces de diamant, [105] en utilisant la détection d'oscillations Brillouin et de déplacement d'interfaces des couches en acoustique picoseconde. Par la suite, A. Devos a proposé la mesure de trois paramètres physiques par acoustique picoseconde dans une couche mince transparente ; celles de l'indice optique, de la vitesse acoustique et de l'épaisseur de la couche mince. [32] La méthode consiste à utiliser la détection des oscillations Brillouin et du déplacement des interfaces dans une lame mince optiquement transparente où deux acquisitions expérimentales sont faites à deux angles d'incidence de sonde différents. En utilisant alors les relations de transmission de Snell-Descartes dans la relation fréquentielle des oscillations Brillouin, il est analytiquement possible de déterminer l'indice optique de la couche à partir de la connaissance des angles d'incidence de la sonde et du rapport des fréquences Brillouin mesurées. On a alors accès à une première mesure. Connaissant la valeur de l'indice optique du milieu, la célérité acoustique dans la lame mince est ensuite mesurée à partir du signal Brillouin. C'est la seconde mesure. Et finalement, la troisième mesure, celle

de l'épaisseur de la lame, est obtenue à partir du temps de vol acoustique dans celle-ci. Il n'est pas possible sur le banc expérimental de faire varier l'angle d'incidence de la sonde optique (section 2.2.2), l'indice optique de la cellule est supposé, comme pour la cellule végétale, égal à 1,4 [155] et, ensuite, le protocole proposé par C. Rossignol ou A. Devos est suivi : la détection Brillouin permet de mesurer la célérité acoustique qui ensuite, avec le temps d'arrivée des échos acoustiques permet de mesurer l'épaisseur de la cellule.

4.3) Détection expérimentale réalisée en deux couleurs dans une même cellule MC3T3

4.3.1) Protocole expérimental

Les cellules animales sont déposées sur les substrats de Ti-6Al-4V par l'équipe d'ingénierie de surfaces biofonctionnelles coordonnée par M.-C. Durrieu de l'unité de recherche INSERM U577 de l'université de Bordeaux 2. Le protocole de polissage du substrat est le même que celui utilisé pour l'étude sur cellules végétales. Les cellules sont fixées par voie chimique (incubation dans du paraformaldéhyde), [156] et l'étude est réalisée à l'air libre. Une dégradation de la cellule provoquée par le rayonnement laser a été observée lorsque l'objectif 50x est utilisé. La focalisation est alors réduite en utilisant un objectif 20x et le diamètre de la tache focale en surface du substrat est estimée à 5 μm . Les puissances de pompe et de sonde sont augmentées de manière à conserver la même fluence en surface du matériau que pour les acquisitions faites sur l'oignon, respectivement 3 et 1,5 pJ par impulsion. On n'observe pas de dégradation de la cellule avec ce protocole. La dégradation cellulaire était donc liée à une trop forte concentration de l'énergie laser dans le cône de focalisation, elle même liée à une forte ouverture numérique de l'objectif.

Par la suite, une étude expérimentale de la mécanique cellulaire sera proposée en fonction de l'ajout d'éléments actifs stimulateurs de l'adhésion cellulaire, qui agissent soit depuis l'interface entre la cellule et le substrat, on utilise alors le peptide RGD, soit sur l'ensemble du cytosquelette de la cellule, on utilise alors la protéine de BMP-2. Les deux principes actifs sont aussi utilisés simultanément. Les résultats seront comparés à une situation de référence, lorsque qu'aucune protéine n'est ajoutée au milieu cellulaire.

Cependant, une étude de la détection expérimentale en fonction de la couleur de sonde laser, bleue et rouge, est auparavant réalisée. Cette étude est menée pour les quatre conditions décrites précédemment. En supposant l'indice optique de la cellule égal à 1,4, la demi-longueur d'onde optique dans la cellule d_0 est égale à 280 nm pour une détection de couleur

rouge et de 140 nm pour une détection de couleur bleue. Pour pouvoir détecter des oscillations Brillouin il est donc nécessaire que la cellule ait une épaisseur supérieure à cette demi-longueur d'onde, figure 4-10. Les mesures faites en profilométrie optique indiquent que ces épaisseurs critiques peuvent être dépassées uniquement au dessus du noyau de la cellule, presque systématiquement pour une détection en sonde bleue. L'étude proposée est donc réalisée en étudiant le noyau des cellules MC3T3. A peu près une acquisition sur 4 permet de détecter un signal exploitable en sondant ce noyau. Des essais ont aussi été réalisés en périphérie cellulaire, autour du noyau, dans les deux couleurs. Il n'a alors presque jamais été possible de détecter un signal exploitable (sur plus d'une centaine d'acquisitions) ; d'autant plus que, dans ce cas, la détection est essentiellement composée du déplacement des interfaces (section 4.2.4.3, situation expérimentale comparable à la simulation (c) de la figure 4-10). On ne peut alors pas discriminer les valeurs de l'épaisseur et de la célérité acoustique. [130] Ce faible taux de réussite global de signaux exploitables par rapport aux nombre d'acquisition est sans doute lié aux difficultés expérimentales, liées aux faibles puissances laser utilisées, à la nature très hétérogène de la cellule, à sa surface très rugueuse,...

La figure 4-11 présente des acquisitions expérimentales obtenues dans le noyau de cellules MC3T3. Sur la figure (a) aucune protéine de stimulation d'adhésion n'est présente, sur les figures (b) et (d) du RGD a été greffé à l'interface entre le substrat et la cellule et sur les figures (c) et (d) la protéine de BMP-2 a été ajoutée en solution aux cellules, 24 heures avant la fixation des cellules. La même puissance de pompe étant toujours utilisée et le coefficient de réflexion du titane étant quasiment identique en pompe bleue et en pompe rouge, de même que son absorption optique*, l'efficacité de la génération thermique est considérée identique avec les deux couleurs de pompe. En revanche, l'amplitude du signal détecté en sonde rouge étant très supérieure à celle du signal détecté en sonde bleue, la détection du signal thermique est meilleure en sonde rouge qu'en sonde bleue.

* International Titanium association : <http://titanium.org/>

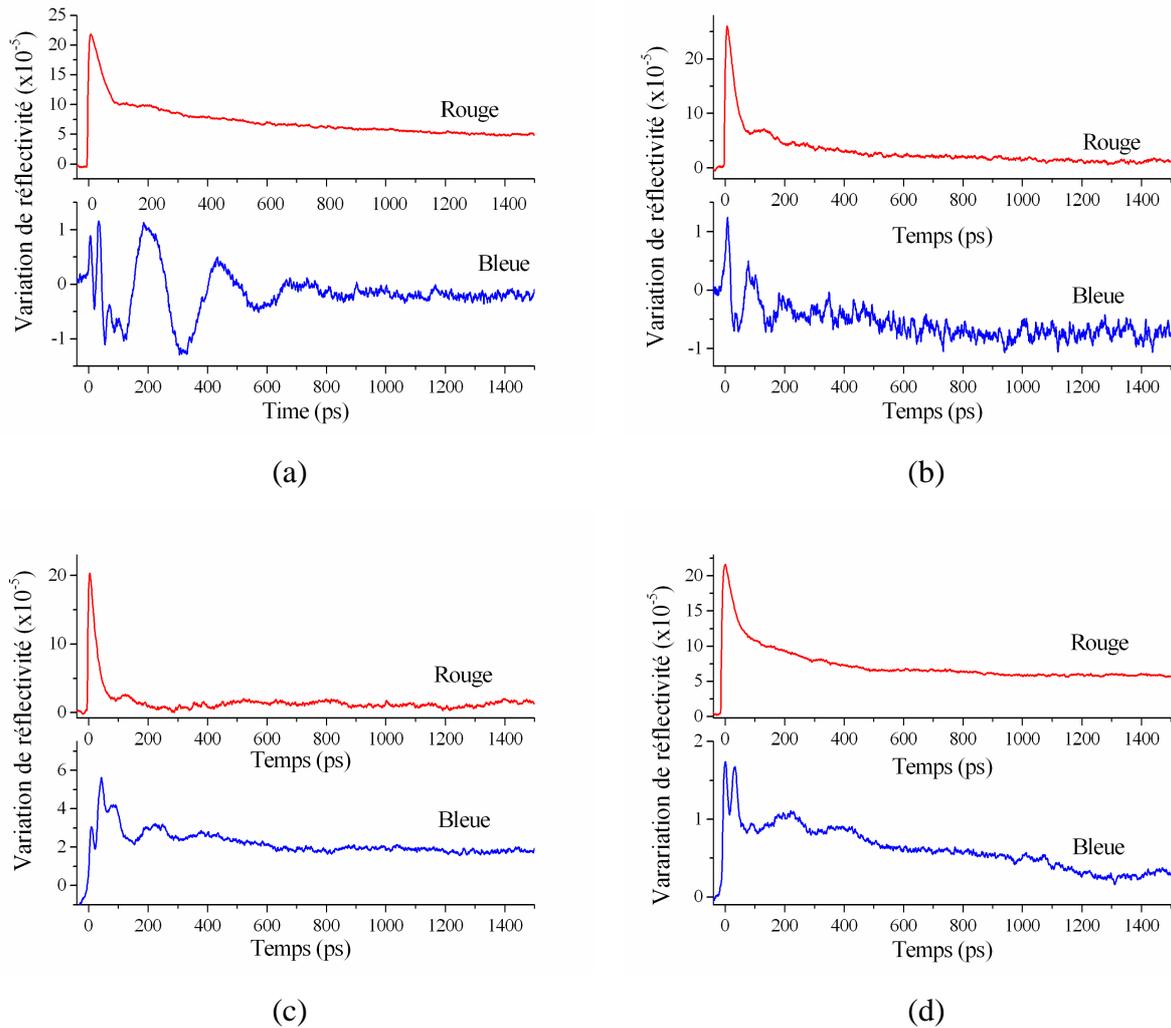


Figure 4-11 : Signaux expérimentaux obtenus dans (a) : Ti-6Al-4V+MC3T3, (b) : Ti-6Al-4V+RGD+MC3T3, (c) : Ti-6Al-4V+BMP2+MC3T3, (d) : Ti-6Al-4V+RGD+BMP2+MC3T3. Pour chaque signal, la courbe du haut est détectée en sonde rouge et la courbe du bas est détectée en sonde bleue.

Pour tous les signaux détectés, ce fond thermique est soustrait en utilisant un polynôme de faible degré, jusqu'à un ordre 3 maximum. Cette soustraction du fond thermique permet de simplifier l'exploitation des signaux en vue de la mesure des propriétés mécaniques de la cellule ; et la contrainte d'utiliser un polynôme de degré maîtrisé permet de modifier le moins possible le signal acoustique. Cependant, cette procédure est délicate car il peut être difficile de ne retrancher que le fond thermique du signal sans modifier la contribution acoustique. Après soustraction, la contribution haute fréquence du signal Brillouin n'est pas affectée par ce retranchement polynomial, en revanche le signal en créneaux peut l'être, au moins en centrant cette détection autour de zéro. La contribution du terme source thermo-acoustique dans la cellule ne peut plus être utilisée dans le modèle de simulation pour

remonter à une information sur la cellule. L'amplitude de la détection du déplacement des interfaces peut elle aussi être modifiée par ce retranchement du fond thermique.

4.3.2) Analyse acoustique de quatre signaux expérimentaux

Afin de remonter à une information, la plus précise possible, sur la mécanique de la cellule, typiquement des mesures de sa viscoélasticité et de son épaisseur, la procédure de mesure inverse consiste à utiliser la détection acousto-optique en supposant un indice optique de la cellule $n_1=1,4$ pour mesurer la célérité acoustique v_1 dans la cellule. Ensuite, la détection du mouvement des interfaces permet de remonter à l'information sur l'épaisseur de la cellule à l'aide de la mesure du temps de vol acoustique t_1 dans celle-ci. Le principe de ce protocole est illustré sur la figure 4-12. [157] Les tracés sans symbole des figures (a) et (b) présentent la détection expérimentale obtenue dans une cellule, numérotée cellule #1, où aucun facteur d'adhésion n'est ajouté. Sur la figure (a) la détection est réalisée en sonde bleue et la figure (b) présente les résultats d'une détection optique réalisée en sonde rouge. Les deux acquisitions expérimentales sont réalisées dans la même cellule, au même point. Les tracés avec les triangles sont les ajustements numériques optimum obtenus avec le modèle de simulation présenté précédemment pour ces deux acquisitions.

Les acquisitions étant réalisées au même point de la cellule, les paramètres mécaniques utilisés pour obtenir ces ajustements sont rigoureusement identiques, ils sont présentés dans le tableau 4.1 de la prochaine section, ligne (a). Le seul paramètre de simulation variant entre ces deux ajustements est optique, il s'agit du coefficient piézo-optique. Pour l'ajustement proposé de la détection en sonde rouge, le coefficient piézo-optique est évalué à -0,4, alors que pour l'ajustement de la détection faite en sonde bleu, il est évalué à -4,8. Les signes de ces coefficients sont en accord avec le modèle de Gladstone-Dale, leur valeur est proche de celle obtenue avec ce modèle. En revanche, il n'a pas été trouvé de référence bibliographique permettant de comparer cette mesure. La simulation de la détection optique expérimentale est la somme de la détection optique du déplacement des interfaces de la cellule ainsi que de la détection acousto-optique dans la cellule. La décomposition de ces détections est présentée en dessous de l'acquisition expérimentale. Sur les tracés avec les étoiles, la détection du mouvement des interfaces est soustraite du modèle de simulation, alors que, sur le tracé avec les ronds, seule cette contribution de la détection optique est simulée.

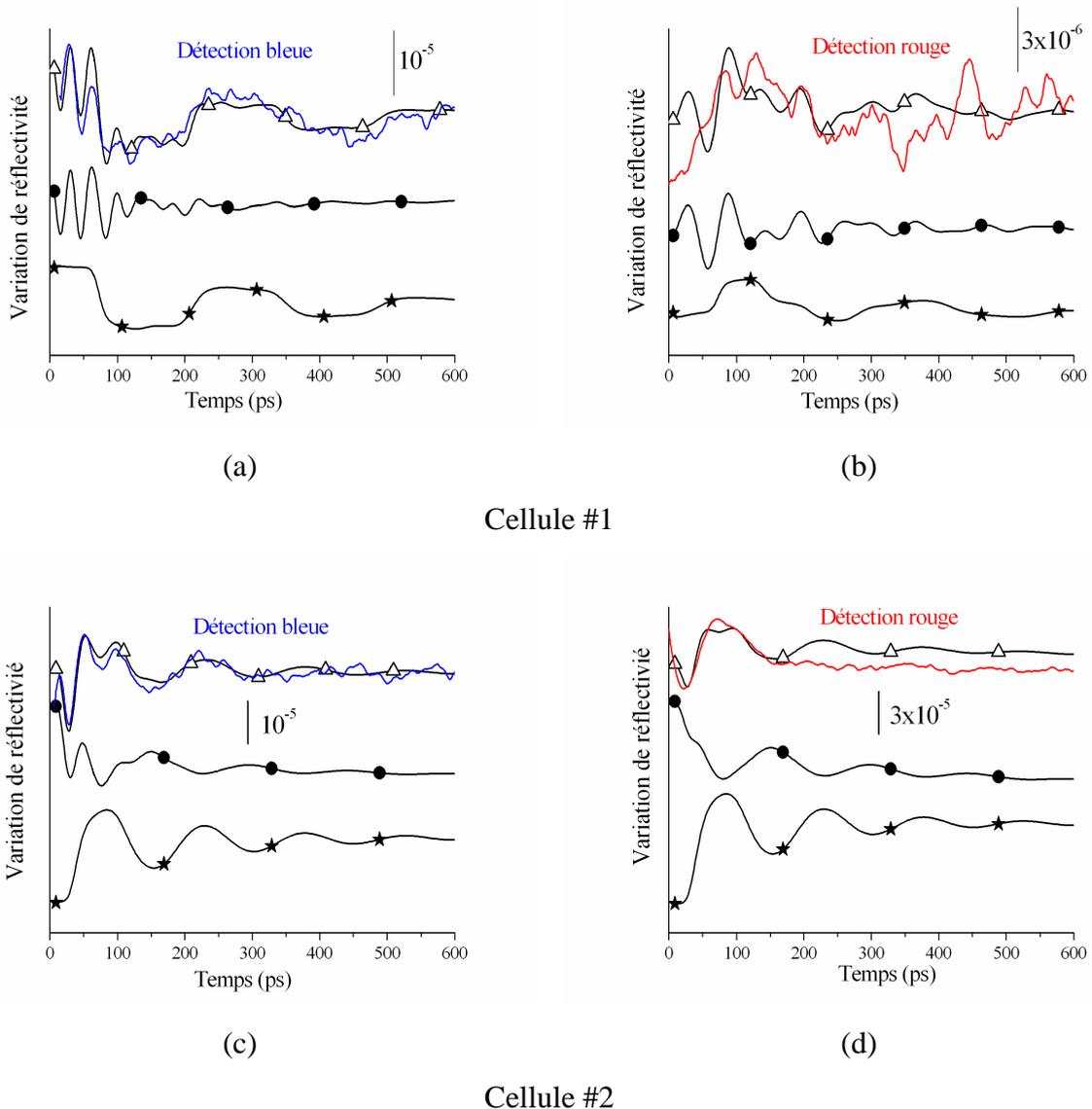


Figure 4-12 : Résultats expérimentaux (lignes) et ajustements numériques (triangles) obtenus sur deux cellules différentes, une par ligne, en deux couleurs différentes en un même point des cellules. Sur la colonne de gauche sont présentés les résultats détectés en sonde bleue, et sur la colonne de droite les résultats détectés en sonde rouge. Pour chaque simulation, la contribution de la détection acousto-optique et de la détection du déplacement des interfaces sont présentées séparément, respectivement sur les tracés avec étoiles et ronds.

Pour la cellule 1, les simulations numériques de ces deux détections montrent que, pour les deux couleurs, le contenu fréquentiel des deux contributions est différent ; la mesure de la célérité acoustique et de l'épaisseur est théoriquement possible dans les deux couleurs de détection. Cependant, la détection obtenue en sonde rouge présente une amplitude très faible par rapport à la détection réalisée en sonde bleue, son rapport signal à bruit est médiocre, aussi on est contraint d'utiliser le signal expérimental détecté en sonde bleue pour obtenir une mesure précise des propriétés mécaniques de la cellule. Ce faisant, la célérité acoustique dans

la cellule est mesurée à 4,4 nm/ps et l'épaisseur à 305 nm. On constate alors seulement un accord de forme entre le signal simulé avec ces propriétés mécaniques et une sonde rouge et le signal détecté expérimentalement avec cette couleur de sonde. Pour cette couleur de détection, la demi-longueur d'onde est de 285 nm, la cellule a donc une épaisseur comparable à cette distance optique, d_o . En revanche, pour une détection bleu, la distance optique est deux fois plus faible aussi la cellule devient épaisse par rapport à cette distance. Il y a alors plusieurs oscillations Brillouin durant le temps de vol acoustique de traversée de la cellule. Indépendamment de la valeur du coefficient piézo-optique, l'ajustement numérique en sonde bleue est alors plus simple, plus précis et plus fiable que l'ajustement en sonde rouge. Cependant, un ajustement numérique sur une cellule d'épaisseur comparable à la distance d'interaction acousto-optique est tout à fait réalisable.

En effet, sur les graphiques (c) et (d), une autre cellule est étudiée, la cellule 2, selon le même protocole que pour la précédente cellule. La figure 4-12(c) présente la détection expérimentale obtenue en sonde bleue avec l'ajustement numérique correspondant, signaux avec symboles. Sur la figure 4-12(d), la détection expérimentale, et les simulations correspondantes, sont de couleur rouge. Les deux détections sont obtenues en sondant le même point de la cellule. Les résultats mesurés, affichés dans le tableau 4.1, ligne (c), indiquent une célérité acoustique de 3,7 nm/ps pour une épaisseur cellulaire de 135 nm seulement. Ces résultats sont à nouveau obtenus avec la détection en sonde bleue, alors que l'épaisseur mesurée de la cellule est très proche de l'épaisseur d'interaction acousto-optique dans cette couleur. Ainsi, la détection optique en sonde bleue dans cette cellule est comparable à la détection optique en sonde rouge dans la cellule précédente. En revanche, l'excellent rapport signal sur bruit permet une très bonne mesure de la vitesse acoustique et de son épaisseur alors que cette mesure n'était pas envisageable en sonde rouge dans la cellule précédente. Le coefficient piézo-optique utilisé pour obtenir la simulation numérique de la figure 4-12(c) est positif, égal à 0,8. L'origine physique de ce changement de signe piézo-optique par rapport à la première cellule n'est à ce jour pas comprise. La détection optique en sonde rouge et l'ajustement numérique correspondant, en gardant les mêmes paramètres de simulation numérique que pour la simulation de la détection en sonde bleue, au coefficient acousto-optique prés, sont présentés sur la figure (d). En sonde rouge, cette cellule est à présent deux fois plus épaisse que l'épaisseur d'interaction acousto-optique d_o . La détection acousto-optique en sonde rouge est alors très peu sensible pour une cellule aussi fine et le contenu fréquentiel de la détection du mouvement d'interfaces et de l'interaction acousto-optique sont extrêmement proches. Il n'est alors, avec cette couleur de sonde, pas possible de

faire une mesure de la vitesse acoustique dans la cellule et de son épaisseur, on peut, au mieux, évaluer le rapport v_1/d pour la cellule. Ce même contenu fréquentiel des deux détecteurs en sonde rouge empêche aussi de mesurer précisément le coefficient piézo-optique de cette cellule pour cette couleur. En revanche, si l'on attribue à nouveau un coefficient piézo-optique positif à cette cellule, la détection d'interface et la détection acousto-optique sont en opposition de phase, et il est possible de s'approcher du profil de la première oscillation expérimentale, figure 4-12(d).

Ainsi, pour au moins deux raisons, il est nettement préférable d'étudier les cellules MC3T3 sur substrat opaque en sonde bleue qu'en sonde rouge d'un point de vue de la détection optique. La première est que la détection en sonde bleue permet la discrimination de la célérité et de l'épaisseur cellulaire pour des cellules aussi fines que 130 nm alors que cette discrimination n'est pas possible en sonde rouge. La seconde raison est que le coefficient piézo-optique est plus grand, d'un ordre de grandeur, en sonde bleue qu'en sonde rouge. La détection expérimentale en sonde bleue présente alors un rapport signal sur bruit bien meilleur qu'en sonde rouge et la qualité de la mesure est alors grandement améliorée. De plus, au niveau biologique, la phototoxicité du laser étant plus forte en couleur bleue qu'en couleur rouge, il est préférable pour la cellule d'utiliser le moins possible de fluence de laser bleu et donc de s'en servir comme sonde plutôt que comme pompe. La suite de l'étude proposée sera donc, sauf mention contraire, réalisée en sonde bleue.

4.4) Étude de la mécanique cellulaire en fonction de l'ajout de peptides stimulateurs d'adhésion cellulaire

4.4.1) Analyse de quatre résultats

L'effet de l'ajout de protéines de stimulation d'adhésion des cellules MC3T3 sur alliage de titane sur la mécanique de la cellule est étudié dans cette section. Comme cela a été dit précédemment, on utilise dans cette étude le peptide RGD, qui agit depuis l'interface entre la cellule et le substrat et/ou la protéine de BMP-2 qui agit sur l'ensemble du cytosquelette de la cellule et sur ses points focaux d'adhésion. La BMP-2 est ajoutée en solution, dans le milieu de culture, 24 heures avant que les cellules soient fixées. Une présentation de quatre signaux détectés en sonde bleue dans quatre cas différents de stimulation d'adhésion cellulaire est proposée sur la figure 4-13. La présentation des signaux est la suivante : sur la figure (a) aucun élément d'adhésion n'est ajouté, sur les figures (b) et (d) la RGD a été ajoutée à l'interface entre le substrat et la cellule, sur les figures (c) et (d) la BMP-2 stimule le

cytosquelette des cellules. Cet ordre de présentation sera respecté dans toute la suite de cette étude.

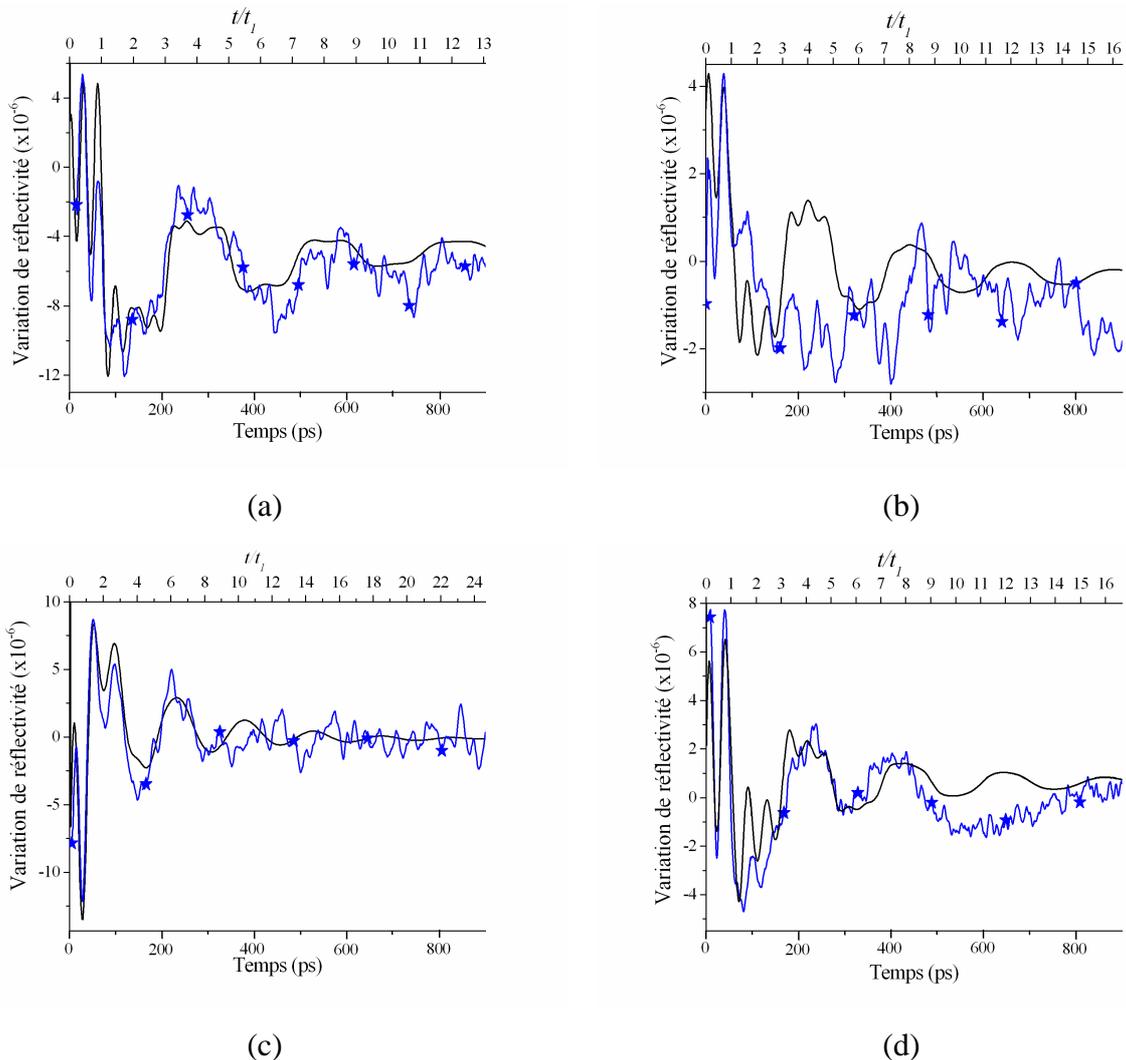


Figure 4-13 : Signaux expérimentaux (étoiles) détectés en sonde bleue dans des cellules MC3T3 et confrontations avec des simulations numériques. (a) : Ti-6Al-4V+MC3T3, (b) : Ti-6Al-4V+RGD+MC3T3, (c) : Ti-6Al-4V +BMP2+MC3T3, (d) : Ti-6Al-4V +RGD+BMP2+MC3T3.

Un ajustement du modèle numérique où les variables d'ajustement sont l'épaisseur, la rigidité complexe de la cellule, et le coefficient piézo-optique est réalisé pour chaque signal expérimental. Pour toutes les présentations, deux axes des abscisses sont proposés, celui du bas est le retard temporel mesuré en ps. Tous les graphiques sont présentés sur une échelle de temps de 900 ps. L'axe du haut correspond à un adimensionnement du temps par rapport au temps de vol mesuré dans la cellule, cet axe permettant de facilement quantifier le nombre d'allers et retours acoustiques dans la cellule vis à vis du temps absolu.

Les ajustements du modèle numérique sont de très bonne qualité sur les présentations (a) et (c). Les signaux (b) et (d) sont en revanche moins bien ajustés, surtout le signal (b). Il

est donc probable que le peptide RGD affecte la propagation acoustique dans la cellule. En effet, bien que la fluence incidente soit toujours la même dans chaque cas, les signaux de la plus faible amplitude sont obtenus lorsque ce peptide RGD est ajouté. Le RGD, présent en surface du substrat, doit donc modifier la transmission d'énergie mécanique entre le substrat et la cellule et il est possible que le modèle de simulation ne représente plus suffisamment la propagation acoustique dans la cellule pour bien décrire la détection expérimentale. Il serait peut être nécessaire de réaliser un nouveau code de simulation où une nouvelle couche d'épaisseur finie serait modélisée entre le substrat et la cellule pour étudier les signaux où le RGD est utilisé. La BMP-2 ne semble en revanche pas modifier la qualité du signal. Ceci est compatible avec son action, non localisée dans l'espace puisqu'elle agit sur l'ensemble du cytosquelette de la cellule.

| | C_1 ($\times 10^9$) (GPa) | C_1^* (cP) | d (nm) | $dn_1/d\eta$ | Z_1 ($\times 10^6$) (Kg.m ⁻² .s ⁻¹) |
|-----|----------------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------------------------------------------------------------------|
| (a) | 21,5 | 15 | 305 | -5 | 4,8 |
| (b) | 21,2 | 14 | 230 | -0,2 | 4,8 |
| (c) | 15,0 | 35 | 135 | 0,8 | 4,0 |
| (d) | 15,8 | 13 | 205 | -1,2 | 4,1 |

Tableau 4-1 : Valeurs physiques de la rigidité complexe de la cellule, de l'épaisseur et du coefficient piézo-optique utilisées pour réaliser les ajustement numériques présentés sur la figure 4-11. L'impédance acoustique Z_1 de la cellule est aussi déterminée.

Les résultats obtenus permettent, sous réserve de supposer une valeur initiale d'indice optique et de densité, et en utilisant un protocole d'étude similaire à celui présenté dans la section 4.3.2, de mesurer la rigidité complexe de la cellule sondée, ainsi que son épaisseur. Les valeurs mesurées pour les signaux présentés sur la figure 4-13 sont données dans le tableau 4-1, ainsi que le coefficient acousto-optique utilisé pour réaliser ces ajustements. L'impédance acoustique Z_1 des cellules est aussi évaluée en supposant une densité cellulaire de 1100 Kg/m³.

Le coefficient acousto-optique permet de pondérer la contribution des oscillations Brillouin dans la cellule vis-à-vis de la détection du mouvement des interfaces. Il est délicat d'en tirer une information pertinente, surtout dans un milieu hétérogène comme une cellule. Cependant, si l'ordre de grandeur de ce coefficient n'a pas pu être quantifié à l'aide de la bibliographie existant, la mesure faite de ce coefficient est proche de celle que l'on obtient en utilisant de modèle empirique de Gladstone-Dale. L'ordre de grandeur est au moins respecté.

Dans toutes les mesures faites, la compressibilité mesurée est élevée, elle est un ordre de grandeur au dessus de celle de l'eau ou de celle mesurée dans l'oignon. Cette mesure sera commentée dans la discussion des résultats, section 4.4.3.

En supposant la densité de la cellule égale à 1100 kg/m^{-3} , une mesure de l'impédance acoustique des cellules est réalisée et présentée dans le tableau 4-1. Le coefficient de réflexion acoustique aux interfaces est alors déterminé. Il est proche de l'unité à l'interface entre la cellule et l'air et de 0,7 à l'interface entre la cellule et le titane. Ce coefficient de réflexion implique qu'en négligeant toutes les autres sources d'atténuation acoustique, il ne reste alors plus que 16% du signal acoustique dans la cellule après la cinquième réflexion acoustique sur l'interface cellule/substrat. Ceci explique que le temps de vie de ce signal acoustique basse fréquence soit fonction, au premier ordre, du nombre de réflexions acoustiques aux interfaces plutôt que du temps absolu de propagation dans la cellule. En effet, la mesure d'épaisseur faite sur la cellule (c) est plus que deux fois moindre que celle sur la cellule (a), or, pour ces deux signaux, le temps de vie expérimental du signal acoustique du déplacement des interfaces est d'une dizaine de temps de traversée acoustique de la cellule. Les célérités acoustiques étant proches, ce temps de vie est donc plus que deux fois plus long en temps absolu pour la cellule présentée en (a) qu'en (c). Cette observation se vérifie avec le signal (d) et le signal expérimental (b) est en revanche trop bruité pour conclure correctement.

En considérant que le noyau de la cellule est semi-transparent optiquement*, l'atténuation viscoélastique de la cellule peut être mesurée à partir de l'atténuation des oscillations Brillouin. Ce signal est en effet haute fréquence, autour de 30 GHz, son atténuation est alors plus forte et il dure moins longtemps que le temps de vie du signal du déplacement mécanique des interfaces. En supposant une valeur d'absorption optique fixe, il dépend alors, au premier ordre, de la viscosité dynamique intrinsèque de la cellule. L'atténuation du signal opto-acoustique permet, grâce aux ajustements numériques du modèle de simulation sur les résultats expérimentaux, d'évaluer la viscosité de la cellule à haute

* Nous n'avons pas trouvé dans la bibliographie de valeur quantitative de l'absorption optique dans le noyau d'une cellule. Cependant l'enveloppe des oscillations Brillouin peut informer sur le caractère transparent ou non d'un matériau. Si les oscillations augmentent lorsque l'onde acoustique se rapproche de la surface, le matériau est semi-opaque, à *contrario*, si les oscillations sont d'amplitude comparable sur tout le temps de vol de traversée acoustique de la cellule, le matériau est transparent. Les signaux détectés ne présentent pas d'augmentation d'amplitude dans le temps, on considère alors la cellule comme étant semi-transparente sur toute son épaisseur.

fréquence, autour de 30GHz. Finalement, la rigidité, la viscosité et l'épaisseur des cellules sont donc évaluées en ajustant le modèle numérique sur le signal expérimental.

4.4.2) Résultats statistiques

Une étude statistique est proposée pour les quatre configurations biologiques déjà présentées. Les mesures concernent la rigidité, la viscosité et l'épaisseur des cellules. La présentation des résultats suivra systématiquement une même convention de symbole, les bâtons vides représentent les échantillons où aucun peptide n'a été ajouté, figures (a), ceux qui sont rayés obliquement sont ceux représentant les échantillons où du RGD a été ajouté, figures (b), les symboles avec un quadrillage dense symbolisent les résultats obtenus lorsque la BMP-2 a été ajoutée, figures (c) et finalement ceux qui sont pleins correspondent aux mesures où les deux protéines de l'étude sont ajoutées simultanément, figures (d).

4.4.2.1) Compressibilité

Sur la figure 4-14 sont présentés les résultats des mesures de rigidités des cellules en fonction de l'ajout de protéine d'adhésion. L'incertitude moyenne des mesures est estimée autour de 1 GPa, la largeur des bâtons représente cette incertitude de mesure. L'incertitude évaluée pour chaque signal est une majoration de l'incertitude estimée à partir des ajustements numériques du signal acousto-optique. Cependant cette majoration n'est pas pour autant pénalisante dans le contexte de cette étude car elle est inférieure à la dispersion des résultats.

Lorsque aucun peptide d'adhésion n'est ajouté, figure (a), les rigidités mesurées dans les cellules sont relativement stables et peu dispersées, autour de 14 GPa. Lorsque seul le RGD est ajouté, la valeur centrale de la rigidité est très comparable, autour de 14 GPa. Les mesures proposées ne détectent donc pas de variation de la compressibilité intrinsèque de la cellule en fonction de l'ajout seul de RGD à l'interface entre le substrat et la cellule. En revanche, lorsque la BMP-2 est utilisée, les rigidités mesurées augmentent. Ainsi, lorsque le RGD et la BMP-2 sont ajoutés ensemble, figure (d), la compressibilité moyenne mesurée augmente d'un peu plus que 4 GPa par rapport à la configuration de référence. Lorsque seule la BMP-2 est ajoutée, figure (c), cette compressibilité moyenne augmente de 3 GPa. Cependant, il serait nécessaire de valider cette dernière mesure en effectuant des mesures supplémentaires car la base de données de cette configuration ne contient actuellement que 4 signaux. Ces résultats permettent tout de même d'identifier clairement un effet de la BMP-2 vis-à-vis de la mesure proposée. Lorsque la protéine de BMP-2 est ajoutée au milieu cellulaire, la compressibilité moyenne mesurée dans les cellules augmente de quelques GPa

par rapport à la situation biologique de référence. Cet effet de rigidification de la cellule est amplifié lorsque la BMP-2 est utilisée en action combinée avec le RGD.

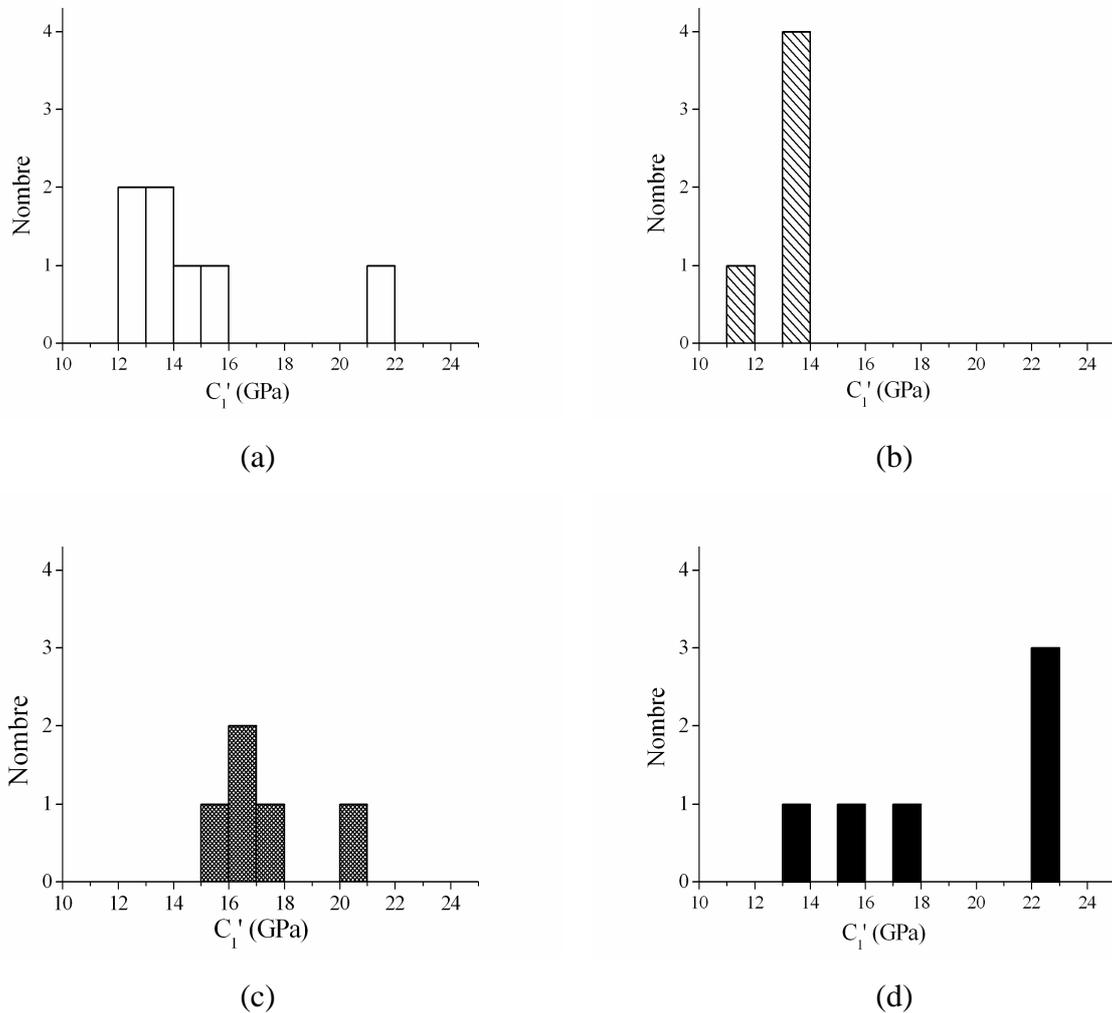


Figure 4-14 : Mesures de rigidités obtenues sur cellules avec et sans peptide de RGD et/ou protéine de BMP-2. Sur la figure (a), rien n'est ajouté, sur les figure (b) et (d) de la RGD est présente à la surface du titane, sur les figures (c) et (d) de la BMP-2 stimule le cytosquelette de la cellule.

4.4.2.2) Viscosité

Les résultats moyens de la mesure de viscosité dynamique pour les mêmes cellules sont à présent étudiés. L'incertitude des ajustements sur le paramètre de viscosité est estimée à 2 cP. Les résultats sont présentés sur la figure 4-15. La dispersion de ces résultats est à nouveau supérieure à l'incertitude de mesure sur un signal unique.

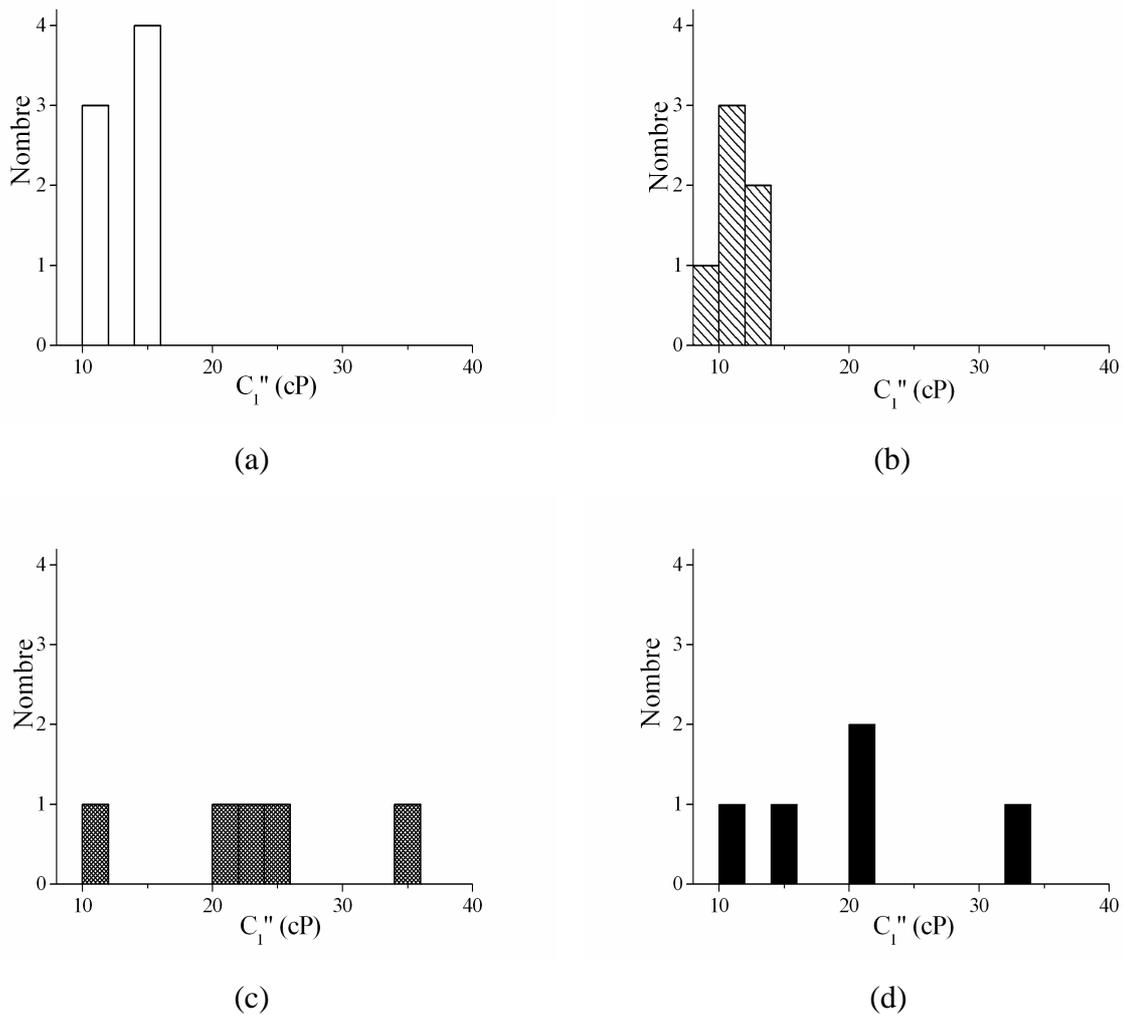


Figure 4-15 : Mesures de viscosités obtenues sur cellules avec et sans peptide de RGD et/ou protéine de BMP-2 à haute fréquence acoustique, autour de 30 GHz. L'ordre de présentation des graphiques suit celui de la figure 4-13.

Les mesures faites dans la configuration de référence et dans la configuration où seul le RGD est ajouté présentent une dispersion relativement faible, de quelques cP, autour d'une valeur centrale évaluée à 12 cP. En revanche, à nouveau, l'effet de la BMP-2 sur la viscosité de la cellule à haute fréquence acoustique est visible. On observe en effet une amplification de la dispersion des mesures et une augmentation de la valeur moyenne de viscosité. Ainsi, lorsque la BMP-2 est ajoutée par rapport aux deux configurations précédentes, la valeur moyenne de viscosité augmente d'un peu moins qu'un rapport 2, et la dispersion des résultats aussi.

4.4.2.3) Fréquence de détection acousto-optique

La viscosité intervient très peu dans la mesure de la vitesse effective mesurée dans la cellule aussi on quantifie la fréquence de la détection acousto-optique à partir des données de rigidité uniquement. Les suppositions faites sont toujours que la densité de la cellule est de 1100 kg/m^3 et que l'indice optique est de 1,4 dans la cellule. La sonde laser rayonne à 400 nm. Les résultats de la fréquence acousto-optique détectée sont présentés sur la figure 4-16, elles sont au-dessus de 20 GHz, soit une décade au dessus de la littérature existante (cf. section 1.4).

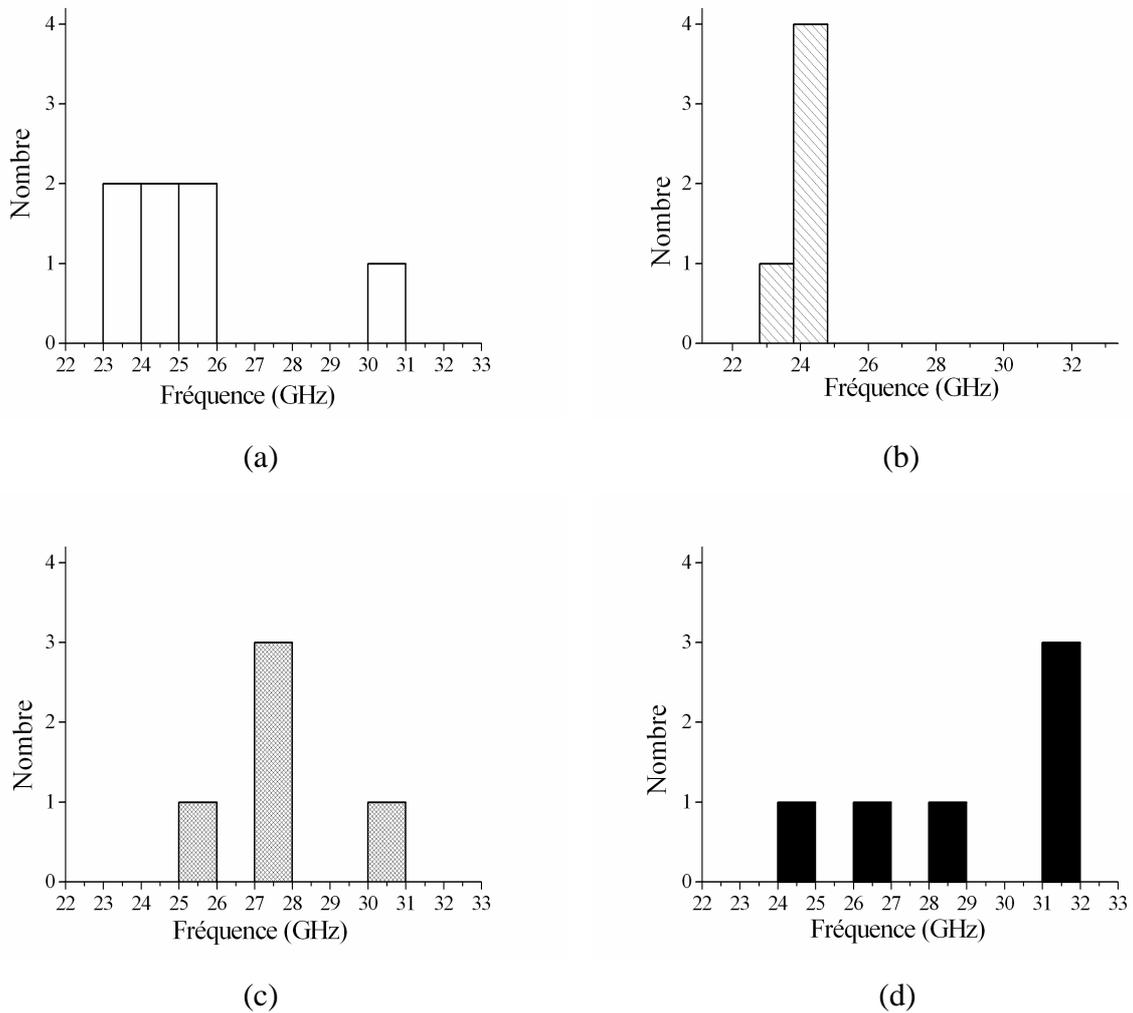


Figure 4-16 : Fréquences acoustiques détectées dans les cellules avec et sans RGD et/ou BMP-2. Les conventions de présentation sont conservées par rapport aux figures précédentes.

4.4.2.3) Épaisseur

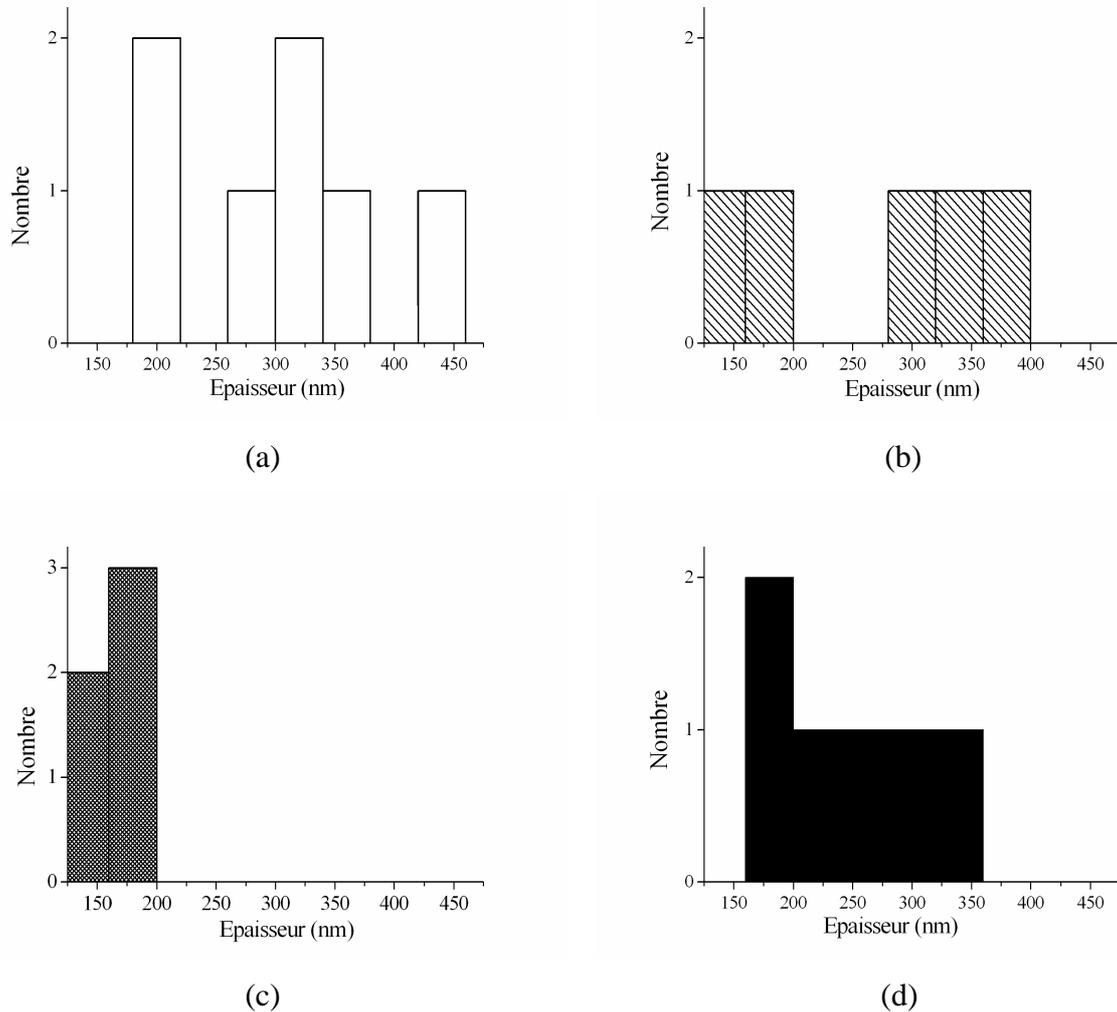


Figure 4-17 : Mesures d'épaisseur des mêmes cellules étudiées que sur la figure 4-13. Les conventions de représentations sont conservées. La largeur des bâtons représente 40nm.

Les mesures d'épaisseurs sont finalement obtenues à partir des célérités acoustiques mesurées pour chaque cellule et en utilisant la contribution du déplacement des interfaces de la détection expérimentale. La figure 4-17 présente les mesures obtenues. Les épaisseurs mesurées s'étendent sur une plage d'épaisseur de 130 nm à 430 nm et les incertitudes sont estimées autour de 10 nm. La configuration de référence est très représentative de la dispersion d'épaisseur cellulaire mesurée, de 140 à 430 nm. L'ajout de protéine de RGD ne semble pas modifier les épaisseurs de cellules, en revanche, les cellules où seule la BMP-2 a été ajoutée sont plus fines et la dispersion de leur épaisseur est faible en comparaison des dispersions d'épaisseur des autres configurations. Cependant l'étude menée sur ces cellules avec BMP-2 ne contient que 5 cellules, aussi la différence vient peut être de cette faible quantité de signaux, et, on note qu'il serait bénéfique de poursuivre l'étude proposée avec

plus de cellules afin d'obtenir une base de donnée plus conséquente. Lorsque le RGD et la BMP-2 sont utilisés simultanément, la dispersion des mesures d'épaisseurs est proche de celle de la condition de référence, même si les valeurs obtenues sont plus faibles et moins dispersées.

4.4.2.4) Moyennes et probabilité de présence

Les moyennes et les probabilités de présence correspondant à toutes les configurations biologiques étudiées, pour tous les paramètres mesurés sont quantifiés. Les moyennes sont présentées dans le tableau 4-2, et les probabilités de présence sont présentées dans le tableau 4-3. Les probabilités de présence sont calculées en utilisant la loi de distribution de Student, avec une probabilité de présence à 90%.

| | C_1' [GPa] | C_1'' [cP] | d [nm] |
|---------------------------|--------------|--------------|----------|
| Ti-6Al-4V+MC3T3 | 14,6 | 12,9 | 305 |
| Ti-6Al-4V+RGD+MC3T3 | 13,2 | 11,2 | 270 |
| Ti-6Al-4V+BMP-2+MC3T3 | 17,2 | 22,7 | 160 |
| Ti-6Al-4V+RGD+BMP-2+MC3T3 | 18,8 | 19,6 | 240 |

Tableau 4-2 : Moyenne des rigidités, viscosités et épaisseurs mesurées dans les 4 configurations biologiques étudiées.

| | C_1' [GPa] | C_1'' [cP] | d [nm] |
|---------------------------|--------------|--------------|----------|
| Ti-6Al-4V+MC3T3 | 2,1 | 1,6 | 50 |
| Ti-6Al-4V+RGD+MC3T3 | 0,6 | 1,7 | 65 |
| Ti-6Al-4V+BMP-2+MC3T3 | 2,0 | 9,3 | 20 |
| Ti-6Al-4V+RGD+BMP-2+MC3T3 | 3,0 | 6,6 | 45 |

Tableau 4-3 : Probabilités de présence à 90% déterminées à l'aide d'une loi de distribution de Student des rigidités, viscosités et épaisseurs dans les 4 configurations biologiques étudiées.

Les valeurs des moyennes confirment les lectures graphiques, la BMP-2 augmente significativement la compressibilité de la cellule, d'un peu moins que 5 GPa ainsi que la mesure de la viscosité qui est un peu moins que doublée. La fiabilité de la mesure est évaluée à partir des probabilités de présence qui définissent l'intervalle de confiance à 90% de part et d'autre de la valeur moyenne de chaque mesure. On mesure un effet de la BMP-2 sur la viscoélasticité de la cellule. En revanche, on ne mesure pas d'effet du RGD sur la viscoélasticité cellulaire, les moyennes étant proches. L'influence des peptides d'adhésion sur

l'épaisseur des cellules est moins manifeste mais il semble que les cellules soient plus fines lorsque le RGD et/ou la BMP-2 sont ajoutés par rapport à la situation de référence.

4.4.3) Discussion des résultats

Les célérités acoustiques paraissent relativement grandes en comparaison des mesures faites en microscopie acoustique, de deux à trois fois plus élevées que celles classiquement mesurées. (cf. annexe A.4) Il est possible qu'il y ait un effet important de la viscoélasticité avec la mesure acoustique très haute fréquence qui soit à l'origine de cette variation de vitesse acoustique, effet qui serait alors comparable à des observations déjà réalisées dans le glycérol liquide. [96] De plus, dans ce travail les mesures sont proposées dans le noyau des cellules alors que les mesures acoustiques proposées dans les autres travaux auxquels on se compare sont des mesures de célérités effectives de l'ensemble de la cellule, c'est-à-dire du noyau mais aussi de la vacuole. Or, les travaux proposés sur cellules d'oignon ont montré que la célérité acoustique est plus forte dans le noyau que dans la vacuole. Cette variation doit être d'autant plus marquée pour les cellules MC3T3 que son cytosquelette est très dense, et que le lieu de la centralisation des ramifications de ce cytosquelette est celui de la mesure faite, le noyau cellulaire. Ainsi, des travaux ont montré que la rigidité du noyau cellulaire de cellules endothéliales peut être jusqu'à un ordre de grandeur supérieure à celle de son cytoplasme. [158] Il est aussi possible que la dimension du noyau de la cellule, de taille nanométrique contribue à cette forte rigidité. En effet, dans un solide de forme sphérique (de rayon R) et de dimensions nanométriques, la contraction du réseau cristallin est, pour un matériau donné, inversement proportionnelle à la taille de la sphère. De même, s'il s'agit d'une sphère liquide, une surpression suivant une loi en $1/R$ à l'intérieur de la sphère est donné par la loi de Laplace. [159] De plus, des rigidités aussi élevées que celles mesurées dans ce travail ont déjà été mesurées dans des cellules d'os en voie de calcification [160] Il a aussi été récemment montré par des mesures faites en nano-indentation que les cellules ostéoblastes sur substrat de titane sont plus rigides que des cellules ostéoblastes sur d'autres substrats, [161] aussi la nature du substrat utilisé peut contribuer, elle aussi, à expliquer cette différence de célérité par rapport à la littérature classique. Enfin l'effet de la fixation cellulaire sur les propriétés mécaniques de la cellule est non connu.

Après avoir fait les acquisitions expérimentales, le cytosquelette et les contacts focaux des cellules ont été marqués par fluorescence afin de visualiser ceux-ci et de regarder, qualitativement, s'il existe un lien entre les variations mesurées et l'adhésion et l'organisation

du cytosquelette de la cellule. Les photographies prises sont présentées sur la figure 4-18.

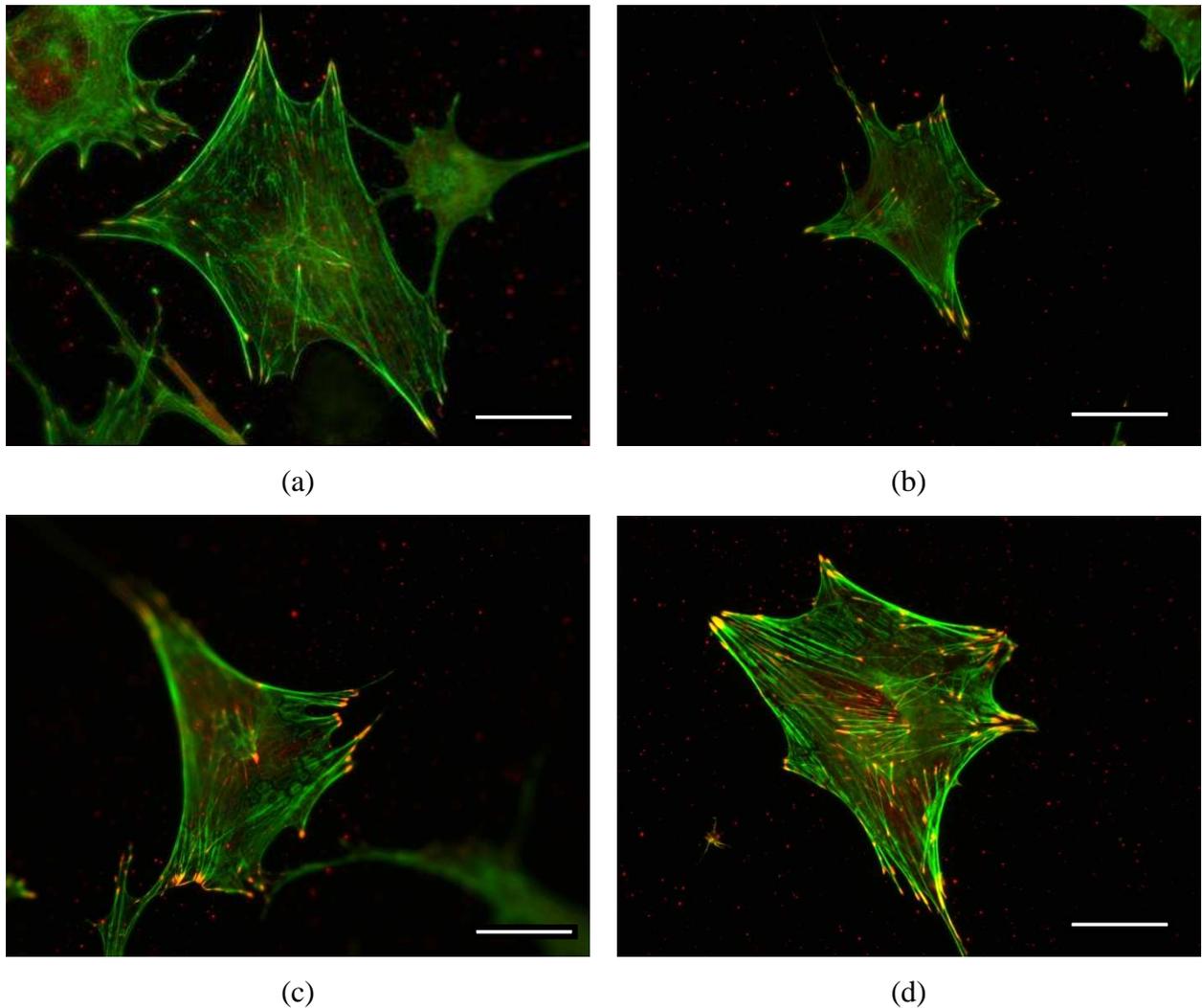


Figure 4-18 : Cellules MC3T3-E1 sur substrat de Ti-6AL-4V. Du RGD est présent en surface du substrat sur les photographies (b) et (d). De la BMP-2 a été ajoutée au milieu de culture sur les photographies (c) et (d). Le cytosquelette et les contacts focaux sont marqués par fluorescence, ils forment respectivement les lignes vertes et les points oranges. (Marquages et photographies réalisés à l’U577) Les barres d’échelle représentent 20 μm.

Les cellules photographiées proviennent des mêmes échantillons de cellules que celles étudiées dans les sections 4.3 à 4.4.2 et l’ordre de présentation des photographies est le même que sur les figures 4-13 à 4-17. Le cytosquelette de la cellule, les filaments d’actine, ou fibres de stress, sont marqués en couleur verte et les contacts focaux en couleur orange. Ces photographies de fluorescence du cytosquelette cellulaire permettent d’illustrer les principes d’action des deux types de principes actifs. Ainsi, l’augmentation d’adhésion produite par le peptide de RGD, agissant depuis l’interface entre le substrat et la cellule, modifie peu le cytosquelette de la cellule. Cet effet est visible en comparant sur la figure 4.16, les

photographies (a) et (b). L'intensité de fluorescence du cytosquelette est peu modifiée entre les deux configurations, ceci voulant dire que la taille des filaments d'actine à l'intérieur de la cellule est sensiblement la même dans les deux configurations, de même que son organisation spatiale dans le cœur de la cellule. Il n'y a alors pas de variation mécanique du cœur de la cellule entre les deux configurations, ce qui correspond à la mesure obtenue.

En revanche, le RGD agit à l'interface cellule/matériau en induisant la formation des contacts focaux, ce qui est visible en comparant les deux photographies : sur la photographie (b), les points oranges correspondent à des contacts focaux matures, donc de surface de contact sur le substrat larges, comparativement à la situation de la cellule de référence. Le monocouche de peptide RGD greffé en surface du titane peut alors modifier les conditions d'impédance acoustique entre la cellule et le substrat, ce qui peut expliquer la baisse d'amplitude de signal détecté, proportionnelle à l'amplitude de déformation acoustique, et les difficultés d'ajustement numérique du signal de détection du déplacement des interfaces. La photographie (c), comparée à la photographie de référence (a), illustre l'action de la BMP-2 sur le cytosquelette et les points d'adhésion focales des cellules. Son action influe sur la maturation des contacts focaux de la cellule, qui deviennent des plaques d'adhésion focale. Suite à la formation de ces plaques d'adhésion, les fibres de stress et le cytosquelette sont densifiés à l'intérieur de la cellule. Cet effet est visible sur la cellule (c) où de nombreuses plaques d'adhésion focales sont formées, d'où partent des filaments d'actine très développés par rapport à la situation de référence de la figure (a). Lorsque le RGD et la BMP-2 sont utilisés complémentaires, figure (d), les plaques d'adhésion focales sont exaltées, et le réseau du cytosquelette dans la cellule devient extrêmement dense et développé. Les fibres de stress sont nombreuses et très toniques, ce qui prouve la polymérisation du cytosquelette d'actine. C'est cette modification globale du réseau du cytosquelette qui est à l'origine de la variation mesurée de la célérité acoustique entre la condition de référence et les autres conditions, avec BMP-2. Lorsque la structure interne de la cellule est modifiée, c'est le support matériel de propagation de l'onde acoustique qui est modifié et la variation mesurée de la viscoélasticité effective de la cellule est la signature acoustique des modifications biologiques internes de la cellule. Ainsi, la combinaison de la visualisation de fluorescence avec la mesure d'acoustique picoseconde dans les cellules, permet de déduire qu'en stimulant son organisation et en densifiant son cytosquelette, la protéine BMP-2 a une action sur la rigidité cellulaire, en l'augmentant significativement. Ces résultats sont en accord avec ceux de C. Rotsch (section 1.1.2), qui a montré un lien entre le module d'Young moyen de la cellule et son réseau d'actine, et A. Safran (section 1.2.1) qui a montré un lien entre la

dimension et la forme des points focaux et la tension du cytosquelette. Si la BMP-2 et la RGD sont utilisées simultanément cet effet est décuplé, et c'est dans cette situation que la mesure de la compressibilité de la cellule est la plus élevée.

Nous n'avons actuellement pas d'explication physique à la variation de viscosité mesurée dans les cellules en fonction de la présence de protéines d'adhésions. Il est possible que l'explication repose sur des considérations chimiques, liées par exemple à la polymérisation des filaments d'actine, qui passe d'une forme monomère à polymère. De plus, il est fort possible que la composition chimique du contenu de la cellule, comme le cytoplasme, soit lui aussi modifié, ce qui peut alors impliquer une variation de viscosité.

Les mesures d'épaisseur sont comparées à des mesures faites par profilométrie optique, comme présentée sur la figure 4-2. Deux contrôles sont réalisés avec cette comparaison : la mesure moyenne d'épaisseur des cellules et la dispersion des épaisseurs de cellules sur un même substrat. Les résultats sont probants, les épaisseurs mesurées par les deux méthodes sont comparables, d'une centaine de nanomètres à quelques centaines. De plus, les deux techniques de mesure permettent de quantifier une dispersion d'épaisseur des cellules équivalente. Cette validation de la mesure des épaisseurs conforte, *a posteriori*, la mesure des célérités acoustiques obtenues dans les cellules, puisque l'épaisseur est directement déduite de la célérité acoustique. De plus, à partir de l'étude statistique réalisée, il semble que l'épaisseur moyenne des cellules soit légèrement influencée par la présence des protéines d'adhésion. En effet, même si la variation est moins significative que pour les mesures de viscoélasticité, l'épaisseur moyenne des cellules est plus faible lorsque des protéines d'adhésion sont ajoutées pour stimuler celle-ci. De plus, l'écart-type de la variation d'épaisseur des cellules est plus faible et plus resserré lorsque la BMP-2 est utilisée. Cette légère variation d'épaisseur des cellules en fonction de l'ajout de protéines d'adhésion est probablement liée à une stimulation d'étalement de la cellule sur le substrat lorsque des protéines d'adhésion sont ajoutées à l'interface entre la cellule et le substrat.

4.5) Perspectives

4.5.1) Perspectives de modélisation

Le modèle d'étude de la génération acoustique, de sa propagation et de sa détection utilisé dans cette section est relativement complet d'un point de vue des phénomènes physiques macroscopiques qui interviennent mais reste un modèle simple vis-à-vis des expériences, sensibles à certains phénomènes microscopiques. Ainsi, la monocouche de RGD

entre la surface du titane et la cellule n'a pas pu être modélisée par le modèle théorique mis en place, cette lacune étant sans doute à la source de la faible qualité de l'ajustement numérique du modèle sur les signaux expérimentaux lorsque le RGD est utilisé pour stimuler l'adhésion cellulaire. De même, depuis le début de ce manuscrit, la cellule est présentée comme un milieu hétérogène, dont les hétérogénéités peuvent être de la dizaine, ou plus, de nanomètres, c'est-à-dire l'ordre de grandeur de la longueur d'onde acoustique générée dans la cellule. Ainsi, le train d'onde acoustique doit être sensible à ces hétérogénéités, or dans le modèle proposé, l'onde acoustique évolue dans un milieu homogène. Il conviendrait donc de prendre en compte un support matériel de propagation acoustique hétérogène. Enfin, une autre piste d'amélioration du modèle concerne la modélisation de la surface supérieure de la cellule, actuellement considérée comme une surface plane alors que les mesures faites en profilométrie montrent que, à la verticale de la surface éclairée par le laser, c'est-à-dire au dessus du noyau, la surface de la cellule est très irrégulière, avec des variations d'épaisseur pouvant atteindre jusqu'à 10% de l'épaisseur de la cellule. Une première estimation de cet effet est modélisée en proposant une simulation correspondant au signal moyen de n simulations où un bruit blanc autour de la valeur de l'épaisseur cellulaire est pris en compte. Cette simulation est proposée sur la figure 4-19.

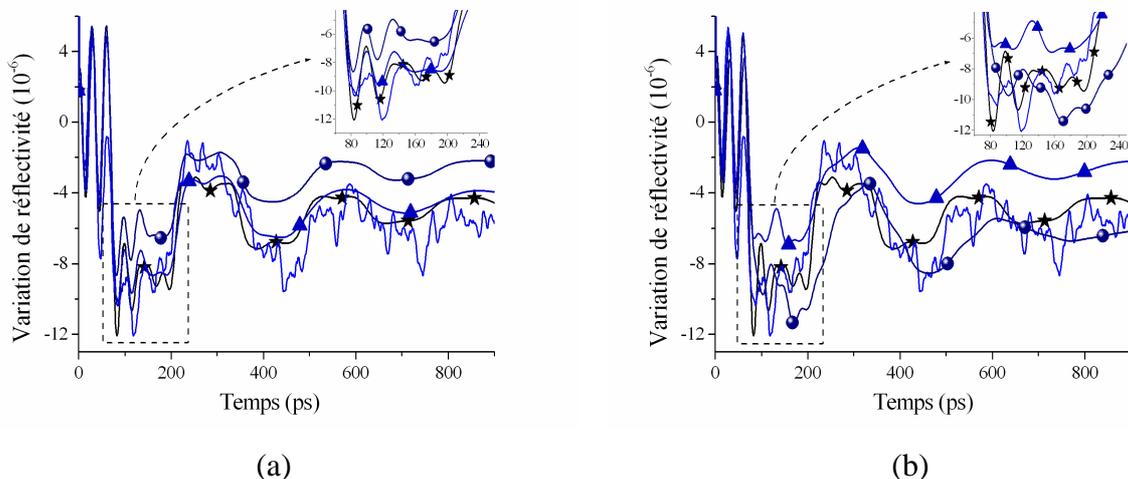


Figure 4-19 : Simulation de la détection acousto-optique dans une lame fine dont l'épaisseur est irrégulière. Le profil d'irrégularité présenté sur la figure (a) est de 5% de l'épaisseur de la lame, et le profil d'irrégularité sur la figure (b) est de 10%. Le signal sans symbole est le signal détecté dans une cellule MC3T3 déjà présenté sur la figure 4-11(a), le signal avec les étoiles est son ajustement proposé et présenté sur la même figure. Les mêmes paramètres de simulations sont conservés, les signaux avec les ronds et avec les triangles modélisent respectivement 15 et 80 épaisseurs différentes.

Le signal expérimental obtenu sur cellules où aucun peptide d'adhésion n'est ajouté, présenté sur la figure 4-12(a) est le support expérimental de cette étude (traits). La simulation qui a été obtenue dans cette même étude du paragraphe 4.3 est aussi présentée sur le tracé avec les symboles en étoile. Les mêmes paramètres de simulations sont conservés et, à présent, une variation de l'épaisseur est simulée. La variation d'épaisseur représente 5% et 10% de l'épaisseur de la cellule, figures (a) et (b) respectivement. Sur les tracés avec les ronds, 15 épaisseurs différentes sont simulées et le signal moyen est ensuite calculé et présenté. Le même principe est ensuite proposé en modélisant, sur les courbes avec les triangles, le signal moyen de 80 épaisseurs différentes.

Dans tous les cas, la première propagation acoustique dans la cellule, avant réflexion sur l'interface cellule/air, est insensible à la variation d'épaisseur puisque celle-ci n'est pas encore vue par l'onde acoustique. Les signaux simulés restent donc inchangés jusqu'à $t \approx d/v_1$, puis, à partir des temps supérieurs, l'onde acoustique est réfléchi sur l'interface rugueuse entre la cellule et l'air, qui modifie alors le signal acoustique. Les oscillations Brillouin, hautes fréquences par rapport à la détection du mouvement des interfaces sont les premières affectées par cette rugosité. L'amplitude et la quantité d'irrégularités simulées influent sur le signal acoustique. Les encarts des graphiques sont un zoom, tous deux présentés à la même échelle, des signaux simulés entre les temps d/v_1 et $3d/v_1$. Lorsque l'amplitude d'irrégularité est faible, les oscillations Brillouin sont affectées après la seconde réflexion acoustique, figure (a), et lorsque cette irrégularité augmente elles sont affectées dès la première réflexion acoustique, figure (b). L'effet de la quantité d'irrégularité est plus délicat à interpréter, il influe surtout sur l'amplitude des sauts de la détection du mouvement des interfaces. Aux temps plus longs, c'est-à-dire après plusieurs réflexions acoustiques aux interfaces, la détection de ce mouvement d'interfaces est ensuite nettement affectée, une variation d'amplitude et de phase du signal en sont la signature, figures (a) et (b).

Au vu des simulations de la figure 4-19, l'atténuation expérimentale des oscillations Brillouin indique que celles-ci sont atténuées après la seconde réflexion acoustique, la variation d'épaisseur de la cellule sur la surface éclairée est donc proche du profil de rugosité correspondant à un bruit blanc de 5% de l'épaisseur cellulaire. Et, le signal modélisé sur 80 épaisseurs différentes est mieux ajusté sur le signal expérimental aux temps longs que le signal modélisé avec 15 épaisseurs. Le profil d'épaisseur de la cellule sur la zone éclairée par le laser doit être donc très irréguliers, avec une variation d'épaisseur de 5% environ.

Ce profil d'irrégularité doit affecter la propagation acoustique dans la cellule après de multiples réflexions acoustiques sur cette surface. Il conviendrait alors de porter une attention

particulière aux conditions aux limites acoustique sur cette interface cellule/milieu 2, afin de mieux prendre en compte la réflexion acoustique perturbée par ce profil discontinu.

4.5.2) Perspectives expérimentales

Bien entendu, la première perspective expérimentale consiste à réaliser des expériences en conditions *in vitro*. Les premiers travaux expérimentaux ont débuté mais les résultats ne permettent pas encore une exploitation fiable des signaux. La caractérisation du sérum biologique a été réalisée par acoustique picoseconde. La sensibilité actuelle de cette technique ne permet pas de distinguer ce sérum de l'eau pure pour ce qui est de ses propriétés thermique, mécanique et optique. En conditions *in vitro*, la cellule est immergée dans ce sérum biologique aussi les coefficients d'impédance acoustique et optique entre la cellule et le milieu 2 sont fortement modifiés par rapport aux conditions où la cellule est à l'air libre et le signal acoustique dans la cellule n'est plus confiné dans la cellule et peut se propager dans le sérum biologique. La figure 4-20 présente la détection attendue lors d'une acquisition expérimentale réalisée en sonde bleue dans une cellule en condition *in vitro* et la comparaison avec des situations de références.

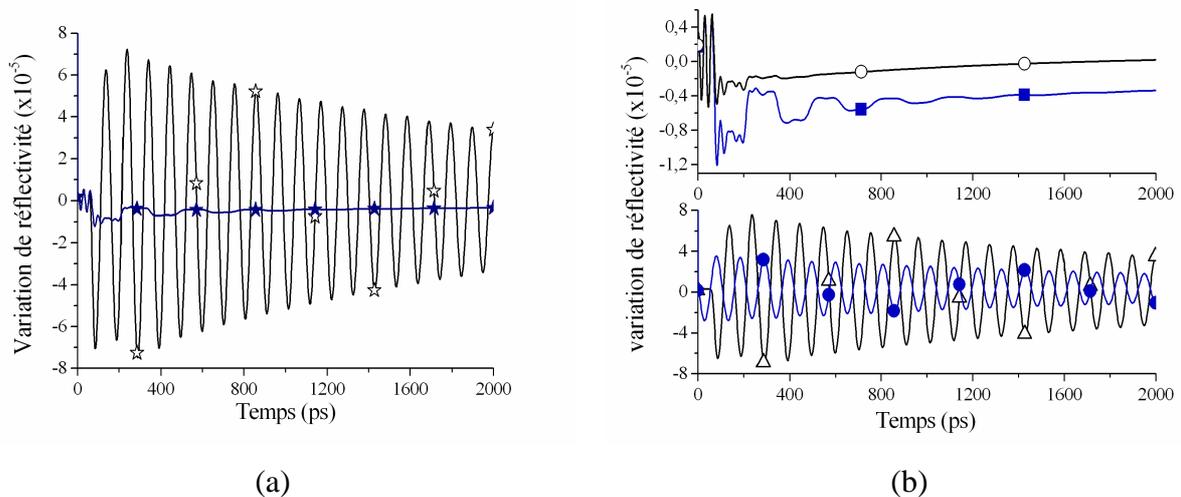


Figure 4-20 : (a) : simulation de la détection optique de la cellule étudiée sur la figure 4-11(a) (étoiles pleines) où le milieu 2 est remplacé par du sérum biologique (étoiles creuses). (b) décomposition de la détection simulée sur la figure (a) en fonction du milieu 1 ou 2. La figure du haut présente la détection optique dans le milieu 1 : sur le signal avec les carrés le milieu 2 est de l'air et sur le signal avec les ronds le milieu 2 est du sérum biologique. La figure du bas présente la détection optique dans le milieu 2, si la cellule n'est pas présente (ronds), et si la cellule est présente (triangles). Le signal avec les symboles creux de la figure (a) est la somme des signaux avec symboles creux de la figure (b).

Sur la figure (a), la simulation de la détection expérimentale dans la cellule (a) de la figure 4-11 est à nouveau présentée (étoiles pleines) et la simulation de la détection

expérimentale en conditions *in vitro* de cette même cellule est aussi ajoutée sur le même graphique (étoiles creuses). La cellule est supposée avoir les mêmes propriétés mécaniques en condition fixée et *in vitro*. Le signal acoustique dans la cellule fuit très rapidement de celle-ci et après le premier temps de vol acoustique de traversée de la cellule la détection optique est essentiellement celle du phonon acoustique se propageant dans l'eau à la fréquence Brillouin. De plus, la cellule, dont les propriétés mécaniques sont un intermédiaire entre celles du titane et de l'eau, agit comme un adaptateur d'impédance et le signal acoustique dans l'eau est de plus grande amplitude lorsque la cellule est présente à l'interface que lorsqu'elle n'y est pas. Ainsi, bien que les indices piézo-optiques utilisés pour cette simulation soient les mêmes dans les deux milieux, cellule et eau, le signal est exalté dans l'eau. Le signal simulé de la détection expérimentale lorsque la cellule est en conditions *in vitro* de la figure (a) est la somme des signaux simulés avec symboles creux de la figure (b). Le graphique du bas présente la détection dans le milieu 2 uniquement, simulé comme étant du sérum biologique, lorsque la cellule est étudiée en conditions *in vitro*, signal avec symboles creux, et lorsqu'il n'y a pas de cellule à la surface du titane, symboles ronds. Cette simulation illustre l'effet de couche d'adaptation d'impédance que réalise la cellule pour la propagation acoustique dans le sérum biologique. Comparativement au signal simulé où le sérum biologique est directement en contact avec le substrat, le signal détecté dans le sérum biologique, lorsque la cellule est présente à la surface du substrat, est augmenté d'un rapport 2. La différence de phase des oscillations Brillouin dans l'eau entre les deux signaux détectés est liée à l'épaisseur de la cellule et la différence de célérité acoustique entre la cellule et l'eau. Le graphique du haut de la figure (b) présente la détection optique uniquement dans la cellule, lorsque la cellule est en conditions *in vitro*, symboles creux, et lorsque la cellule est fixée, c'est-à-dire la simulation présentée sur la figure 4-12(a), symboles carrés. Par rapport à la simulation de la détection dans la cellule à l'air libre, le déplacement de l'interface entre la cellule et le milieu 2 est très nettement diminué lorsque de l'eau compose le milieu 2, et, le signal acoustique n'étant plus confiné dans la cellule, l'amplitude du signal acoustique dans la cellule est nettement diminué après le premier temps de vol de traversée acoustique de la cellule.

L'exploitation des signaux expérimentaux d'une cellule étudiée en conditions *in vitro* est alors plus délicate que lorsque la cellule est fixée. En effet, dans cette situation, l'information acoustique dans la cellule ne devient directement exploitable que sur le premier temps de traversée acoustique de la cellule. En considérant qu'il n'y a pas de modification ni de l'épaisseur ni des propriétés mécaniques de la cellule lorsqu'elle est fixée ou en condition *in vitro*, et en reprenant les signaux étudiés dans la section précédente, section 4.4.1, le temps

de vol caractéristique de traversée de la cellule est alors centré sur 50 ps, avec un écart type de 20 ps. Concernant la procédure d'ajustement numérique du signal simulé sur les acquisitions expérimentales, si l'on utilise uniquement le signal sur ce temps de vol acoustique, ~50ps, il paraît délicat d'extraire des informations de la mécanique de la cellule avec une aussi bonne précision que lorsque les cellules sont en conditions fixées. Il est cependant peut être possible d'utiliser le signal détecté sur une nanoseconde ou plus, mais auparavant une étude de sensibilité de l'ensemble du signal détecté en fonction des propriétés mécaniques de la cellule uniquement est nécessaire afin de vérifier la pertinence de ce principe d'étude. Cette étude n'a pas encore été réalisée. Celle-ci devrait être menée en parallèle d'une réflexion pour améliorer la détection du signal aux temps très courts. Par exemple, D. Cahill propose une technique de mesure par ellipsométrie résolue en temps qui, semble-t-il, permet d'étudier les interface solide/liquide avec un gain de détection de deux ordres de grandeurs par rapport à une détection classique de mesure interférométrique d'acoustique picoseconde. [162]

De plus, le saut d'amplitude de signal au temps de vol de traversée acoustique de la cellule est fonction de l'impédance acoustique de la cellule et du sérum biologique. L'impédance acoustique du sérum biologique étant connue, il est alors possible d'extraire de ce saut d'amplitude l'impédance acoustique de la cellule. Cependant, afin de pouvoir évaluer précisément ce saut d'amplitude il est nécessaire de parfaitement le situer dans le temps. Pour se faire, il est alors possible d'utiliser le module du signal analytique du signal expérimental. En effet, le signal analytique permet de quantifier la puissance d'un signal donné. Or, un signal sinusoïdal étant de densité de puissance constante, le signal analytique de la détection expérimentale permet de faire ressortir l'enveloppe du signal détecté et la localisation des échos temporels est facilement réalisée.

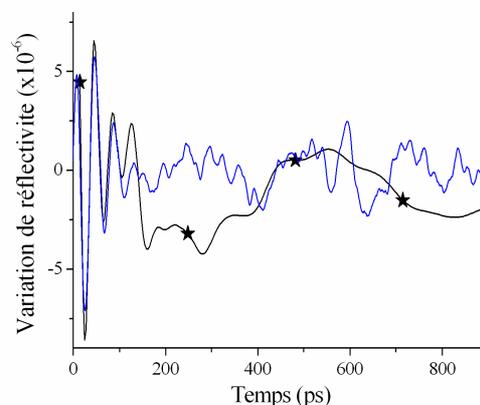


Figure 4-22 : Acquisition expérimentale sur cellule ostéoclaste avec une détection de couleur bleue et confrontation avec une simulation (étoiles).

Une seconde perspective expérimentale consiste à étudier d'autres types de cellules, celles-ci pouvant être des cellules souches, des cellules sanguines ou autres. Cette étude pourrait d'ailleurs être liée à la résolution des premières difficultés d'application de l'acoustique picoseconde à l'étude de cellules biologiques animales en conditions *in vitro* si l'on diversifie cette application de l'acoustique picoseconde sur des cellules plus épaisses que celles étudiées dans ce manuscrit. Des essais ont été réalisés sur cellules ostéoclastes*, adhérentes sur le même alliage de titane Ti-6AL-4V. Une acquisition expérimentale réalisée avec une sonde de couleur bleue est présentée sur la figure 4-21.

Le déplacement des interfaces entre la cellule et l'air n'est pas visible sur cette acquisition expérimentale. L'origine de cette absence de signal de déplacement d'interface n'est à ce jour pas comprise. Un ajustement numérique est proposé pour cette acquisition, et présenté sur le signal avec les étoiles. Cet ajustement permet de mesurer une célérité de 3,6 nm/ps, une épaisseur de 500nm et une atténuation de 28 cP. L'épaisseur de cette cellule est donc supérieure à celles mesurées sur cellules MC3T3, et la quantité d'oscillations Brillouin sur un temps de vol acoustique de traversée de la cellule devient suffisante pour envisager des premières études en conditions *in vitro*.

Une réflexion poussée devrait aussi être menée sur le protocole expérimental optimal pour mesurer avec le plus de sensibilité possible les propriétés mécaniques de la cellule. Ce travail a déjà débuté avec T. Dehoux, recruté sur un projet de recherche lié à cette activité d'acoustique picoseconde dans les cellules biologiques, qui a pour sa part décidé d'essayer de s'affranchir des difficultés liées à la détection optique en pompant et en sondant avec le laser impulsionnel sur la face opposée du substrat biologique qui fait alors quelques centaines de nanomètres d'épaisseur.

Cependant, d'autres possibilités peuvent être imaginées, comme par exemple utiliser deux pompes lasers de même puissance qui seraient décalées temporellement d'une demi période temporelle des oscillations Brillouin. Ainsi, le but serait de minimiser le signal détecté, et une fois ce minimum établi, l'écart temporel peut être connu avec une précision très fine. Ainsi, il est possible que ce principe de travail permette d'améliorer la mesure de la fréquence Brillouin, donc de la célérité acoustique dans la cellule, et finalement de son épaisseur.

* Les cellules ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse. Ce sont des cellules avec plusieurs noyaux. Elles sont en moyenne plus épaisses que les cellules ostéoblastes.

Et, à nouveau, une utilisation plus complète de la détection de fluorescence pourrait être réalisée. Ainsi, si celle-ci était résolue en temps, elle pourrait permettre une mesure précise de l'indice optique de la cellule au lieu où elle est sondée, mais aussi une mesure de sa viscosité par exemple. [163] Un gain de pertinence de la mesure serait ainsi réalisé, puisque l'indice optique ne serait plus estimé mais mesuré et la mesure de viscosité pourrait être confrontée avec une autre mesure, de fréquence très différente. De même, la mesure de l'épaisseur des cellules peut être réalisée par fluorescence, en marquant par fluorescence la membrane cellulaire et en mesurant l'intensité de fluorescence détectée en fonction de la position en z de la cellule par rapport au plan focal de l'objectif de microscope. Deux pics de fluorescence doivent être détectés, chaque pic correspondant au passage de la membrane au niveau du point focal de l'objectif de microscope.

4.6) Conclusion

Dans cette quatrième, et dernière partie de ce manuscrit, les premières activités d'acoustique picoseconde dans une cellule animale ont été réalisées et exploitées. Le modèle de simulation mis en place pour cette étude est fortement inspiré du précédent, dédié à l'étude des cellules épaisses. Ainsi, la différence fondamentale entre les deux modèles est la possibilité pour l'onde acoustique de pouvoir faire des allers et retours dans la cellule. Les conséquences de cette possibilité acoustique ont alors été étudiées en détail, tant au niveau acoustique qu'au niveau de la détection optique. Il a été constaté que la détection optique peut être considérée comme la détection résultant de deux cavités dynamique de Fabry-Perot. La première cavité dynamique de Fabry-Perot est une cavité virtuelle se formant entre les interfaces de la lame et le front d'onde acoustique qui se propage dans la lame acoustique. Cette cavité est fondamentalement similaire à celle qui a été modélisée dans le cadre de l'étude des cellules épaisses. Cependant, le support de la propagation acoustique étant dans cette étude d'épaisseur mince, une étude en fonction de cette épaisseur a été réalisée. Si la lame acoustique est suffisamment épaisse, les oscillations Brillouin peuvent apparaître et la fréquence de ces oscillations est directement proportionnelle à la célérité du front d'onde acoustique se propageant dans la lame. Si la lame est 4 fois plus mince que la longueur d'onde optique utilisée pour la détection, ces oscillations ne peuvent plus apparaître, mais on observe tout de même une interaction acousto-optique. La seconde cavité de Fabry-Perot est formée par la lame transparente elle-même, et la dynamique de cette cavité est à nouveau créée par l'onde acoustique qui, lorsqu'elle atteint les interfaces de la lame provoque un déplacement mécanique de celles-ci, créant alors un déphasage optique des rayons réfléchis sur les

interfaces. La fréquence du signal créée par cette cavité est fonction de l'épaisseur du matériau et de la célérité acoustique dans la lame acoustique. Ainsi, si la lame optique est suffisamment épaisse pour que les oscillations Brillouin apparaissent, la mesure de la célérité acoustique et de l'épaisseur de la cellule sont possibles.

L'application expérimentale a été réalisée, en cherchant dans un premier temps la couleur du laser la plus sensible à la détection optique du signal acoustique ainsi que la zone de la cellule qui peut permettre la détection d'oscillations Brillouin. Une fois cette étude réalisée une application directe de la technique pour la mesure des propriétés mécaniques de la cellule en fonction de ses conditions d'adhésion sur un biomatériau a été réalisée. Cette application a permis de quantifier l'effet de la protéine de BMP-2 sur les propriétés mécaniques de la cellule adhérente au biomatériau, à la fois sa rigidité et son épaisseur mais aussi sa viscosité. Les mesures réalisées ont été confrontées avec d'autres techniques d'étude cellulaire, ceci permettant une interprétation biologique des mesures réalisées. Ainsi, une nouvelle application de l'acoustique picoseconde dans les cellules a pu être établie. Cette application intéresse déjà un certain nombre de chercheurs en sciences biologiques, car il n'était jusqu'à présent pas possible de générer et de détecter un signal acoustique dans une cellule à une aussi haute fréquence que 30 GHz. De plus, il a été montré que des cellules aussi fines que 130 nm pouvaient être étudiées, la barre symbolique des 100 nm pouvant sans doute être franchie, alors que jusqu'à présent les études acoustique conventionnelles sur cellules n'étaient réalisées que sur des cellules de plusieurs micromètres d'épaisseur.

Certaines perspectives de la méthode pour l'étude cellulaire ont ensuite été abordées. Ces perspectives concernent la modélisation physique de la propagation acoustique dans la cellule et de sa détection optique et quelques développements expérimentaux qui pourraient être opérés afin d'améliorer le dispositif déjà existant. Cependant, la première perspective à réaliser concerne les études *in vitro*. Le temps a manqué durant ce travail pour les réaliser mais tout est prêt pour les faire, même si l'exploitation des résultats risque d'être délicate en l'état d'avancement du travail.

Chapitre 5

Conclusion générale

Ce manuscrit a présenté une première approche de l'utilisation de l'acoustique picoseconde comme outil d'étude non destructif des cellules biologiques. L'acoustique picoseconde est un outil très étudié et utilisé, mais essentiellement en physique du solide. Afin que le physicien puisse situer l'apport que propose l'acoustique picoseconde par rapport aux méthodes d'études cellulaires déjà existantes, et à disposition du biologiste dans son laboratoire de recherche, un panorama des grandes techniques d'étude à l'échelle de la cellule a été proposé dans le chapitre 1. Cette présentation s'est focalisée plus particulièrement sur les méthodes d'imagerie et d'étude de l'adhésion cellulaire sur un substrat. De même, une revue de l'acoustique picoseconde appliquée aux fluides ou à la matière molle a été proposée, première étape avant l'étude d'autres systèmes encore plus fluctuants et complexes : les systèmes vivants. Il est cependant surprenant de constater que seulement une quinzaine d'études ont été proposées et publiées sur ces milieux non solides alors que plus de 400 articles sur l'acoustique ultrarapide sont à ce jour publiés*.

Le second chapitre a présenté les principaux développements expérimentaux nécessaires pour utiliser l'acoustique picoseconde en science du vivant. Ces développements sont la création d'un microscope d'épi-fluorescence, compatible avec le montage pompe-sonde du banc acoustique, qui permet l'imagerie des cellules et de ces constituants internes, ainsi que l'adaptation du banc expérimental pour pouvoir étudier la cellule en utilisant deux couleurs laser différentes en un même point de la cellule. Ces deux développements permettent alors une étude aisée des cellules puisque celles-ci deviennent facilement visibles optiquement, avec ou sans fluorescence, et, sans changement des réglages optiques et du pointé laser, la réponse optique du signal acoustique généré peut être obtenue en deux couleurs différentes. Une enceinte biologique, étanche et thermostatée, compatible avec l'utilisation du banc acoustique, a aussi été développée pour satisfaire les conditions d'études *in vitro* de cellules animales. Une quantification des performances de mesure du dispositif ainsi développé a par la suite été réalisée pour pouvoir situer celles-ci par rapport aux mesures sur les cellules biologiques.

* Recherche sur Scopus, avec les mots clefs « ultrafast acoustics »

Les travaux sur cellules ont alors pu débuter. Au préalable, un code de simulation a été développé. Ce code est simple mais modélise de façon relativement complète les phénomènes macroscopiques liés à l'acoustique picoseconde. Ceux-ci sont la génération puis la diffusion thermique, la propagation acoustique en milieu viscoélastique, et enfin la détection optique dans un milieu transparent perturbé par les champs thermiques et acoustique. Ce modèle, ainsi que quelques premières études expérimentales, accompagnées d'une étude bibliographique, a permis de valider dans un premier temps le caractère non invasif de la technique pour la cellule. Ensuite, une étude de la reproductibilité des signaux expérimentaux, pour une cellule unique et pour n cellules, en fonction des organites cellulaires d'une variété donnée a été réalisée. Les mesures réalisées sont exploitées en utilisant le modèle de simulation développé, sur lequel une procédure d'ajustement numérique entre la simulation et les données expérimentales permet la résolution du problème inverse. Le potentiel de l'acoustique picoseconde pour l'imagerie cellulaire a finalement été démontré.

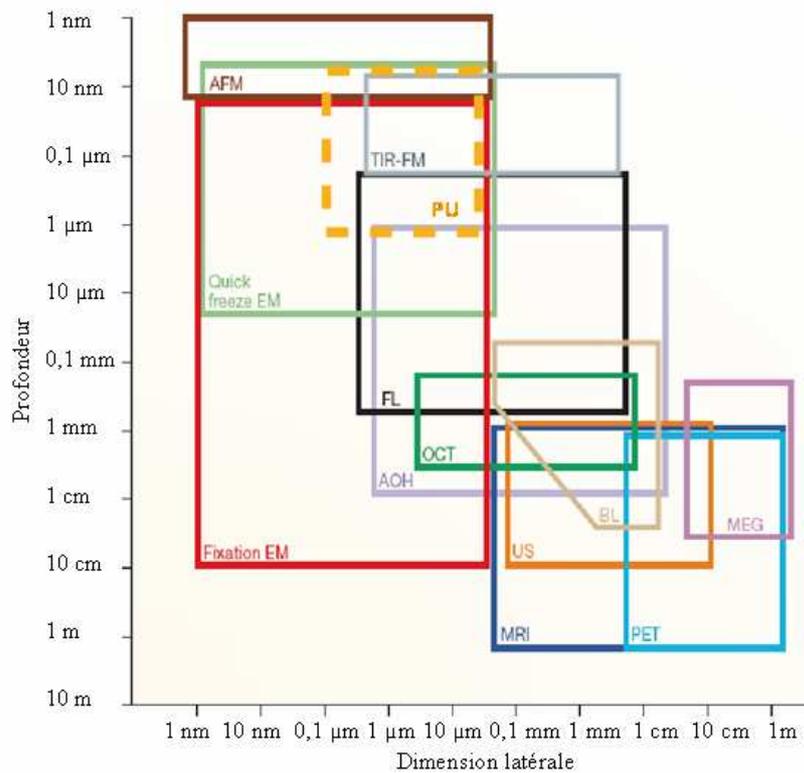


Figure 5-1 : Revue des techniques d'imagerie cellulaire proposée par R. Tsien [35], déjà proposée en section 1.3.5, sur laquelle l'acoustique picoseconde a été ajoutée, encart en pointillé orange, noté PU (Picosecond Ultrasonics). On note que l'acoustique picoseconde est très complémentaire de l'acoustique ultrasonore classique (US) car les résolutions proposées ne sont pas les mêmes. De plus, l'acoustique picoseconde vient compléter une zone où peu de techniques étaient présentes, *a fortiori* en étude *in vitro*.

Le quatrième, et dernier chapitre a finalement permis de proposer une seconde application de l'acoustique picoseconde pour la biologie. Cette application est une mesure des propriétés mécaniques cellulaires en fonction de l'utilisation de protéines de stimulation de l'adhésion cellulaire sur biomatériaux. L'étude étant réalisée sur cellules très fines, un nouveau modèle de simulation a été développé. Ce modèle a permis l'étude de la détection optique en fonction de la couleur de sonde utilisée comparativement à l'épaisseur des cellules. Il a été démontré que la mesure des propriétés viscoélastiques des cellules, ainsi que leur épaisseur est possible. Les mesures réalisées ont montré une sensibilité à la BMP-2. L'interprétation biologique de cette sensibilité a pu être réalisée grâce à la coopération avec l'équipe de reconstruction tissulaire de l'unité INSERM U577. Cette coopération met en évidence l'intérêt que peut avoir la communauté des sciences de la vie pour l'application développée dans ce travail. Ce dernier chapitre a aussi mis en évidence que cette technique permet la génération et détection d'ondes acoustiques dont le contenu spectral peut être jusqu'à deux ordres de grandeurs au dessus de ce qui était réalisé auparavant dans des cellules biologiques un ordre de grandeur plus fines que ce que l'on trouve dans la bibliographie.

Ainsi, même s'il reste encore des travaux à réaliser pour améliorer la technique, force est de constater que l'acoustique picoseconde pourra bientôt être ajoutée à la revue des techniques d'études biologique de R. Tsien. [35] Cet ajout est proposé sur la figure 5-1, un encart en pointillé représentant la technique d'acoustique picoseconde y figure. Son intérêt pour les sciences du vivant y apparaît alors clairement, cette technique est complémentaire des études acoustiques ultrasonores usuelles, encart US sur la figure, puisque les fenêtres de résolutions ne sont pas les mêmes et, de plus, l'acoustique picoseconde vient s'insérer dans une zone où peu de techniques sont présentes, surtout en condition *in vitro*.

Des phonons acoustiques encore un ordre de grandeur au dessus de ceux qui ont permis ce travail pourraient être utilisés avec un montage similaire, mais équipé d'une détection de rayons X. [164] Je pars développer et apprendre à utiliser un tel montage ces deux prochaines années...

Annexes :

A.1) Annexes à la modélisation du problème de la cellule végétale

A.1.1) Étude acoustique

Dans l'espace de Fourier, l'équation d'onde décrivant la propagation acoustique est :

$$\frac{\partial^2 u_i(z, \omega)}{\partial z^2} - k_i^2 u_i(z, \omega) = C_i \alpha_i \frac{\partial T_i(z, t)}{\partial z}, \quad (\text{A.1})$$

où l'on a fait apparaître un nombre d'onde acoustique : $k_i = \omega \sqrt{\rho_i / C_i}$. On suppose comme conditions limites du problème la continuité des déplacements

$$u_0(0, \omega) = u_1(0, \omega), \quad (\text{A.2})$$

et de la contrainte à l'interface :

$$C_0 \frac{\partial u_0(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=0} - \alpha_0 C_0 T_0(0, \omega) = C_1 \frac{\partial u_1(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=0} - \alpha_1 C_1 T_1(0, \omega), \quad (\text{A.3})$$

Les solutions de l'équation (A.1), en prenant en compte les directions de propagation dans chaque milieu, sont de la forme :

$$u_0(z, \omega) = G_0(\omega) e^{-jk_0 z} + I_0(\omega) e^{-\Gamma_0 z} + L_0(\omega) e^{-\beta_0 z}, \quad (\text{A.4})$$

pour le substrat, et

$$u_1(z, \omega) = H_1(\omega) e^{jk_1 z} + J_1(\omega) e^{\Gamma_1 z}, \quad (\text{A.5})$$

pour le milieu viscoélastique. Les termes où apparaît le nombre d'onde acoustique correspondent aux solutions de l'équation d'onde sans second membre, et les termes où apparaît la diffusion thermique ou la pénétration optique correspondent aux solutions particulières de l'équation d'onde acoustique. Les expressions développées des constantes d'intégrations sont :

$$I_0(\omega) = - \frac{\alpha_0 A_0(\omega) \Gamma_0(\omega)}{\left[\Gamma_0(\omega)^2 + k_0(\omega)^2 \right]}, \quad (\text{A.6})$$

et :

$$L_0(\omega) = - \frac{\alpha_0 F_0(\omega) \beta_0}{\left[\beta_0^2 + k_0(\omega)^2 \right]}, \quad (\text{A.7})$$

dans le substrat. Dans la cellule, le seul terme solution de l'équation avec second membre est celui lié à la diffusion thermique, son expression est :

$$J_1(\omega) = -\frac{\alpha_1 B_1(\omega) \Gamma_1(\omega)}{[\Gamma_1(\omega)^2 + k_1(\omega)^2]}. \quad (\text{A.8})$$

Les expressions des constantes d'intégration décrivant la solution particulière de l'équation d'onde (A.1) liées à la diffusion thermique sont semblables, leur contributions sont donc similaires mais pondérées par les propriétés thermiques et mécaniques des milieux auxquelles elles correspondent. De la même manière, l'expression (A.7), décrivant la solution particulière liée au terme source de la pénétration optique dans l'équation d'onde (A.1) du substrat, a une expression similaire à la solution particulière décrivant le terme source de la diffusion thermique dans ce même milieu. Qualitativement, leurs contributions dans la génération acoustique sont semblables, par contre quantitativement leurs temps caractéristiques sont différents. Les expressions développées des constantes d'intégrations issues des conditions aux limites sont :

$$D_0(\omega) = \frac{J_1(\omega) C_1 (k_1 + j\Gamma_1)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + \frac{I_0(\omega) (jC_0 \Gamma_0 - C_1 k_1)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + \frac{L_0(\omega) (jC_0 \beta_0 - C_1 k_1)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + j \frac{C_0 \alpha_0 (A_0(\omega) + F_0(\omega)) - C_1 \alpha_1 B_1(\omega)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]}, \quad (\text{A.9})$$

pour le substrat et :

$$E_1(\omega) = \frac{J_1(\omega) (jC_1 \Gamma_1 - C_0 k_0)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + \frac{I_0(\omega) C_0 (j\Gamma_0 + k_0)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + \frac{L_0(\omega) C_0 (k_0 + j\beta_0)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]} + j \frac{C_0 \alpha_0 (A_0(\omega) + F_0(\omega)) - C_1 \alpha_1 B_1(\omega)}{[C_1 k_1 + C_0 k_0]}, \quad (\text{A.10})$$

pour la cellule. A nouveau, ces expressions sont très semblables entre elles, leur contribution est pondérée par les propriétés thermiques et mécaniques des deux milieux.

A.1.2) Étude optique

L'expression du champ électrique total dans un milieu dont la permittivité diélectrique est perturbée au premier ordre en un point z' est obtenue dans le corps de texte de la section 3.2.3.1. On rappelle son expression :

$$\vec{E}_i(z, \omega) = \left[\begin{array}{l} \left(M_i^h e^{-jqn_i^h z} \right) \\ \left(+ N_i^h e^{jqn_i^h z} \right) \end{array} \right] - \frac{jq}{2n_i^h} \left[\begin{array}{l} \left(M_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') dz' + N_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') e^{2jqn_i^h z'} dz' \right) e^{-jqn_i^h z} \\ \left(- M_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') e^{-2jqn_i^h z'} dz' + N_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') dz' \right) e^{jqn_i^h z} \end{array} \right] \vec{x}. \quad (\text{A.11})$$

Le champ magnétique créé par ce champ électrique est déterminé à l'aide des équations de Maxwell : [128]

$$\text{curl}\vec{E} + \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = \vec{0}. \quad (\text{A.12})$$

L'expression du champ magnétique induit par le champ électrique (A.11) est alors :

$$\vec{B}_i(z, \omega) = \left[n_i^h \begin{pmatrix} M_i^h e^{-jqn_i^h z} \\ -N_i^h e^{jqn_i^h z} \end{pmatrix} - \frac{jq}{2} \begin{pmatrix} (M_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') dz' + N_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') e^{2jqn_i^h z'} dz') e^{-jqn_i^h z} \\ + (M_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') e^{-2jqn_i^h z'} dz' + N_i^h \int \mathcal{E}_i^s(z') dz') e^{jqn_i^h z} \end{pmatrix} \right] \vec{y}. \quad (\text{A.13})$$

Les champs électrique et magnétique sont ensuite appliqués aux conditions limites du problème, c'est-à-dire à l'interface entre la cellule et le substrat. On suppose à cette interface leur continuité. Dans le substrat, la propagation optique modélisée est unidirectionnelle, sans diffraction optique. Dans la cellule, aucune présupposition n'est faite. Le déplacement mécanique de l'interface par la perturbation acoustique est pris en compte, celle-ci est située en $z=0+u(0, \omega)=u_0$. Ainsi, le système formé par la condition limite de continuité du champ électrique est :

$$M_0^h e^{-jqn_0^h u_0} = \begin{pmatrix} M_1^h e^{-jqn_1^h u_0} \\ +N_1^h e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix} - \frac{jq}{2n_1^h} \begin{pmatrix} (M_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' + N_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz') e^{-jqn_1^h u_0} \\ - (M_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' + N_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') dz') e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix}. \quad (\text{A.14})$$

Les termes M_1^h et N_1^h définissent respectivement les champs électriques propagatif et rétrograde dans la cellule. Le terme M_1^h est déterminé par les conditions expérimentales, il correspond à la sonde laser incidente qui éclaire la cellule. La continuité du champ magnétique à l'interface est décrite par la relation suivante :

$$n_0^h M_0^h e^{-jqn_0^h u_0} = n_1^h \begin{pmatrix} M_1^h e^{-jqn_1^h u_0} \\ -N_1^h e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix} - \frac{jq}{2} \begin{pmatrix} (M_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' + N_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz') e^{-jqn_1^h u_0} \\ + (M_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' + N_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') dz') e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix}, \quad (\text{A.15})$$

En insérant l'expression (A.14) dans l'expression (A.15), l'expression suivante est obtenue :

$$N_1^h \begin{pmatrix} (n_0^h + n_1^h) e^{jqn_1^h u_0} \\ + \frac{jq}{2} \left(1 - \frac{n_0^h}{n_1^h}\right) \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' e^{-jqn_1^h u_0} \\ + \frac{jq}{2} \left(1 + \frac{n_0^h}{n_1^h}\right) \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix} = M_1^h \begin{pmatrix} (n_1^h - n_0^h) e^{-jqn_1^h u_0} \\ + \frac{jq}{2} \left(\frac{n_0^h}{n_1^h} - 1\right) \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' e^{-jqn_1^h u_0} \\ - \frac{jq}{2} \left(1 + \frac{n_0^h}{n_1^h}\right) \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' e^{jqn_1^h u_0} \end{pmatrix}, \quad (\text{A.16})$$

L'expression (A.16) n'est alors fonction que d'une inconnue que l'on veut déterminer, N_1^h , qui décrit l'amplitude du champ réfléchi sur l'interface cellule/substrat. Pour simplifier les notations, on considère à présent le problème sans diffraction optique. Les conditions limites permettent d'identifier le coefficient de réflexion optique à l'interface :

$$N_1^h = \frac{(n_1^h - n_0^h) e^{-jqn_1^h u_0}}{(n_0^h + n_1^h) e^{jqn_1^h u_0}} M_1^h = r_{10} e^{-2jqn_1^h u_0} M_1^h, \quad (\text{A.17})$$

qui est alors inséré dans la relation (A.16). De plus, le problème optique homogène et le problème optique diffracté sont alors scindés, et finalement l'expression (A.16) est simplifiée comme suit :

$$\begin{pmatrix} +N_1^h e^{jqn_1^h u_0} \\ +M_1^h r_{10} e^{-jqn_1^h u_0} \end{pmatrix} \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' = \begin{pmatrix} -M_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' e^{jqn_1^h u_0} \\ -r_{10} N_1^h \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' e^{-jqn_1^h u_0} \end{pmatrix}, \quad (\text{A.18})$$

Puis en injectant la relation (A.17) dans l'expression (A.18) on obtient finalement une relation liant les quatre rayons optiques diffractés :

$$r_{10}^2 \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' e^{-2jqn_1^h u_0} + 2r_{10} \int \mathcal{E}_1^s(z') dz' + \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' e^{2jqn_1^h u_0} = 0, \quad (\text{A.19})$$

équivalente à :

$$\int \mathcal{E}_1^s(z') dz' = \frac{-\left(\int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' e^{2jqn_1^h u_0} + r_{10}^2 \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' e^{-2jqn_1^h u_0}\right)}{2r_{10}}, \quad (\text{A.20})$$

Cette relation permet d'obtenir l'expression finale du champ électrique diffracté au premier ordre dans un milieu amagnétique et transparent semi-infini par une perturbation de premier ordre de la permittivité diélectrique. Il suffit d'appliquer la relation (A.20) dans l'expression du champ électrique rétrograde de la relation (A.11) en prenant en compte la relation de réflexion (A.17). Il vient alors :

$$\bar{E}_1(z, \omega) = M_1^h \left[r_{10} e^{-2jqn_1^h u_0} + \frac{jq}{4n_1^h} \left(\int \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' - r_{10}^2 e^{-4jqn_1^h u_0} \int \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' \right) \right] e^{jqn_1^h z} \bar{x}, \quad (\text{A.21})$$

Les bornes d'intégrations de cette expression sont définies par le demi espace du milieu transparent où le déplacement de l'interface est pris en compte :

$$\bar{E}_1(z, \omega) = M_1^h \left[r_{10} e^{-2jqn_1^h u_0} + \frac{jq}{4n_1^h} \left(\int_{u_0}^{-\infty} \mathcal{E}_1^s(z') e^{-2jqn_1^h z'} dz' - r_{10}^2 e^{-4jqn_1^h u_0} \int_{u_0}^{-\infty} \mathcal{E}_1^s(z') e^{2jqn_1^h z'} dz' \right) \right] e^{jqn_1^h z} \bar{x}, \quad (\text{A.22})$$

Si l'on insère l'expression de la déformation acoustique dans la cellule dans l'expression (3.16) qui décrit la perturbation de la constante diélectrique en fonction de la perturbation acoustique, on obtient l'expression de la détection optique de la perturbation acoustique :

$$\bar{E}_1(z, \omega) = M_1^h \left[r_{10} + \frac{jq}{4n_1^h} \frac{\partial n_1}{\partial \eta} \left(\frac{H_1(\omega) e^{jk_1 u_0}}{k_1} \left(\frac{r_{10}^2}{k_1 + 2qn_1^h} - \frac{1}{k_1 - 2qn_1^h} \right) + \frac{J_1(\omega) e^{\Gamma_1 u_0}}{\Gamma_1} \left(\frac{1}{(\Gamma_1 - 2jqn_1^h)} - \frac{r_{10}^2}{(\Gamma_1 + 2jqn_1^h)} \right) \right) \right] e^{jqn_1^h(z-2u_0)} \bar{x}, \quad (\text{A.23})$$

A.2) Détails des calculs pour la résolution du code à deux interfaces

A.2.1) Résolution thermique

La solution du terme source de l'équation de la chaleur du substrat est la même que celle pour le code à une interface.

Les solutions des constantes d'intégrations des solutions générales sont obtenues en résolvant le système 4x4 déterminé par les conditions limites de flux et de température aux deux interfaces.

Le dénominateur des solutions est pour le substrat :

$$denom_{therm_0}^{II} = \begin{pmatrix} (K_1\Gamma_1(K_1\Gamma_1(1+RK_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0(1+RK_2\Gamma_2) + K_2\Gamma_2) + K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2)e^{2\Gamma_1d} \\ - (K_1\Gamma_1(K_1\Gamma_1(RK_0\Gamma_0 - 1) + K_0\Gamma_0(1+RK_2\Gamma_2) + K_2\Gamma_2) - K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2) \end{pmatrix}, \quad (A.24)$$

et pour les milieux transparents :

$$denom_{therm_{trans}}^{II} = \begin{pmatrix} e^{2\Gamma_1d} (K_1\Gamma_1((K_1\Gamma_1 + K_2\Gamma_2)(1+RK_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2) \\ + (K_1\Gamma_1((K_2\Gamma_2 - K_1\Gamma_1)(1+RK_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0) - K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2) \end{pmatrix}. \quad (A.25)$$

Les numérateurs des solutions sont :

$$num_{A_0}^{II} = -C_0^I \begin{pmatrix} (K_1\Gamma_1((K_1\Gamma_1 + K_2\Gamma_2)(1+RK_0\beta_0) + K_0\beta_0) + K_0K_2\Gamma_2\beta_0)e^{2\Gamma_1d} \\ + (K_1\Gamma_1((K_2\Gamma_2 - K_1\Gamma_1)(1+RK_0\beta_0) + K_0\beta_0) - K_0K_2\Gamma_2\beta_0) \end{pmatrix}, \quad (A.26)$$

$$num_{A_1}^{II} = C_0^I K_0 (K_1\Gamma_1 - K_2\Gamma_2)(\Gamma_0 - \beta_0), \quad (A.27)$$

$$num_{B_1}^{II} = C_0^I K_0 (K_1\Gamma_1 + K_2\Gamma_2)(\Gamma_0 - \beta_0)e^{2\Gamma_1d}, \quad (A.28)$$

$$num_{B_2}^{II} = 2C_0^I K_0 K_1 \Gamma_1 (\Gamma_0 - \beta_0) e^{(\Gamma_1 + \Gamma_2)d}, \quad (A.29)$$

$$denom_{therm_2}^{II} = \begin{pmatrix} e^{2\Gamma_1d} (K_1\Gamma_1((K_1\Gamma_1 + K_2\Gamma_2)(1+RK_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2) \\ + (K_1\Gamma_1((K_2\Gamma_2 - K_1\Gamma_1)(1+RK_0\Gamma_0) + K_0\Gamma_0) - K_0\Gamma_0K_2\Gamma_2) \end{pmatrix}, \quad (A.30)$$

Les solutions des termes de diffusion de l'équation générale de la chaleur sont alors :

| Substrat | Couche mince | Milieu 2 |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| $A_0''(z, \omega) = \frac{num_{A_0}''}{denom_{therm_0}''}$ | $A_1''(z, \omega) = \frac{num_{A_1}''}{denom_{therm_1}''}$ | |
| | $B_1''(z, \omega) = \frac{num_{B_1}''}{denom_{therm_1}''}$ | $B_2''(z, \omega) = \frac{num_{B_2}''}{denom_{therm_2}''}$ |

A.2.2) Résolution acoustique

Les solutions des champs de déplacements dans les trois milieux sont :

$$U_0''(z, \omega) = G_0''(\omega)e^{-jk_0z} + I_0''(\omega)e^{-\Gamma_0z} + L_0''(\omega)e^{-\beta_0z}, \quad (\text{A.31})$$

$$U_1''(z, \omega) = G_1''(\omega)e^{-jk_1z} + H_1''(\omega)e^{jk_1z} + I_1''(\omega)e^{-\Gamma_1z} + J_1''(\omega)e^{\Gamma_1z}, \quad (\text{A.32})$$

$$U_2''(z, \omega) = H_2''(\omega)e^{jk_2z} + J_2''(\omega)e^{\Gamma_2z}, \quad (\text{A.33})$$

Les solutions des équations avec second membre sont déterminées :

| | Substrat | Couche mince | Milieu 2 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Pénétration optique | $L_0''(z, \omega) = -\frac{C_0\alpha_0F_0''\beta_0}{\beta_0^2 + k_0^2}$ | | |
| Diffusion thermique | $I_0''(z, \omega) = -\frac{C_0\alpha_0A_0''\Gamma_0}{\Gamma_0^2 + k_0^2}$ | $I_1''(z, \omega) = -\frac{C_1\alpha_1A_1''\Gamma_1}{\Gamma_1^2 + k_1^2}$ $J_1''(z, \omega) = \frac{C_1\alpha_1B_1''\Gamma_1}{\Gamma_1^2 + k_1^2}$ | $J_2''(z, \omega) = \frac{C_2\alpha_2B_2''\Gamma_2}{\Gamma_2^2 + k_2^2}$ |

Les solutions des équations générales sont déterminées par les conditions aux limites sur les interfaces :

$$u_0''(0, \omega) = u_1''(0, \omega), \quad (\text{A.34})$$

$$C_0 \frac{\partial u_0''(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=0} - \alpha_0 C_0 T_0''(0, \omega) = C_1 \frac{\partial u_1''(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=0} - \alpha_1 C_1 T_1''(0, \omega), \quad (\text{A.35})$$

$$u_1''(z=-d, \omega) = u_2''(z=-d, \omega), \quad (\text{A.36})$$

$$C_1 \frac{\partial u_1''(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=-d} - \alpha_1 C_1 T_1''(z=-d, \omega) = C_2 \frac{\partial u_2''(z, \omega)}{\partial z} \Big|_{z=-d} - \alpha_2 C_2 T_2''(z=-d, \omega), \quad (\text{A.37})$$

Après résolution du système les solutions sont déterminées. Le dénominateur acoustique commun de ces expressions est :

$$denom_{ac}^H = e^{-\Gamma_1 d} \left((C_2 k_2 C_0 k_0 + C_1^2 k_1^2) (e^{2jk_1 d} - 1) + C_1 k_1 (C_2 k_2 + C_0 k_0) (1 + e^{2jk_1 d}) \right). \quad (\text{A.38})$$

Les numérateurs sont :

$$num_{G_0^H(z, \omega)} = \left[\begin{aligned} & I_0^H e^{-\Gamma_1 d} \left(\begin{aligned} & j\Gamma_0 C_0 (C_1 k_1 (e^{2jk_1 d} + 1) + C_2 k_2 (e^{2jk_1 d} - 1)) \\ & + C_1 k_1 (C_1 k_1 (1 - e^{2jk_1 d}) - C_2 k_2 (e^{2jk_1 d} + 1)) \end{aligned} \right) \\ & + L_0^H e^{-\Gamma_1 d} \left(\begin{aligned} & j\beta_0 C_0 (C_1 k_1 (1 + e^{2jk_1 d}) + C_2 k_2 (e^{2jk_1 d} - 1)) \\ & + C_1 k_1 (C_1 k_1 (1 - e^{2jk_1 d}) - C_2 k_2 (e^{2jk_1 d} + 1)) \end{aligned} \right) \\ & - jC_1 I_1^H \left(\begin{aligned} & e^{-\Gamma_1 d} (C_1 k_1 - C_2 k_2) (\Gamma_1 - jk_1) \\ & + e^{d(2jk_1 - \Gamma_1)} (C_2 k_2 + C_1 k_1) (jk_1 + \Gamma_1) \\ & - 2e^{jk_1 d} k_1 (jC_2 k_2 + C_1 \Gamma_1) \end{aligned} \right) \\ & + jC_1 J_1^H \left(\begin{aligned} & e^{-\Gamma_1 d} (C_1 k_1 - C_2 k_2) (jk_1 + \Gamma_1) \\ & + e^{d(2jk_1 - \Gamma_1)} (C_1 k_1 (\Gamma_1 - jk_1) + k_2 (C_1 \Gamma_1 - jC_2 k_1)) \\ & + 2(jC_2 k_2 - C_1 \Gamma_1) k_1 e^{d(jk_1 - 2\Gamma_1)} \end{aligned} \right) \\ & + 2jC_1 C_2 J_2^H k_1 e^{d(jk_1 - \Gamma_1 - \Gamma_2)} (\Gamma_2 - jk_2) \\ & - jC_0 \alpha_0 (C_1 k_1 (1 + e^{2jk_1 d}) + C_2 k_2 (e^{2jk_1 d} - 1)) (F_0^H \beta_0 + A_0^H \Gamma_0) e^{-\Gamma_1 d} \\ & + jC_1 \Gamma_1 \alpha_1 \left(\begin{aligned} & 2C_1 B_1^H k_1 e^{d(jk_1 - 2\Gamma_1)} - 2C_1 A_1^H e^{jk_1 d} \\ & + e^{-\Gamma_1 d} (C_1 k_1 - C_2 k_2) (A_1^H - B_1^H) \\ & + e^{d(2jk_1 - \Gamma_1)} (C_1 k_1 + C_2 k_2) (A_1^H - B_1^H) \end{aligned} \right) \\ & - 2jk_1 e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2 - jk_1)} C_1 B_2^H \Gamma_2 C_2 \alpha_2 \end{aligned} \right], \quad (\text{A.39})$$

$$num_{G_1^H(z, \omega)} = \left[\begin{aligned} & I_0^H (j\Gamma_0 + k_0) C_0 (C_1 k_1 - C_2 k_2) e^{-\Gamma_1 d} \\ & + L_0^H (j\beta_0 + k_0) C_0 (C_1 k_1 - C_2 k_2) e^{-\Gamma_1 d} \\ & + jI_1^H \left(\begin{aligned} & e^{-\Gamma_1 d} (C_2 k_2 - C_1 k_1) (C_1 \Gamma_1 - jC_0 k_0) \\ & + e^{jk_1 d} (C_0 k_0 + C_1 k_1) (C_1 \Gamma_1 + jC_2 k_2) \end{aligned} \right) \\ & + jJ_1^H \left(\begin{aligned} & e^{-\Gamma_1 d} (jC_0 k_0 + C_1 \Gamma_1) (C_1 k_1 - C_2 k_2) \\ & + e^{d(jk_1 - 2\Gamma_1)} (C_0 k_0 + C_1 k_1) (jC_2 k_2 - C_1 \Gamma_1) \end{aligned} \right) \\ & + jJ_2^H (C_0 k_0 + C_1 k_1) (\Gamma_2 - jk_2) C_2 e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2 - jk_1)} \\ & - j\alpha_0 C_0 (F_0^H \beta_0 + A_0^H \Gamma_0) (C_1 k_1 - C_2 k_2) e^{-\Gamma_1 d} \\ & - jC_1 \Gamma_1 \alpha_1 \left(\begin{aligned} & e^{-\Gamma_1 d} (C_1 k_1 - C_2 k_2) (B_1^H - A_1^H) \\ & + (C_0 k_0 + C_1 k_1) (A_1^H e^{jk_1 d} - B_1^H e^{d(jk_1 - 2\Gamma_1)}) \end{aligned} \right) \\ & - jB_2^H C_2 \Gamma_2 \alpha_2 e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2 - jk_1)} (C_0 k_0 + C_1 k_1) \end{aligned} \right], \quad (\text{A.40})$$

$$\text{num}_{H_1''(z,\omega)} = \left(\begin{array}{l}
I_0'' (j\Gamma_0 + k_0) C_0 (C_1 k_1 + C_2 k_2) e^{2jk_1 d} \\
+ L_0'' (j\beta_0 + k_0) C_0 (C_1 k_1 + C_2 k_2) e^{2jk_1 d} \\
- jI_1'' e^{d(jk_1 + \Gamma_1)} \left(\begin{array}{l}
(jC_2 k_2 + C_1 \Gamma_1)(C_0 k_0 - C_1 k_1) \\
+ e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} (C_1 \Gamma_1 - jC_0 k_0)(C_1 k_1 + C_2 k_2)
\end{array} \right) \\
+ jJ_1'' e^{d(jk_1 + \Gamma_1)} \left(\begin{array}{l}
(C_0 k_0 - C_1 k_1)(C_1 \Gamma_1 - jC_2 k_2) e^{-2\Gamma_1 d} \\
+ (C_1 \Gamma_1 + jC_0 k_0)(C_1 k_1 + C_2 k_2) e^{d(jk_1 - \Gamma_1)}
\end{array} \right) \\
- jJ_2'' (C_0 k_0 - C_1 k_1)(\Gamma_2 - jk_2) C_2 e^{d(jk_1 - \Gamma_2)} \\
- j\alpha_0 (F_0'' \beta_0 + A_0'' \Gamma_0) C_0 (C_1 k_1 + C_2 k_2) e^{2jk_1 d} \\
+ jC_1 \Gamma_1 e^{d(jk_1 + \Gamma_1)} \alpha_1 \left(\begin{array}{l}
(C_0 k_0 - C_1 k_1)(A_1'' - B_1'' e^{-2\Gamma_1 d}) \\
+ (A_1'' - B_1'')(C_1 k_1 + C_2 k_2) e^{d(jk_1 - \Gamma_1)}
\end{array} \right) \\
+ jC_1 B_2'' \Gamma_2 e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2)} (C_0 k_0 - C_1 k_1) e^{d(jk_1 + \Gamma_1)} \alpha_2
\end{array} \right) e^{\Gamma_1 d}, \quad (\text{A.41})$$

$$\text{num}_{H_2''(z,\omega)} = \left(\begin{array}{l}
2I_0'' C_1 k_1 C_0 e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} (j\Gamma_0 + k_0) e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \\
+ 2L_0'' C_1 k_1 C_0 e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} (j\beta_0 + k_0) e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \\
+ jI_1'' C_1 e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \left(\begin{array}{l}
(C_1 k_1 - C_0 k_0)(jk_1 + \Gamma_1) + 2k_1 (jC_0 k_0 - C_1 \Gamma_1) e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} \\
+ e^{2jk_1 d} (C_0 k_0 + C_1 k_1)(\Gamma_1 - jk_1)
\end{array} \right) \\
+ jJ_1'' C_1 e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \left(\begin{array}{l}
+ 2k_1 (jC_0 k_0 + C_1 \Gamma_1) e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} \\
- e^{2d(jk_1 - \Gamma_1)} (C_1 k_1 + C_0 k_0)(jk_1 + \Gamma_1) \\
+ e^{-2\Gamma_1 d} (\Gamma_1 - jk_1)(C_0 k_0 - C_1 k_1)
\end{array} \right) \\
- jJ_2'' e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \left(\begin{array}{l}
+ e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2)} (jC_2 \Gamma_2 + C_1 k_1)(C_0 k_0 - C_1 k_1) \\
+ e^{d(2jk_1 - \Gamma_1 - \Gamma_2)} (C_1 k_1 - jC_2 \Gamma_2)(C_0 k_0 + C_1 k_1)
\end{array} \right) \\
- 2j\alpha_0'' C_1 k_1 C_0 e^{d(jk_1 - \Gamma_1)} (F_0'' \beta_0 + A_0'' \Gamma_0) e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \\
- j\Gamma_1 C_1 e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \alpha_1'' \left(\begin{array}{l}
(C_1 k_1 - C_0 k_0)(A_1'' - B_1'' e^{-2\Gamma_1 d} (e^{2jk_1 d} - 1)) \\
+ A_1'' (C_1 k_1 + C_0 k_0) e^{2jk_1 d} + 2C_1 k_1 (B_1'' - A_1'') e^{d(jk_1 - \Gamma_1)}
\end{array} \right) \\
+ jC_2 B_2'' \Gamma_2 e^{d(jk_2 + \Gamma_1)} \alpha_2'' \left(\begin{array}{l}
(C_0 k_0 - C_1 k_1) e^{-d(\Gamma_1 + \Gamma_2)} \\
- (C_1 k_1 + C_0 k_0) e^{d(2jk_1 - \Gamma_1 - \Gamma_2)}
\end{array} \right)
\end{array} \right) e^{-\Gamma_1 d} \quad (\text{A.42})$$

L'expression de chaque terme est finalement obtenue en effectuant la division du numérateur qui lui correspond avec celle du dénominateur acoustique.

A.3) Vers une résolution analytique de la détection optique dans le problème bi-interfaces

A.3.1) Résolution du problème optique non perturbé

La détection optique est à présent résolue. Cette résolution s'appuie sur la résolution optique du modèle à une interface. On autorise une unique direction optique dans le titane et deux directions optique dans les milieux transparents. Les solutions de l'équation de Maxwell sans diffraction optique sont appliquées au modèle, équation (3.22). Le problème est dans un premier temps résolu sans prendre en compte la perturbation créée par les champs thermique et acoustique aussi les graphème s et h sont dans l'immédiat non écrits. Les expressions des champs électriques dans chaque milieu sont alors :

$$\vec{E}_0^{\parallel}(z, \omega) = M_0^{\parallel} e^{-jqn_0 z} \vec{x}, \quad (\text{A.43})$$

dans le titane,

$$\vec{E}_1^{\parallel}(z, \omega) = (M_1^{\parallel} e^{-jqn_1 z} + N_1^{\parallel} e^{jqn_1 z}) \vec{x}, \quad (\text{A.44})$$

dans la cellule,

$$\vec{E}_2^{\parallel}(z, \omega) = (M_2^{\parallel} e^{-jqn_2 z} + N_2^{\parallel} e^{jqn_2 z}) \vec{x}, \quad (\text{A.45})$$

dans le milieu 2. Les champs magnétiques sont déduits de ces expressions à l'aide des équations de Maxwell, comme précédemment, et les conditions limites de continuité du champ électrique et du champ magnétique sont appliquées aux interfaces. L'amplitude du terme M_2 de l'onde incidente est connue grâce à la mesure de sa puissance sur le banc expérimental et la puissance du champ optique détecté en photodiodes est déterminée par l'amplitude du terme N_2 . Ce dernier peut s'écrire explicitement en fonction des amplitudes des autres ondes optiques, à partir des conditions limites électriques à l'interface entre la cellule et le milieu 2 :

$$N_2^{\parallel} = \left(-M_2^{\parallel} e^{2jqn_2 d} + M_1^{\parallel} e^{jq(n_1+n_2)d} + N_1^{\parallel} e^{-jq(n_1+n_2)d} \right). \quad (\text{A.46})$$

L'onde optique ainsi déterminée,

$$\vec{E}_r^{\parallel}(z) = N_2^{\parallel} e^{jqn_2 z} \vec{x}, \quad (\text{A.47})$$

décrit le champ électrique total réfléchi par le système optique formé par les deux interfaces.

Les champs électriques dans les trois milieux sont :

$$\vec{E}_0^{\parallel}(z, \omega) = M_0^{\parallel} e^{-jqn_0 z} \vec{x}, \quad (\text{A.48})$$

$$\vec{E}_1^{\parallel}(z, \omega) = (M_1^{\parallel} e^{-jqn_1 z} + N_1^{\parallel} e^{jqn_1 z}) \vec{x}, \quad (\text{A.49})$$

$$\vec{E}_2^H(z, \omega) = (M_2^H e^{-jqn_2 z} + N_2^H e^{jqn_2 z}) \vec{x}, \quad (\text{A.50})$$

Les champs magnétiques correspondant à chaque champ électrique sont déterminés à l'aide de la relation de Maxwell, équation (A.12) et le système formé par les conditions de continuité des champs électriques et magnétiques aux deux interfaces est alors :

$$M_0^H e^{-jqn_0 u_0} = (M_1^H e^{-jqn_1 u_0} + N_1^H e^{jqn_1 u_0}), \quad (\text{A.51})$$

$$n_0 M_0^H e^{-jqn_0 u_0} = n_1 (M_1^H e^{-jqn_1 u_0} - N_1^H e^{jqn_1 u_0}), \quad (\text{A.52})$$

pour l'interface titane/cellule,

$$(M_1^H e^{jqn_1 d} + N_1^H e^{-jqn_1 d}) = (M_2^H e^{jqn_2 d} + N_2^H e^{-jqn_2 d}), \quad (\text{A.53})$$

$$n_1 (M_1^H e^{jqn_1 d} - N_1^H e^{-jqn_1 d}) = n_2 (M_2^H e^{jqn_2 d} - N_2^H e^{-jqn_2 d}), \quad (\text{A.54})$$

pour l'interface cellule/ milieu2.

Les amplitudes des ondes ainsi déterminées sont alors :

$$M_1^h = \frac{2M_2^h n_2^h (n_0^h + n_1^h) \left((n_0^h + n_1^h) e^{jqn_1^h d} + (n_1^h - n_0^h) e^{-jqn_1^h (2u_0 + d)} \right)}{\left((n_1^h + n_2^h) (n_0^h + n_1^h) (n_0^h + n_1^h) e^{jq(2n_1^h - n_2^h) d} \right.} \quad (\text{A.55})$$

$$\left. + \left((n_2^h - n_1^h) (n_1^h - n_0^h)^2 e^{-jqn_1^h (2u_0 + d)} + 2n_2^h \left((n_1^h)^2 + (n_0^h)^2 \right) \right) e^{-jq(2n_1^h u_0 + n_2^h d)} \right)$$

$$N_2^h = M_2^h \frac{(n_0^h + n_1^h) (n_2^h - n_1^h) e^{jq(n_1^h + n_2^h) d} + (n_1^h - n_0^h) (n_2^h + n_1^h) e^{-2jqn_1^h u_0} e^{-jq(n_1^h - n_2^h) d}}{(n_1^h + n_2^h) (n_0^h + n_1^h) e^{jq(n_1^h - n_2^h) d} + (n_1^h - n_0^h) (n_2^h - n_1^h) e^{-2jqn_1^h u_0} e^{-jq(n_1^h + n_2^h) d}}, \quad (\text{A.56})$$

$$N_1^h = \frac{2M_2^h n_2^h (n_1^h - n_0^h) \left((n_0^h + n_1^h) e^{jqn_1^h d} + (n_1^h - n_0^h) e^{-jqn_1^h (2u_0 + d)} \right) e^{-2jqn_1^h u_0}}{\left((n_1^h + n_2^h) (n_0^h + n_1^h) (n_0^h + n_1^h) e^{jq(2n_1^h - n_2^h) d} \right.} \quad (\text{A.57})$$

$$\left. + \left((n_2^h - n_1^h) (n_1^h - n_0^h)^2 e^{-jqn_1^h (2u_0 + d)} + 2n_2^h \left((n_1^h)^2 + (n_0^h)^2 \right) \right) e^{-jq(2n_1^h u_0 + n_2^h d)} \right)$$

$$M_0^H = (M_1^H e^{-jqn_1 u_0} + N_1^H e^{jqn_1 u_0}) e^{jqn_0 u_0}, \quad (\text{A.58})$$

A.3.2) Résolution du problème optique avec diffraction

Le problème optique diffracté est relativement lourd à écrire formellement. La présentation du problème matriciel à résoudre est proposée sous la forme suivante, à partir des conditions homogènes et particulières :

$$\begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} & A_{13} & 0 \\ A_{21} & A_{22} & A_{23} & 0 \\ 0 & A_{32} & A_{33} & A_{34} \\ 0 & A_{42} & A_{43} & A_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_0^h \\ M_1^h \\ N_1^h \\ N_2^h \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ e^{jqm_2d} \\ n_2 e^{-jqm_2d} \end{pmatrix}, \quad (\text{A.59})$$

avec :

$$\begin{aligned} A_{11} &= e^{-jqn_0u_0} \\ A_{12} &= -e^{-jqn_1u_0} + \frac{jq_1}{2n_1} \left(\int \varepsilon_1(z') dz' e^{-jqn_1u_0} - \int \varepsilon_1(z') e^{-2jqn_1z'} dz' e^{jqn_1u_0} \right) \\ A_{13} &= -e^{jqn_1u_0} + \frac{jq_1}{2n_1} \left(\int \varepsilon_1(z') e^{2jqn_1z'} dz' e^{-jqn_1u_0} - \int \varepsilon_1(z') dz' e^{jqn_1u_0} \right) \\ A_{21} &= n_0 e^{-jqn_0u_0} \\ A_{22} &= -n_1 e^{-jqn_1u_0} + \frac{jq_1}{2} \left(\int \varepsilon_1(z') dz' e^{-jqn_1u_0} + \int \varepsilon_1(z') e^{-2jqn_1z'} dz' e^{jqn_1u_0} \right) \\ A_{23} &= n_1 e^{jqn_1u_0} + \frac{jq_1}{2} \left(\int \varepsilon_1(z') e^{2jqn_1z'} dz' e^{-jqn_1u_0} + \int \varepsilon_1(z') dz' e^{jqn_1u_0} \right) \\ A_{32} &= -e^{jqn_1d} + \frac{jq_1}{2n_1} \left(\int \varepsilon_1(z') dz' e^{jqn_1d} - \int \varepsilon_1(z') e^{-2jqn_1z'} dz' e^{-jqn_1d} \right) \\ A_{33} &= -e^{-jqn_1d} + \frac{jq_1}{2n_1} \left(\int \varepsilon_1(z') e^{2jqn_1z'} dz' e^{jqn_1d} - \int \varepsilon_1(z') dz' e^{-jqn_1d} \right) \\ A_{34} &= e^{-jqn_2d} \\ A_{42} &= n_1 e^{-jqn_1d} + \frac{jq_1}{2} \left(\int \varepsilon_1(z') dz' e^{jqn_1d} + \int \varepsilon_1(z') e^{-2jqn_1z'} dz' e^{-jqn_1d} \right) \\ A_{43} &= -n_1 e^{-jqn_1d} + \frac{jq_1}{2} \left(\int \varepsilon_1(z') e^{2jqn_1z'} dz' e^{jqn_1d} + \int \varepsilon_1(z') dz' e^{-jqn_1d} \right) \\ A_{44} &= n_2 e^{jqn_2d} \end{aligned} \quad (\text{A.60})$$

Il reste alors à inverser la matrice [A] et ensuite établir une relation entre les termes intégraux, comme obtenu dans l'équation (A.19). Cette résolution est délicate à résoudre formellement. En revanche, elle pourrait être résolue numériquement relativement facilement.

A.4) Paramètres physiques mesurés dans les cellules trouvés dans la bibliographie

Propriétés thermiques :

| Conductivité thermique [W/m.K] | Chaleur spécifique [J.kg ⁻¹ .K ⁻¹] | Densité [Kg.m ⁻³] |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Cellules de coeurs de cochons : 0.58 [165] | ? | E. coli (bactéries intestinales de mammifère): 1160 [166] |
| Cellules de coeurs de humains : 0.587 [167] | | globules rouges humains : 1139 [166] |

Propriétés acoustiques :

L'essentiel des propriétés acoustiques déterminées sur cellules uniques sont évaluées par microscopie acoustique. J. Bereither-Hahn a rédigé deux chapitres de livres, [85] et [168] où l'essentiels des résultats de la littérature sont présentés. Les célérités acoustiques typiques mesurées sont de l'ordre de 1650 m/s, et les épaisseurs de quelques micromètres ($d < 5 \mu\text{m}$). On présente quelques résultats de la littérature, classés chronologiquement. T. Kundu a étudié des cellules endothéliales XTH-2 (cellules de cœur de têtard de xénope) adhérentes sur substrat de verre, [88], les mesures sont une célérité de 1,6 km/s et une épaisseur micrométrique. J. Bereither-Hahn a étudié la mécanique de la cellule en fonction de l'organisation et de la densité des microtubules à l'intérieur de la cellule. [92] Les cellules sont des XTH-2, il suppose une densité de cellule à 1060 Kg/m^3 , et il mesure une variation de la célérité acoustique. Pour les cellules dont le cytosquelette est stimulé, la célérité acoustique peut monter à 1,9 km/s. T. Kundu a à nouveau appliqué la microscopie à une étude sur cellules XTH-2, en raffinant son modèle pour exploiter les mesures, les épaisseurs sont à nouveau de quelques micromètres et les célérités mesurées sont entre 1,6 et 1,7 km/s. Il a ensuite étudié des cellules kératinocyte HaCaT, des cellules de peau, [169] en mesurant des vitesses de 1,6 km/s dans des cellules allant de 0,5 à $3 \mu\text{m}$. E. Weiss [90] a étudié des cellules endothéliales cancéreuses HeLa. Les vitesses acoustiques dans la cellule sont autour de 1530 km/s et les épaisseurs sont micrométriques.

Propriétés optiques :

L'indice optique des cellules est typiquement évalué à 1,4. [155] Les coefficients piézo-optiques et thermo-optiques n'ont pas été trouvés dans la littérature existante.

Bibliographie :

- [1] R. Hooke : Micrographia, or Some Physiological Description of minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon, *The Royal Society*, (1664)
- [2] Ministère délégué à la Recherche : Nanosciences et nanotechnologies. Une réflexion prospective, *Mission Scientifique technique et Pédagogique*, (2005)
- [3] S. Sokolov : Ultrasonic oscillations and their applications, *Tech Phys.*, **2**, 1-23 (1935)
- [4] R. Lemons, C. Quate : Acoustic microscopy: Biomedical applications, *Science*, **188**, 905-911 (1975)
- [5] A. G. Bell : Upon the production of sound by radiant energy, *Proceeding of the Philosophical Magazine and Journal of Science*, **XI**, 510-528 (1880)
- [6] L. Brillouin : Diffusion de la lumière et des rayons X par un corps transparent homogène influence de l'agitation thermique, *Annales de physiques*, **17**, 88-122 (1922)
- [7] E. Gross : Change of wave-length of light due to elastic heat waves of scattering in liquids, *Nature*, **126**, 201-202 (1930)
- [8] T. Maiman : Stimulated optical radiation in ruby, *Nature*, **187**, 493-494 (1960)
- [9] A. J. DeMaria, D.A. Stetser, H. Heynau : Self mode-locking of lasers with saturable absorbers, *Appl. Phys. Lett.*, **8**, 174-176 (1966)
- [10] C. Thomsen, J. Strait, Z. Vardeny, H.J. Maris, J. Tauc, J. Hauser : Coherent phonon generation and detection by picosecond light pulses, *Phys. Rev. Lett.*, **53**, 989-992 (1984)
- [11] C. Thomsen, H.T. Grahn, H.J. Maris, J.Tauc : Surface generation and detection of phonons by picosecond light pulses, *Phys. Rev. B*, **34**, 4129-4138 (1986)
- [12] G. Tas, C.J. Morath, H.J. Maris : Reflection of high-frequency acoustic phonon from solid-liquid interfaces studied by picosecond ultrasonics, *Physica B*, **219-220**, 660-662 (1996)
- [13] Y. G. Lee, K. Bretz, F. K. Wise, W. Sachse : Picosecond acoustic measurements of longitudinal wave velocity of submicron polymer films, *Appl. Phys. Lett.*, **69**, 1692-1994 (1996)
- [14] D. H. Hurley, O. B. Wright, O. Matsuda, V.E. Gusev, O. V. Kolosov : Laser picosecond acoustics in isotropic and anisotropic materials, *Ultrasonics*, **38**, 470-474 (2000)
- [15] T. Bienville, B. Perrin : Generation and detection of quasi transverse waves in a anisotropic crystal by picosecond ultrasonics, *In Proceedings of the WCU, Paris*, 813-816 (2003)
- [16] C. Rossignol, J.M. Rampnoux, M. Perton, B. Audoin, S. Dilhaire : Generation and detection of shear acoustic waves in metal submicrometric films with ultrashort laser pulses, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 166106-166110 (2005)
- [17] Y. Sugawara, O.B. Wright, O. Matsuda, M. Takigahira, Y. Tanaka, S. Tamura, V.E. Gusev : Watching ripples on crystals, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 185504-4 (2002)
- [18] L. J. Shelton, F. Yang, W.K. Ford, H.J. Maris : Picosecond ultrasonic measurement of the velocity of phonons in water, *Phys. Status Solidi C*, **242**, 1379-1382 (2005)
- [19] S. Kashiwada, O. Matsuda, J. Baumberg, R.L. Voti, O.B. Wright : In situ monitoring of the growth of ice films by laser picosecond acoustics, *J. Appl. Phys.*, **100**, 073506.1-073506.6 (2006)
- [20] F. Yang, T. Atay, C. H. Dang, T. J. Grimsley, S. Che, J. Ma, Q. Zhang, A. V. Nurmikko, H. J. Maris : Study of phonon propagation in water using picosecond ultrasonics, *J. Phys. Conf. Ser.*, **92**, 012024 (2007)

- [21] F. Yang, S. Che, G.A. Antonelli, H. J. Maris, A. V. Nurmikko : Picosecond ultrasonic experiments with water and its application to the measurement of nanostructures, *J. Appl. Phys.*, **107**, 103537-8 (2010)
- [22] L. Rouai, B. Bonello, G. Louis, B. Perrin, P. Peretti : Elasticity of ultrathin copper-phthalocyanine Langmuir-Blodgett films by picosecond ultrasonics, *J. Appl. Phys.*, **85**, 8155-8159 (1999)
- [23] G. A. Antonelli, B. Perrin, B.C. Daly, D.G. Cahill : Characterization of mechanical and thermal properties using ultrafast optical metrology, *Mater. Res. Soc. Bull.*, **31**, 607-613 (2006)
- [24] Y. Guillet, C. Rossignol, B. Audoin, G. Calbris, S. Ravaine : Optoacoustic response of a single submicronic gold particule revealed by the picosecond ultrasonics technique, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 061909-3 (2009)
- [25] D. Ségur, Y. Guillet, B. Audoin : Intrinsic geometric scattering probed by picosecond optoacoustics in a cylindrical cavity: Application to acoustic and optical characterizations of a single micron carbon fiber, *Appl. Phys. Lett.*, **97**, 031901-031903 (2010)
- [26] O. Wilson, X. Hu, D.G. Cahill, P. Braun : Colloidal metal particule as probes of nanoscale thermal transport in fluids, *Phys. Rev. B*, **66**, 224301-6 (2002)
- [27] T. Dehoux, O. Wright, R. Li Voti : Picosecond time scale imaging of mechanical contacts, *Ultrasonics*, **50**, 197-201 (2009)
- [28] O. Wright, B. Perrin, O. Matsuda, V.E. Gusev : Optical excitation and detection of picosecond acoustic pulses in liquid mercury, *Phys. Rev. B*, **78**, 024303 (2008)
- [29] F. Descremps, L. Belliard, B. Perrin, M. Gauthier : Sound velocity and absorption measurements under high pressure using picosecond ultrasonics in a diamond anvil cell: application to the stability study of AIPdMn, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 035502-4 (2008)
- [30] D. Cahill, W. Ford, K. Goodson, G. Mahan, A. Majumdar, H. Maris, R. Merlin, S. Phillpot : Nanoscale thermal transport, *J. Appl. Phys.*, **93**, 793-818 (2003)
- [31] G. Tas, H.J. Maris : Electron diffusion in metals studied by picosecond ultrasonics, *Phys. Rev. B*, **49**, 15046-15054 (1994)
- [32] R. Côte, A. Devos : Refractive index, sound velocity and thickness of thin transparent films from multiple angles picosecond ultrasonics, *Review of Scientific Instruments*, **76**, 053906 (2005)
- [33] E. Mottay, P. Rigail, C. Pierre, S. Ermeneux, J.M. Rampnoux, W. Claeys, S. Dilhaire : Ultrafast heterodyne optical sampling applied to picosecond ultrasonics and nanoscale heat transfert, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 72030V (2009)
- [34] C. T. Lim, E.H. Zhou, A. Li, S.R.K. Vedula, H.X. Fu : Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics, *Mater. Sci. Eng., C*, **26**, 1278-1288 (2006)
- [35] R. Y. Tsien : Imagining imaging's future, *Nat. Cell Biol.*, **5**, 16-21 (2003)
- [36] B. Geiger : Encounters in space, *Science*, **294**, 1661-1663 (2001)
- [37] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti : Integrin Signaling, *Science*, **285**, 1028-1032 (1999)
- [38] P. Schaffner, M.M. Dard : Structure and function of RGD peptides involved in bone biology, *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 119-132 (2003)
- [39] M. Lahmani, P. Boisseau, P. Houdy : Les nanosciences: 3 Nanotechnologies et nanobiologie, *Belin*, **ISSN: 1635-8414**, (2007)
- [40] H. Curtis, S. N. Barnes : Biology 5th edition, (1989)
- [41] G. Cooper : La cellule, une approche moléculaire, **ISBN: 2-7445-0056-9**, (1999)
- [42] S. Suresh : Biomechanics and biophysics of cancer cells, *Acta Mater.*, **55**, 3989-4014 (2007)

- [43] C. Rotsch, M. Radmacher : Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study, *Biophys. J.*, **78**, 520-525 (2000)
- [44] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber : Geometric control of cell life and death, *Science*, **276**, 1425-1428 (1997)
- [45] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, A. Z. Hryniewicz : Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy, *Eur. Biophys. J.*, **28**, 312-316 (1999)
- [46] S. A. Safran, N. Gov, A. Nicolas, U.S. Schwarz, T. Tlusty : Physics of cell elasticity, shape and adhesion, *Physica A*, **352**, 171-201 (2005)
- [47] A. S. G. Curtis : The mechanism of cells adhesion to glass, a study by interference reflection microscopy, *J. Cell Biol.*, **20**, 199-215 (1964)
- [48] L. Limozin, K. Sengupta : Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion, *ChemPhysChem*, **10**, 2752-2768 (2009)
- [49] D. Debavelaere-Callens, L. Peyre, P. Campistron, H. Hildebrand : On the use of ultrasounds to quantify the longitudinal threshold force to detach osteoblastic cells from a conditioned glass substrate, *Biomaterial Engineering*, **24**, 521-525 (2007)
- [50] L. Peyre : Contribution au développement d'une méthode quantitative de détachement de cellules adhérentes par ultrasons: Application à la caractérisation de l'adhésion cellulaire sur biomatériaux, *Thèse de doctorant, Université de Valenciennes*, N° **d'ordre: 06/06**, (2006)
- [51] A. Myrdycz, D. Callens, K. Kot, F. Monchau, E. Radziszewski, A. Lefebvre, H. Hildebrand : Cell under stress: a non destructive evaluation of adhesion by ultrasounds, *Biomol. Eng*, **19**, 219-225 (2002)
- [52] O. du Roure, A. Saez, A. Buguin, R. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, B. Ladoux : Force mapping in epithelial cell migration, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 2390-2395 (2005)
- [53] A. Saez, M. Ghibaudo, B. Ladoux, A. Buguin, P. Silberzan : Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat, *Images de la physique*, 94-100 (2007)
- [54] A. Saez, A. Buguin, P. Silberzan, B. Ladoux : Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys. J.*, **89**, 61-73 (2005)
- [55] K. Anselme, M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Lost, P. Hardouin : Quantitative and qualitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **49**, 155-166 (1999)
- [56] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti : Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature*, **309**, 30-33 (1984)
- [57] E. Ruoslahti : RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 697-715 (1996)
- [58] M. Morra : Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins, *European Cells and Materials*, **12**, 1-15 (2006)
- [59] C. Chollet, C. Chanseau, M. Remy, A. Guignandon, R. Bareille, C. Labrugère, L. Bordenave, M.-C. Durrieu : The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces, *Biomater.*, **30**, 711-720 (2009)
- [60] A. K. Shah, J. Lazatin, R.K. Sinha, T. Lennox, N.J. Hickok, R.S. Tuan : Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy, *Biology of the cell*, **91**, 131-142 (1999)
- [61] K. Anselme : Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomater.*, **21**, 667-681 (2000)
- [62] D. Chen, M. Zhao, G. Mundy : Bone Morphogenetic Proteins, *Growth Factor*, **22**, 233-241 (2004)

- [63] G. Hacker : The morphology of apoptosis, *Cell and Tissue Research*, **301**, 5-17 (2000)
- [64] G. G. Stokes : On the change of refrangibility of light, *Philos. Trans. R. Soc. London*, **142**, 463-562 (1852)
- [65] C. Jones, K. Subling : Refractive index sensing using fluorescence lifetime imaging (FLIM), *J. Phys. Conf. Ser.*, **45**, 223-230 (2006)
- [66] K. Suhling, P.M.W. French, D. Phillips : Time-resolved fluorescence microscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **4**, 13-22 (2005)
- [67] L. de Broglie : Recherche sur la théorie des quanta, *Annales de Physiques*, **10ème série, T.3**, (1925)
- [68] G. Roblin : Microscopie, *Tech. Ing.*, **R 6 710**, (1998)
- [69] D. J. Stockes : Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, **361**, 2771-2787 (2003)
- [70] L. Reimer, H. Kohl : Transmission Electron Microscopy: Physics of image formation fifth edition, *Springer Science*, (2008)
- [71] J. A. Hildebrand, D. Rugar, R.N. Johnston, C.F. Quate : Acoustic microscopy of living cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 1656-1660 (1981)
- [72] T. Kundu : Ultrasonic nondestructive evaluation: Engineering and biological material characterization, *CRC Press*, ISBN: 0849314623 (2003)
- [73] Z. Yu, S. Boseck : Scanning acoustic microscopy and its applications to material characterization, *Rev. Mod. Phys.*, **67**, 863-891 (1995)
- [74] M. Muha, A. Moulthrop, G. Kozlowski, B. Hadimioglu : Acoustic microscopy at 15.3 GHz in pressurized superfluid helium, *Appl. Phys. Lett.*, **56**, 1019-1021 (1990)
- [75] G. Binning, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel : Surface studies by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57-61 (1982)
- [76] G. Binning, C.F. Quate, Ch. Gerber : Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930-934 (1986)
- [77] M. Lahmani, C. Dupas, P. Houdy : Les nanosciences: 1. Nanotechnologies et nanophysique, *Belin*, ISBN: 2-7011-4386-1, (2006)
- [78] M. Radmacher : Measuring the elastic properties of biological samples with the atomic force microscope, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **16**, 47-57 (1997)
- [79] H. J. Butt, E. Wolff, S.A.C. Gould, P.K. Hansma : Imaging cells with the atomic force microscope, *J. Struct. Biol.*, **105**, 54-61 (1990)
- [80] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerish, H.E. Gaub : Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 313-317 (2000)
- [81] M. Edidin : Near-field scanning optical microscopy, a siren call to biology, *Traffic*, **2**, 797-803 (2001)
- [82] A. Stemmer, M. Beck, R. Fiolka : Widefield fluorescence microscopy with extended resolution, *Histochem Cell Biol.*, **130**, 807-817 (2008)
- [83] M. Fernandez-Suarez, A. Y. Ting : Fluorescent probes for super resolution imaging in living cells, *Nat. Rev. Moll. Cell. Biolo.*, **9**, 929-943 (2008)
- [84] T. Kujawska, J. Wojcik, L. Filipczyn : Possible temperature effects computed for acoustic microscopy used for living cells, *Ultrasound Med. Biol.*, **30**, 93-101 (2004)
- [85] J. Bereither-Hahn : Probing biological cells and tissues with acoustic microscopy, *Advances in Acoustic Microscopy: Volume 1*, ISBN: 0306447983, 79-115 (1995)
- [86] N. Hozumi, R. Yamashita, C.K. Lee, M. Nagao, K. Kobayashi, Y. Saigo, M. Tanaka, N. Tanaka, S. Ohtsuki : Ultrasonic sound speed microscope for biological tissue characterization driven by nanosecond pulse, *Acoustical Sciences & Technologies*, **24**, 386-390 (2003)

- [87] R. Johnston, A. Atalar, J. Heiserman, V. Jipson, C. Quate : Acoustic microscopy: Resolution of subcellular detail, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3325-3329 (1979)
- [88] T. Kundu, J. Bereiter-Hahn, K. Hillman : Measuring elastic properties of cells by evaluation of scanning acoustic microscopy $V(z)$ values using simplex algorithm, *Biophys. J.*, **59**, 1194-1207 (1991)
- [89] T. Kundu, J. Bereiter-Hahn, I. Karl : Cell property determination from the acoustic microscope generated voltage versus frequency curves, *Biophys. J.*, **78**, 2270-2279 (2000)
- [90] E. C. Weiss, P. Anastasiadis, G. Pilarczyk, R.M. Lemor, P.V. Zinin : Mechanical properties of single cells by high-frequency time-resolved acoustic microscopy, *IEEE trans. Ultr. Ferro. Freq. Control*, **54**, 2257-2271 (2007)
- [91] C. M. Miyasaka, B. R. Tittmann, R. R. Mercer, A.M. Mastro : Osteoblast adhesion of breast cancer cells with scanned image microscopy, *Proc. SPIE*, **5394**, 273-279 (2004)
- [92] I. Karl, J. Bereiter-Hahn : Cell contraction caused by microtubule disruption is accompanied by shape changes and an increased elasticity measured by scanning optical microscopy, *Cell Chemistry and Biophysics*, **29**, 225-241 (1998)
- [93] C. Rossignol : Etude théorique et numérique d'expériences d'acoustique picoseconde, *Thèse de doctorant, Université de Paris 6*, N° d'ordre: **6417**, (2000)
- [94] C. J. Morath, H.J. Maris : Phonon attenuation in amorphous solids studied by picosecond ultrasonics, *Phys. Rev. B*, **54**, 203-213 (1996)
- [95] B. Bonello, P. Djemia, F. Ganot, L. Rouaï, G. Louis : Brillouin light scattering study of Langmuir-Blodgett films: Elastic properties versus thickness, *J. Appl. Phys.*, **94**, 3606-3611 (2003)
- [96] T. Pezeril, C. Klieber, S. Andrieu, K. A. Nelson : Optical generation of gigahertz-frequency shear acoustic waves in liquid glycerol, *Phys. Rev. Lett.*, **102**, 107402-4 (2009)
- [97] H. J. Maris : L'acoustique picoseconde, *Pour la science*, **245**, 88-91 (1999)
- [98] D. Bejan and G. Raseev : Nonequilibrium electron distribution in metals, *Phys. Rev. B*, **55**, 4250-4256 (1997)
- [99] A. Devos : Acoustique picoseconde: une acoustique riche en couleurs, *Thèse d'Habilitation à Diriger des Recherches, Université de Lille 1*, (2005)
- [100] H. Michel : Imagerie pompe-sonde femtoseconde: Application à l'étude thermique de nanomatériaux pour la microélectronique, *2008*, (2008)
- [101] J. G. Dil : Brillouin scattering in condensed matter, *Rep. Prog. Phys.*, **45**, 285-334 (1982)
- [102] A. Kastler : La vie et l'oeuvre de Léon Brillouin, *L'Onde Electrique*, **50**, (1970)
- [103] J. M. Rampnoux : Développement de bancs d'acoustique picoseconde pour la caractérisation sans contact par impulsions laser ultracourtes de composants micrométriques et sub-micrométriques de composants microélectroniques, *Université de Bordeaux I*, N° d'ordre: **2757**, (2003)
- [104] P. Legros, C. Pujol : Microscopie à épi-fluorescence et microscopie confocale: des bases à la pratique, *Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'IFR de Neurosciences, INSERM*, (2008)
- [105] C. Rossignol, B. Perrin, S. Laborde, L. Vandenbulcke, M.I. De Barros, P. Djemia : Nondestructive evaluation of micrometric diamond films with an interferometric picosecond ultrasonics technique, *J. Appl. Phys.*, **95**, 4157-4162 (2004)
- [106] C. Rossignol, J.M. Rampnoux, T. Dehoux, S. Dilhaire, B. Audoin : Picosecond ultrasonics time resolved spectroscopy using a photonic crystal fiber, *Ultrasonics*, **44**, e1283-e1287 (2006)

- [107] P. Franken, A. Hill, C. Peters, G. Weinreich : Generation of optical harmonics, *Phys. Rev. Lett.*, **7**, 118-119 (1961)
- [108] A. Devos, R. Côte, G. Caruyer, A. Lefevre : A different way of performing picosecond ultrasonic measurements in thin transparent films based on laser-wavelength effects, *Appl. Phys. Lett.*, **86**, 211903-211905 (2005)
- [109] B. Audoin : Traitement du signal, *Cours de Master, Université Bordeaux I*, (2009)
- [110] B. Audoin : Evaluation ultrasonore de l'endommagement anisotrope d'un composite à matrice fragile, *Thèse de doctorant, Université de Bordeaux I*, N° d'ordre: **620**, (1991)
- [111] A. Devos, C. Lerouge : Evidence of laser-wavelength effect in picosecond ultrasonics: possible connection with interband transitions, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 2669-2672 (2001)
- [112] V. A. Del Grosso, C.W. Mader : Speed of sound in pure water, *J. Acoust. Soc. Am.*, **52**, 1442-1446 (1972)
- [113] J. Rouch, C.C. Lai, S. H. Chen : Brillouin scattering studies of normal and supercooled water, *J. Chem. Phys.*, **65**, 4016-4021 (1976)
- [114] A. Ng, M. Parker, A. Parr, P. Saunders, A. Smith, K. Waldron : Physicochemical characteristics of onion (*Allium Cepa* L.) tissues, *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 5612-5617 (2000)
- [115] G. Forget : Conception et synthèse de surface nanostructurées et/ou fonctionnalisées par des nanoparticules comme système de ciblage cellulaire, *Université de Bordeaux I*, N° d'ordre **3768**, (2009)
- [116] C. Rossignol, N. Chigarev, M. Ducouso, B. Audoin, G. Forget, F. Guillemot, M.-C. Durrieu : In vitro picosecond ultrasonics in a single cell, *Appl. Phys. Lett.*, **93**, 123901-3 (2008)
- [117] H. Meri : Rayonnement d'ultrasons générés par laser dans les matériaux anisotropes, *Université de Bordeaux I*, N° d'ordre **2842**, (2004)
- [118] A. Mandelis : Diffusion waves and their uses, *Phys. Today*, **53**, 29-34 (2000)
- [119] P. L. Kapitza : Heat transfer and superfluidity of helium II, *Phys. Rev.*, **60**, 354-355 (1941)
- [120] G. Zhenbin, D. Cahill, P. Braun : Thermal conductance of hydrophilic and hydrophobic interfaces, *Phys. Rev. Lett.*, **96**, 186101-4 (2006)
- [121] B. Audoin, C. Rossignol, N. Chigarev, M. Ducouso, G. Forget, F. Guillemot, M.-C. Durrieu : Picosecond acoustics in vegetal cells: Non-invasive in vitro measurements at a sub-cell scale, *Ultrasonics*, **50**, 202-207 (2010)
- [122] B. Perrin : Investigation of short-time heat transfer effects by an optical pump-probe method, *Microscale and nanoscale heat transfert*, **ISSN: 1437-0859**, (2007)
- [123] D. G. Cahill : Analysis of heat flow in layered structures for time-domain thermoreflectance, *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, 5119-5122 (2004)
- [124] A. Pelling, M. Horton : An historical perspective on cell mechanics, *European Journal of Physiology*, **456**, 3-12 (2007)
- [125] B. A. Auld : Acoustic fields and waves in solids, vol 1, *R.E. Krieger Publishing Compagny, Malabar, Florida*, (1990)
- [126] B. Daly, K. Kang, Y. Wang, D. Cahill : Picosecond ultrasonic measurements of attenuation of longitudinal acoustic phonons in silicon, *Phys. Rev. B*, **80**, 174112-4 (2009)
- [127] Z. Bozoki, A. Miklos, A. Lorincz : Theory of picosecond transient reflectance measurement of thermal and elastic properties of thin metal films, *Mater. Sci. Eng., B*, **5**, 147-150 (1990)
- [128] M. Born, E. Wolf : Principles of optics, *Cambridge university Press, Cambridge*, 7ème édition, (1999)

- [129] A. Jeffrey, H.-H. Dai : Handbook of mathematical formulas and integrals, *Academic Press*, (2008)
- [130] M. Ducouso, T. Dehoux, B. Audoin, O.F. Zouani, C. Chollet, M.-C. Durrieu : Picosecond acoustic detection in single cells: Interface step motion for thin animal cells and Brillouin scattering for thick vegetal cells, *J. Phys. Conf. Ser.*, (**accepté**) (2010)
- [131] A. Polian : Brillouin scattering at high pressure: an overview, *J. Raman Spectrosc.*, **34**, 633-637 (2003)
- [132] H.-N. Lin, R. J. Stoner, H. J. Maris, J. Tauc : Phonon attenuation and velocity measurements in transparent materials by picosecond acoustic interferometry, *J. Appl. Phys.*, **69**, 3816-3822 (1990)
- [133] C. Saubade : Lois de réfringence et propriétés de l'eau à différentes températures: II. Approche macroscopique, *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **17**, 3507-3517 (1984)
- [134] J. Mukerjee : Remote sensing of ocean water with Raman and Brillouin scattering, *Defense science and technology organisation*, Commonwealth of Australia, (2001)
- [135] P. D. T. Huibers : Models for the wavelength dependence of the index of refraction of water, *Applied Optics*, **36**, 3785-3787 (1997)
- [136] X. Quan, E. Fry : Empirical equation for the index of refraction of seawater, *Applied Optics*, **34**, 3477-3480 (1995)
- [137] H. Masuhara, S. Kawata, F. Tokunaga : Nano Biophotonics, 3 Science and Technology, Elsevier, Amsterdam (Netherlands), **ISBN: 1574-0641** (2007)
- [138] K. Köning : Multiphoton microscopy in life sciences, *Journal of Microscopy*, **200**, 83-104 (2000)
- [139] H. Liang, K. Trong Vu, P. Krishnan, T. C. Trang, D. Shin, S. Kimel, M. W. Berns : Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping, *Biophys. J.*, **70**, 1529-1533 (1996)
- [140] American National Standard for Safe Use of Lasers, *Laser Institute of America*, ANSI Z136.1, (2007)
- [141] K. Köning, P. T. C. So, W. W. Mantulin, E. Gratton : Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes, *Opt. Lett.*, **22**, 135-136 (1997)
- [142] I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, B.-L. Lin : Wavelength dependent damage in biological multi-photon confocal microscopy: A micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti:sapphire and Cr:forsterite laser sources, *Opt. Quantum Electron.*, **34**, 1251-1266 (2002)
- [143] M. Ducouso, C. Rossignol, B. Audoin, F. Guillemot, M.-C. Durrieu : Picosecond ultrasonics signal in biological materials: comparison between predictions and experiments, *Acoustics 08 Paris*, 4829-4833 (2008)
- [144] C. Dong, P. So, T. French, E. Gratton : Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy, *Biophys. J.*, **69**, 2234-2242 (1995)
- [145] H.-J. Van Manen, P. Verkuijlen, P. Wittendorp, V. K. Subramamiam, T. van den Berg, D. Ross, C. Otto : Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biophys. J.*, **94**, 67-69 (2008)
- [146] O. B. Wright, T. Hyoguchi : Ultrafast vibration and laser acoustics in thin transparent films, *Opt. Lett.*, **16**, 1529-1531 (1991)
- [147] O. Wright : Thickness and sound velocity measurement in thin transparent films with laser picosecond acoustics, *J. Appl. Phys.*, **71**, 1617-1629 (1992)

- [148] O. Matsuda, O.B. Wright : Reflection and transmission of light in multilayers perturbed by picosecond strain pulse propagation, *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.*, **19**, 3028-3041 (2002)
- [149] A. Devos, J.-F. Robillard, R. Côte, P. Emery : High -laser-wavelength sensitivity of the picosecond ultrasonic response in transparent thin films, *Phys. Rev. B*, **74**, 064114-7 (2006)
- [150] B. Bonello, F. Armand, J.-P. Pradeau, H. Perez, B. Perrin, G. Louis : Evidence for the alteration of an organic/metal interface resulting from the formation of a broad interfacial layer, *J. Appl. Phys.*, **86**, 4959-4963 (1999)
- [151] C. Mechri, P. Ruello, J.M. Breteau, M.R. Baklanov, P. Verdonck, V. Gusev : Depth-profiling of elastic inhomogeneities in transparent nanoporous low-k materials by picosecond ultrasonic interferometry, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 091907-091909 (2009)
- [152] K. P. Kundu, I. M. Cohen : Fluid mechanics, second edition, *Academic Press*, **ISBN: 0-12-178251-4**, (2002)
- [153] R. Côte : Oscillations Brillouin en acoustique picoseconde colorée, *Université des sciences et technologies de Lille*, **N° d'ordre: 3736**, (2005)
- [154] T. Dehoux : Génération et détection par couplage élasto-optique tridimensionnel de champs acoustiques picosecondes diffractés, *Thèse de doctorant, Université de Bordeaux I*, **N° d'ordre: 3431**, (2007)
- [155] J. Beuthan, O. Minet, J. Helfmann, M. Herring, G. Müller : The spatial variation of the refractive index in biological cells, *Phys. Med. Biol.*, **41**, 369-382 (1996)
- [156] C. Chollet, S. Lazare, F. Guillemot, M. C. Durrieu : Impact of RGD micro-patterns on cell adhesion, *Colloids Surf., B*, **75**, 107-114 (2010)
- [157] M. Ducouso, T. Dehoux, C. Rossignol, B. Audoin, O.F. Zouani, C. Chollet, M.-C. Durrieu : Two color probing of the ultrafast photo-acoustic response in a single biological cell, *J. Phys. Conf. Ser.*, (**accepté**), (2010)
- [158] N. Caille, O. Thoumine, Y. Tardy, J.J. Meister : Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells, *J. Biomech.*, **35**, 177-187 (2002)
- [159] M. Lahmani, C. Bréchnignac, P. Houdy : Les nanosciences: 2 Nanomatériaux et nanochimie, *Belin*, **ISBN: 2-7011-3831-0**, (2006)
- [160] C. E. Hoffler, K. E. Moore, K. Kozloff, P. K. Zysset, M. B. Brown, S. A. Goldstein : Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli, *Bone*, **26**, 603-609 (2000)
- [161] L. Saruwatari, H. Aita, F. Butz, H.K. Nakamura, J. Ouyangt, Y. Yang, W.A. Chiou, T. Ogawa : Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure, *J. Bone Miner. Res.*, **20**, 2002-2016 (2005)
- [162] C.-K. Min, D. G. Cahill, S. Granick : Time-resolved ellipsometry for heat transfer studies at liquid/solid and gas/solid interfaces, *Soumis*, (2010)
- [163] J. W. Borst, M.A. Hink, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser : Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins, *Journal of Fluorescence*, **15**, 153-160 (2005)
- [164] A. M. Linderberg, I. Kang, S.L. Johnson, T. Missala, P.A. Heimann, Z. Chang, J. Larsson, P.H. Bucksbaum, H.C. Kapteyn, H.A. Padmore, R.W. Lee, J.S. Wark, R.W. Falcone : Time-resolved X-ray diffraction from coherent phonons during a laser-induced phase transition, *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 111-114 (2000)
- [165] D. Koncan, J. Rifel, G. Drevensek, S. Kocijancic, S. Ogorelec, M. Budihna : Thermal conductivity of the porcine heart tissue, *European journal of Physiology*, **440**, R143-R144 (2000)

- [166] M. Godin, A.K. Bryan, T.P. Burg, K. Babcock, S.R. Manalis : Measuring the mass, density, and size of particules and cells using a suspended microchannel resonator, *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 123121-3 (2007)
- [167] H. F. Bowman, T.A. Balasubramian : A new technique utilizing thermistor probes for the measurement of thermal properties of biomaterials, *Cryobiology*, **13**, 572-580 (1976)
- [168] J. Bereither-Hahn, C. Blase : Ultrasonic characterization of biological cells, *Ultrasonic nondestructive evaluation engineering and biological materials characterization*, **ISBN: 0-8493-1462-3**, 725-759 (2004)
- [169] T. Kundu, J.P. Lee, C. Blase, J. Bereither-Hahn : Acoustic microscope lens modeling and its application in determining biological cell properties from single- and multi-layered cell models, *J. Acoust. Soc. Am.*, **120**, 1646-1654 (2006)