



Microscope opto-acoustique utilisant la technique d'acoustique picoseconde pour l'échographie cellulaire

Maroun Abi Ghanem

► To cite this version:

Maroun Abi Ghanem. Microscope opto-acoustique utilisant la technique d'acoustique picoseconde pour l'échographie cellulaire. Mécanique [physics]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0167 . tel-01131810

HAL Id: tel-01131810

<https://theses.hal.science/tel-01131810>

Submitted on 16 Mar 2015

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

SPÉCIALITÉ : Mécanique

Par **Maroun ABI GHANEM**

**Microscope opto-acoustique utilisant la technique d'acoustique
picoseconde pour l'échographie cellulaire**

Sous la direction de : **M. Bertrand AUDOIN**
(co-directeur : **M. Thomas DEHOUX**)

Soutenue le 6 octobre 2014

Membres du jury :

Mme. D. FOURNIER, Professeur émérite, UPMC
M. E. BOSSY, Maître de conférences HDR, ESPCI
M. C. GLORIEUX, Professeur, Katholieke Universiteit Leuven
M. B. AUDOIN, Professeur, Université de Bordeaux
M. T. DEHOUX, Chargé de recherche, CNRS
M. P. LAUGIER, Directeur de recherche, CNRS
M. P. NASSOY, Directeur de recherche, CNRS
Mme. M.-C. DURRIEU, Directrice de recherche, INSERM

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Invité

Microscope opto-acoustique utilisant la technique d'acoustique picoseconde pour l'échographie cellulaire

L'adhésion et les propriétés mécaniques des cellules jouent un rôle crucial dans le fonctionnement cellulaire ainsi que dans l'apparition de maladies dégénératives. Pour mesurer ces quantités, nous avons développé dans ce travail un microscope opto-acoustique pour l'imagerie non-invasive de la mécanique de cellules individuelles avec une résolution sub-cellulaire. Ce microscope utilise la technique d'acoustique picoseconde qui permet de générer et détecter optiquement des ondes acoustiques avec une large bande s'étendant jusqu'à 1 THz. Dans le but de reproduire le comportement mécanique des cellules à des fréquences acoustiques supérieures à 10 GHz, une étude sur des objets mous biomimétiques est menée dans une première partie. Les rigidité, viscosité et épaisseur de ces systèmes multicouches micrométriques sont caractérisées. Dans la deuxième partie de ce manuscrit, la technique d'acoustique picoseconde est employée pour imager le contact entre une cellule animale modèle et un biomatériau, ainsi que l'impédance acoustique de cette cellule. Un outil d'analyse nécessaire pour le traitement du signal acoustique est mis en place. Enfin, un microscope opto-acoustique opérationnel entre 10 et 100 GHz est présenté dans la dernière partie. Il est basé sur un dispositif pompe-sonde asynchrone qui permet de produire des images acoustiques en un temps court (4 pixels/min) avec une résolution axiale de l'ordre d'une dizaine de nm. Cette approche est comparable à une échographie mais à l'échelle cellulaire. L'étude de l'adhésion et des propriétés mécaniques de plusieurs types de cellules à différents stades de maturation est abordée. Des images topographiques des zones fines (< 50 nm) d'une cellule sont également analysées. Le microscope développé durant cette thèse offrira la possibilité d'explorer de nouvelles pistes de recherche dans les domaines de la biologie cellulaire et des biotechnologies.

Mots clés : Acoustique picoseconde, imagerie, adhésion cellulaire, mécanique cellulaire, objets mous biomimétiques.

An opto-acoustic microscope based on picosecond ultrasonics for single cell ultrasonography

Adhesion and mechanical properties of cells are key players in several cellular functions and are involved in the development of degenerative diseases. To characterize these quantities, we developed in this work an opto-acoustic microscope for the non-invasive imaging of the mechanics of individual cells with a sub-cell resolution. This microscope uses the Picosecond Ultrasonics (PU) technique that allows optical generation and detection of acoustic waves with a large bandwidth up to 1 THz. In order to reproduce the mechanical behaviour of cells at acoustic frequencies greater than 10 GHz, a study of cell-mimicking micro-objects is first considered. The rigidity, viscosity and thickness of these micro-layered structures are characterized. In the second part of this manuscript, the PU technique is applied for imaging the contact between a simple animal cell and a biomaterial, as well as the acoustic impedance of this cell. An essential tool for analysing the acoustic signal is developed. In the third part, the opto-acoustic microscope operating between 10 and 100 GHz is finally presented. It is based on an asynchronous pump-probe setup that allows producing acoustic images within a short time (4 pixels/min) and offering an axial resolution of about 10 nm. This is similar to cell ultrasonography. The study of the adhesion and of the mechanical properties of different cell types at different stages of cell maturation is then tackled. The topographic images of thin cell regions (< 50 nm) are also analysed. The microscope implemented during this thesis should offer the possibility of exploring new avenues in the field of cellular biology.

Keywords : Picosecond ultrasonics, imaging, cellular adhesion, cell mechanics, cell-mimicking objects.

**Université de Bordeaux
CNRS UMR 5295
I2M, dept. APY – BAT. A4
351 cours de la Libération
F-33405, Talence, France**

Je remercie Marc Deschamps, directeur de recherche au CNRS, Olivier Poncelet, chargé de recherche au CNRS, ainsi qu'Eric Arquis, professeur des universités à l'Institut Polytechnique de Bordeaux, pour m'avoir accueilli au sein du département d'acoustique physique (APY) de l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie de Bordeaux (I₂M) au cours de ma thèse.

Ce mémoire est le résultat d'un travail effectué au sein de l'équipe Ultrasons Laser, coordonnée par Bertrand Audoin, professeur des universités à l'université de Bordeaux.

Je tiens à remercier Christ Glorieux, professeur des universités à la KU Leuven, et Emmanuel Bossy, maître de conférences HDR à l'ESPCI ParisTech, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à Danièle Fournier, professeur émérite à l'UPMC, pour avoir présidé le jury de thèse.

Je remercie également Pascal Laugier, directeur de recherche au CNRS et directeur du Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB), Pierre Nassoy, directeur de recherche au CNRS, et Marie-Christine Durrieu, directrice de recherche à l'INSERM, pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

J'adresse particulièrement toute ma gratitude à Bertrand Audoin et à Thomas Dehoux, chargé de recherche au CNRS, pour m'avoir encadré durant ces trois années. Leurs connaissances, leur passion pour le domaine et leurs conseils ont rendu possible l'aboutissement de ce travail de thèse. Je ne pourrai jamais les remercier assez pour tout ce qu'ils m'ont apporté depuis mon arrivée à Bordeaux, tant sur le plan académique que personnel. Les mousses au « Rose » et les barbecues sur la plage sont inoubliables. Thomas, je me souviendrai toujours du voyage à Singapour là où il faut pas commander de poulet !

Je remercie vivement Yannick Guillet, maître de conférences à l'université de Bordeaux, pour son aide précieuse, ses conseils et son soutien durant les expériences en ultrasons laser ainsi que durant mes premiers pas dans l'enseignement et le monde académique. Désolé pour ce qui s'est passé à Carcans !

Je remercie sincèrement Clément Rossignol, chargé de recherche au CNRS, pour nos multiples discussions ainsi que son encouragement.

J'adresse mes remerciements à Michel Castaings, professeur des universités à l'université de Bordeaux, pour son soutien et pour nos multiples discussions tant sur l'après-thèse que sur les meilleures méthodes pour arrêter de fumer.

Je remercie également Christophe Aristégui, professeur des universités à l'université de Bordeaux, et Olivier Poncelet pour leur accueil et leurs nombreux conseils. Grâce à leurs conseils, j'ai pu avoir une idée plus claire sur le monde académique dans lequel je vais évoluer.

Mes remerciements vont à Thomas Brunet, maître de conférences à l'université de Bordeaux, pour son soutien et son aide durant ma mission d'enseignement. Merci pour nos fréquents échanges qui m'ont beaucoup apporté et pour les moments passés à Singapour, à Poitiers et à Bordeaux !

Je remercie profondément Béatrice Desoudin et Sandrine Guit sans qui le laboratoire ne tournerait pas ! Dès qu'un besoin est formulé, elles répondaient toujours présentes ! Merci beaucoup ! Un grand merci également à Cathy Blanchard qui œuvre jour après jour pour le bien être du laboratoire.

Je remercie Samuel Raetz pour son accueil lors de ma première année de thèse, pour les cours de programmation et d'acoustique ainsi que pour les moments inoubliables que nous avons eus à Fréjus, à Poitiers et à Singapour. Un merci particulier à Alexis Viel, « le chaud », pour cette troisième année très spéciale, pour tous les moments passés au bureau, pour les wraps batata partagés les midis et pour les réflexions conceptuelles qu'on se faisait ! Il savait en toutes circonstances être un excellent ami. Je remercie également Benoît Mascaro, avec qui je partageais le même bureau pendant ces trois ans, pour toutes les discussions sur la phase, pour les soirées bordelaises et pour les balades sur les plages du bassin ! Je tiens à remercier Julien Chandezon pour tous les échanges que nous avons eus sur la manip hétérodyne mais surtout pour son poulet rôti chaque mercredi !

Je remercie sincèrement, et plus largement, toutes les personnes du département d'Acoustique Physique de l'I2M pour leur accueil, leur aide et leur soutien au cours de ces trois années. Un merci particulier à Allaoua, Atef, Salvo, Feng, Romain et Tony. C'était un grand plaisir de travailler avec vous ! Egalement, merci à l'équipe des biologistes dirigée par Marie-Christine Durrieu : Guillaume, Laurent et Omar. Un grand merci à l'équipe de thésards et de post-docs : Jérôme, Philippe, Alban, Pierric, Samuel, Mohammed, Dima, Lazhar, Karim, Abdoulaye, Emmanuel et Edith.

Pour tous ceux avec qui j'ai partagé des souvenirs impérissables durant mon séjour en France : Pierre, Talia, Georges, Tony, Sami, Jad, Sinisa, Jenny, Josette et tous les autres. Pour leur support, leur amitié et leur générosité : merci !

A ma sœur, Mirella.

A mes parents, Najat et Nazir.

A Lili, pour tout le reste.

*If you want to find the secrets of the universe,
think in terms of energy, frequency and vibration.*

Nikola Tesla.

Table des matières

Table des matières	i
Table des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Introduction générale	1
 PARTIE I	
ETUDE D’OBJETS BIOMIMÉTIQUES PAR ACOUSTIQUE PICOSECONDE	7
Introduction de la première partie	9
 Chapitre 1 Acoustique picoseconde : principes physiques et applications aux sciences du vivant	11
1.1 Principe et dispositif expérimental	12
1.2 Génération photoélastique	12
1.3 Détection élasto-optique	15
1.3.1 Milieu opaque	19
1.3.2 Milieu transparent	20
1.4 Application de l’acoustique picoseconde à l’étude de cellules biologiques : débuts et potentialités	22
1.5 Conclusion	23
 Chapitre 2 Des microcapsules sphériques : un modèle simple de cellules biologiques	25
2.1 Montage expérimental	26
2.1.1 Préparation de l’échantillon	26
2.1.2 Oscillations Brillouin pour une capsule	27

2.2	Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans une capsule	29
2.2.1	Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans le PLGA	30
2.2.2	Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans le PFOB	31
2.3	Détermination du rapport h/R	32
2.4	Rhéologie de la coquille	32
2.5	Adhésion et rayon de contact R_c d'une capsule	35
2.6	Conclusion	37
Conclusion de la première partie		39
PARTIE II		
ADHÉSION DE CELLULES ANIMALES MODÈLES		41
Introduction de la deuxième partie		43
Chapitre 3 Adhésion cellulaire : réponse de la cellule à son environnement		47
3.1	L'adhésion cellulaire et son rôle dans le fonctionnement de la cellule	48
3.1.1	Le cytosquelette et l'adhésion cellulaire	48
3.1.2	Interactions cellule-substrat et mécanotransduction	50
3.1.3	Cellule en migration et dynamique de l'adhésion cellulaire	51
3.2	Techniques de mesure d'adhésion : principes et limitations	53
3.2.1	Mesure de l'adhésion d'un ensemble de cellules	53
3.2.2	Mesure de l'adhésion d'une cellule individuelle par microscopie à fluorescence	54
3.2.3	Mesure de l'adhésion d'une cellule unique par contact	55
3.2.4	Mesure de l'adhésion d'une cellule sur substrat microstructuré	56
3.2.5	Mesure de l'adhésion d'une cellule unique par techniques de piégeage . . .	57
3.3	Une technique alternative : l'acoustique picoseconde	58
3.4	Conclusion	60
Chapitre 4 Impédance acoustique d'une cellule animale modèle et contact non spécifique avec un substrat métallique		63
4.1	Echantillon et oscillations Brillouin dans les monocytes	64
4.1.1	Les monocytes : définition, choix et préparation	64
4.1.2	Célérité du son dans la cellule	67
4.2	Coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule	68
4.3	Mesure de l'impédance acoustique et de la raideur d'interface	75

4.3.1	Interface imparfaite : modèle de type ressort	75
4.3.2	Processus numérique pour l'extraction de l'impédance acoustique et de la raideur d'interface	77
4.3.3	Impédance acoustique Z_c des monocytes et raideur d'interface titane-monocytes K	79
4.3.4	Analyse thermique	80
4.4	Conclusion	81
Conclusion de la deuxième partie		83
 PARTIE III		
ECHOGRAPHIE CELLULAIRE À L'AIDE D'UN MICROSCOPE OPTO-ACOUSTIQUE IN-VERSÉ		85
Introduction de la troisième partie		87
 Chapitre 5 Montage asynchrone d'acoustique picoseconde pour un microscope opto-acoustique inversé		
		91
5.1	Microscopie acoustique	92
5.1.1	Historique	92
5.1.2	Principes de la microscopie acoustique	94
5.1.3	Exemples d'applications	96
5.2	Caractéristiques du montage pompe-sonde asynchrone	97
5.3	Conclusion	100
 Chapitre 6 Imagerie acoustique de cellules individuelles		101
6.1	Obtention de l'image acoustique	101
6.2	Variations d'impédance et d'adhésion pendant le temps de culture cellulaire . .	107
6.2.1	Evolution de l'impédance des hMEC	107
6.2.2	Evolution de l'adhésion des hMEC en fonction du temps	110
6.3	Impédance acoustique et adhésion de différents types cellulaires	115
6.3.1	Impédance acoustique et type cellulaire	116
6.3.2	Adhésion de différents types cellulaires	117
6.4	Perpectives : Effet de l'interaction cellule-cellule sur l'adhésion cellule-substrat .	118
6.5	Conclusion	120

Chapitre 7 Topographie et viscosité des zones fines d’une cellule	123
7.1 Énergie acoustique réfléchie	123
7.1.1 Modélisation des résonances mécaniques de la cellule	124
7.1.2 Attribution d’une loi simple de comportement	126
7.2 Topographie de la lamelle d’une cellule en migration	129
7.3 Rhéologie de la cellule : limitation du modèle de Kelvin-Voigt	132
7.4 Perspectives : propriétés mécaniques et adhésion des zones très fines	134
Conclusion de la troisième partie	137
Conclusion générale	141
Bibliographie	145

Table des figures

1	Schéma d'une cellule montrant ses différents composants. Adapté d'après O'Connor <i>et al.</i> ⁶	3
2	Échelle spatiale relative aux différentes structures biologiques. Adapté d'après O'Connor <i>et al.</i> ⁶ (* La valeur indiquée sur la figure correspond à la dimension de l'espace interne de l'artériole.)	4
1.1	Montage typique d'acoustique picoseconde.	13
1.2	(a) Géométrie de l'échantillon de tungstène opaque déposé sur un substrat semi-infini de silicium. (b) Changement de réflectivité en fonction du temps. L'encart montre un zoom sur les échos acoustiques.	20
1.3	(a) Détection élasto-optique dans un échantillon de PLGA transparent déposé sur un substrat de titane. (b) Changement de réflectivité en fonction du temps. L'encart montre la transformée de Fourier du signal temporel.	21
2.1	(a) Photographie de capsules obtenue par microscopie confocale et (b) en lumière blanche.	27
2.2	(a) Configuration expérimentale utilisée pour étudier les propriétés mécaniques des capsules. (b) Types de capsules étudiés.	28
2.3	(a) Variation de la réflectivité en fonction du temps dans les différents types de capsules. (b) Spectre de Fourier du signal temporel obtenu dans une capsule 0.35-Cap. (c) Géométrie de l'échantillon étudié.	29
2.4	(a) Variation de la vitesse des ondes acoustiques v_{cq} dans la coquille des 0.25-Cap (points rouges), 0.35-Cap (points noirs) et 0.55-Cap (étoiles bleues) ainsi que dans les 1.00-Cap (triangles verts) en fonction du rayon R . La barre d'erreur à droite indique la précision sur la mesure de v_{cq} . (b) Valeur moyenne de la vitesse des ondes acoustiques v_{cq} en fonction du type des capsules.	30

2.5	(a) Variation de la vitesse des ondes acoustiques v_{cr} dans le cœur des 0.25-Cap (points rouges) et 0.35-Cap (points noirs) en fonction du rayon R . (b) Valeur moyenne de la vitesse des ondes acoustiques v_{cr} en fonction du type des capsules.	31
2.6	(a) Variation de l'épaisseur h en fonction du rayon R de la capsule dans les 0.25-Cap, mesurée expérimentalement (points rouges) et prédite par la calibration chimique (aire grisée). (b) Variation de l'épaisseur h en fonction du rayon R de la capsule dans les 0.35-Cap, mesurée expérimentalement (points noirs) et prédite par la calibration chimique (aire grisée).	33
2.7	(a) Oscillations Brillouin à 9 GHz observées dans le PLGA massif et à 18 GHz détectées dans une 1.00-Cap. (b) Variation de l'atténuation α_{cq} dans le PLGA en fonction de la fréquence acoustique f .	34
2.8	(a) Variation de l'atténuation α_{cq} dans les coquilles de PLGA en fonction du rayon de la capsule R . (b) Variation de l'atténuation α_{cq} dans les coquilles de PLGA en fonction du rapport h/R .	35
2.9	(a) Oscillations Brillouin dans le cœur d'une 0.25-Cap et d'une 0.35-Cap. (b) Variation de l'atténuation dans le cœur α_{cr} en fonction de R/h . (c) Variation du rayon de contact R_c en fonction de $\sqrt{R}(R/h)$. L'encart représente le contact d'une sphère avec un substrat rigide d'après Elsner <i>et al.</i> ⁵⁹	36
3.1	Schéma illustrant les adhésions cellule-cellule et l'adhésion cellule-substrat, adapté d'après Schoen <i>et al.</i> ⁸¹ (a) Architecture de la couche d'adhésion cellule-cellule d'après Hen <i>et al.</i> ⁸² et (b) de la couche d'adhésion cellule-substrat d'après Kanchanawong <i>et al.</i> ⁸³	49
3.2	Modèle de la migration cellulaire, adapté d'après Mattila <i>et al.</i> ⁹³ (1) extension de la membrane cellulaire à l'avant, (2) fixation au substrat, (3) déplacement en avant du corps cellulaire et (4) détachement et rétraction de l'arrière.	51
3.3	Eléments de structures d'une cellule en migration (a) vue de côté et (b) vue de dessus, adapté d'après Schwarz <i>et al.</i> ⁷⁶ Les adhésions naissantes se trouvent dans le lamellipode. Elles se transforment en points focaux d'adhésions et se lient aux fibres d'actine dans la lamelle.	52
3.4	Techniques classiques de mesure d'adhésion cellulaire. (a) Chambre à flux / Contraintes induites par laser. (b) Microscopie à force atomique (AFM). (c) Micropipette à aspiration. (d) Microplaques. (e) Pince optique. (f) Pince magnétique.	54
3.5	Technique récente de mesure d'adhésion. Image des trajectoires des intégrines mesurées par microscopie à super-résolution. Image d'après Rossier <i>et al.</i> ⁹⁹	55

3.6	Microscopie à force de traction. (a) Schéma modélisant le substrat de la cellule, adapté d'après Watt <i>et al.</i> ⁸⁸ (b) Cartographie des contraintes exercées par la cellule, d'après Schwarz <i>et al.</i> ⁷⁶	56
3.7	Technique de micropilliers. (a) Schéma modélisant le substrat de la cellule, adapté d'après Watt <i>et al.</i> ⁸⁸ (b) Photographie obtenue par microscopie électronique à balayage d'une cellule adhérente sur un substrat de micro-pilliers, d'après Trichet <i>et al.</i> ¹⁰³	57
3.8	La technique de « pincement acoustique » sonde la mécanique du cytosquelette <i>in vivo</i> . Illustration d'après Fan <i>et al.</i> ¹⁰⁷	58
4.1	(a) Photographie de monocytes cultivés sur du SiO ₂ obtenue par microscopie électronique à balayage. (b) Géométrie de l'échantillon utilisé.	65
4.2	(a) Configuration bi-latérale pour la mesure de la célérité acoustique : la pompe est focalisée par le dessous à l'interface saphir-titane et la sonde par le dessus à l'interface cellule-titane. (b) Variation de la réflectivité en fonction du temps dans le cas de la configuration bi-latérale et spectre de Fourier associé (encart).	67
4.3	(a) Configuration uni-latérale inférieure pour la mesure du coefficient de réflexion : la pompe et la sonde sont focalisées à l'interface saphir-titane avec un objectif 60x. (b) La lumière blanche est focalisée avec un objectif 50x et l'image des cellules est obtenue à travers une caméra CCD. Les pointillés rouges sur l'image indiquent la ligne du balayage 1D.	69
4.4	(a) Variation relative de la réflectivité en fonction du temps issue d'un point à l'interface titane-air (courbe noire) et d'un point à l'interface titane-cellule (pointillés rouges). Les échos dus aux allers retours dans le film de titane sont indiqués par des flèches à 85 ps et 170 ps. Un zoom sur le premier écho est illustré dans l'encart. (b) Module de la transformée de Fourier du premier écho. L'encart montre le spectre normalisé de l'écho en dB. (c) Signal acoustique obtenu après soustraction du fond thermique (noir) et signal acoustique calculé à partir des propriétés mécaniques du titane et du saphir. La durée Δt correspond au temps séparant les deux échos.	70
4.5	(a) Scalogramme de la variation de la réflectivité à l'interface titane-air (b) Scalogramme de la variation de la réflectivité à l'interface titane-cellule.	73

4.6	(a) Cartographie position-fréquence de l'amplitude du coefficient de réflexion acoustique (b) Variation du coefficient de réflexion r_{ac} pour les fréquences 30 GHz (courbe noire) et 60 GHz (courbe grise) en fonction de la position sur la ligne de balayage.	74
4.7	(a) Interface imparfaite titane-cellule de type ressort (b) Variation de $ r_{\sigma}^{th} $ en fonction de la raideur K du ressort pour une impédance $Z_t = 32$ MPa.s/m, une impédance $Z_c = 5$ MPa.s/m et trois fréquences acoustiques 10 GHz (rouge avec des ronds pleins), 45 GHz (noir) et 85 GHz (bleu avec des ronds creux).	75
4.8	(a) Variation expérimentale de r_{ac} en fonction de la fréquence (points noirs) et théorique (ligne rouge) pour 3 points dans la cellule (b) sse en fonction de Z_c et K pour un point dans la cellule.	77
4.9	(a) Impédance acoustique Z_c suivant la position (b) Raideur d'interface K suivant la position. (c) Image fluorescente d'un monocyte montrant une adhésion homogène sur tout la zone cellulaire, adapté d'après Rullo <i>et al.</i> ¹²²	79
4.10	(a) Balayage 1D d'un monocyte. (b) Impédance acoustique et (c) Raideur d'interface en fonction de la position.	80
4.11	Variation de la température en fonction de la position	81
5.1	(a) Microscope acoustique opérationnel en mode de transmission d'après Lemons <i>et al.</i> ¹⁴⁹ (b) Microscope acoustique opérationnel en mode de réflexion d'après Johnston <i>et al.</i> ¹⁵⁶ (c) Image obtenue par microscope acoustique à 160 MHz et (d) par microscope optique de cellules d'oignon d'après Lemons <i>et al.</i> ¹¹ (e) Image obtenue par microscope acoustique à 2600 MHz et (f) par microscope électronique à balayage d'une cellule fibroblaste d'après Johnston <i>et al.</i> ¹⁵⁶	93

5.2	(a) Image acoustique obtenue par la méthode d'interférences et (b) image obtenue par immunofluorescence d'une cellule endothéliale. Les interférences issues d'une ligne de balayage (ligne droite en blanc sur la figure 5.2(a)) sont tracées sur l'image acoustique pour illustration. Figures adaptés d'après Luers <i>et al.</i> ¹⁷⁰ (c) Image acoustique obtenue à travers la variation de l'amplitude du signal en fonction de la position axiale. La variation en blanc correspond au balayage effectué suivant la droite blanche. (d) Variation de l'amplitude du signal en fonction de la position latérale sur l'échantillon pour différentes positions axiales. (e) Variation de l'amplitude du signal en fonction de la position axiale pour différentes positions latérales sur l'échantillon. Figures adaptées d'après Kundu <i>et al.</i> ¹⁶⁸ (f) Principe de détection temporelle des échos réfléchis. (g) Signal temporel montrant deux échos réfléchis à l'interface cellule-liquide et à l'interface cellule-substrat. Figures adaptées d'après Weiss <i>et al.</i> ¹⁵⁵	95
5.3	Dispositif expérimental du montage pompe-sonde asynchrone utilisé pour l'application de l'acoustique picoseconde à l'imagerie cellulaire.	97
5.4	Principe de l'échantillonnage hétérodyne du montage asynchrone. Inspiré d'après les travaux de thèse d'A. Abbas. ¹⁵³	99
6.1	(a) Montage iPOM et procédure de balayage acoustique. (b) Variation de la réflectivité en fonction du temps et signal acoustique résultant après soustraction de la contribution thermique (encart). (c) Vue de dessus d'une cellule hMEC en lumière blanche.	102
6.2	Images extraites d'un film montrant l'évolution des signaux acoustiques enregistrés en fonction du temps.	103
6.3	Image en lumière blanche de la cellule (à gauche) et images acoustiques de la cellule obtenues à partir du coefficient de réflexion à 10, 25, 40, 55, 70 et 85 GHz (à droite).	105
6.4	(a) Image de l'impédance acoustique Z_c . (b) Image du contact cellule-titane à travers la raideur du ressort K . (c) Variations du coefficient de réflexion en fonction de la raideur K du ressort pour une fréquence acoustique de 85 GHz.	106

6.5	(a) Vue de dessus en lumière blanche et (b) image acoustique à 20 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 30 minutes sur un film de titane. (c) Vue de dessus en lumière blanche et (d) image acoustique à 20 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 12 heures sur un film de titane. Distributions des impédances acoustiques mesurées à l'intérieur de la cellule après un temps de culture de (e) 30 minutes et de (f) 12 heures. Les cadres blancs sur les images des cellules délimitent les zones sur lesquelles l'étude statistique d'impédance et de raideur a été faite.	108
6.6	(a) Impédance moyenne et (b) hétérogénéité du corps cellulaire des hMEC en fonction du temps de culture.	109
6.7	(a) Photo en lumière blanche et (b) image acoustique à 80 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 30 minutes. (c) Photo en lumière blanche et (d) image acoustique à 80 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 12 heures sur un film de titane. (e) Distributions des raideurs d'interface K mesurées à l'intérieur d'une cellule cultivée pendant 30 minutes. (f) Distributions des raideurs d'interface K mesurées à l'intérieur d'une cellule cultivée pendant 12 heures.	111
6.8	Variation de $ r_{\sigma}^{th} $ en fonction de la fréquence pour trois différentes valeurs de K . A une fréquence élevée fixée, plus la raideur K est faible, plus $ r_{\sigma}^{th} $ est grand. . .	112
6.9	(a) Distributions des raideurs d'interface K mesurées à l'intérieur d'une cellule cultivée pendant 30 minutes. (b) Procédure d'obtention du rapport de surface d'adhésion forte à partir de la distribution des raideurs K illustrée dans (a). (c) zoom sur la distribution des raideurs K entre 0 et 5 GPa/nm.	113
6.10	(a) Adhésion faible quantifiable et (b) rapport de surface d'adhésion forte du corps cellulaire des hMEC en fonction du temps de culture.	114
6.11	(a) Vue de face en lumière blanche d'une cellule hMSC cultivée pendant 24 heures, (d) d'une cellule sénescence cultivée pendant 8 heures, (g) d'un monocyte cultivé pendant 12 heures et (j) d'une hMEC cultivée pendant 12 heures sur le titane. (b) Distributions des impédances acoustiques dans les hMSC, (e) les cellules sénescences, (h) les monocytes et (k) les hMEC à 12 heures. (c) Distributions des raideurs dans les hMSC, (f) les cellules sénescences, (i) les monocytes et (l) les hMEC à 12 heures.	115
6.12	(a) Impédance moyenne et (b) hétérogénéité du corps cellulaire des différents types cellulaires étudiés.	117
6.13	(a) Adhésion faible quantifiable et (b) rapport de surface d'adhésion forte du corps cellulaire des différents types cellulaires étudiés.	118

6.14	(a) Vue de face en lumière blanche des cellules hMEC adhérentes entre elles. (b) Image acoustique à 10 GHz et (c) à 80 GHz de ces cellules. (d) Impédance moyenne et (b) hétérogénéité du corps cellulaire de hMEC individuelles et en interaction cultivées pendant 30 minutes.	119
6.15	(a) Adhésion moyenne imparfaite (b) rapport de surface d'adhésion parfaite du corps cellulaire de hMEC individuelles et en interaction cultivées pendant 30 minutes.	120
7.1	(a) Variation de l'amplitude du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence mesuré à différentes positions repérées par les lettres A à E. Les flèches indiquent les résonances acoustiques. (b) Image en lumière blanche de la région cellulaire d'une cellule hMSC imagée par iPAM. Les lettres A à E indiquent la position des mesures tracées sur la figure 7.1(a).	124
7.2	Géométrie du modèle proposé. Le substrat de titane est considéré comme milieu semi infini et la cellule comme un milieu fini d'épaisseur d . L'interface Σ entre les deux milieux est située en $z = 0$. L'onde acoustique est incidente en Σ du côté titane avec une amplitude I (flèche noire). L'onde réfléchie en Σ , possédant une amplitude R , est indiquée par une flèche rouge. Les ondes d'amplitudes A (flèche verte) et B (flèche bleue), correspondent aux ondes progressives et rétrogrades dans la cellule.	125
7.3	Variation de $ r_\sigma $ en fonction de la fréquence pour quatre valeurs de viscosité. . .	128
7.4	(a) Image en lumière blanche d'une cellule hMSC en migration. Les zones encadrées correspondent aux zones imagées par iPOM. (b)-(d) Images en épaisseur de la lamelle et du noyau de la cellule. (c)-(e) Images de microscopie à fluorescence de la lamelle et du noyau de la cellule. la protéine d'actine est marquée en vert et la vinculine en rouge.	131
7.5	Variation du coefficient de réflexion acoustique en fonction de la fréquence mesurée (traits discontinus bleus) et modélisée avec le modèle rhéologique de (a) Kelvin-Voigt (rouge) et (b) de Gilroy-Phillips (noir) pour deux positions. La zone barrée dans (a) correspond à l'intervalle de fréquence pour lequel le modèle de Kelvin-Voigt n'est plus adapté.	133
7.6	Variation du rapport M_I/M_R en fonction de la fréquence dans le cas du modèle rhéologique de Kelvin-Voigt (pointillés bleus) et de Gilroy-Phillips (trait plein rouge).	134
7.7	Images acoustiques d'une partie membranaire très fine d'une cellule hMSC. . . .	135

Liste des tableaux

3.1	Techniques de mesures d'adhésion cellulaire.	61
7.1	Données utilisées pour modéliser le coefficient de réflexion acoustique à l'interface entre une couche mince visqueuse et le titane.	128

Introduction générale

Les ultrasons sont des ondes acoustiques, donc mécaniques, de fréquence supérieure à 20 kHz. Ils sont donc inaudibles pour l'oreille humaine. On les utilise souvent pour caractériser les propriétés mécaniques d'un milieu et pour inspecter une structure. Puisqu'ils ne sont pas nocifs, les ultrasons sont très répandus dans le domaine biomédical. Outre leurs nombreuses applications thérapeutiques, ils sont un outil principal voire essentiel pour l'imagerie et l'aide au diagnostic.¹ Ces ondes non-invasives ont la capacité de pénétrer à l'intérieur du corps humain et permettent d'imager, à différentes échelles, la morphologie et la mécanique des structures internes d'un organisme vivant (organes, tissus, ...). La résolution de l'image est imposée par la fréquence des ultrasons utilisés. Plus la fréquence de ces ondes acoustiques est élevée, plus l'onde est sensible aux variations mécaniques à une petite échelle, et meilleure est la résolution.

A l'échelle sub-millimétrique, l'outil d'imagerie par ultrasons le plus répandu est aujourd'hui l'échographe. Cet instrument utilise des ultrasons de fréquences allant du MHz à une quinzaine de MHz générés par un transducteur piézoélectrique. Les ultrasons sont transmis dans le corps humain et se réfléchissent sur les structures ayant des propriétés mécaniques différentes. Ces ondes réfléchies transportent alors une information sur ces propriétés (densité, épaisseur, viscosité, ...) vers le détecteur. Grâce à cette information, des images dont le contraste est basé sur les propriétés mécaniques peuvent être produites, permettant de visualiser des organes de dimensions millimétriques à centimétriques. La facilité à produire des images quantitatives de structures et à observer des morphologies, en temps réel, de façon complètement non-invasive et très économique, a fait de l'échographie une technologie incontournable dans l'imagerie et l'aide au diagnostic. C'est pourquoi actuellement un échographe occupe une place de choix dans presque toutes les branches et les spécialités de la médecine. A titre d'exemple, on l'emploie en obstétrique pour suivre le développement fœtal, en cardiologie pour observer le fonctionnement du cœur, ainsi que dans d'autres nombreux domaines pour, par exemple, détecter des tumeurs apparaissant dans des organes comme la thyroïde ou la prostate, lors du développement d'un cancer.

Grâce à la profondeur sur laquelle ils peuvent pénétrer, les ultrasons trouvent leur intérêt aussi bien dans l'imagerie tissulaire que dans l'imagerie médicale à l'échelle d'un organe (de dimensions supérieures au millimètre). La nécessité d'étudier le fonctionnement des structures biologiques de dimensions inférieures au millimètre ainsi que le besoin de sonder les anomalies dans les tissus et les organes de tailles plus petites que celles visualisées par échographie, a exigé l'emploi de techniques alternatives. Afin d'observer des structures de dimensions supérieures à une dizaine de micromètres, on utilise une technique d'imagerie en voie de développement dite photoacoustique.² Pour cela, on se sert de la capacité des tissus à absorber la lumière pour générer des ultrasons. En effet, suite à l'absorption de la lumière par un tissu, ce dernier chauffe et se dilate, créant ainsi des ondes ultrasonores. Les pressions acoustiques générées par ces ondes dépendent de l'absorption optique du tissu. Elles sont détectées par un transducteur piézoélectrique. Le contraste de l'image ainsi formée est cette fois-ci basé sur l'absorption optique du tissu. La résolution de cette image est dictée par la durée des impulsions lumineuses utilisées ainsi que par les propriétés optiques du tissu illuminé. Des impulsions lumineuses d'une nanoseconde (10^{-9} s) sont couramment employées. Elles permettent de générer des ultrasons de fréquences allant jusqu'à 100 MHz, offrant une résolution comprise entre environ $10\text{ }\mu\text{m}$ et $650\text{ }\mu\text{m}$.³ L'imagerie photoacoustique est une technologie en voie d'expansion qui emploie un laser comme source de lumière impulsionnelle pour générer des ultrasons. Elle permet d'imager jusqu'à quelques millimètres de profondeur (la profondeur de diffusion optique) des structures biologiques très diffusantes optiquement, pouvant atteindre en taille quelques dizaines de micromètres. Grâce au caractère non-invasif du rayonnement laser employé, cette technique peut être utilisée pour imager *in vivo* la structuration des vaisseaux sanguins, la supervascularisation, les tumeurs cérébrales,⁴ l'oxygénation des tissus,⁵ etc...

L'emploi des ultrasons comme outil d'imagerie dans diverses applications biomédicales, de l'observation de la morphologie d'une structure biologique jusqu'au suivi de son fonctionnement et de sa croissance, montre qu'il est possible d'observer et d'analyser les mécanismes biologiques, la physiologie et les pathologies d'un organisme vivant à travers ses propriétés mécaniques, et ceci à une échelle sub-millimétrique. Il apparaît clairement que les ultrasons constituent un outil idéal pour sonder la mécanique de la matière vivante à différentes échelles. Il apparaît de même que, pour une compréhension plus complète et plus globale du fonctionnement complexe de la matière vivante, il est nécessaire d'étudier sa mécanique sur une large gamme d'échelles spatiales. Il est donc évident que l'investigation de la biomécanique à l'échelle sub-micronique est essentielle.

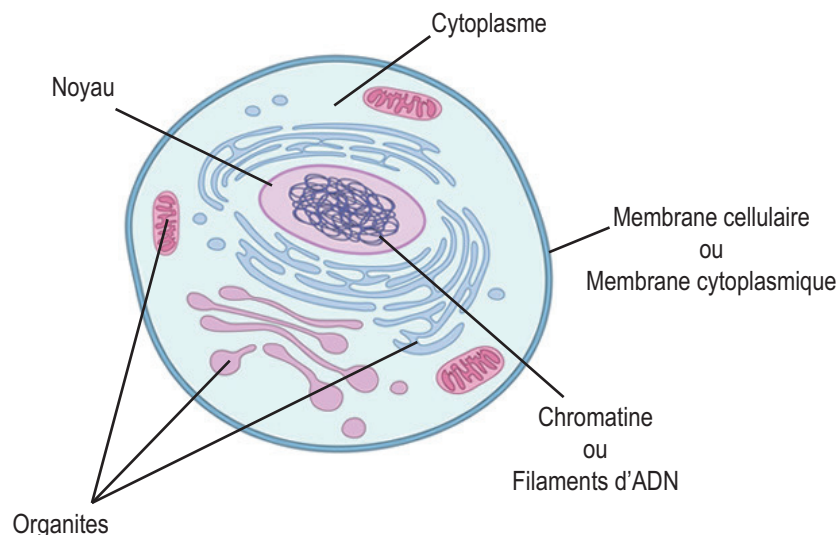


Fig. 1 – Schéma d'une cellule montrant ses différents composants. Adapté d'après O'Connor *et al.*⁶

A l'échelle micronique, la matière vivante se présente sous forme d'une cellule biologique individuelle. Une cellule, schématisée sur la figure 1, constitue l'unité la plus petite contenant tout le bagage nécessaire pour accomplir toutes les fonctions essentielles de la vie. Elle peut se développer, se déplacer, se diviser et s'adapter aux changements de son environnement. La structure qui l'entoure est appelée membrane cellulaire (Fig. 1). Cette membrane constitue la frontière entre le contenu de la cellule et l'environnement extérieur qui l'entoure, et assure les échanges entre la cellule et son entourage. Le liquide interne de la cellule, le cytoplasme, est un liquide transparent formé principalement d'eau. Il constitue la substance fondamentale dans laquelle baignent tous les éléments et composants de la cellule (organites) (Fig. 1). Parmi ces composants, on identifie le noyau de la cellule sous forme d'une structure fermée et poreuse. Dans le noyau se trouve la substance contenant tout le code génétique responsable du fonctionnement de la cellule. Cette substance, dite acide nucléique, contient les molécules d'ADN qui forment les chromosomes et possèdent l'information nécessaire pour la survie de la cellule (Fig. 1). La cellule, possédant une épaisseur allant de quelques dizaines de nanomètres (10^{-9} m) à quelques micromètres et s'étendant en largeur sur 10 à 100 microns, maintient sa forme et sa morphologie grâce à son support mécanique essentiel, le cytosquelette.

Les propriétés mécaniques de la cellule ainsi que celles de son environnement, interviennent dans de nombreux mécanismes et processus biologiques à l'échelle cellulaire comme par exemple la division, la prolifération et l'adhésion cellulaire. De plus, elles ont un rôle crucial dans le développement de maladies (dégénératives, cancers, etc...). L'étude de ces propriétés mécaniques avec une résolution sub-cellulaire est d'une importance capitale pour la compréhension du fonctionne-

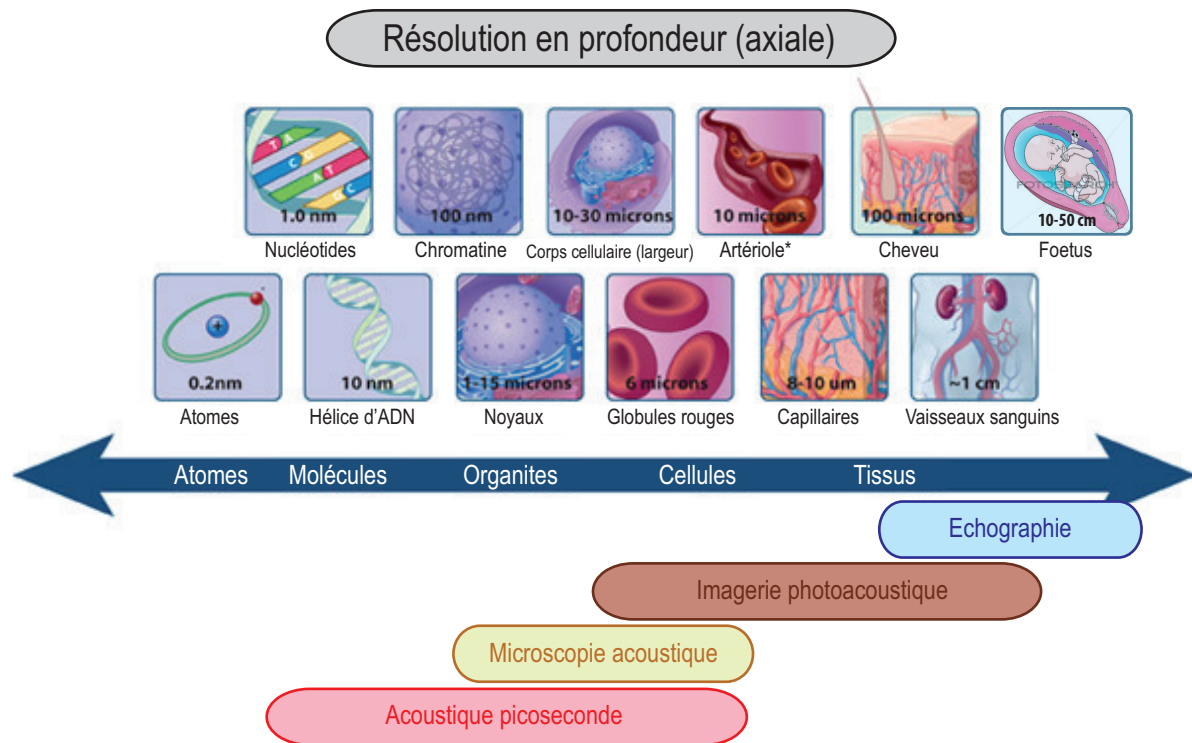


Fig. 2 – Échelle spatiale relative aux différentes structures biologiques. Adapté d'après O'Connor *et al.*⁶ (* La valeur indiquée sur la figure correspond à la dimension de l'espace interne de l'artériole.)

ment physiologique et pathologique d'une cellule.⁷ Plusieurs approches microscopiques comme la microscopie à force atomique⁸ et les nanopipettes à aspiration⁹ sont actuellement employées pour mesurer les propriétés mécaniques d'une cellule. Cependant, ces techniques peuvent altérer l'intégrité de la cellule.¹⁰ L'étude non-invasive de la mécanique d'une cellule à l'aide d'ultrasons peut être réalisée grâce à la microscopie acoustique.¹¹ Cette technique d'imagerie ultrasonore utilise des transducteurs piézoélectriques pour générer des ondes acoustiques de fréquences allant jusqu'à quelques GHz (10^9 Hz), permettant ainsi de mesurer les propriétés mécaniques de cellules individuelles avec une résolution en profondeur pouvant atteindre le micromètre.¹² Toutefois, à quelques GHz, le contraste acoustique observé dans une cellule n'est pas suffisant pour une étude quantitative de tous ces éléments, en particulier le cytosquelette dont l'épaisseur n'est que de quelques dizaines de nanomètres. Afin que les ultrasons se propageant dans la cellule soient sensibles à de telles structures nanométriques, il est nécessaire d'augmenter leur fréquence.

La découverte de la technique d'acoustique picoseconde par H. J. Maris et son équipe dans les années 80¹³ a permis de franchir la limite du GHz pour les fréquences acoustiques. En utilisant des impulsions laser de durée inférieure à la picoseconde (10^{-12} s), des ondes acoustiques de fréquence allant jusqu'au THz (10^{12} Hz) peuvent être générées grâce à l'effet photoélastique. Ainsi, la caractérisation des propriétés mécaniques d'une cellule pourrait être envisagée avec

une échelle nanométrique. Cette idée de sonder la mécanique d'une cellule individuelle à l'aide de l'acoustique picoseconde a été évoquée en 1998 par H. J. Maris quand il a dit¹⁴ :

« 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 fœtus, 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 soutient l'ensemble de la cellule), afin de réaliser l'équivalent des radiographies, mais à l'échelle microscopique. »

Cependant, il a fallu attendre jusqu'en 2008 pour qu'une première application biologique d'acoustique picoseconde soit réalisée à Bordeaux par l'équipe Ultrasons Laser.¹⁵ Depuis, l'équipe bordelaise s'est investie dans l'étude et la caractérisation de la mécanique des cellules par acoustique picoseconde dans le but d'étendre au nanomètre l'échelle de l'imagerie biomédicale par ultrasons, présentée sur la figure 2, et de réaliser une échographie à l'échelle cellulaire : c'est dans ce cadre que s'inscrit cette thèse.

Les travaux de cette thèse ont donc pour objet l'imagerie des propriétés mécaniques de la cellule à l'aide d'ondes acoustiques GHz générées par acoustique picoseconde. Ils seront exposés dans ce mémoire en trois parties.

La première partie sera consacrée à la caractérisation des propriétés mécaniques d'objets micrométriques biomimétiques pour une étude amont, afin de modéliser et mieux comprendre le comportement mécanique complexe des cellules. La deuxième partie portera sur l'étude 1D des propriétés mécaniques d'une cellule animale modèle et de l'adhésion cellule-biomatériau par acoustique picoseconde. La troisième partie étendra cette étude au cas 2D : l'échographie d'une cellule à l'aide d'ondes acoustiques GHz sera exposée.

Première partie

Etude d'objets biomimétiques par
acoustique picoseconde

Introduction

L'effet photoélastique est la génération d'une onde élastique grâce à l'absorption d'une onde lumineuse (onde électromagnétique). Il a été observé par A. G. Bell en 1880 lors de sa conception du photophone^{16,17} et a ensuite stimulé de nombreuses applications dans les domaines de l'optique et de l'acoustique grâce à l'avènement du laser en 1960.¹⁸ Cette nouvelle source de lumière cohérente et monochromatique est capable d'apporter localement à la matière de grandes quantités d'énergie. Après une cascade d'événements, l'énergie lumineuse d'un laser irradiant un milieu opaque va provoquer la vibration mécanique de ce milieu, dans lequel des ondes acoustiques générées grâce à cette vibration, vont se propager. Le contenu fréquentiel de ces ondes acoustiques est principalement dicté par la durée de l'impulsion laser. Dans les années 60, cette durée était de l'ordre de la nanoseconde et permettait donc, de générer des ondes acoustiques avec des fréquences supérieures à 20 kHz : le domaine des ultrasons lasers était né. Ayant l'avantage de générer sans contact et d'une manière non destructive des ondes acoustiques, cette nouvelle technologie a connu un grand succès dans l'évaluation et le contrôle non-destructif des matériaux. L'arrivée d'impulsions laser inférieures à la picoseconde dans les années 70¹⁹ a offert la possibilité de générer des ultrasons avec des fréquences dépassant le seuil accessible par des transducteurs piézoélectriques. En 1984, en se servant d'impulsions laser d'une picoseconde, H. J. Maris a observé pour la première fois la propagation d'impulsions acoustiques de largeur de quelques dizaines de picosecondes : il donne naissance à l'acoustique picoseconde.¹³ Des ondes acoustiques avec un contenu fréquentiel s'étendant jusqu'au THz, peuvent être ainsi générées.

La naissance de l'acoustique picoseconde il y a 30 ans a offert un outil original pour l'étude des structures nanométriques, grâce aux fréquences acoustiques GHz typiquement générées. C'est pourquoi elle a naturellement trouvé son intérêt dans les nanotechnologies²⁰ et la micro-électronique,²¹ qui nécessitent une évaluation non destructive à l'échelle sub-micronique de films minces et de multi-couches nanométriques structurées. Elle a également permis d'évaluer d'une manière non-invasive la qualité d'interface entre des nanofilms de natures différentes.²² Au fil des années, les domaines d'applications de l'acoustique picoseconde ont connu une forte expansion. Aujourd'hui, on se sert de cette technique pour caractériser des nanoparticules²³ et des

microfibres,²⁴ pour étudier la physique et la chimie des nanocontacts²⁵ ou encore pour mesurer l'atténuation des phonons dans les verres et les polymères,²⁶⁻²⁸ dans l'eau²⁹ et la glace^{30,31} ainsi que dans le glycérol³² et le mercure.³³ De plus, l'acoustique picoseconde peut être appliquée à l'évaluation des propriétés thermiques des matériaux³⁴ ainsi qu'à de nombreuses autres études.³⁵ Ainsi, cette technique a atteint un niveau de maturité important pour l'étude de la matière inerte à l'échelle sub-micronique, mais qu'en est-il de son application à la matière vivante ?

En commençant par introduire les principes physiques de l'acoustique picoseconde, nous montrerons dans cette partie l'émergence de cette technique pour l'étude de la matière vivante. Pour ce faire, nous articulerons la partie autour des points suivants :

- principes physiques de l'acoustique picoseconde,
- outils mathématiques nécessaires pour la modélisation des résultats expérimentaux,
- sonder la mécanique d'une cellule par des ondes acoustiques GHz,
- caractériser les propriétés mécaniques d'objets biomimétiques avant de passer aux cellules,
- détermination des propriétés mécaniques des systèmes multicouches viscoélastiques micro-métriques,
- description d'une loi de comportement utile pour la modélisation de la rhéologie des cellules au GHz.

Le premier chapitre de cette partie exposera les mécanismes de la génération et de la détection des ondes en acoustique picoseconde. La détection dans un milieu opaque et dans un milieu transparent est ensuite présentée dans le but de montrer les deux formes de détection que nous rencontrerons dans ce travail. Enfin, nous décrirons brièvement les premières applications biologiques de l'acoustique picoseconde.

Dans le second chapitre, nous emploierons l'acoustique picoseconde pour étudier les propriétés mécaniques d'objets mous biomimétiques dans le but de simuler et comprendre préalablement la mécanique d'une cellule. Pour cela, nous déterminerons la célérité et l'atténuation acoustiques dans ces objets ainsi que leurs épaisseurs sub-microniques. Enfin, nous nous servirons de l'atténuation acoustique pour décrire la loi de comportement au GHz de tels objets polymériques ainsi que pour étudier leur nanocontact avec la surface rigide sur laquelle ils adhèrent.

Chapitre 1

Acoustique picoseconde : principes physiques et applications aux sciences du vivant

La technique d'acoustique picoseconde a été inventée par H. J. Maris *et al.* en 1984¹³ en observant la propagation d'une impulsion acoustique dans un film d'As₂Te₃. Elle a connu un grand succès dans les domaines des nanotechnologies pour sa capacité à caractériser les propriétés mécaniques de couches très minces (de quelques nanomètres à quelques micromètres). Cette technique, basée sur un dispositif d'optique ultra-rapide pompe-sonde, permet à la fois la génération et la détection d'ondes acoustiques de fréquences pouvant atteindre le THz. Grâce à un tel dispositif, l'acoustique picoseconde offre le moyen d'étudier à distance et d'une manière non-invasive des matériaux et des structures d'épaisseurs sub-microniques.

Au cours des années, les applications de l'acoustique picoseconde se sont développées autour de plusieurs thématiques de recherche de la physique de la matière condensée. Son utilisation s'étend aujourd'hui jusqu'à la physique de la matière vivante, sous l'impulsion des travaux menés à Bordeaux en 2007.¹⁵ Après avoir détecté optiquement les ondes ultrasonores GHz se propageant dans une cellule végétale, l'équipe bordelaise s'est lancée dans l'étude des propriétés mécaniques de la cellule en se servant de l'acoustique picoseconde comme instrument de mesure.¹⁵ Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'introduction au fonctionnement de cet instrument tel qu'il existait au début de cette thèse.

Dans ce chapitre, nous décrirons le dispositif pompe-sonde employé pour générer et détecter des impulsions acoustiques picosecondes. Nous détaillerons les mécanismes physiques responsables de la génération et de la détection de ces ondes. Le principe de la détection sera exposé

tout d'abord dans le cas d'un film mince de métal opaque, puis dans le cas d'un milieu transparent. Enfin, nous montrerons l'émergence de l'acoustique picoseconde pour l'étude du vivant.

1.1 Principe et dispositif expérimental

La technique d'acoustique picoseconde consiste à générer des ondes acoustiques à l'aide d'impulsions lumineuses très courtes, de durées inférieures à la picoseconde. Comme le processus mécanique mis en jeu par cet impact lumineux est très rapide, il est nécessaire, afin de le suivre dans le domaine temporel, de mettre en place une détection optique utilisant l'observation de la lumière perturbée par un changement d'indice optique du milieu étudié. Pour illustrer le fonctionnement de cette technique, considérons le dispositif expérimental représenté dans la figure 1.1. Un laser impulsif titane-saphir délivre des impulsions de durée égale à 100 fs avec un taux de répétition de 80 MHz. L'utilisation d'un cube séparateur non polarisant permet de séparer le train d'impulsion en deux. Les impulsions du premier train, appelées pompe, génèrent les ondes acoustiques qui se propagent dans le milieu étudié et modifient localement son indice optique. Les impulsions du deuxième train, dites sonde, servent à détecter ce changement à travers le couplage élasto-optique. L'impulsion pompe, suite à son absorption par le matériau, génère également des phénomènes thermiques qui peuvent être détectés par la sonde à travers l'effet thermo-optique. Les phénomènes acoustiques et thermiques, induisant tous deux une variation d'indice optique, sont ensuite suivis temporellement en augmentant l'écart temporel entre la pompe et la sonde grâce à une ligne à retard mécanique.

Afin de détecter les faibles variations d'intensité lumineuse de la sonde engendrées par la propagation des ondes acoustiques, on fait appel à une détection synchrone. Cette dernière permet d'extraire des signaux de très faibles amplitudes à partir d'un signal d'origine très bruité. Pour cela, on utilise un modulateur acousto-optique pour moduler l'intensité du faisceau pompe à une fréquence donnée. Pour un retard pompe-sonde fixe (c'est-à-dire pour une position fixe de la ligne à retard), on mesure à l'aide d'une photodiode les variations d'intensité de la sonde. La détection synchrone analyse alors la composante spectrale à la fréquence de modulation, rejetant ainsi le bruit contenu aux autres fréquences. Nous détaillerons dans la suite les mécanismes physiques responsables de la génération et de la détection des ondes acoustiques.

1.2 Génération photoélastique

Dans un premier temps, nous nous intéressons au processus de génération d'ondes élastiques lors d'une expérience d'acoustique picoseconde. Pour illustration, nous décrivons les mécanismes

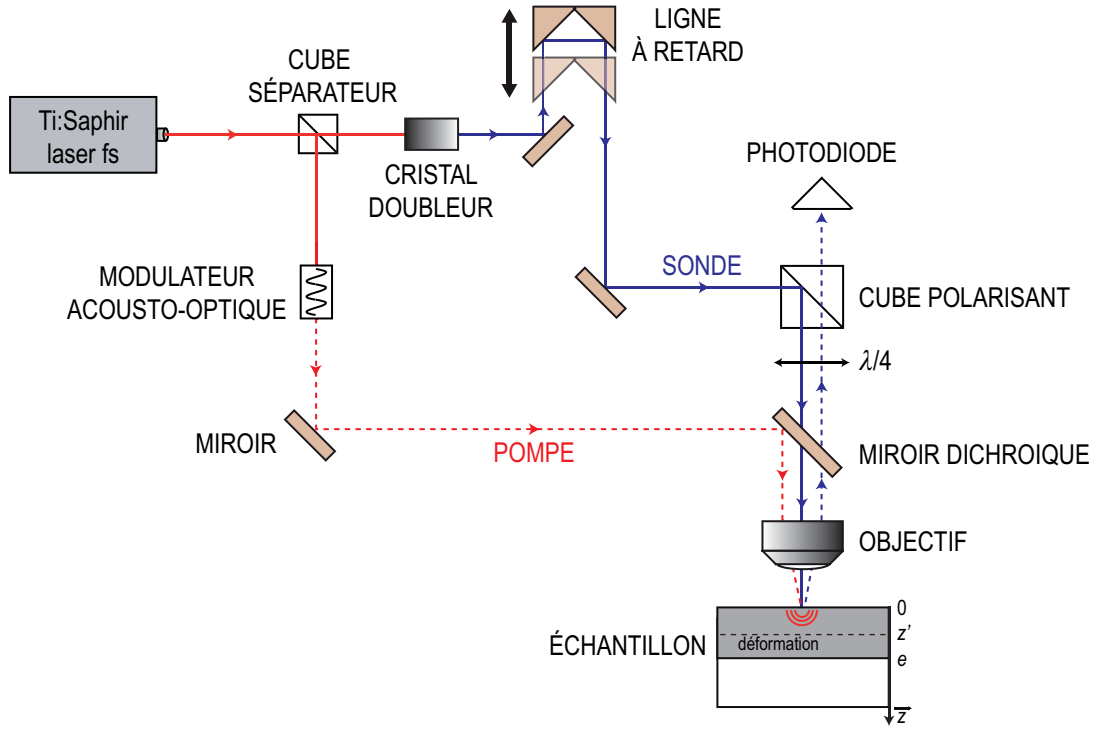


Fig. 1.1 – Montage typique d'acoustique picoseconde.

physiques mis en jeu, de l'absorption de l'impulsion pompe par l'échantillon jusqu'à la génération d'un train d'ondes élastiques dans un cas simple. Quand l'énergie lumineuse est absorbée par le matériau, la température de ce dernier augmente en raison du couplage photo-thermique. Ce couplage résulte de la transformation de l'énergie transportée par les photons en énergie thermique. Cette élévation de température induit alors une dilatation très rapide, localisée dans la zone d'absorption du faisceau laser. C'est à travers cet effet que l'énergie thermique se transforme en vibration mécanique qui se manifeste sous forme d'ondes élastiques. La propagation de ces ondes est généralement décrite par l'acoustique linéaire.

Afin d'obtenir une expression analytique de la déformation, Thomsen *et al.*³⁶ ont considéré une approche macroscopique unidimensionnelle (suivant $\vec{z}$) (Fig. 1.1) pour décrire la génération photo-élastique qui rassemble les couplages photo-thermique et thermo-élastique. Quand le faisceau laser pompe est incident normalement à la surface libre d'un échantillon absorbant (Fig. 1.1), l'énergie volumique déposée à la profondeur z s'écrit :

$$Q(z, t) = I_p \beta (1 - R_{op}) \delta(t) e^{-\beta z} \quad (1.1)$$

où R_{op} est la réflectivité optique, I_p l'énergie surfacique de la pompe et β le coefficient d'absorption optique. L'indice optique de l'échantillon est complexe, $n = n' + jn''$. La partie réelle n' renseigne sur la célérité de l'onde électromagnétique tandis que la partie imaginaire n'' est

reliée au coefficient d'absorption optique β de l'échantillon. Ainsi, la profondeur de pénétration optique β^{-1} s'écrit en fonction de n'' :

$$\beta^{-1} = \frac{\lambda_{op}}{4\pi n''} \quad (1.2)$$

avec λ_{op} la longueur d'onde optique. Un milieu est dit opaque quand la profondeur de pénétration optique est plus petite que son épaisseur, $\beta^{-1} \ll e$. Dans le cas contraire, il est transparent.

La distribution de température T engendrée par le dépôt d'énergie lumineuse sur la surface de l'échantillon peut être décrite par l'équation parabolique de la chaleur qui s'écrit comme suit :

$$\rho C_p \frac{\partial T(z, t)}{\partial t} = \kappa \frac{\partial^2 T(z, t)}{\partial z^2} + Q(z, t) \quad (1.3)$$

où ρ est la densité du milieu étudié, C_p sa chaleur spécifique et κ sa conductivité thermique. L'énergie lumineuse absorbée $Q(z, t)$ apparaît alors comme terme source de cette équation. Puisque la vitesse des ondes acoustiques est très grande devant la vitesse de diffusion thermique, nous pouvons négliger la diffusion thermique. L'équation 1.3 devient :

$$\rho C_p \frac{\partial T(z, t)}{\partial t} = Q(z, t) = I_p \beta (1 - R_{op}) \delta(t) e^{-\beta z} \quad (1.4)$$

La solution prend la forme :

$$T(z, t) = \frac{I_p \beta (1 - R_{op})}{\rho C_p} e^{-\beta z} H(t) \quad (1.5)$$

avec $H(t)$ la fonction échelon de Heaviside. L'élévation de la température due à l'impulsion lumineuse peut ainsi être déduite³⁶ :

$$\Delta T(z) = \frac{I_p \beta (1 - R_{op})}{\rho C_p} e^{-\beta z} \quad (1.6)$$

L'élévation de température $\Delta T(z)$, crée une dilatation qui génère une contrainte mécanique $-C\alpha_{th}\Delta T(z)$, où C désigne le coefficient d'élasticité de l'échantillon et α_{th} son coefficient de dilatation thermique. Le champ de contrainte $\sigma(z, t)$ s'écrit alors :

$$\sigma(z, t) = C \frac{\partial u(z, t)}{\partial z} - C\alpha_{th}\Delta T(z) \quad (1.7)$$

avec $u(z, t)$ le champ de déplacement. A l'équilibre local, l'équation d'onde s'écrit :

$$\rho \frac{\partial^2 u(z, t)}{\partial t^2} = \frac{\partial \sigma(z, t)}{\partial z} \quad (1.8)$$

En combinant les équations 1.7 et 1.8 et en définissant la vitesse des ondes acoustiques dans le milieu étudié $v = \sqrt{C/\rho}$, on déduit l'équation décrivant le champ de déplacement $u(z, t)$ dans l'échantillon :

$$\frac{\partial^2 u(z, t)}{\partial z^2} - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 u(z, t)}{\partial t^2} = \alpha_{th} \frac{\partial \Delta T(z)}{\partial z} \quad (1.9)$$

La contrainte thermique créée par l'élévation de température $\Delta T(z)$ apparaît alors comme terme source.

En imposant des conditions limites mécaniques aux interfaces, on peut ensuite obtenir le champ de déplacement $u(z, t)$ ainsi que le champ de déformation $\mu(z, t) = \partial u(z, t)/\partial z$ dus à la propagation d'ondes acoustiques générées par effet photo-élastique. En nous plaçant dans un cas simple, c'est-à-dire en négligeant la diffusion thermique, les effets électroniques ainsi que la durée des impulsions laser, nous avons donné les équations de base servant à modéliser la génération photo-acoustique. Un calcul plus général du champ de déplacement peut être consulté, par exemple, dans les travaux de thèse de M. Perton.³⁷

Le contenu spectral de l'onde acoustique générée est principalement limité par le produit de l'absorption optique et de la vitesse des ondes acoustiques dans le matériau utilisé, soit $\lesssim \beta v$. Dans le cas des métaux, comme β^{-1} est de l'ordre d'une dizaine de nm et v varie entre 5000 m/s et 7000 m/s, le contenu fréquentiel s'étend jusqu'à plusieurs centaines de GHz. Ces fréquences correspondent à des longueurs d'ondes acoustiques allant du nm à quelques centaines de nm. Ainsi, l'acoustique picoseconde permet d'atteindre une résolution nanométrique en profondeur (résolution axiale). Après avoir présenté brièvement le processus de génération intervenant dans la technique d'acoustique picoseconde, nous exposons dans la section suivante le principe de détection des ondes acoustiques générées.

1.3 Détection élasto-optique

Les contraintes mécaniques générées dans l'échantillon sont détectées à l'aide de l'impulsion sonde, retardée temporellement par rapport à l'impulsion pompe grâce à la ligne à retard. Cette détection est réalisée à travers le couplage élasto-optique, en mesurant le changement de réflectivité de l'échantillon induit par la modification de l'indice optique au passage des ondes acoustiques. Classiquement, le changement d'indice optique causé par la propagation acoustique

peut s'écrire de la manière suivante³⁶ :

$$\Delta n'(z, t) = \frac{\partial n'}{\partial \mu} \mu(z, t), \quad (1.10a)$$

$$\Delta n''(z, t) = \frac{\partial n''}{\partial \mu} \mu(z, t), \quad (1.10b)$$

où $\Delta n'(z, t)$ et $\Delta n''(z, t)$ désignent respectivement les variations en temps et en espace de la partie réelle $n'(z, t)$ et de la partie imaginaire $n''(z, t)$ causées par le passage de l'onde de déformation $\mu(z, t)$. Les constantes $\partial n'/\partial \mu$ et $\partial n''/\partial \mu$ sont des propriétés intrinsèques de l'échantillon et dépendent de la longueur d'onde de la sonde. La permittivité diélectrique perturbée associée, $\Delta \epsilon$, s'écrit :

$$\Delta \epsilon(z, t) = 2(n' + jn'') \left[\frac{\partial n'}{\partial \mu} + j \frac{\partial n''}{\partial \mu} \right] \mu(z, t) \quad (1.11)$$

Pour obtenir le changement de réflectivité induit par la propagation de l'onde acoustique, il faut résoudre les équations de Maxwell en considérant que les propriétés optiques de l'échantillon varient en temps et en espace. En considérant que l'échantillon est isotrope, l'équation de propagation du champ électrique s'écrit :

$$\frac{\partial^2 E_z(z, t)}{\partial z^2} + q_0^2 [\epsilon + \Delta \epsilon(z, t)] E_z(z, t) = 0 \quad (1.12)$$

où $q_0 = \omega/c_0$ est le nombre d'onde optique dans le vide et ϵ désigne la permittivité diélectrique non perturbée (en l'absence de déformation mécanique) :

$$\epsilon = (n' + jn'')^2 \quad (1.13)$$

La décomposition de la permittivité diélectrique en une partie non perturbée constante ϵ et une partie perturbée de faible amplitude $\Delta \epsilon$ permet de linéariser l'équation 1.12. En écrivant également le champ électrique $E_z(z, t)$ comme la somme d'une solution $E_z^\epsilon(z, t)$ non perturbée et d'une solution $E_z^{\Delta \epsilon}(z, t)$ perturbée,

$$E_z(z, t) = E_z^\epsilon(z, t) + E_z^{\Delta \epsilon}(z, t) \quad (1.14)$$

l'équation 1.12 peut être écrite sous forme d'un système couplé de deux équations d'onde en négligeant les termes du second ordre. La première équation d'onde décrit la propagation du champ électrique non perturbé dans le milieu :

$$\frac{\partial^2 E_z^\epsilon(z, t)}{\partial z^2} + q_0^2 \epsilon E_z^\epsilon(z, t) = 0 \quad (1.15)$$

La deuxième équation décrit la propagation du champ électrique perturbé dans le milieu :

$$\frac{\partial^2 E_z^{\Delta\epsilon}(z, t)}{\partial z^2} + q_0^2 \epsilon E_z^{\Delta\epsilon}(z, t) = -q_0^2 \Delta\epsilon(z, t) E_z^\epsilon(z, t) \quad (1.16)$$

Il s'agit de la méthode des approximations successives au premier ordre. La solution de l'équation d'onde non perturbée 1.15 correspond au champ électrique E_z^ϵ non perturbé. En particulier, le champ électrique réfléchi à la surface libre de l'échantillon (suivant $\vec{z}$) s'écrit :

$$E_z^\epsilon(z, t) = r_{01} E_0 e^{-j(q_0 z + \omega t)} \quad (1.17)$$

avec E_0 l'amplitude optique dans le vide. r_{01} est le coefficient de réflexion optique entre le vide et l'échantillon :

$$r_{01} = \frac{1 - n}{1 + n} \quad (1.18)$$

L'équation de propagation optique perturbée 1.16 peut être résolue par des techniques classiques (fonction de Green, variation de la constante, ...). Sa solution est³⁸ :

$$E_z^{\Delta\epsilon}(z, t) = j t_{01} \frac{q_0}{2n} t_{10} E_0 e^{-j(q_0 z + \omega t)} \int_0^\infty \Delta\epsilon(z') e^{2j q_0 n z'} dz' \quad (1.19)$$

avec

$$t_{01} = \frac{2}{1 + n}, \quad (1.20a)$$

$$t_{10} = \frac{2n}{1 + n}. \quad (1.20b)$$

où t_{01} est le coefficient de transmission optique à l'interface vide-film et t_{10} est le coefficient de transmission optique à l'interface film-vide.

Une façon d'analyser le sens physique de l'équation 1.19 consiste à considérer une déformation de type Dirac localisée en z' . Elle crée alors un saut d'indice, lui aussi localisé en z' . Le champ électrique se réfléchit sur ce saut d'indice avec un coefficient de réflexion δr_μ qui s'écrit :

$$\delta r_\mu = j \frac{q_0}{2n} \Delta\epsilon \quad (1.21)$$

L'exponentielle $e^{2j q_0 n z'}$ de l'équation 1.19 traduit l'aller-retour parcouru par le champ électrique entre la surface libre et le saut d'indice localisé en z' . L'intégrale par rapport à z' prend en compte la distribution spatiale de la variation d'indice optique, image de la distribution spatiale de la déformation.

L'équation 1.19 permet de définir la variation relative Δr du coefficient de réflexion optique en écrivant que $E_z^{\Delta\epsilon} = \Delta r E_0 e^{-j(q_0 z + \omega t)}$. Dès lors,

$$\Delta r = jt_{01} \frac{q_0}{2n} t_{10} \int_0^\infty \Delta\epsilon(z') e^{2jq_0 n z'} dz' \quad (1.22)$$

L'expression de Δr montre que l'amplitude et la phase de la sonde sont perturbées par la propagation acoustique dans l'échantillon. L'amplitude du champ électrique réfléchi peut être mesurée en effectuant des mesures réflectométriques tandis que la phase du champ électrique réfléchi s'obtient à travers des mesures interférométriques.

Enfin, il est nécessaire de relier le coefficient de réflexion Δr aux grandeurs mesurées. Le champ électrique réfléchi en présence d'une déformation acoustique E_z^r s'écrit comme la somme du champ réfléchi à la surface E_z^ϵ et du champ perturbé $E_z^{\Delta\epsilon}$:

$$E_z^r = E_z^\epsilon + E_z^{\Delta\epsilon} = r E_0 e^{-j(q_0 z + \omega t)} \quad (1.23)$$

avec la réflectivité

$$r = r_{01} \left(1 + \frac{\Delta r}{r_{01}} \right) \quad (1.24)$$

Pour faire apparaître les variations d'amplitude A et de phase ϕ , r peut s'écrire³⁸ :

$$r(t) = r_{01} [1 + A(t)] e^{j\phi(t)} \quad (1.25)$$

Comme $A(t)$ et $\phi(t)$ sont de faible amplitude, un développement limité au premier ordre donne la réflectivité :

$$r(t) = r_{01} [1 + A(t) + j\phi(t)] \quad (1.26)$$

Dans ce travail, nous effectuons une mesure réflectométrique : on mesure à l'aide d'une photodiode une variation d'intensité lumineuse $\Delta I / I_0$:

$$\frac{\Delta I}{I_0} = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (1.27)$$

I_0 est l'intensité lumineuse incidente et I est celle qui est perturbée par la déformation acoustique. Ces deux intensités s'écrivent :

$$I_0 = |E_z^\epsilon|^2 = r_{01}^2 |E_0|^2 \quad (1.28)$$

et

$$I = |E_z^r|^2 = \left| E_z^\epsilon + E_z^{\Delta\epsilon} \right|^2 \approx |E_z^\epsilon|^2 + 2r_{01} |E_0|^2 \operatorname{Re}(\Delta r) \quad (1.29)$$

Ainsi, la mesure de $\Delta I/I_0$ donne accès à l'amplitude $A(t)$ de la variation relative de réflectivité $\Delta r/r_{01}$:

$$\frac{\Delta I}{I_0} = \frac{2\operatorname{Re}(\Delta r)}{r_{01}} = 2A(t) \quad (1.30)$$

Nous allons maintenant présenter des résultats expérimentaux illustrant la détection par réflectométrie dans le cas d'un échantillon opaque et dans le cas d'un échantillon transparent.

1.3.1 Milieu opaque

Dans ce paragraphe, afin de décrire un signal typique obtenu en acoustique picoseconde dans le cas d'un échantillon opaque, nous présentons une mesure effectuée dans un film de tungstène (W) déposé sur un substrat semi-infini de silicium (Si). Son épaisseur est $e = 250$ nm, bien supérieure à la pénétration optique ~ 15 nm. La figure 1.2(a) montre la géométrie de l'échantillon. Le faisceau pompe (en rouge) est incident normalement à la surface libre du tungstène. Une onde de déformation longitudinale est générée dans le film. Elle se propage jusqu'à l'interface film-substrat où elle se réfléchit partiellement et retourne vers la surface libre du film. Elle fait ensuite de nombreux allers-retours dans le film. Le faisceau sonde est également incident normalement à la surface libre du tungstène (la sonde en bleu est représentée avec une incidence oblique uniquement pour une raison de schématisation). À cause de la forte absorption du tungstène, la détection s'établit à proximité de la surface libre (sur la profondeur de pénétration optique), à travers le mécanisme décrit précédemment.

La figure 1.2(b) montre la variation de la réflectivité en fonction du temps mesurée dans le cas de l'échantillon opaque de tungstène présenté dans la figure 1.2(a). Le temps allant de 0 à 1 ns correspond à l'écart temporel entre la pompe et la sonde piloté par la ligne à retard. À $t = 0$, c'est-à-dire quand les impulsions des faisceaux de pompe et de sonde arrivent au même instant, nous observons une variation brutale appelée pic de coïncidence. Ce brusque changement de réflectivité provient de la variation soudaine de température du film au moment de l'absorption de la radiation électromagnétique. Il traduit également la dynamique électronique rapide dans le métal à cet instant. Ensuite, une lente décroissance, correspondant à la diffusion thermique, est observée. Notons que l'influence de la diffusion thermique n'était pas prise en compte dans le calcul précédent de la détection optique, le but étant d'expliquer uniquement le principe de la détection des ondes acoustiques. Par conséquent, la variation d'indice optique (Eq. 1.10) a été

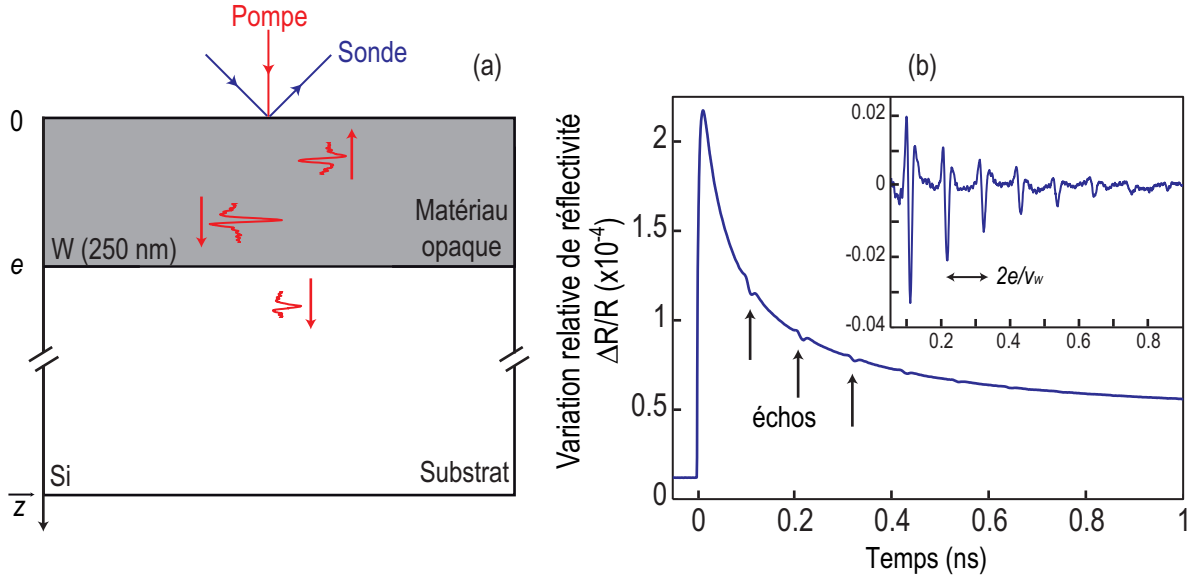


Fig. 1.2 – (a) Géométrie de l'échantillon de tungstène opaque déposé sur un substrat semi-infini de silicium. (b) Changement de réflectivité en fonction du temps. L'encart montre un zoom sur les échos acoustiques.

uniquement reliée au coefficient piézo-optique $\partial n / \partial \mu$ en négligeant le coefficient thermo-optique $\partial n / \partial T$.

En plus de la lente décroissance thermique, des échos acoustiques provenant des réflexions successives sur les interfaces film-substrat et film-air apparaissent. Les trois premiers échos sont indiqués par des flèches. L'encart de la figure 1.2(b) montre uniquement le signal acoustique mesuré obtenu par soustraction du fond thermique à l'aide d'un polynôme. Les échos sont parfaitement identifiés à un intervalle de $2e/v_W$, où v_W désigne la vitesse des ondes acoustiques longitudinales dans le tungstène. Ainsi, à travers l'amplitude et la phase de ces échos, on est capable de caractériser les propriétés mécaniques (densité, atténuation, vitesse des ondes acoustiques, etc...) de films de très petites épaisseurs (quelques centaines de nanomètres), ainsi que les interfaces où les ondes acoustiques se réfléchissent.

1.3.2 Milieu transparent

Dans un milieu opaque, la faible pénétration optique de l'impulsion sonde ne permet de détecter les variations de réflectivité qu'à proximité de la surface de l'échantillon étudié. C'est pourquoi seuls des échos sont détectés pour ce type d'échantillons. A l'inverse, lorsque le milieu est transparent, le faisceau sonde le traverse entièrement et interagit avec l'onde acoustique sur toute la profondeur. Il est nécessaire d'avoir une structure en plus de l'échantillon pour absorber la pompe. Pour cela, l'échantillon transparent doit être déposé sur une couche ou un substrat absorbant. Pour illustrer la détection élasto-optique, nous présentons les résultats obtenus avec

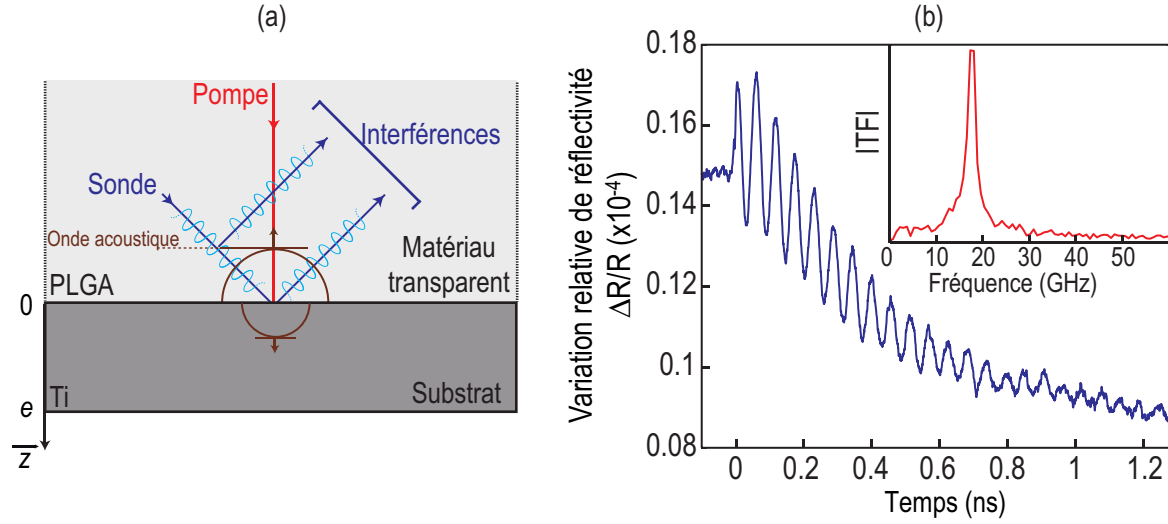


Fig. 1.3 – (a) Détection élasto-optique dans un échantillon de PLGA transparent déposé sur un substrat de titane. (b) Changement de réflectivité en fonction du temps. L'encart montre la transformée de Fourier du signal temporel.

un échantillon composé d'un matériau polymère transparent appelé PLGA (ce constituant sera détaillé dans le chapitre 2) déposé sur un substrat de titane (Fig. 1.3(a)). L'impulsion pompe est focalisée à l'interface PLGA-Ti, et génère des ondes acoustiques qui se propagent de part et d'autre de l'interface.

La sonde est également focalisée à l'interface PLGA-Ti, à travers le PLGA transparent. Le mécanisme de détection est toujours celui décrit précédemment. Dans le cas d'un milieu transparent, on peut l'expliquer de la façon suivante. L'onde acoustique se propageant forme une interface optique qui se déplace à la vitesse de l'onde acoustique dans le PLGA. L'impulsion sonde est donc réfléchiée à la fois par l'onde acoustique et à l'interface PLGA-Ti (Fig. 1.3(a)).

Le changement de réflectivité (Eq. 1.30) mesuré est cette fois piloté par les interférences de ces deux réflexions subies par l'impulsion sonde. Un changement de réflectivité maximal est mesuré quand une interférence constructive entre les rayons réfléchis a lieu, tandis que pour une interférence destructive, on mesure un changement de réflectivité minimal. Au fur et à mesure de la propagation de l'onde acoustique dans l'échantillon, la différence de chemin optique entre les faisceaux réfléchis augmente, donnant lieu à une alternance d'interférences constructives et destructives. En fonction du temps, des oscillations, dites oscillations Brillouin, s'établissent.³⁹ Ces oscillations peuvent être observées dans la figure 1.3(b) montrant le changement de réflectivité en fonction du temps enregistré dans le PLGA transparent avec une sonde de longueur d'onde $\lambda_{sonde} = 400$ nm. La transformée de Fourier de ces oscillations, présentée dans l'encart, indique une fréquence d'oscillations égale à 18 GHz. Pour une onde de déformation se déplaçant à la vitesse des ondes acoustiques v_{eq} dans le PLGA, la fréquence des oscillations Brillouin f_B

observées est égale à³⁶ :

$$f_B = \frac{2n_{cq}v_{cq}}{\lambda_{sonde}} \quad (1.31)$$

où n_{cq} est l'indice optique du PLGA. Ainsi, connaissant l'indice optique du milieu, on est capable de remonter à la vitesse des ondes acoustiques en mesurant f_B . De plus, il est possible de mesurer l'atténuation d'un milieu à la fréquence f_B grâce au temps de vie des oscillations Brillouin.²¹

En conclusion, nous avons présenté les principes physiques essentiels à la compréhension de la génération et de la détection en acoustique picoseconde. Nous avons montré les deux types de signaux acoustiques auxquels nous serons confrontés dans la suite de ce travail. Nous exposerons brièvement dans la dernière section de ce chapitre l'application de cette technique à l'étude du vivant initiée par l'équipe d'accueil à l'université de Bordeaux.

1.4 Application de l'acoustique picoseconde à l'étude de cellules biologiques : débuts et potentialités

Les premières applications de l'acoustique picoseconde à l'étude de matériaux biologiques ont été réalisées par l'équipe Ultrasons Laser de l'université de Bordeaux en 2007 lorsque C. Rossignol *et al.* ont montré la possibilité de détecter des oscillations Brillouin à des fréquences de 5 à 7 GHz dans une cellule végétale,¹⁵ accédant ainsi aux propriétés mécaniques de la cellule avec une résolution sub-micronique. En observant les oscillations Brillouin dans le noyau et la vacuole^a de la cellule, Rossignol *et al.* ont pu déduire une vitesse des ondes acoustiques dans la vacuole (~ 1600 m/s) proche de celle de l'eau tandis que dans le noyau, la célérité extraite était d'environ 2000 m/s.¹⁵ Ces observations ont montré la faculté de l'acoustique picoseconde à mesurer des propriétés mécaniques différentes dans une même cellule, révélant ainsi son hétérogénéité mécanique. Plusieurs expériences sur de nombreuses cellules d'oignon ont ensuite été menées par l'équipe bordelaise, en particulier par M. Ducouso dans ses travaux de thèse, et ont permis de différencier des cellules issues de variétés d'oignon différentes.⁴⁰ Également durant sa thèse, M. Ducouso est parvenu à mesurer l'épaisseur du noyau d'une cellule animale ainsi que sa viscosité et sa rigidité à travers les oscillations Brillouin.^{41,42} Cependant, le lien entre les valeurs mesurées et la microstructure du noyau des cellules animales sondées restait à explorer. C'est pour cela qu'une étude d'objets biomimétiques possédant des propriétés mécaniques similaires à celles des cellules a été initiée en 2012. Cette étude vise à déterminer la loi de comportement et la géométrie de microcapsules viscoélastiques biomimétiques,²⁸ dans

a. La vacuole est un organite présent dans les cellules végétales.

le but de modéliser le comportement mécanique des cellules au GHz. L'étude de ces objets biomimétiques fera l'objet du chapitre suivant.

1.5 Conclusion

La technique d'acoustique picoseconde a été introduite dans ce chapitre. Le montage pompe-sonde classiquement employé pour suivre des phénomènes ultra-rapides de durées inférieures à la nanoseconde a été présenté dans la première section. Cela a permis de mettre en évidence le phénomène de génération d'ondes acoustiques par effet photoélastique d'une part et le phénomène de détection de ces ondes par effet élasto-optique d'autre part. Les mécanismes physiques responsables de ces deux phénomènes ont ensuite été exposés. A travers les équations de base, la génération photoélastique a été détaillée dans un cas simple, de l'absorption de l'impulsion pompe par l'échantillon jusqu'à la naissance d'un train d'ondes élastiques. La détection des ondes élastiques a ensuite été abordée. En considérant une perturbation d'indice optique au passage des ondes acoustiques, la modélisation de cette détection, réalisée à travers le couplage élasto-optique, a été rappelée en résolvant les équations de Maxwell.³⁸ Le rappel des principes de cette modélisation a permis de présenter les équations nécessaires à la description de la réflectivité optique. Ces équations seront utilisées dans le chapitre suivant pour modéliser la réponse des échantillons.

Les signaux acoustiques mesurés dans des milieux opaques et transparents ont ensuite été présentés. Dans un milieu opaque, la faible pénétration optique du faisceau sonde ne donne accès aux variations relatives de réflectivité qu'à proximité de la surface de l'échantillon et ne permet donc que la détection des échos acoustiques ayant effectués des allers-retours dans le milieu. Dans un milieu transparent, le faisceau sonde interagit avec l'onde acoustique sur toute la profondeur, donnant lieu aux oscillations Brillouin. Ainsi, à travers les oscillations Brillouin et les échos acoustiques, on est capable de caractériser les propriétés mécaniques d'un milieu telles que la densité, la rigidité et la viscosité ainsi que les propriétés des interfaces où les ondes acoustiques subissent des réflexions.

Enfin, les premiers travaux effectués avec des cellules végétales par l'équipe Ultrasons Laser à Bordeaux ont montré la sensibilité de l'acoustique picoseconde aux faibles variations des propriétés mécaniques au sein d'une même cellule. Ces résultats innovants ont ouvert de nouvelles pistes de recherche pour une meilleure compréhension de la mécanique d'une cellule. Parmi ces pistes, la caractérisation des propriétés mécaniques d'objets mous biomimétiques en vue d'étudier par la suite l'adhésion cellule-biomatériau ainsi que l'impédance, la rigidité et la viscosité

locales de la cellule est cruciale. L'étude des propriétés mécaniques d'objets biomimétiques sera détaillée dans le chapitre suivant.

Chapitre 2

Des microcapsules sphériques : un modèle simple de cellules biologiques

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté les premiers travaux effectués antérieurement à cette thèse par l'équipe Ultrasons Laser à Bordeaux et portant sur l'application de l'acoustique picoseconde à l'étude de la mécanique cellulaire. En particulier, les propriétés mécaniques de différents organites d'une cellule d'oignon en 2008¹⁵ ou d'une cellule animale ont été obtenues.⁴¹ Ces résultats caractérisant les propriétés mécaniques des cellules au GHz nécessitaient une comparaison à des modèles contrôlés décrivant la mécanique de la cellule à ces fréquences. C'est pourquoi en 2012, une étude visant à étudier la mécanique de microcapsules sphériques biomimétiques par acoustique picoseconde a été initiée.²⁸ Nous étendrons dans ce chapitre ce travail en analysant des capsules avec des épaisseurs de coquilles et des diamètres différents afin d'étudier l'influence de la géométrie sur le comportement mécanique à des fréquences GHz.

Nous présenterons dans le premier paragraphe de ce chapitre le protocole de préparation de ces capsules ainsi que les différents types que nous avons étudiés. Ensuite, nous décrirons la démarche expérimentale utilisée pour la génération et la détection d'oscillations Brillouin dans ces capsules. L'analyse de ces oscillations nous permettra de déterminer l'épaisseur de la coquille, la célérité et l'atténuation acoustiques dans la coquille et le cœur de chaque capsule. Nous nous servirons de la mesure de l'atténuation dans la coquille pour retrouver la loi de comportement dans les polymères au GHz. Nous finirons par discuter la corrélation entre l'atténuation acoustique mesurée dans le cœur et le contact capsule-métal.

2.1 Montage expérimental

Dans la première section de ce chapitre, nous présentons les microcapsules sphériques sur lesquelles les expériences d'acoustique picoseconde ont été menées dans le but de sonder leurs propriétés mécaniques. Nous décrivons la méthode de préparation de ces échantillons et les quatre types de capsules que nous avons utilisés dans ce travail. Nous montrons enfin la configuration expérimentale employée pour mesurer les propriétés viscoélastiques de ces capsules en milieu liquide.

2.1.1 Préparation de l'échantillon

Les microcapsules trouvent leur intérêt essentiellement dans les domaines médical et pharmaceutique. Elles sont constituées d'une coquille biodégradable, qui isole un cœur pouvant être liquide ou gazeux. La coquille peut être fonctionnalisée pour atteindre un tissu cible, et sa dégradation lui permet alors d'y libérer le contenu du cœur.^{43–46} Dans ce travail, nous utilisons des microcapsules sphériques formées d'une coquille biodégradable en PLGA^a encapsulant un cœur composé d'un liquide perfluoré, le PFOB^b. De plus, en encapsulant un liquide perfluoré comme le PFOB qui se caractérise par une très faible vitesse du son longitudinale (~ 600 m/s), les microcapsules de PLGA-PFOB sont souvent employées comme agents de contraste pour l'imagerie acoustique.^{47,48} D'autre part, le PLGA a des propriétés mécaniques proches de celles des cellules animales.⁴⁹ C'est une des raisons pour lesquelles nous les étudions, comme nous le détaillerons dans la troisième partie de ce manuscrit.

La conception et l'élaboration des capsules est assurée par N. Tsapis au laboratoire Physicochimie-Pharmacotechnie-Biopharmacie (UMR CNRS 8612). La préparation des capsules est réalisée par émulsion-évaporation^{50 c}. Le PLGA est dissout dans 4 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) avec la quantité de PFOB ($\text{C}_8\text{F}_{17}\text{Br}$) désirée puis placé dans un bain thermostaté maintenu à 20 °C afin d'assurer une complète miscibilité du PFOB. La solution est ensuite emulsifiée dans 20 mL de solution aqueuse avec 1.5 % de cholate de sodium. Le dichlorométhane est enfin évaporé par agitation magnétique.^{28,50} Cette préparation permet d'obtenir une solution polydisperse de capsules, avec un rapport constant entre le rayon R de la capsule et l'épaisseur h de la coquille. Le rapport h/R peut être modifié en ajustant la quantité de PLGA. Les capsules sont lyophilisées^d pour un stockage de longue durée. La figure 2.1(a) montre une

a. Pour Poly(Lactide-Co-Glycolide Acid).

b. Pour PerFluoroOctylBromide.

c. L'émulsion consiste à mélanger deux ou plusieurs liquides non miscibles en situation normale.

d. La lyophilisation est l'acte de déshydrater un produit préalablement surgelé par sublimation.

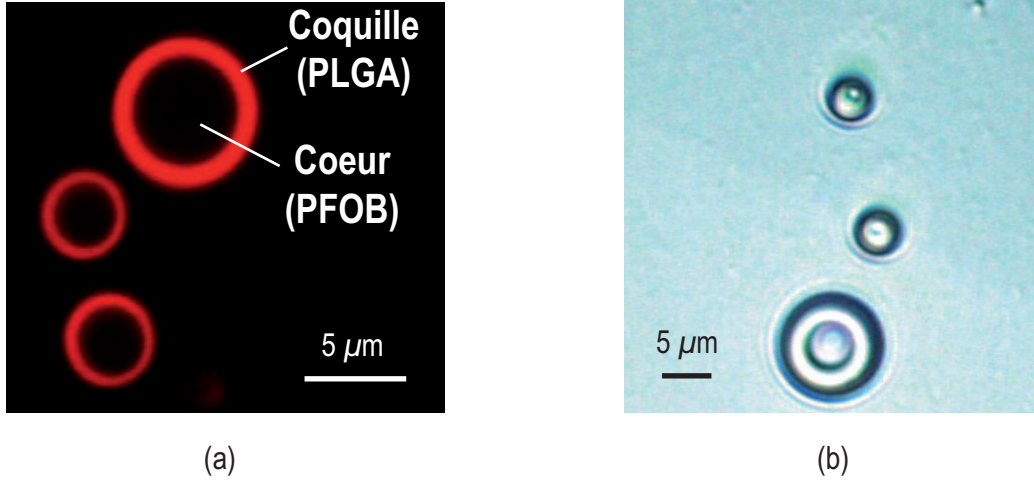


Fig. 2.1 – (a) Photographie de capsules obtenue par microscopie confocale et (b) en lumière blanche.

image obtenue par microscopie confocale de capsules de PLGA-PFOB où le PLGA est marqué en rouge.

Afin de générer et de détecter des ondes acoustiques GHz dans les capsules, nous les réhydratons avec de l'eau distillée une heure avant l'acquisition. Ensuite, nous plaçons 5 μL de la solution contenant les capsules sur un film mince de titane de 500 nm d'épaisseur, déposé sur 1 mm de silice (SiO_2) par PVD (Physical Vapor Deposition). Pour limiter l'évaporation de l'eau, nous couvrons l'échantillon avec une lamelle couvre-objet en verre transparent. La température ambiante est maintenue à 23 °C sous la température de transition vitreuse du PLGA (39 °C).²⁸ Les capsules sont observées en lumière blanche à travers un objectif 50x comme le montre la figure 2.1(b).

La géométrie de l'échantillon est représentée dans la figure 2.2(a). Afin d'observer l'influence du rapport de forme des capsules sur la propagation acoustique, nous étudions quatre lots de capsules possédant chacun un rapport h/R différent. Les quatre lots de capsules étudiés ($h/R = 1.00, 0.55, 0.35$ et 0.25) sont illustrés sur la figure 2.2(b). Le rapport $h/R = 1.00$ désigne des capsules entièrement composées de PLGA.

2.1.2 Oscillations Brillouin pour une capsule

En se servant du dispositif expérimental présenté dans le chapitre 1, nous focalisons les faisceaux pompe ($\lambda_{\text{pompe}} = 800 \text{ nm}$, 3 pJ) et sonde ($\lambda_{\text{sonde}} = 400 \text{ nm}$, 1.5 pJ) à l'aide d'un objectif 50x (N.A 0.8) à l'interface capsule-titane (Fig. 2.2(a)) en passant à travers la capsule transparente. La tache focale de pompe a un rayon $\chi_{\text{pompe}} \approx 2 \mu\text{m}$ et celle de la sonde un

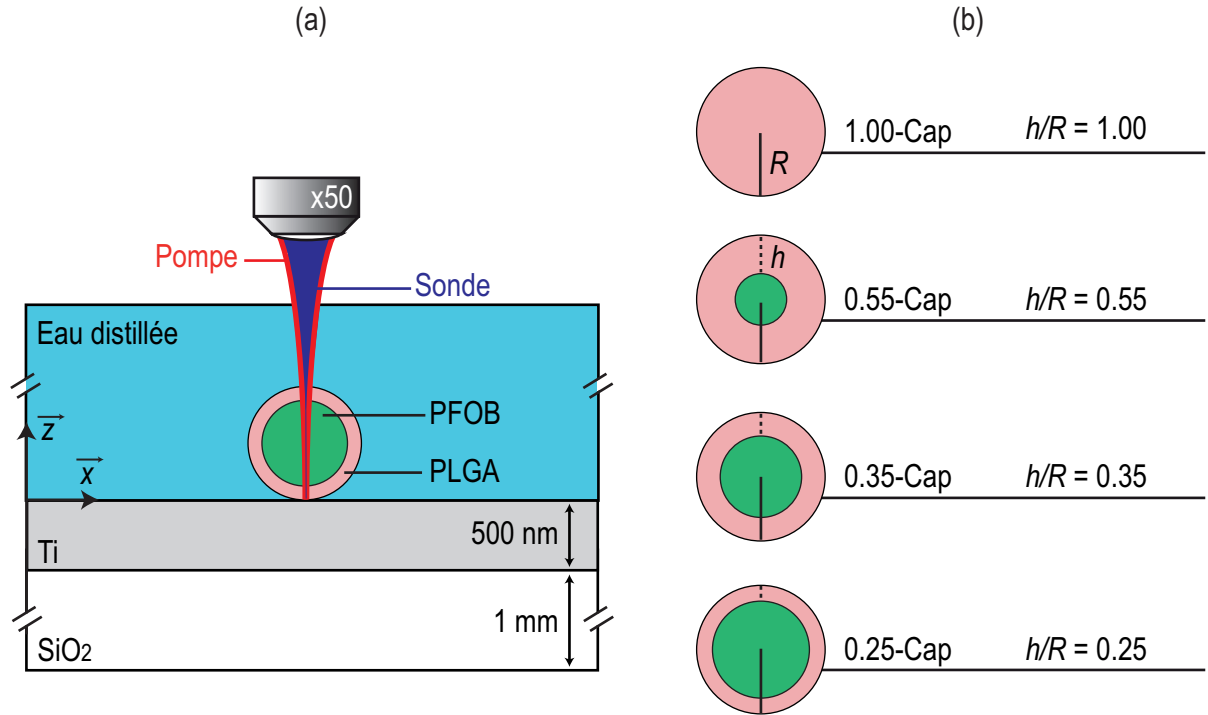


Fig. 2.2 – (a) Configuration expérimentale utilisée pour étudier les propriétés mécaniques des capsules. (b) Types de capsules étudiées.

rayon $\chi_{sonde} \approx 1 \mu\text{m}$ (à $1/e^2$). Suite à l'absorption de la pompe dans le film de titane sur une distance de $\sim 15 \text{ nm}$, la dilatation thermique du métal génère une impulsion acoustique dans le métal. Comme la capsule est en contact avec le titane, une impulsion acoustique est également transmise dans la coquille. L'impulsion acoustique interagit avec le faisceau sonde pénétrant dans la capsule transparente, et produit des oscillations Brillouin. Ces oscillations sont présentées sur la figure 2.3(a) montrant la variation de la réflectivité en fonction du temps dans quatre capsules appartenant chacune à un lot différent. Un polynôme a été soustrait de chaque mesure afin de supprimer la contribution thermique du métal.

Quand la capsule est entièrement constituée de PLGA (lot 1.00-Cap), des oscillations Brillouin de fréquence $f_{cq} = 18 \text{ GHz}$ sont observées (déduite d'après le spectre de Fourier). Ces oscillations, révélant la propagation de l'onde acoustique dans la coquille de PLGA, sont présentes jusqu'à $\sim 1.2 \text{ ns}$ dans le cas du lot 1.00-Cap. En revanche, en sondant des capsules possédant un rapport h/R plus petit, par exemple les lots 0.35-Cap et 0.25-Cap, la contribution du cœur de la capsule peut être identifiée. La figure 2.3(b) montre le spectre de Fourier du signal temporel correspondant à une capsule 0.35-Cap. Nous observons deux pics indiquant une première fréquence $f_{cq} = 18 \text{ GHz}$ produite dans les premières 300 ps, suivie d'une seconde fréquence $f_{cr} = 4 \text{ GHz}$, apparaissant au delà de 300 ps. Ces deux fréquences révèlent la propagation du front acoustique successivement dans le PLGA puis dans le PFOB. Cela est également

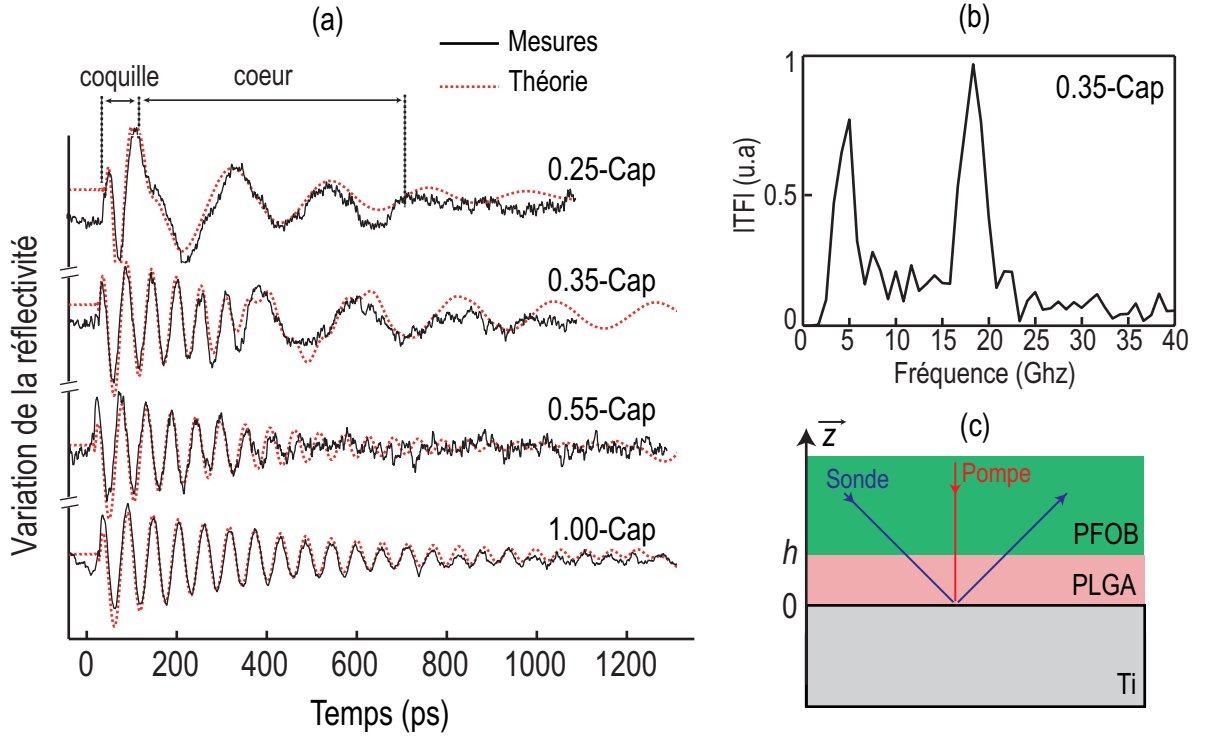


Fig. 2.3 – (a) Variation de la réflectivité en fonction du temps dans les différents types de capsules. (b) Spectre de Fourier du signal temporel obtenu dans une capsule 0.35-Cap. (c) Géométrie de l'échantillon étudié.

visible sur le signal temporel mesuré dans une capsule du lot 0.25-Cap où une transition entre les deux fréquences est observée vers 80 ps. Pour des capsules du lot 0.55-Cap, les oscillations dues au PLGA sont fortement atténuées et ne peuvent être observées que sur les premières 400 ps. La contribution du cœur n'apparaît donc pas. La transition de fréquence observée dans les capsules de PLGA-PFOB suggère ainsi la capacité de la technique d'acoustique picoseconde à mesurer l'épaisseur de la coquille. Pour ce faire, il est nécessaire de déterminer la vitesse des ondes acoustiques dans chaque constituant.

2.2 Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans une capsule

Afin de déterminer les propriétés mécaniques (célérité et atténuation acoustique dans le PLGA et le PFOB) ainsi que l'épaisseur de la coquille dans chaque capsule étudiée, nous nous servons d'un programme développé dans l'équipe permettant de modéliser l'interaction photoélastique dans une capsule.^{28,51} Nous considérons pour cela une couche de PLGA d'épaisseur finie h , placée entre deux milieux semi-infinis de titane et de PFOB, comme illustré dans la figure 2.3(c). La diffusion thermique suite à l'absorption de la pompe dans le titane est décrite

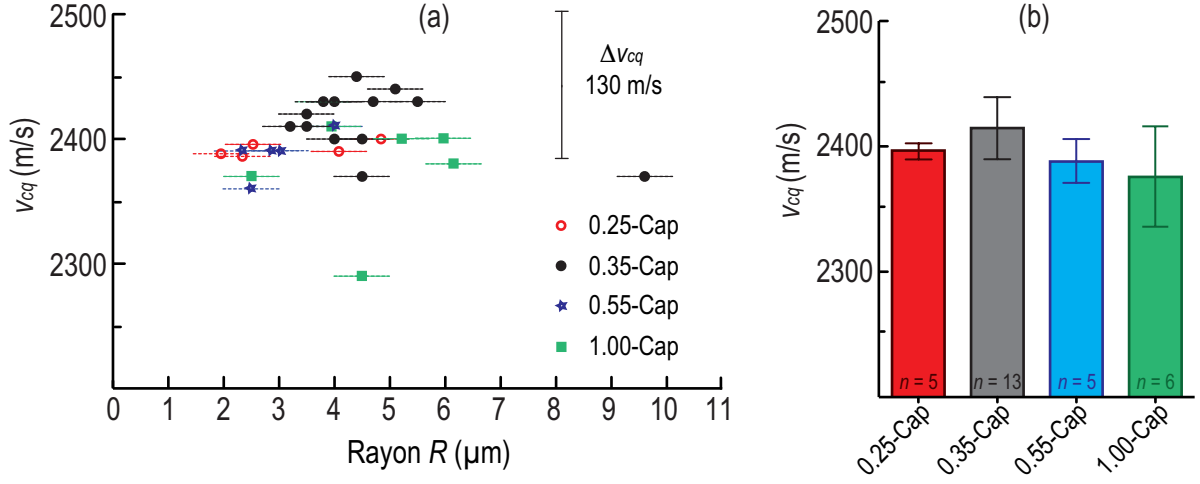


Fig. 2.4 – (a) Variation de la vitesse des ondes acoustiques v_{cq} dans la coquille des 0.25-Cap (points rouges), 0.35-Cap (points noirs) et 0.55-Cap (étoiles bleues) ainsi que dans les 1.00-Cap (triangles verts) en fonction du rayon R . La barre d’erreur à droite indique la précision sur la mesure de v_{cq} . (b) Valeur moyenne de la vitesse des ondes acoustiques v_{cq} en fonction du type des capsules.

par l’équation de Fourier en utilisant les propriétés thermiques du titane massif.⁴⁰ La propagation d’onde acoustique résultant de la source thermique est décrite par une équation 1D (Eq. 1.9 du chapitre 1). La variation relative de la réflectivité (Eq. 1.22 du chapitre 1) est obtenue en résolvant les équations de Maxwell. Elle est tracée dans la figure 2.3(a) en pointillés rouges en ajustant à chaque fois les fréquences f_{cq} et f_{cr} , les atténuations α_{cq} et α_{cr} dans le PLGA et dans le PFOB, respectivement, ainsi que l’épaisseur h de la coquille (pour les capsules présentant une transition en fréquence de f_{cq} à f_{cr}) pour décrire les signaux mesurés. Les vitesses des ondes acoustiques v_{cq} et v_{cr} dans le PLGA et dans le PFOB sont ensuite déduites à partir de f_{cq} et f_{cr} en utilisant l’équation 1.31. Nous considérons pour cela l’indice optique $n_{cq} = 1.5$ dans le PLGA²⁸ et l’indice optique $n_{cr} = 1.3$ dans le PFOB,⁵² pour une longueur d’onde de sonde $\lambda_{sonde} = 400$ nm. Nous mesurons les fréquences f_{cq} et f_{cr} avec une précision de ± 0.5 GHz puisque la fenêtre temporelle de nos signaux est de 1 ns. En différentiant l’équation 1.31, nous trouvons les erreurs Δv_{cq} et Δv_{cr} sur les vitesses des ondes acoustiques dans le PLGA et dans le PLFOB. L’ajustement théorique nous permet donc de déterminer les cinq paramètres v_{cq} , v_{cr} , α_{cq} , α_{cr} et h . Commençons tout d’abord par discuter les valeurs des célérités mesurées.

2.2.1 Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans le PLGA

Plusieurs capsules ont été étudiées dans chaque lot dans le but d’analyser des capsules de différents rayons. Nous avons sondé au total 29 capsules de rayons R compris entre $\sim 2 \mu\text{m}$ et $\sim 6 \mu\text{m}$ réparties sur les 4 lots. Les rayons ont été estimés à $\pm 0.5 \mu\text{m}$ à l’aide des images

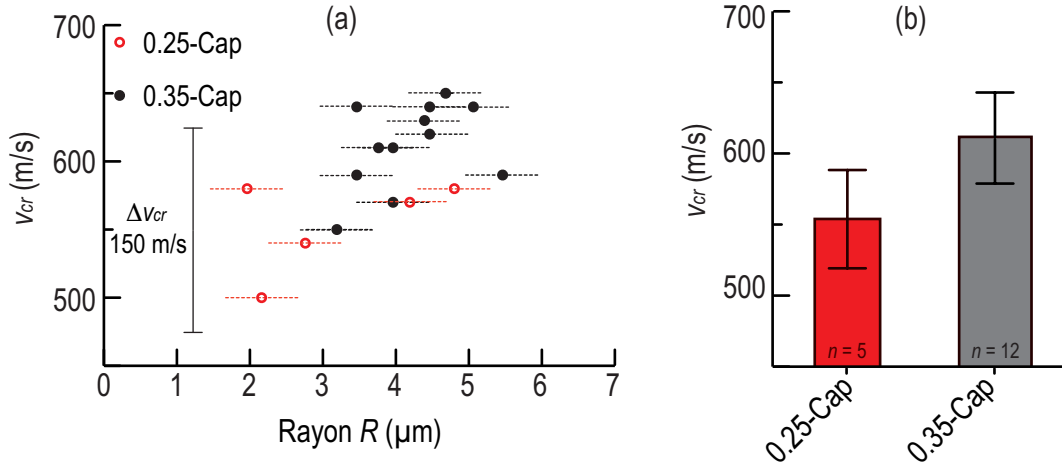


Fig. 2.5 – (a) Variation de la vitesse des ondes acoustiques v_{cr} dans le cœur des 0.25-Cap (points rouges) et 0.35-Cap (points noirs) en fonction du rayon R . (b) Valeur moyenne de la vitesse des ondes acoustiques v_{cr} en fonction du type des capsules.

optiques obtenues en lumière blanche (Fig. 2.1(b)). Notons que dans la plupart des cas, l'erreur sur le rayon de la capsule est surestimée. Nous avons tracé dans la figure 2.4(a) les célérités v_{cq} dans la coquille calculées à l'aide de l'ajustement théorique à partir de f_{cq} dans toutes les capsules sondées. Sur toute la gamme de rayons explorée, nous observons que la variation de la vitesse des ondes acoustiques dans le PLGA en fonction du rayon de la capsule R est très faible. Nous sommes donc capables de déduire une valeur moyenne de la vitesse des ondes acoustiques dans la coquille, $v_{cq} \approx 2400 \text{ m/s}$. En traçant la vitesse moyenne v_{cq} mesurée dans chaque lot de capsules en fonction du rapport h/R (Fig. 2.4(b)), nous observons que la variation de vitesse est toujours inférieure à 5 % ($\pm 25 \text{ m/s}$ en moyenne). Cette valeur est similaire à celle trouvée par Parker *et al.* à 10 MHz.⁵³ Par conséquent, ni le rayon de la capsule, ni la variation du rapport h/R n'affectent la vitesse des ondes acoustiques dans le PLGA. Dans la suite de ce chapitre, nous considérons que la vitesse des ondes acoustiques dans le PLGA est toujours égale à $v_{cq} = 2400 \text{ m/s}$. Passons maintenant aux mesures de la vitesse des ondes acoustiques dans le PFOB v_{cr} .

2.2.2 Vitesse de propagation des ondes acoustiques dans le PFOB

La mesure de la vitesse des ondes acoustiques dans le cœur de la capsule v_{cr} n'est possible que pour les capsules appartenant aux lots 0.25-Cap et 0.35-Cap, les oscillations Brillouin à $f_{cr} = 4 \text{ GHz}$ étant absentes pour les autres lots (1.00-Cap et 0.55-Cap) (Fig. 2.3). La vitesse des ondes acoustiques dans le PFOB v_{cr} est obtenue de la même manière que la vitesse dans le PLGA v_{cq} et est tracée sur la figure 2.5(a) en fonction du rayon de la capsule. La figure

2.5(b) montre la variation de la vitesse moyenne des ondes acoustiques v_{cr} dans le cœur dans ces deux lots analysés. Une augmentation de 50 m/s est observée entre la vitesse moyenne v_{cr} pour les capsules appartenant au lot 0.25-Cap et pour celles appartenant au lot 0.35-Cap. Cette variation de vitesse n'est pas significative parce que la précision de la mesure de v_{cr} obtenue en différentiant l'équation 1.31 est de 150 m/s. Cependant, la vitesse des ondes acoustiques dans le PFOB a été mesurée à 10 MHz à 600 m/s par Marsh *et al.*⁵⁴ et correspond à une valeur très proche de notre mesure. Nous considérons donc que la vitesse dans le cœur n'est pas affectée par la fabrication des capsules et qu'elle est également $v_{cr} = 600$ m/s.²⁸

Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent la capacité de l'acoustique picoseconde à mesurer la vitesse de propagation des ondes acoustiques simultanément dans les deux compartiments de la capsule.

2.3 Détermination du rapport h/R

Nous avons mesuré les vitesses des ondes acoustiques dans la coquille et dans le cœur. Nous pouvons maintenant déterminer l'épaisseur des coquilles pour les capsules où une transition entre les fréquences f_{cq} et f_{cr} est observée (lots 0.25-Cap et 0.35-Cap). Pour chaque capsule, nous considérons la vitesse v_{cq} qui lui est correspondante. Ensuite, nous ajustons dans le modèle théorique l'épaisseur h pour décrire le temps pour lequel la transition entre la contribution à $f_{cq} = 18$ GHz et celle à $f_{cr} = 4$ GHz a eu lieu. Notons que la valeur obtenue ne dépend pas de la célérité dans le cœur, mais uniquement de la célérité dans la coquille. Nous avons tracé h en fonction du rayon R pour les lots 0.25-Cap et 0.35-Cap respectivement sur les figures 2.6(a) et 2.6(b). L'erreur sur h est estimée à l'œil en faisant varier les paramètres et en observant l'écart sur l'ajustement théorique.

Sur ces figures, nous indiquons par une aire grisée le rapport h/R prédit par la calibration chimique.⁴⁷ Nous remarquons que les mesures réalisées dans les lots 0.25-Cap et 0.35-Cap se trouvent dans le domaine prédit, indiquant que les épaisseurs h déterminées à l'aide des oscillations Brillouin dans la coquille sont cohérentes avec la prédiction chimique. La dispersion des mesures autour de la valeur moyenne est comparable à celle obtenue par Mousnier *et al.*⁵⁵ Ceci permet de s'assurer de la fiabilité de nos mesures.

2.4 Rhéologie de la coquille

Dans le but de décrire la rhéologie du PLGA, il est nécessaire d'analyser la dépendance en fréquence de l'atténuation α_{cq} . Pour cela, nous avons réalisé des mesures de réflectivité sur du

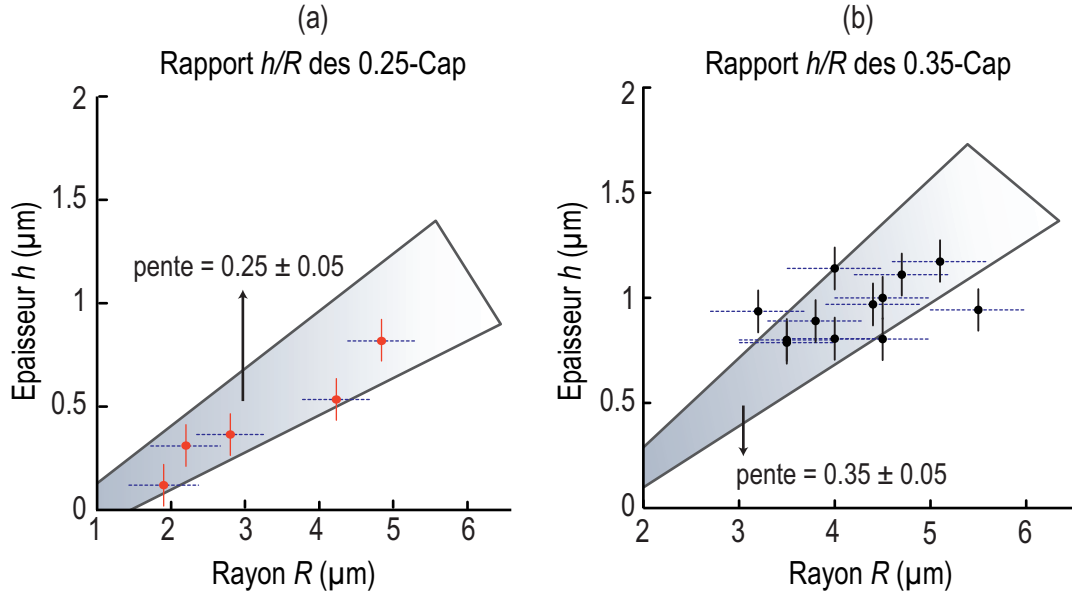


Fig. 2.6 – (a) Variation de l'épaisseur h en fonction du rayon R de la capsule dans les 0.25-Cap, mesurée expérimentalement (points rouges) et prédite par la calibration chimique (aire grisée). (b) Variation de l'épaisseur h en fonction du rayon R de la capsule dans les 0.35-Cap, mesurée expérimentalement (points noirs) et prédite par la calibration chimique (aire grisée).

PLGA massif en doublant la longueur d'onde optique de la sonde. Ainsi, en changeant λ_{sonde} de 400 nm à 800 nm, nous décalons la fréquence des oscillations Brillouin dans le PLGA de 18 GHz à 9 GHz (Eq. 1.31) et nous avons accès à l'atténuation sur une gamme de fréquences plus large.

La figure 2.7(a) montre les oscillations Brillouin mesurées (points) dans le PLGA massif à 9 GHz et dans une bille de PLGA (lot 1.00-Cap) à 18 GHz en fonction du temps. L'ajustement théorique (trait plein) permet d'extraire l'atténuation des oscillations Brillouin α_{cq} . Ainsi, nous trouvons dans le PLGA massif une atténuation $\alpha_{cq} \sim 0.77 \pm 0.2 \mu\text{m}^{-1}$ à 9 GHz. Comparons cette valeur avec celles trouvées dans le PLGA massif à 10 MHz⁵³ et à 18 GHz.²⁸

La figure 2.7(b) montre la variation de l'atténuation α_{cq} dans le PLGA en fonction de la fréquence. Les deux points bleus sont issus des mesures à 9 GHz et à 18 GHz, tandis que le point rouge correspond à la valeur de l'atténuation mesurée par Parker *et al.* dans du PLGA massif à 10 MHz.⁵³ Nous observons que ces 3 points de mesure passent par une droite de pente 1.2, indiquant une faible dépendance en fréquence de α_{cq} . Un tel comportement peut être décrit par le modèle de Gilroy-Philips, également employé pour décrire la rhéologie du polystyrène au GHz.⁵⁶ Pour des fréquences $\ll 100$ GHz, ce modèle prédit une atténuation $\alpha_{cq} \propto f_{cq}^{(1+q)}$.⁵⁷ Dans le PLGA, nous trouvons $q = 0.2$,²⁸ valeur typique pour les verres mous⁵⁶ (Fig. 2.7(b)). Ceci suggère que le PLGA se comporte comme un verre mou, ce qui en fait un bon candidat pour mimer les propriétés rhéologiques de cellules⁵⁸ à haute fréquence d'oscillation.

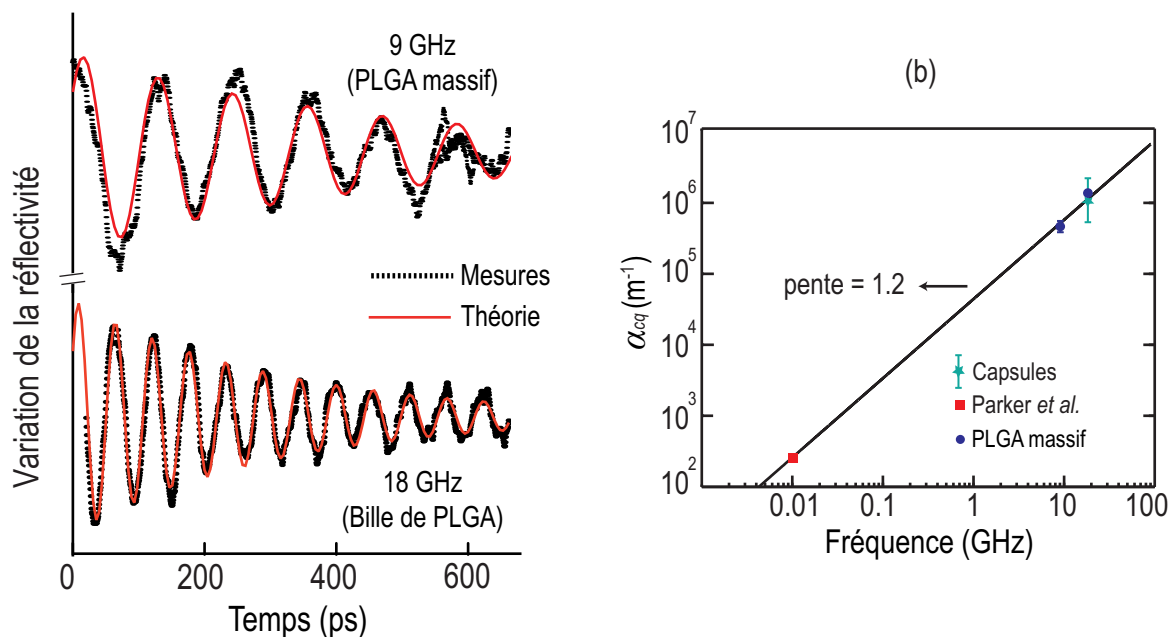


Fig. 2.7 – (a) Oscillations Brillouin à 9 GHz observées dans le PLGA massif et à 18 GHz détectées dans une 1.00-Cap. (b) Variation de l'atténuation α_{cq} dans le PLGA en fonction de la fréquence acoustique f .

Ensuite, nous avons mesuré la valeur moyenne de l'atténuation dans les billes de PLGA (lot 1.00-Cap) à 18 GHz, $\alpha_{cq} \approx 1.2 \pm 0.4 \mu m^{-1}$ grâce à l'ajustement théorique (Fig. 2.7(a)). Nous avons reporté ce point sur la figure 2.7(b)) (triangle vert). La valeur moyenne passe par la droite, indiquant que l'atténuation dans la bille ne diffère pas de celle du PLGA massif. Cela suggère que les effets de géométrie sont négligeables, et montre que la mesure de l'atténuation dans de tels systèmes sphériques est fiable.

Nous avons également mesuré les atténuations dans les coquilles des lots 0.25-Cap, 0.35-Cap et 0.55-Cap. Elles sont tracées sur la figure 2.8(a) avec l'erreur estimée à l'œil en faisant varier les paramètres et en observant l'écart sur l'ajustement théorique. La mesure de l'atténuation dans les coquilles des capsules de ces lots montre une diminution de α_{cq} en fonction du rayon de la capsule^e. La figure 2.8(b) montre α_{cq} pour chaque lot. Une variation de la valeur moyenne de α_{cq} ainsi que de son écart-type en fonction du rapport h/R est observée. Les épaisseurs de coquille sont comprises entre 1 μm et 100 nm. Pour ces épaisseurs, il a été montré qu'il n'y a pas de confinement des chaînes de polymères.²⁸ Cette variation de α_{cq} d'une capsule à une autre au sein d'un même lot (écart-type > 50 % dans le lot 0.55-Cap par exemple), ainsi que d'un lot à un autre ne peut pas être expliquée par le confinement. En revanche, elle peut être attribuée au

e. L'atténuation a été mesurée dans 2 des 5 coquilles du lot 0.25-Cap à cause du faible nombre d'oscillations Brillouin empêchant la mesure d'une atténuation dans les 3 autres coquilles.

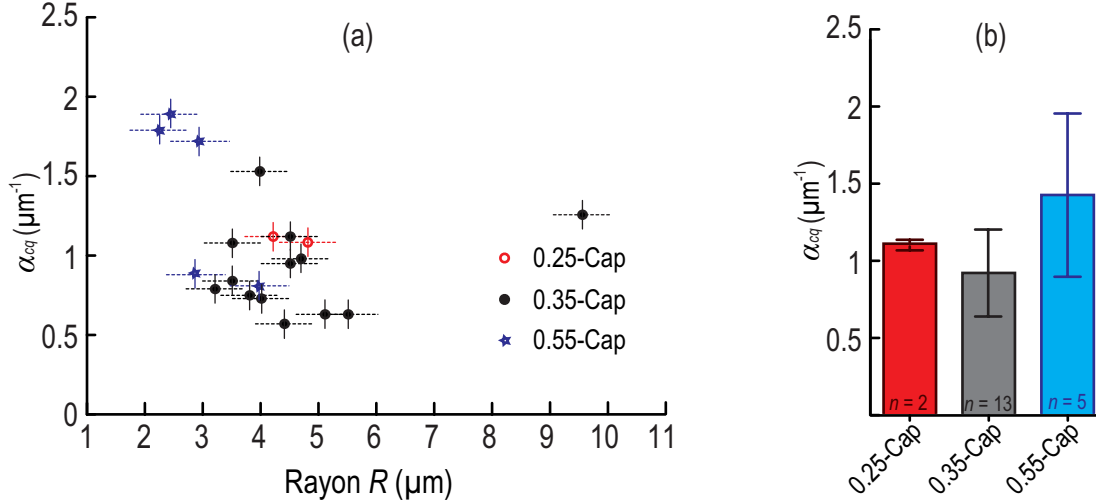


Fig. 2.8 – (a) Variation de l'atténuation α_{cq} dans les coquilles de PLGA en fonction du rayon de la capsule R . (b) Variation de l'atténuation α_{cq} dans les coquilles de PLGA en fonction du rapport h/R .

contact partiel de chaque capsule avec le substrat de titane.²⁸ Ce contact, pouvant dépendre du rayon R et du rapport h/R , est discuté dans le paragraphe suivant.

La détermination de l'atténuation dans la coquille a permis de décrire la rhéologie du PLGA. La loi de comportement de ce polymère, très proche de celle attendue dans les cellules biologiques, servira par la suite de modèle pour décrire la rhéologie cellulaire au GHz. Dans la dernière section de ce chapitre, nous étudions l'atténuation α_{cr} dans le PFOB et discutons une éventuelle corrélation entre l'atténuation mesurée et le contact capsule-titane.

2.5 Adhésion et rayon de contact R_c d'une capsule

Dans les lots 0.25-Cap et 0.35-Cap, où la contribution à 4 GHz du cœur de la capsule est visible, le temps de vie de l'oscillation Brillouin nous donne accès à l'atténuation α_{cr} dans le PFOB. La figure 2.9(a) montre l'ajustement théorique des oscillations Brillouin observées dans le PFOB d'une capsule du lot 0.25-Cap et d'une autre du lot 0.35-Cap. Les valeurs de α_{cr} mesurées dans ces deux cas ($3 \mu\text{m}^{-1}$ et $5.3 \mu\text{m}^{-1}$) sont supérieures à l'atténuation dans le PFOB prédite par la littérature, $\alpha_{PFOB} = 1.6 \mu\text{m}^{-1}$ ^{28,52 f}. Comme les paramètres variables d'une capsule à l'autre sont l'épaisseur de sa coquille h et son rayon R , nous proposons donc de regarder la variation de l'atténuation mesurée dans le cœur en fonction du rapport R/h dans chaque capsule. Pour cela, le rapport R/h est déduit à partir de h , déterminé à l'aide de l'ajustement théorique comme expliqué dans la section 2.3, et de R mesuré optiquement à l'aide des images

f. L'atténuation $\alpha_{PFOB} = 1.6 \mu\text{m}^{-1}$ dans le PFOB a été mesurée à 18 GHz, donnant une viscosité longitudinale de $1.2 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$,²⁸ similaire à celle mesurée à 10 MHz par analogie avec le modèle de Kelvin-Voigt.⁵²

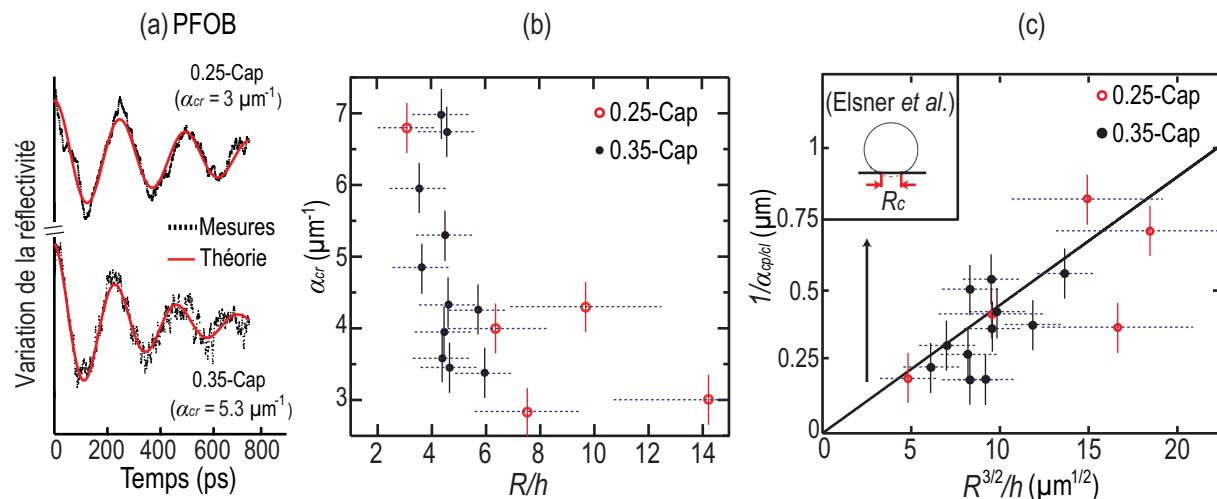


Fig. 2.9 – (a) Oscillations Brillouin dans le cœur d'une 0.25-Cap et d'une 0.35-Cap. (b) Variation de l'atténuation dans le cœur α_{cr} en fonction de R/h . (c) Variation du rayon de contact R_c en fonction de $\sqrt{R}(R/h)$. L'encart représente le contact d'une sphère avec un substrat rigide d'après Elsner *et al.*⁵⁹

en lumière blanche. Ainsi, nous traçons α_{cr} en fonction du rapport R/h sur la figure 2.9(b). Nous apercevons que les valeurs de α_{cr} varient en fonction du rapport R/h de la capsule, suggérant une corrélation entre α_{cr} , le rayon R et l'épaisseur h de la coquille.

Pour expliquer cette corrélation, considérons que la source acoustique dans la capsule est la zone de contact entre la capsule et le titane. Puisque la capsule est sphérique, cette zone est un disque de rayon R_c (Fig. 2.9(c)). Cela revient donc à considérer le rayonnement acoustique d'un disque plan de rayon R_c . Dans ce cas, la limite du champ proche est $R_c^2 f_{cr}/v_{cr}$. Au delà de cette région, le rayonnement acoustique décroît plus rapidement à cause de la diffraction. En considérant que l'atténuation mesurée dans le PFOB est la somme de l'atténuation provenant de la propagation en champ lointain $\alpha_{cp/cl}$ et de l'atténuation dans le PFOB α_{PFOB} ,

$$\alpha_{cr} = \alpha_{cp/cl} + \alpha_{PFOB} \quad (2.1)$$

nous pouvons remonter à $\alpha_{cp/cl}$ par une simple soustraction $\alpha_{cp/cl} = \alpha_{cr} - \alpha_{PFOB}$. Examinons s'il existe une corrélation entre $\alpha_{cp/cl}$ et le rayon de contact R_c . Pour ce faire, il est nécessaire de considérer un modèle théorique exprimant le rayon de contact d'une capsule en fonction de son rayon ainsi que de l'épaisseur de sa coquille.

Elsner *et al.* ont étudié l'adhésion de capsules vides de rayons R compris entre $5 \mu\text{m}$ et $50 \mu\text{m}$, et dont les coquilles, d'épaisseurs h , sont constituées de multicouches de polymères ioniques.⁵⁹ Pour de faibles déformations, ils ont prédit une dépendance en $R^{3/2}/h$ du rayon de contact R_c ⁵⁹ :

$$R_c = \sqrt{\frac{2\sqrt{12}\pi R^3 W_a}{E h^2}} \quad (2.2)$$

où W_a est l'énergie d'adhésion par unité de surface et E le module de Young du matériau constituant la coquille de la capsule.

Nous avons reporté sur la figure 2.9(c) les valeurs expérimentales (points rouges pour le lot 0.25-Cap et noirs pour le lot 0.35-Cap) de l'inverse de $\alpha_{cp/cl}$ en fonction de $R^{3/2}/h$ en considérant $\alpha_{PFOB} = 1.6 \mu m^{-1}$. Une augmentation de $1/\alpha_{cp/cl}$ en fonction de $R^{3/2}/h$ est observée. En évaluant l'équation 2.2 pour un module de Young du PLGA $E \approx 0.7 \text{ GPa}$ ⁶⁰ et une énergie d'adhésion $W_a = 0.065 \text{ J.m}^{-2}$ égale à l'énergie de Dupré typique d'un système verre-métal,⁶¹ nous traçons sur la figure 2.9(c) R_c en fonction de $R^{3/2}/h$.

Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation entre α_{cr} et R_c . Le bon accord entre notre estimation de $1/\alpha_{cp/cl}$ et le modèle de Elsner *et al.* décrivant une capsule vide pour des paramètres physiques raisonnables suggère que le contact des capsules n'est pas influencé par la présence du cœur liquide. Cette analyse doit être approfondie en étudiant le lien exact entre $\alpha_{cp/cl}$ et R_c , et en incluant le cœur dans la modélisation du contact.

2.6 Conclusion

L'objet de ce chapitre était la caractérisation par acoustique picoseconde d'objets mous micrométriques mimant les cellules par leurs propriétés mécaniques. Pour cela nous avons choisi d'étudier des microcapsules sphériques composées d'une coquille biodégradable de verre polymérique, le PLGA, encapsulant un cœur formé d'un liquide perfluoré, le PFOB. Après avoir présenté la méthode de préparation de ces échantillons ainsi que les quatre lots de capsules de rapports h/R différents, nous avons décrit la configuration expérimentale employée pour mesurer les propriétés mécaniques de ces capsules à travers les oscillations Brillouin.

L'ajustement théorique des oscillations observées dans chaque capsule nous a permis de déterminer dans un premier temps la vitesse des ondes acoustiques dans la coquille v_{cq} et dans le cœur v_{cr} . Les résultats issus de 29 capsules ont montré que la vitesse v_{cq} ne dépend ni du rayon de la capsule ni de la variation du rapport h/R . Ensuite, nous avons déterminé l'épaisseur des coquilles des capsules montrant une transition en fréquence dans les oscillations Brillouin de f_{cq} à f_{cr} . Nos mesures ont montré que les épaisseurs h déterminées à l'aide des oscillations Brillouin dans la coquille sont cohérentes avec la prédiction chimique. De plus, nous avons déterminé l'atténuation dans le PLGA à deux fréquences différentes. Cela a permis de décrire la loi de

comportement de ce polymère qui nous servira par la suite de modèle rhéologique des cellules au GHz.

Nous avons enfin mesuré l'atténuation α_{cr} dans le cœur des lots 0.25-Cap et 0.35-Cap. L'observation d'une diminution de α_{cr} en fonction de R/h révèle l'effet de la diffraction provenant de la propagation en champ lointain. En reliant cette décroissance au rayon de contact R_c de la capsule avec le titane, nous sommes parvenus à obtenir un bon accord entre les résultats expérimentaux et la théorie de contact prédite par Elsner *et al.*⁵⁹ Cet accord accrédite l'existence d'une corrélation entre l'atténuation des oscillations Brillouin et le contact capsule-métal. Cependant, l'étude du nanocontact à l'aide des oscillations Brillouin reste à approfondir dans de futurs travaux.

Après avoir caractérisé les propriétés mécaniques des capsules biomimétiques, la suite de ce manuscrit sera dédiée à l'étude des propriétés mécaniques d'une cellule animale par acoustique picoseconde.

Conclusion de la première partie

Dans cette première partie du manuscrit, une caractérisation des propriétés mécaniques de microcapsules synthétiques biomimétiques a été réalisée par acoustique picoseconde. Dans le but d'appliquer cette technique ultrasonore à l'étude de la mécanique de structures complexes comme les cellules, il a été nécessaire dans un premier temps d'introduire ses principes en soulignant ses principales caractéristiques, puis de l'employer pour comprendre la mécanique de systèmes biomimétiques simples avant de passer aux cellules. Cette démarche s'est articulée autour de deux chapitres.

Dans le premier chapitre, les principes physiques de l'acoustique picoseconde ont été présentés. Le dispositif pompe-sonde synchrone couramment employé pour générer et détecter des ondes acoustiques à des fréquences allant jusqu'au THz a tout d'abord été introduit. En exposant les mécanismes responsables de la génération de ces ondes, nous avons présenté les équations de base permettant de modéliser ce phénomène à travers le couplage photo-élastique. Nous avons ensuite décrit la modélisation de la détection de ces ondes par effet élasto-optique. Ainsi, nous avons mis en place le bagage théorique nécessaire pour la modélisation des expériences d'acoustique picoseconde. De plus, la présentation d'un signal acoustique dans un milieu opaque et d'un autre dans un milieu transparent a illustré les signaux auxquels nous serons confrontés dans la suite de ce travail et qui nous permettront de caractériser les propriétés mécaniques de nos échantillons.

Les principales caractéristiques de l'acoustique picoseconde ont été mises en évidence. Ces caractéristiques se résument par une capacité à sonder, d'une manière non-invasive et sans contact, les propriétés mécaniques, optiques, thermiques ou électriques de nanostructures ainsi que des interfaces de milieux formés de multicouches nanométriques. En s'appuyant sur ces potentialités et sur l'étude d'objets biomimétiques initiée récemment par l'équipe bordelaise dans la matière vivante, nous avons employé cette technique pour caractériser, dans le chapitre 2, la mécanique de microcapsules sphériques biomimétiques au GHz. Nous avons ainsi été capables de mesurer la vitesse et l'atténuation des ondes acoustiques, ainsi que l'épaisseur sub-micronique de films viscoélastiques dans des systèmes multicouches micrométriques en milieu liquide. Une

analyse de l'atténuation acoustique mesurée dans une couche mince de polymères a permis de trouver un modèle rhéologique décrivant le comportement des verres mous au GHz. Ce modèle nous sera par la suite utile pour l'étude de la rhéologie des cellules à ces fréquences.

Enfin, nous avons montré dans cette partie la possibilité de sonder le nanocontact entre une capsule composée d'une coquille encapsulant un cœur et une surface rigide au travers de la diffraction acoustique. En effet, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'atténuation acoustique dans le cœur provenant du passage de l'onde acoustique en champ lointain et le rayon de contact de la capsule. Cette corrélation peut de plus expliquer les variations d'atténuation observées dans les coquilles des capsules. Nous avons observé que, si la valeur moyenne de α_{cq} reste constante, l'écart-type augmente avec h/R . Cela peut s'expliquer par le fait que la passage du champ proche en champ lointain s'effectue dans la coquille. Il serait donc intéressant de se servir aussi de l'atténuation dans la coquille pour avoir une information plus complète et plus précise sur le contact. Il ne reste pas moins évident, en vue de cette analyse, que des modèles simples d'adhésion de type JKR (Johnson-Kendall-Roberts) ne peuvent pas représenter le nanocontact de capsules micrométriques à coquilles au GHz puisqu'ils ne prennent pas en compte l'influence de la coquille.

Pour conclure, nous avons introduit dans cette partie la technique d'acoustique picoseconde, l'instrument de mesure que nous utiliserons tout au long de ce travail pour étudier l'acoustique de la matière vivante et mesurer ses propriétés mécaniques. Pour cela, nous avons mis en place les outils d'analyse mathématiques qui nous serviront pour la modélisation nos résultats expérimentaux. Nous avons ensuite montré l'intérêt de sonder la matière vivante, en particulier une cellule, au moyen d'ondes acoustiques GHz. Comme les cellules présentent des structures complexes et difficiles à analyser, des microcapsules biomimétiques ont été employées pour une étude amont, afin de simuler la mécanique de la cellule au GHz. A travers cette étude, nous sommes parvenus à mesurer les propriétés mécaniques de multicouches viscoélastiques micrométriques (vitesse des ondes acoustiques, atténuation acoustique, épaisseur). De plus, nous avons identifié un modèle rhéologique pouvant par la suite être appliqué aux cellules. Par ailleurs, nous avons révélé une influence de l'adhésion sur l'atténuation acoustique. Une fois maîtrisée par de futurs travaux, cette caractéristique des ondes acoustiques permettra d'étudier le contact de micro-objets ainsi que l'adhésion cellulaire. Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous passons à l'étude des propriétés mécaniques et de l'adhésion de cellules animales présentant des formes géométriques similaires à celles des objets biomimétiques.

Deuxième partie

Adhésion de cellules animales modèles

Introduction

La capacité des cellules biologiques à répondre aux signaux mécaniques provenant de leur environnement joue un rôle très important et fondamental dans plusieurs processus biologiques comme la migration, la différenciation et la formation des tissus.^{62–65} En 1917, dans son traité « *On growth and form* », D’Arcy Thompson a décrit la morphogenèse par un modèle mécanique incluant les forces physiques mises en jeu et les mouvements cellulaires.⁶⁶ Des études très récentes ont éclairé le rôle des forces mécaniques dans l’organisation interne⁶⁷ et dans les formes des cellules.⁶⁸ En particulier, le phénomène d’adhésion cellulaire a attiré l’attention des biologistes depuis environ un siècle.

Pendant leur communication avec l’environnement, les cellules adhèrent à leur support et entre elles en se servant de leur cytosquelette pour assurer l’échange de forces mécaniques cellule-environnement. Cependant, les mécanismes précis qui dictent la réponse des cellules aux changements mécaniques qu’elles ressentent demeurent incertains, d’autant plus que les propriétés mécaniques de la cellule elle-même, en particulier du noyau, sont mal connues. Ce processus mécanique d’interaction cellule-environnement, appelé mécanotransduction, est un acteur principal dans le fonctionnement cellulaire.^{67,69} Afin d’arriver à déterminer ces mécanismes, il est donc nécessaire de sonder la mécanique de la cellule et de l’interface cellule-substrat avec une résolution sub-cellulaire. Pour cela, il faut mettre en place de nouvelles techniques ayant la faculté d’évaluer les interactions mécaniques mises en jeu pendant le processus d’adhésion cellulaire. Plusieurs approches permettent actuellement de mesurer l’adhésion à l’échelle d’une cellule individuelle. Cependant, ces méthodes de mesure présentent plusieurs limitations qui peuvent masquer des informations indispensables à la compréhension du phénomène d’adhésion. Il est donc nécessaire d’utiliser une technique alternative.

Depuis sa découverte en 1984, l’acoustique picoseconde était traditionnellement orientée vers le contrôle non destructif et l’investigation des solides nanométriques.^{13,70,71} Cette technique opto-acoustique offre une résolution latérale micrométrique dictée par le diamètre du faisceau sonde et une résolution nanométrique en profondeur grâce aux hautes fréquences acoustiques accessibles, allant jusqu’au THz. Ces résolutions sont particulièrement adaptées à l’imagerie à

l'échelle sub-cellulaire. C'est pour cette raison qu'en 2007, l'équipe Ultrasons Laser a commencé à étudier les propriétés mécaniques d'une cellule végétale à l'aide de l'acoustique picoseconde, donnant ainsi naissance à la biophononique.¹⁵ Afin de mieux comprendre la dynamique GHz de ces milieux complexes, l'équipe s'est également investie dans l'étude de systèmes biomimétiques, comme par exemple les microcapsules sphériques de PLGA et PFOB présentées dans le chapitre 2 de ce manuscrit.²⁸ Ces travaux ont démontré que l'acoustique picoseconde est adaptée à l'étude de la mécanique d'une cellule biologique.

De plus, il a été montré que cette technique permet d'évaluer le contact entre films minces⁷² et entre nanoparticules,^{25,73} voire entre une sphère viscoélastique et un film métallique.²⁸ Pour aller plus loin dans l'étude des propriétés mécaniques d'une cellule, le but de ce travail est d'utiliser cette capacité de l'acoustique picoseconde pour étudier l'adhésion cellule-substrat à l'aide d'ondes acoustiques GHz. Ainsi, dans cette deuxième partie nous présenterons :

- les principaux mécanismes et structures cellulaires impliqués dans l'adhésion,
- la manipulation d'objets cellulaires simples dans un premier temps dans le but d'évaluer leur adhésion grâce à l'acoustique picoseconde,
- la réalisation d'un échantillonnage spatial 1D le long d'une ligne à l'interface cellule-substrat,
- la mise en place des outils d'analyse nécessaires pour le traitement du signal acoustique mesuré,
- un modèle théorique du contact cellule-substrat.

Cette partie sera organisée en deux chapitres. Afin de situer le contexte biologique de ce travail, le chapitre 3 sera consacré à l'introduction du processus d'adhésion cellulaire. Ce bref aperçu présentera une synthèse des mécanismes physiques, des interactions et des échanges mécaniques se produisant entre la cellule et l'environnement. En évoquant dans un premier temps le rôle crucial que joue l'adhésion dans le maintien du fonctionnement de la cellule, la nécessité d'étudier ce processus biologique sera révélée. Afin d'illustrer le processus d'adhésion et l'adaptation continue du cytosquelette à ce changement, un processus biologique modèle, la migration d'une cellule, sera présenté. Enfin, les techniques classiques de mesure d'adhésion cellulaire seront exposées. L'intérêt de mesurer l'adhésion cellulaire au travers d'ondes acoustiques GHz sera également discuté.

La mesure de l'impédance d'une cellule animale et de l'adhésion cellule-substrat sera ensuite exposée dans le chapitre 4 de ce mémoire. L'échantillon sur lequel les expériences ont été menées

sera présenté. Ensuite, après avoir parlé du biotransducteur adapté à l'application de l'acoustique picoseconde pour l'étude du contact cellule-substrat, les premières mesures du coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule seront effectuées le long d'une ligne passant par la cellule. A l'aide d'un traitement de signal dédié, la qualité de l'adhésion entre une cellule animale et un biomatériau sera enfin quantifiée. L'impédance acoustique obtenue donnera de plus accès à la densité ou à la rigidité des cellules animales sondées.

Chapitre 3

Adhésion cellulaire : réponse de la cellule à son environnement

Depuis quelques années, l'acoustique picoseconde est développée en vue de son application à la biologie cellulaire. En mesurant les propriétés mécaniques de cellules individuelles à des fréquences acoustiques de l'ordre du GHz, l'équipe bordelaise Ultrasons Laser parvient à les étudier d'une manière non-invasive. Ceci met la technique d'acoustique picoseconde sur la voie de l'imagerie cellulaire. Cette imagerie, dont la résolution serait nanométrique (grâce aux longueurs d'ondes acoustiques utilisées) est d'un grand intérêt pour la compréhension de la mécanique à l'échelle de la cellule unique.

Il est aujourd'hui établi que les facteurs mécaniques externes à la cellule, comme la rigidité et la géométrie de son environnement, ont une influence cruciale sur la forme et le fonctionnement de la cellule.⁶⁴ Les processus cellulaires médiés par les activités enzymatiques et les taux de réactions ont été beaucoup étudiés d'un point de vue chimique.⁷⁴ Cependant, l'étude de la mécanique cellulaire et des forces appliquées sur les cellules, qui affectent également de nombreux mécanismes cellulaires, est un domaine de recherche actuellement en pleine émergence.⁷⁵ Un des processus cellulaires dans lequel la mécanique de la cellule est clairement révélée est l'adhésion. Nous allons l'illustrer dans ce chapitre.

Premièrement, nous présentons dans ce chapitre le rôle de l'adhésion cellulaire dans le développement et le maintien des fonctions cellulaires. Ensuite, le principe de ce processus est introduit d'une manière générale. Pour cela, le rôle du cytosquelette, qui est la structure cellulaire principale impliquée dans l'adhésion, est exposé. Deuxièmement, les différents types d'adhésion sont abordés et les interactions cellule-substrat sont détaillés. Ceci est illustré dans le cas de la migration où la dynamique et les différentes formes que peuvent acquérir les structures cellulaires sont particulièrement instructives. Les techniques de mesure d'adhésion couramment utilisées

sont enfin présentées et l'intérêt d'utiliser l'acoustique picoseconde pour étudier l'adhésion est discuté.

3.1 L'adhésion cellulaire et son rôle dans le fonctionnement de la cellule

Durant leur cycle de vie, les cellules communiquent avec leur environnement et entre elles. Cet échange d'information est indispensable pour le maintien de leur fonctionnement. Il peut s'effectuer suivant une variété de voies de communication. L'adhésion cellulaire constitue une de ces voies à travers laquelle la communication entre la cellule et son environnement se fait par contact. Elle joue un rôle important dans la migration, la différenciation et la prolifération des cellules.⁷⁶ Pour adhérer avec le milieu qui l'entoure et/ou avec d'autres cellules voisines, une cellule met en œuvre un ensemble complexe d'interactions mécaniques. Comprendre les mécanismes mis en jeu est aujourd'hui un axe de recherche en pleine émergence. De plus, il a été démontré qu'un dysfonctionnement dans l'attachement des cellules peut être impliqué dans le développement du cancer,⁷⁷ ainsi que dans par exemple, l'athérosclérose.⁷⁸ Ajoutons qu'une mauvaise adhésion peut entraîner un détachement de la cellule et donc sa mort.⁷⁹ Par ailleurs, la maîtrise du processus d'adhésion cellulaire est d'une importance capitale en biotechnologie, typiquement pour la fabrication et l'optimisation d'implants, de prothèses et de biomatériaux.⁸⁰ Un des acteurs principaux de l'adhésion est le cytosquelette.

3.1.1 Le cytosquelette et l'adhésion cellulaire

Le cytosquelette joue un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire.⁸⁴ Il est la structure de base qui donne à la cellule sa forme et l'aide à maintenir son organisation interne. Il offre le support mécanique nécessaire pour qu'elle puisse exercer ses fonctions essentielles, se diviser et se mouvoir. Il est principalement constitué de trois éléments qui diffèrent dans leurs compositions et leurs tailles : les microtubules, les filaments d'actine, et les filaments intermédiaires^a. Parmi ces trois types de structures, les microtubules sont des tubes rigides d'un diamètre d'environ 25 nm. Ce sont les plus épais et ils ont une longueur moyenne de 25 μ m. Les filaments d'actine sont les plus fins et possèdent un diamètre d'environ 6 nm, tandis que les filaments intermédiaires ont, comme leur nom l'indique, un diamètre intermédiaire d'environ 10 nm. Les filaments d'actine sont beaucoup moins rigides que les microtubules. Cependant, la présence de nombreuses liaisons entre ces filaments crée un réseau très rigide,⁸⁴ qui joue un rôle majeur dans les processus

a. Les filaments intermédiaires existent uniquement chez les mammifères.

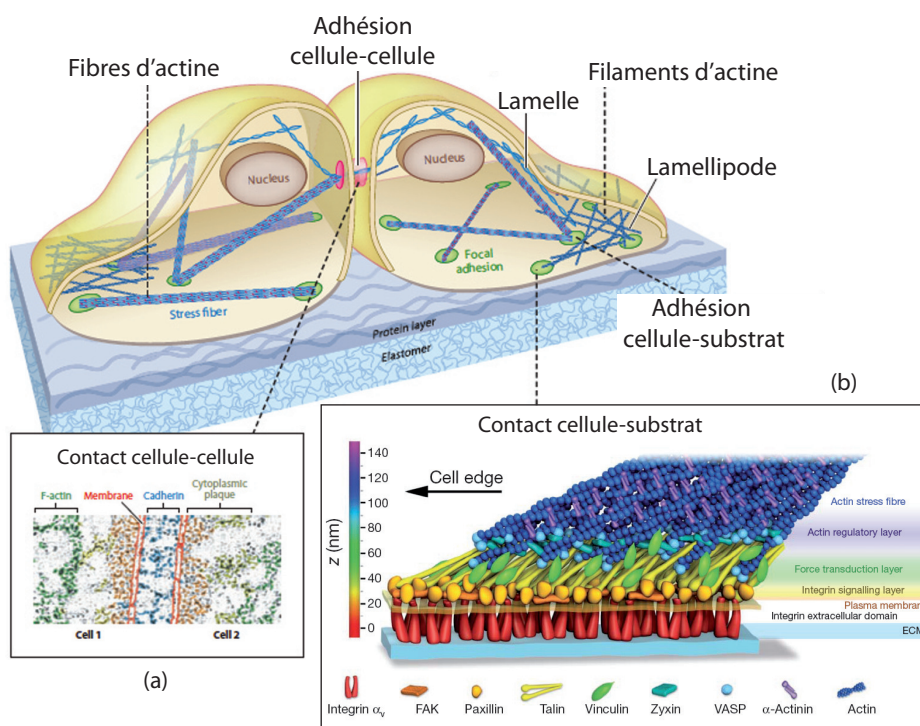


Fig. 3.1 – Schéma illustrant les adhésions cellule-cellule et l'adhésion cellule-substrat, adapté d'après Schoen *et al.*⁸¹ (a) Architecture de la couche d'adhésion cellule-cellule d'après Hen *et al.*⁸² et (b) de la couche d'adhésion cellule-substrat d'après Kanchanawong *et al.*⁸³

mécaniques. C'est grâce à ce réseau de filaments que la cellule acquiert sa forme, qu'elle s'attache, et qu'elle se déplace sur un substrat.

Pour permettre l'activité cellulaire, le cytosquelette a une structure très dynamique dont la forme dépend de l'équilibre entre les forces exercées par l'extérieur sur la cellule et celles qui sont générées par la cellule elle-même. De plus, le cytosquelette est connecté à l'extérieur (cellule, substrat, ...) par des sites d'adhésion localisés. Les forces transitent alors de l'extérieur vers les filaments d'actine (ou vice-versa) via ces contacts localisés. Il faut alors distinguer deux formes d'adhésion cellulaire : l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-substrat. La figure 3.1 présente un schéma illustrant ces deux types d'adhésion cellulaire.

L'adhésion entre deux cellules est à l'origine de la formation de tissus et d'organes.⁸¹ D'une manière générale, cette adhésion se développe au travers d'une couche principalement constituée de cadhérine (protéine d'adhésion).⁸² Cette jonction de cadhérine se forme entre les membranes des deux cellules pour relier de part et d'autre leurs filaments d'actine, comme le montre la figure 3.1(a). Ce type d'adhésion ne sera pas traité dans ce manuscrit et nous nous intéressons dans ce qui suit uniquement à l'adhésion cellule-substrat. L'adhésion cellule-substrat s'établit entre le cytosquelette et le support sur lequel se trouve la cellule par l'intermédiaire d'une couche de

protéines transmembranaires, appelées intégrines, de quelques dizaine de nm d'épaisseur (Fig. 3.1(b)). La jonction d'intégrines est la plus répandue, et on la retrouve dans les liaisons entre la matrice extra-cellulaire (MEC) et l'intérieur de la cellule (Fig. 3.1(b))^b. L'adhésion cellulaire est réalisée quand la couche d'intégrines relie le cytosquelette de la cellule aux fibres de la MEC en formant des points focaux d'adhésion. Une fois ces deux structures connectées, la jonction d'intégrines active des voies de signalisation intracellulaires, modifiant l'expression des gènes dans le noyau et affectant le comportement et le fonctionnement de la cellule.⁸⁰ Ces jonctions cellule-substrat présentent une architecture très complexe et très dynamique formée d'un réseau de protéines stratifiées.⁸³ En 2010, on était parvenu à identifier 180 interactions protéine-protéine mises en jeu dans ce réseau,⁸⁵ ce qui illustre sa richesse et sa complexité. Notons que dans le cas d'une adhésion sur un biomatériau (quartz, titane, ...),^{86,87} les mécanismes sont différents. Dans tous les cas, les interactions de la cellule avec son substrat ont une grande influence sur les processus biologiques.

3.1.2 Interactions cellule-substrat et mécanotransduction

Le substrat n'est pas simplement un support sur lequel la cellule est posée, il est également impliqué dans son fonctionnement et son comportement et ce à travers l'adhésion. La cellule s'adapte et se réarrange de l'intérieur en fonction des conditions existant à l'extérieur. En particulier, il a été démontré que les cellules sentent et répondent à la rigidité de leur environnement.⁶⁸ Cette capacité à sentir le monde extérieur est très visible chez les cellules souches dont la différenciation est affectée par les propriétés mécaniques de leur environnement.⁸⁸ Par exemple, des substrats ayant un module d'Young comparable à celui des tissus osseux (~ 100 kPa⁸⁹) favorisent la différenciation des cellules souches mésenchymales en cellules osseuses, tandis que des substrats ayant un module d'Young faible, comme celui qu'on trouve dans les tissus du cerveau (~ 1 kPa⁸⁹), favorisent la différenciation en cellules neuronales.⁹⁰ Cette observation motive la fabrication de substrats aux propriétés mécaniques contrôlées pour influencer le comportement des cellules. Cette approche constitue un axe de recherche important dans l'ingénierie tissulaire et la biotechnologie.⁸⁰

La cellule peut également changer de forme et de comportement en fonction des forces externes auxquelles elle pourrait être soumise. Par exemple, les cellules endothéliales^c sentent le cisaillement produit par le flux sanguin.⁹¹ Même si appliquer des forces extérieures sur les cellules ou modifier la rigidité de leur environnement sont deux procédures distinctes, les mé-

b. Une matrice extra cellulaire (MEC) est une couche fibreuse de protéines qui forme le substrat se trouvant sous et/ou autour de la cellule, que ça soit *in vivo* ou en culture cellulaire.⁶⁷

c. Les cellules endothéliales sont les cellules qui constituent la paroi interne des vaisseaux sanguins.

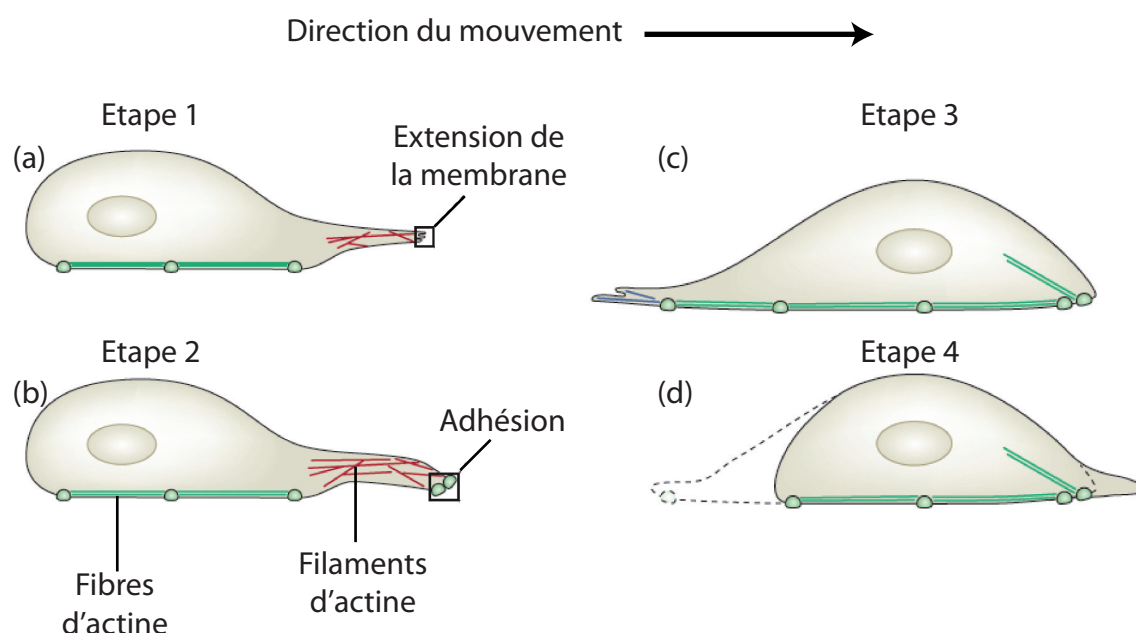


Fig. 3.2 – Modèle de la migration cellulaire, adapté d'après Mattila *et al.*⁹³ (1) extension de la membrane cellulaire à l'avant, (2) fixation au substrat, (3) déplacement en avant du corps cellulaire et (4) détachement et rétraction de l'arrière.

canismes sous-jacents reposent sur le même processus biologique : la mécanotransduction.⁶⁴ Ce processus décrit la conversion des forces mécaniques en information biochimique.⁹² Il tient un rôle principal dans le fonctionnement de la cellule en particulier durant les phases d'adhésion. L'adaptation de l'activité cellulaire à la mécanique de son environnement via la mécanotransduction est particulièrement visible au cours du processus de migration.

3.1.3 Cellule en migration et dynamique de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellule-substrat est un processus très dynamique qui permet à la cellule de se réorganiser continûment et de s'adapter aux variations mécaniques engendrées par l'extérieur et l'intérieur de la cellule.⁶⁷ La migration cellulaire est un phénomène typique d'adhésion dans lequel toute cette dynamique est particulièrement visible. Le mécanisme précis de la migration d'une cellule change selon le type cellulaire, mais d'une façon générale, il se divise en quatre étapes illustrées par la figure 3.2.⁹³ Premièrement, il y a extension de la membrane cellulaire, et ce à travers la dynamique des filaments d'actine (Fig. 3.2(a)). Deuxièmement, l'avant de la cellule se fixe au substrat en formant des sites d'adhésion (Fig. 3.2(b)). Ensuite, dans la troisième étape, l'ensemble de la cellule est déplacé en avant grâce aux forces induites par la contraction des filaments d'actine reliés aux points focaux d'adhésion (Fig. 3.2(c)). La dernière étape, qui a

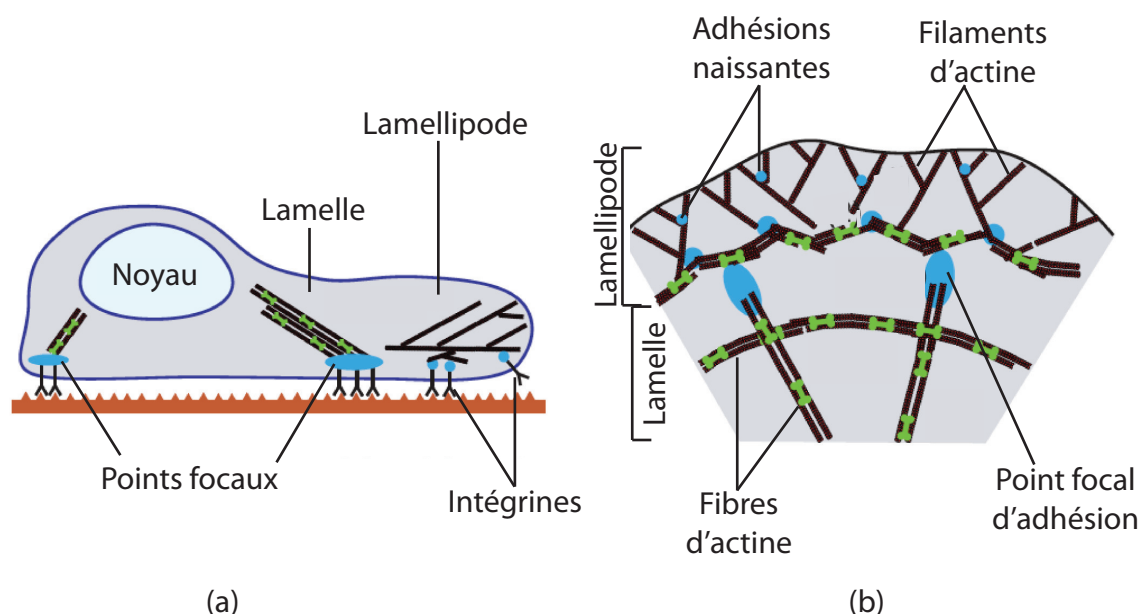


Fig. 3.3 – Eléments de structures d'une cellule en migration (a) vue de côté et (b) vue de dessus, adapté d'après Schwarz *et al.*⁷⁶ Les adhésions naissantes se trouvent dans le lamellipode. Elles se transforment en points focaux d'adhésions et se lient aux fibres d'actine dans la lamelle.

lieu en même temps que la troisième, se caractérise par le détachement de l'arrière de la cellule et sa rétraction (Fig. 3.2(d)).

Examinons de plus près la formation de sites d'adhésion et la coordination entre la dynamique de ces sites et celle des filaments d'actine. La figure 3.3 représente les différentes structures impliquées dans la dynamique d'une cellule en migration.⁷⁶ Tout d'abord, l'adhésion de la cellule avec le substrat a lieu dans le lamellipode de la cellule. Le lamellipode désigne la partie membranaire saillante qui se trouve à l'avant de la cellule et qui lui permet d'explorer son territoire et se déplacer (Fig. 3.3(a)-(b)). Le lamellipode est très riche en actine, et la polymérisation de ces protéines conduit à la formation des filaments d'actine qui permettent au lamellipode de se mettre en mouvement. Les premiers sites d'adhésion formés dans le lamellipode sont appelés adhésions naissantes. Ces points d'adhésions peuvent soit se désassembler, soit rester et devenir matures. Cela dépend de la dynamique de la migration. Une fois matures, ces sites d'adhésions deviennent des points focaux d'adhésion qui ont typiquement une largeur de $2\ \mu\text{m}$ et une longueur qui varie entre 3 et $10\ \mu\text{m}$.⁶⁷ Ces points focaux sont localisés dans la lamelle, une région dense en actine qui se trouve derrière le lamellipode (Fig. 3.3(a)-(b)). Ils relient au substrat les fibres contractées d'actine qui s'étendent sur tout le contenu cellulaire. Cette dynamique cellulaire, qui implique une organisation continue du cytosquelette ainsi que la formation et la maturation de sites d'adhésion, est une illustration de la mécanotransduction. Cela motive le développement de techniques qui permettent de mesurer les forces impliquées dans l'adhésion

et de les corrélérer avec l'organisation cellulaire. Quelques unes de ces techniques sont présentées dans la section suivante de ce chapitre.

3.2 Techniques de mesure d'adhésion : principes et limitations

3.2.1 Mesure de l'adhésion d'un ensemble de cellules

Afin de vérifier si les cellules sont adhérentes sur leur substrat, la technique la plus simple et la plus utilisée est le rinçage. Dans cette technique, les cellules sont cultivées sur un substrat,⁹⁴ et sont rincées avec une solution physiologique. Les cellules qui n'étaient pas attachées ou celles qui adhéraient mal sur le substrat sont éliminées. Le pourcentage de cellules restant sur le support donne une estimation de leur adhésion.⁹⁵ Malgré l'avantage qu'elle présente d'un point de vue économique et simplicité en équipement, la technique du lavage n'est pas reproductible ni quantitative parce que les forces de cisaillement appliquées par le flux de la solution de rinçage sont inconnues et ne peuvent pas être générées de façon contrôlée.

Pour pouvoir contrôler les forces de cisaillement provenant d'un flux, les méthodes dites hydrodynamiques, comme la chambre à flux laminaire (Fig. 3.4(a)) ou à flux radial, et les méthodes de centrifugation peuvent être utilisées.⁹⁶ Les contraintes appliquées sont de l'ordre du Pa.⁹² L'estimation de l'adhésion est faite comme dans le cas d'un lavage simple, c'est-à-dire en comparant le nombre de cellules restant après le flux avec le nombre initial de cellules. La force exercée par le flux sur la cellule dépend de la géométrie de cette dernière et, comme on ne connaît pas la géométrie, on n'est pas certain de l'impact du flux, ce qui est un inconvénient principal de ces techniques. De plus, ces techniques donnent une information sur un ensemble de cellules, ce qui peut masquer les propriétés mécaniques à l'échelle d'une cellule individuelle. Cependant, elles sont particulièrement adaptées à l'étude des phénomènes d'adhésions collectives de cellules *in vitro*,⁹⁷ et surtout dans les zones soumises à des flux comme les vaisseaux sanguins.

Il existe également une approche de la mesure d'adhésion collective qui consiste à détacher les cellules à l'aide d'impulsions laser.⁹⁸ Après culture cellulaire sur un substrat déposé sur un film métallique, une impulsion laser est focalisée à la surface libre du film en métal. La dilatation thermique du métal, due au dépôt de l'énergie lumineuse du faisceau laser, génère des ondes de contraintes d'amplitude élevée qui se propagent dans le film (Fig. 3.4(a)). Les contraintes générées sont utilisées pour détacher les cellules adhérentes sur le substrat. En faisant varier l'amplitude de ces contraintes via la variation de la puissance du laser, on peut accéder aux forces de rupture de l'ensemble des cellules adhérentes.

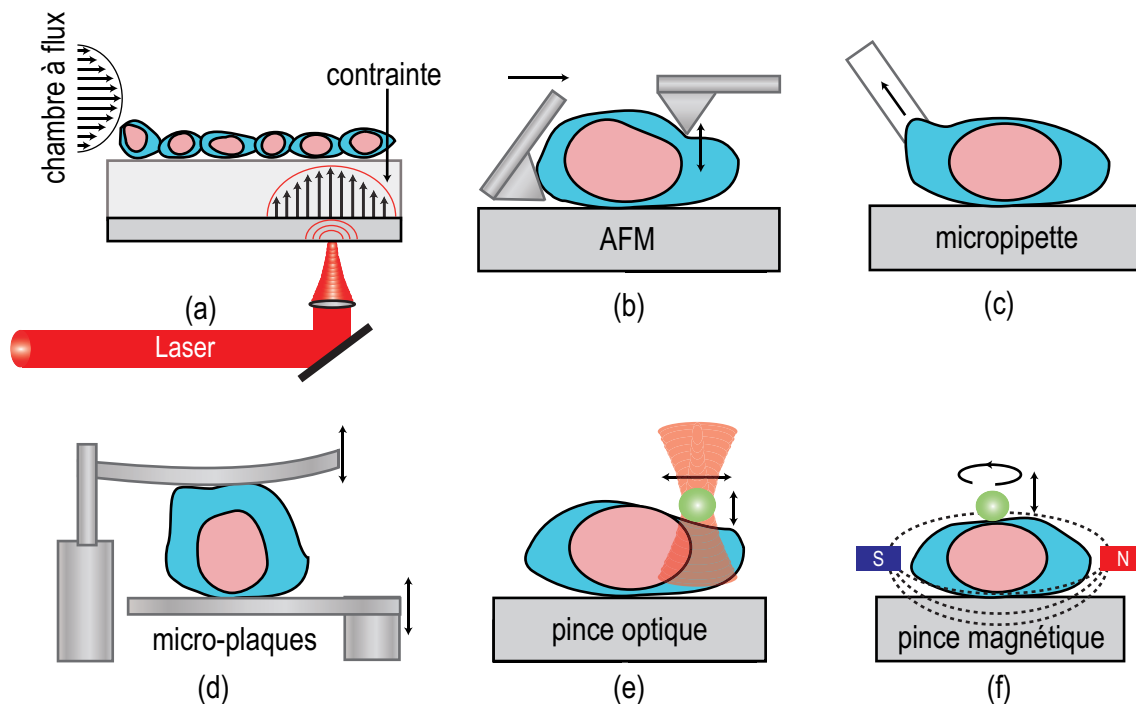


Fig. 3.4 – Techniques classiques de mesure d'adhésion cellulaire. (a) Chambre à flux / Contraintes induites par laser. (b) Microscopie à force atomique (AFM). (c) Micropipette à aspiration. (d) Microplaques. (e) Pince optique. (f) Pince magnétique.

3.2.2 Mesure de l'adhésion d'une cellule individuelle par microscopie à fluorescence

Plusieurs techniques de microscopie à fluorescence sont utilisées pour observer et mesurer l'adhésion cellulaire. La technique la plus simple et la plus employée est l'immunofluorescence ou l'immunomarquage. Elle consiste à coupler un fluorochrome (substance chimique fluorescente) à un anticorps. L'anticorps va ensuite s'accrocher à un antigène qui lui est spécifique. En marquant des anticorps propres aux protéines d'adhésion, comme par exemple la vinculine,⁸³ on est capable de visualiser les sites d'adhésion des cellules. Cette technique peut s'appliquer *in vitro* mais reste cependant qualitative.

Récemment, grâce au pouvoir séparateur de la microscopie à super-résolution (qui permet de dépasser la limite de diffraction), les trajectoires des intégrines ont pu être visualisées avec des précisions nanométriques en les marquant par des molécules fluorescentes⁹⁹ (Fig. 3.5). Cette technique a ainsi permis de filmer en temps réel le mouvement des protéines responsables de l'adhésion, ce qui offre un moyen puissant pour étudier la dynamique de la formation des sites d'adhésion.

L'inconvénient majeur des techniques de microscopie à fluorescence réside dans la nécessité de cibler spécifiquement un nombre limité de protéines d'adhésion parmi les centaines de

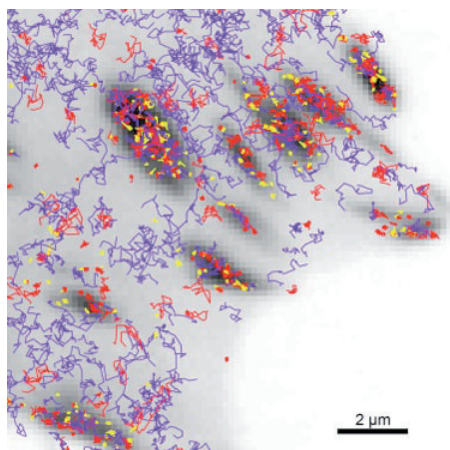


Fig. 3.5 – Technique récente de mesure d’adhésion. Image des trajectoires des intégrines mesurées par microscopie à super-résolution. Image d’après Rossier *et al.*⁹⁹

protéines impliquées dans l’adhésion.⁸⁵ Par conséquent, l’information recueillie manque de généralité car elle concerne uniquement les protéines ciblées. Par ailleurs, elles n’offrent pas de mesure quantitative des forces d’adhésion.

3.2.3 Mesure de l’adhésion d’une cellule unique par contact

A l’échelle d’une cellule individuelle, différentes techniques existent pour mesurer l’adhésion. L’AFM (Atomic Force Microscope) est l’une des techniques les plus utilisées pour étudier le contact. Son principe consiste à exercer une force sur la cellule à l’aide d’une pointe micrométrique reliée à un micro levier pour détacher la cellule de son support¹⁰⁰ (Fig. 3.4(b)). En mesurant la force appliquée pour détacher la cellule, on peut remonter à une information sur la force d’adhésion entre la cellule et le substrat. Cette méthode offre une large gamme de contraintes pouvant être exercées (du kPa au MPa). Elle permet également une mesure de force avec des résolutions spatiales élevées et peut être combinée avec d’autres techniques de microscopie optique. L’AFM peut également être employé pour la mesure des propriétés mécaniques de la cellule.⁸ Cependant, cette approche requiert un contact direct avec la cellule et une modélisation préalable de l’interaction pointe-cellule.

Le principe qui consiste à détacher la cellule en lui appliquant une force par contact direct est également mis en œuvre dans la méthode d’aspiration par micropipette¹⁰¹ (Fig. 3.4(c)). Cette fois-ci, une micropipette est utilisée pour aspirer la cellule jusqu’à ce qu’elle se détache. Alors, en connaissant la force de succion appliquée, on peut accéder à la force d’adhésion.

La technique des microplaques se base également sur le détachement de la cellule. Elle consiste à cultiver la cellule entre deux plaques parallèles. Une fois attachée, les plaques sont écartées jusqu’à rupture de l’adhésion et la force appliquée pour obtenir cette rupture est mesurée (Fig.

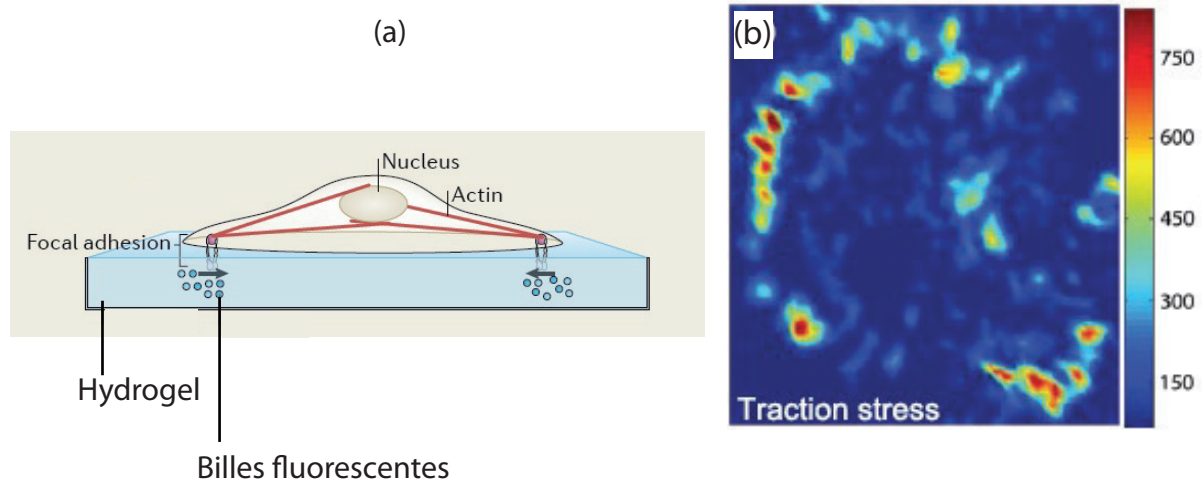


Fig. 3.6 – Microscopie à force de traction. (a) Schéma modélisant le substrat de la cellule, adapté d'après Watt *et al.*⁸⁸ (b) Cartographie des contraintes exercées par la cellule, d'après Schwarz *et al.*⁷⁶

3.4(d)). Cette approche peut être utilisée pour quantifier les contacts entre cellules et mesurer leurs rigidités ou encore étudier l'effet induit par la modification de la forme d'une cellule sur son adhésion.¹⁰² Tout comme l'AFM, elle met en jeu une large gamme de contraintes pouvant être exercées sur les cellules (du Pa au MPa) et possède une résolution de force très élevée. Cependant, comme toutes les techniques présentées dans ce paragraphe, elle reste invasive dans le sens où un contact avec la cellule est indispensable.

3.2.4 Mesure de l'adhésion d'une cellule sur substrat microstructuré

L'adhésion entre la cellule et son environnement peut aussi être étudiée en modifiant les propriétés mécaniques d'un substrat et en observant les interactions de la cellule avec le substrat. La microscopie à force de traction (TFM) est une technique couramment utilisée et permettant d'imager les contraintes exercées par la cellule sur le substrat.⁷⁶ Les cellules sont cultivées sur des substrats de gel polymérique contenant des billes fluorescentes (Fig. 3.6(a)). En mesurant le déplacement des billes dans le substrat dû aux forces exercées par la cellule et, par corrélation d'image, il est possible de cartographier les contraintes de traction exercées par la cellule sur le gel (Fig. 3.6(b)).

Une autre approche utilisant des substrats structurés consiste à cultiver les cellules sur un tapis de micro-pilliers. La figure 3.7 illustre cette technique (Fig. 3.7(a)) et présente l'image d'une cellule cultivée sur un substrat en micro-pilliers (Fig. 3.7(b)). En mesurant la déflexion des pilliers due aux forces exercées par les cellules pour adhérer, il est possible de faire des images quantitatives de l'adhésion.

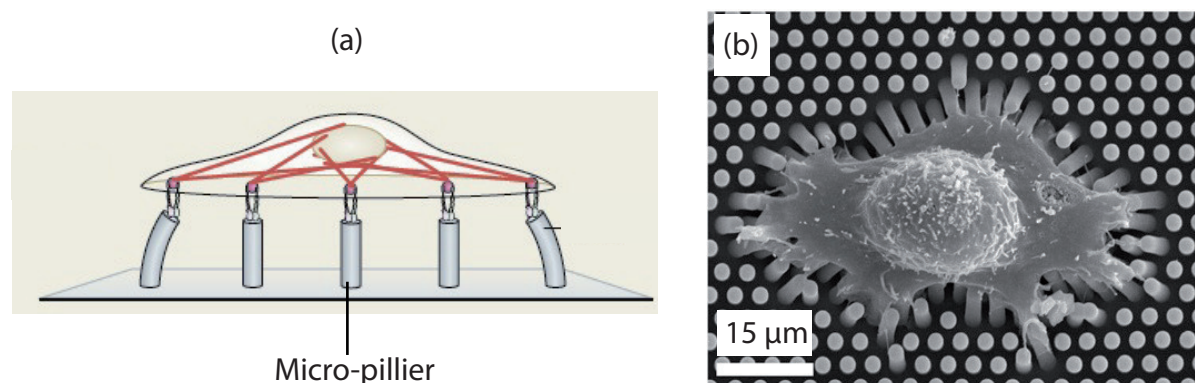


Fig. 3.7 – Technique de micropilliers. (a) Schéma modélisant le substrat de la cellule, adapté d'après Watt *et al.*⁸⁸ (b) Photographie obtenue par microscopie électronique à balayage d'une cellule adhérente sur un substrat de micro-pilliers, d'après Trichet *et al.*¹⁰³

Ces deux techniques, qui utilisent la modification du substrat supportant la cellule, ont la faculté de détecter les forces générées par la cellule sans lui imposer une force extérieure. Elles sont capables de détecter des forces exercées localement au niveau des points focaux allant de 1 à 100 nN. Cependant, elles reposent sur l'utilisation de substrats qui ne sont pas représentatifs de structures cellulaires ou de bio-implants.

3.2.5 Mesure de l'adhésion d'une cellule unique par techniques de piégeage

Les interactions cellule-substrat peuvent être mesurées par des techniques dites de piégeages, comme la technique des pinces optiques (Fig. 3.4(e)). Une pince optique est réalisée en focalisant fortement un laser avec un microscope d'ouverture numérique élevée. Un objet diélectrique se trouvant dans la zone de Rayleigh du faisceau laser est alors immobilisé grâce à son interaction avec le champ électromagnétique du laser. Cette méthode de micromanipulation permet de piéger des particules allant de ~ 20 nm à quelques μm ¹⁰⁴ et d'exercer des forces jusqu'à 100 pN sur ces particules. Ces caractéristiques lui confèrent un grand succès dans la mesure de forces et de mouvements à l'échelle d'une cellule individuelle. Elle est par exemple utilisée pour observer la réponse intracellulaire à des forces extérieures. Une bille revêtue de protéines propres à la MEC est placée sur la surface d'une cellule adhérente, afin de mimer les adhésions médiées par les protéines d'intégrines.¹⁰⁵ La bille est ensuite piégée par la pince optique. En modulant la force de détention de la bille dans le piège et en observant son déplacement dû aux forces de traction exercées par le cytosquelette pour la faire sortir de son piège, la structuration interne du cytosquelette et sa réaction à des forces extérieures appliquées peuvent être analysées.^{92,105} D'une manière similaire, des pinces magnétiques peuvent être réalisées pour manipuler des billes à l'aide d'un champ magnétique au lieu d'un faisceau laser (Fig. 3.4(f)).¹⁰⁶

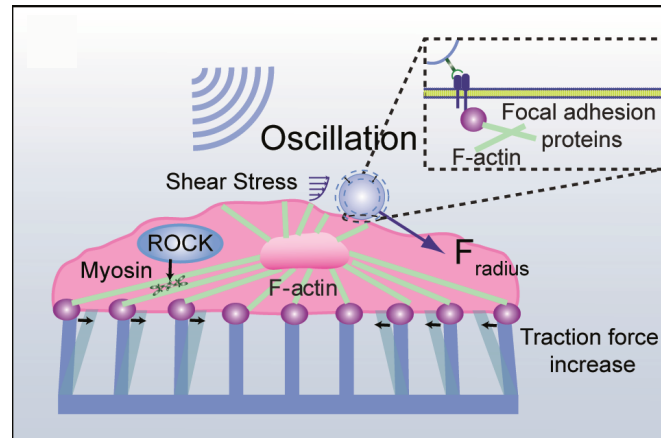


Fig. 3.8 – La technique de « pincement acoustique » sonde la mécanique du cytosquelette *in vivo*. Illustration d'après Fan *et al.*¹⁰⁷

Ces techniques donnent accès à une large gamme de forces allant de 0.001 à 100 pN. Cependant, elles sont difficiles à mettre en œuvre et peuvent être invasives parce qu'un corps étranger est introduit dans l'environnement de la cellule. La cellule peut de plus être endommagée à cause des fluences élevées des lasers nécessaires au fonctionnement des pièges optiques.

Récemment, une autre approche de piégeage de billes pour l'étude de la mécanotransduction a été développée (Fig. 3.8).¹⁰⁷ La cellule est déposée sur un substrat de micro-piliers, et une bille est attachée sur sa surface libre. L'approche, dite de « pincement acoustique », consiste à exciter à l'aide d'ondes acoustiques la micro-bille. Cela permet d'appliquer à une cellule vivante des forces mécaniques contrôlées par les ultrasons allant du pN au nN. Grâce à la mesure de la déflexion des piliers, il est possible de sonder la transmission de forces allant de l'extérieur (la bille) vers le substrat, et de remonter ainsi à une information plus complète sur la réponse de la cellule aux conditions extérieures. Cette technique émergente offre la possibilité d'étudier l'adhésion à l'échelle d'une cellule unique d'une manière non-invasive et pour un grand nombre de cellules en même temps. Un résumé des méthodes couramment employées pour mesurer et étudier l'adhésion cellulaire, leurs applications, avantages et inconvénients est dressé dans le tableau 3.1 inséré à la fin de ce chapitre.

3.3 Une technique alternative : l'acoustique picoseconde

Ces dernières années, l'acoustique picoseconde a montré la possibilité de déterminer d'une manière non-invasive les propriétés mécaniques (rigidité, densité, viscosité) d'objets mous biomimétiques²⁸ et de cellules végétales⁴⁰ et animales,⁴² ceci avec une résolution en profondeur pouvant aller jusqu'à quelques centaines de nanomètres. Cette technique se caractérise par sa

capacité à générer et mesurer sans contact des déformations de l'ordre du 10^{-6} sur une large gamme de fréquence pouvant atteindre 1 THz. En outre, l'acoustique picoseconde a montré depuis une quinzaine d'années sa capacité à mesurer le contact et l'adhésion. En effet, l'équipe de H. J. Maris a étudié en 1998 l'adhésion d'un film mince d'or déposé sur un substrat de silicium à l'aide du coefficient de réflexion acoustique à l'interface or-silicium.¹⁰⁸ Le coefficient de réflexion a été mesuré à une seule fréquence acoustique, la fréquence de résonance du film d'or. Une cartographie de l'interface or-silicium a ensuite permis d'observer une variation de ce coefficient de réflexion. Cette variation, attribuée à la qualité de l'interface entre le film d'or et le substrat, a permis une quantification de l'adhésion entre les deux solides. Un an plus tard, L. Rouai *et al.* ont prouvé que l'acoustique picoseconde est capable d'évaluer le contact entre les fines couches stratifiées viscoélastiques de réseaux utilisés dans le domaine de la microélectronique.¹⁰⁹ Quelques années plus tard, B. Bonello *et al.* ont étudié la qualité d'interface entre des couches organiques en se servant également du coefficient de réflexion acoustique.¹¹⁰ De plus, à travers des mesures du coefficient de réflexion sur une large gamme de fréquence allant jusqu'à 100 GHz, G. A. Antonelli *et al.* ont caractérisé les constantes élastiques, les propriétés thermiques et l'adhésion de films minces d'aluminium résonants.¹¹¹ Récemment, l'équipe de O. B. Wright a également montré que l'acoustique picoseconde permettait d'imager le contact entre une sphère et un substrat.²⁸ Cette équipe a démontré que le coefficient de réflexion acoustique est proportionnel à la pression de contact entre la sphère et le substrat, et est extrêmement sensible à la nanostructure de l'interface. Par ailleurs, Y. Guillet *et al.* sont parvenus à mesurer la dynamique du contact entre une nanoparticule d'or et un substrat de silice en sondant le mouvement de la surface de la nanoparticule par interférométrie.⁷³ Enfin, A. Ayouch *et al.* ont employé la technique d'acoustique picoseconde pour étudier l'adhésion entre des nanoparticules de silice formant un solide colloïdal.²⁵ En mesurant les variations de la vitesse du son se propageant dans ce milieu colloïdal, cette équipe a prouvé la faculté de la technique opto-acoustique à quantifier le nano-contact dû à des liaisons covalentes ou de Van der Waals entre les particules. Ajoutons à cela, la possibilité de caractériser le contact thermique¹¹²⁻¹¹⁴ et électrique¹¹⁵ avec cette technique.

Ces applications de l'acoustique picoseconde à la caractérisation de nano-interfaces soutiennent la possibilité d'étudier l'adhésion cellulaire. Cette technique alternative pourrait alors être mise en œuvre dans des conditions physiologiques, sans contact avec la cellule et de façon non-invasive.

3.4 Conclusion

Après avoir exposé dans la première section le contexte biologique de l'adhésion et le rôle important qu'elle joue dans plusieurs processus biologiques, nous avons ensuite introduit le mécanisme de la migration d'une cellule. L'étude de ce mécanisme a permis de présenter en même temps la dynamique de l'adhésion et les principales structures du cytosquelette impliquées dans cette dynamique. La présentation des processus mécaniques intervenant au cours de l'adhésion d'une cellule migrante a également permis de mieux comprendre les interactions cellule-substrat et le processus de mécanotransduction à la base de ces interactions.

Dans un deuxième temps, quelques techniques permettant de mesurer l'adhésion cellulaire ou d'étudier les forces intervenant dans la mécanotransduction ont été abordées. Les méthodes de microscopie à fluorescence sont sélectives puisqu'une seule protéine est ciblée pour obtenir une information sur l'adhésion, et dans la plupart des cas, cette information est qualitative.¹¹⁶ La plupart des autres méthodes employées nécessitent un contact avec la cellule comme par exemple l'AFM et les pinces optiques et magnétiques qui introduisent des billes dans le contenu cellulaire. Cette interaction avec la cellule peut influencer son adhésion avec l'environnement. Par conséquent, l'information recueillie, même si elle est quantifiée, peut ne pas refléter le mécanisme d'adhésion tel qu'il se produit lorsque la cellule n'est exposée à aucun facteur extérieur. Ajoutons également que certaines méthodes au contact telles que les micropipettes à aspiration sont des approches nuisibles aux cellules.⁹⁷ D'autre part, les substrats déformables qui détectent les forces exercées par la cellule elle-même ne sont pas toujours représentatifs des biomatériaux utilisés pour des applications biomédicales et ne peuvent pas être appliqués dans le cas de substrats rigides (métal, os).

Enfin, nous avons montré à travers les travaux de différentes équipes concernant les matériaux solides le potentiel de l'acoustique picoseconde à étudier l'adhésion et le contact à l'échelle submicronique. Ces travaux ont révélé l'intérêt d'appliquer cette approche opto-acoustique à l'étude de l'adhésion cellulaire. L'application de l'acoustique picoseconde à l'analyse de l'adhésion cellule-substrat, ainsi que la détermination des propriétés mécaniques de cellules animales modèles, seront traitées dans la suite de ce manuscrit.

Tab. 3.1 – Techniques de mesures d’adhésion cellulaire.

Technique	Contraintes appliquées	Applications	Avantages	Inconvénients
Ringage	Cisaillement	adhésion collective, Réponse des cellules soumises à des flux	Economique Simple	Non quantitative Contraintes inconnues
Ch.flux laminaire	Cisaillement (Pa)	Adhésion collective, réponse aux flux	Reproductibilité	Non quantitative Distribution non uniforme
Contraintes par laser	Compression			
AFM	Traction (kPa - MPa)	Indentation, détachement, rhéologie, rigidité	Gamme de forces Résolution élevée	Contact avec l'échantillon Longue durée
Micropipettes	Traction (Pa - MPa)	Adhésion cellule-cellule, détachement, rigidité	Gamme de forces Résolution élevée	Contact avec l'échantillon Invasive
Micro-plaques				
Pincés optiques	Traction (Pa)	Déformation cellulaire, Rhéologie, cytosquelette	Combinaison de l'optique Résolution élevée	Contact avec l'échantillon Complicée à réaliser
Pincés magnétiques	Traction (Pa-kPa)			
Micro piliers	Forces générées par la cellule	Forces / Contraintes par point focal	Non invasives / Forces générées par la cellule	Pas caractéristique de substrats réels
Gels (TFM)				
Microscopie à fluorescence		Protéines d'adhésion	Non invasives <i>in vivo</i>	Non quantitatif, marquage sélectif

Chapitre 4

Impédance acoustique d'une cellule animale modèle et contact non spécifique avec un substrat métallique

Comme mentionné dans le chapitre 3, l'étude de l'adhésion d'une cellule et de ses interactions avec l'environnement est un sujet important dont l'exploration peut conduire à des avancées significatives dans le domaine de la biophysique. Son rôle est crucial dans le cycle de vie d'une cellule, puisqu'elle intervient dans presque tous les mécanismes et toutes les fonctions cellulaires comme par exemple la prolifération, la migration et la différenciation.⁹² Par conséquent, la compréhension de l'adhésion cellulaire permettra de lever certains verrous actuels en biologie moléculaire et en biotechnologie.

L'imagerie du contact entre une cellule et un biomatériau nécessite de développer de nouvelles techniques qui soient capables de quantifier les mécanismes en jeu sans introduire de facteurs extérieurs qui puissent fausser l'interprétation. De plus, les techniques basées sur le contact peuvent compromettre l'intégrité des cellules dans certains cas (le cas des micropipettes). D'autre part, les techniques de modification de substrats, même si elles nécessitent pas de forces extérieures appliquées à la cellule, ne sont pas toujours représentatives de substrats réels. Enfin, les méthodes basées sur la fluorescence présentent l'inconvénient d'être sélectives et, dans la plupart des cas, qualitatives.

Plusieurs travaux récents ont montré la capacité de l'acoustique picoseconde à sonder le contact entre solide. Par ailleurs, cette technique a aussi été employée pour sonder les propriétés

mécaniques de cellules individuelles, et ce sans contact.^{40,42,117} Cependant, l'étude de l'adhésion cellulaire n'a jamais été abordée avec des ondes acoustiques GHz. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer à distance et quantitativement par acoustique picoseconde les interactions existant entre une cellule unique et un biomatériau.

Dans la première section de ce chapitre, l'échantillon cellulaire et le transducteur que nous avons utilisés sont présentés. La deuxième section traite de la mesure du coefficient de réflexion à l'interface titane-cellule. Ce coefficient de réflexion est analysé en détails à travers une étude temps-fréquence des signaux acoustiques. Enfin, l'impédance de la cellule et la qualité de contact sont étudiées à partir de la dépendance en fréquence du coefficient de réflexion.

4.1 Echantillon et oscillations Brillouin dans les monocytes

Dans la première section de ce chapitre nous présentons les monocytes. Il s'agit d'un type cellulaire qui constitue un modèle intermédiaire entre les objets biomimétiques et les types cellulaires développant des morphologies et des mécanismes plus complexes.¹¹⁸ Il est donc adapté au développement de la technique d'acoustique picoseconde. De plus, manipuler des cellules biologiques pour étudier leur adhésion tout en conservant le caractère non invasif de l'acoustique picoseconde exige le choix d'un transducteur adéquat conçu spécialement pour des applications de biologie cellulaire.¹¹⁹ Le transducteur utilisé sera également détaillé dans cette section. Nous montrons enfin les oscillations Brillouin obtenues dans ces cellules afin de mesurer la vitesse de propagation du son.

4.1.1 Les monocytes : définition, choix et préparation

Les monocytes sont des cellules animales, plus précisément de mammifères, qui se trouvent dans le sang. Ce sont des globules blancs ou leucocytes^a qui jouent un rôle très important au sein du système immunitaire. Produits par des tissus contenus dans la moelle osseuse^b, les monocytes participent, via la phagocytose^c, à la protection contre l'invasion d'organismes extérieurs tels les virus et les bactéries. Par ailleurs, l'adhésion des monocytes est un acteur principal dans le développement de l'athérosclérose.¹²⁰

La figure 4.1(a) montre une image de monocytes adhérents sur un biomatériau de verre obtenue par microscopie électronique à balayage. La forme sphérique simple de ces cellules, très

a. Les leucocytes sont les cellules du système immunitaire.

b. Les monoblastes sont les cellules à la base de la formation de ces tissus.

c. La phagocytose est un processus cellulaire à travers lequel une cellule immunitaire détruit les corps extérieurs et les débris cellulaires. Elle se caractérise par la capacité de la cellule à « dévorer » ces corps en adhérant autour d'eux et en les fragmentant.

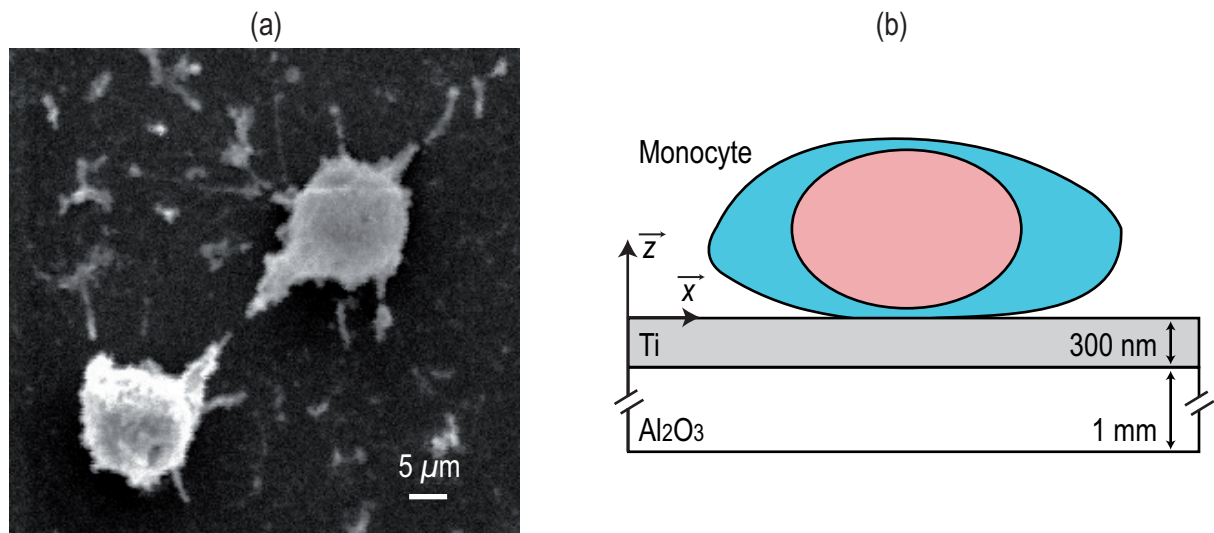


Fig. 4.1 – (a) Photographie de monocytes cultivés sur du SiO_2 obtenue par microscopie électronique à balayage. (b) Géométrie de l'échantillon utilisé.

proche de celle des capsules biomimétiques étudiées dans la première partie de ce mémoire, est l'une des principales raisons du choix de ce type cellulaire. De plus, le diamètre d'un monocyte, compris entre 14 et 20 μm ,¹²¹ plus petit que celui des cellules étudiées dans les chapitres suivants, nous permet de réaliser un échantillonnage spatial en un temps relativement court avec les techniques d'acoustique picoseconde conventionnelles^d. Ajoutons à cela que la cellule est un matériau fortement dissipatif où l'atténuation est typiquement de l'ordre de $1 \mu\text{m}^{-1}$.¹⁵ Par conséquent, l'épaisseur des monocytes, bien supérieure à 1 μm , permet a priori de considérer ces cellules comme un milieu semi-infini suivant la direction de propagation des ondes acoustiques $\vec{z}$ (Fig. 4.1 (b)). D'autre part, il a été montré par microscopie à fluorescence que l'adhésion des monocytes est homogène.¹²² La zone d'adhésion, homogène sur toute la surface de la cellule, permettra de valider la capacité de la technique opto-acoustique à sonder le contact entre une cellule et un biomatériau, avant de passer à l'étude de structures d'adhésion plus complexes.

L'enjeu dans l'application de l'acoustique picoseconde à l'étude de cellules biologiques est d'obtenir le plus d'informations possible sur ces milieux sans les endommager. Pour cette raison, un nouveau biotransducteur permettant de réduire considérablement la diffusion thermique dans la cellule et de diminuer le stress cellulaire induit par les lasers a été développé par l'équipe Ultrasons Laser.¹²³ Il est composé d'un film mince de titane biocompatible, d'épaisseur $e = 300 \pm 5 \text{ nm}$, déposé par PVD (Physical Vapor Deposition) sur un substrat de saphir (0001) d'épaisseur 1 mm. La transparence du saphir offre la possibilité de focaliser le faisceau pompe à l'interface saphir-titane avec un objectif 60x (N.A 0.7). Cela permet de contenir la diffusion de la chaleur,

d. Nous utiliserons ultérieurement un dispositif d'acoustique picoseconde permettant de réduire d'un facteur 100 le temps d'acquisition.

l'échauffement des électrons à $t = 0$, ainsi que l'exposition de la cellule au rayonnement de la pompe car la pénétration optique dans le titane est de 15 nm, bien inférieure à l'épaisseur du film. La fréquence de modulation du laser a été choisie égale à 1 MHz de manière à éviter un confinement thermique dans le transducteur de titane.¹²⁴ La rugosité de la surface de titane, d'environ 10 nm, a été caractérisée par profilométrie optique. La géométrie de l'échantillon est représentée dans la figure 4.1(b). La culture des monocytes sur le biomatériau est assurée par l'équipe du laboratoire CBMN, UMR CNRS 5248, coordonnée par M.-C. Durrieu. Les monocytes, dérivant d'une lignée cellulaire^e, sont cultivés sur le titane et fixés par de la paraformaldehyde. Notons qu'il s'agit d'une fixation chimique et non pas mécanique. Cette technique de fixation permet de manipuler les cellules à l'air libre sans les dégrader et garantie qu'elles ne changeront pas de propriétés durant l'expérience.⁴¹

Étant constitué d'un film mince, ce transducteur permet de se placer dans deux configurations supplémentaires à la configuration classique utilisant un transducteur épais, présenté dans la première partie de ce manuscrit. En focalisant la sonde par le dessus, à l'interface cellule-titane avec un objectif 50x (N.A 0.8), on est capable de détecter les oscillations Brillouin dans la cellule et par suite d'obtenir la vitesse des ondes acoustiques : la configuration est dite bi-latérale (Fig. 4.2(a)). D'autre part, afin de déterminer séparément le coefficient de réflexion, une deuxième configuration est possible : la configuration dite uni-latérale inférieure. Dans ce cas les deux faisceaux pompe et sonde sont focalisés du même côté, à l'interface saphir-titane (Fig. 4.3)(a). Il faut souligner qu'en se plaçant dans cette configuration, aucun laser n'est visible sur la caméra du microscope, ce qui empêche la localisation des faisceaux sur l'échantillon. Pour s'affranchir de ce problème, il est nécessaire de se placer dans la configuration bi-latérale et de s'assurer, en détectant les oscillations Brillouin dans la cellule, que la pompe focalisée de dessous est parfaitement alignée avec la sonde focalisée de dessus. Une fois que la position de la pompe sur la cellule est ainsi repérée, on peut maintenant focaliser la sonde du même côté que la pompe. Ainsi, ce nouveau biotransducteur ouvre de nouvelles voies pour caractériser les milieux cellulaires en offrant la possibilité de mesurer à la fois la vitesse des ondes acoustiques dans la cellule à travers les oscillations Brillouin, son impédance acoustique et la qualité d'interface via le coefficient de réflexion acoustique. C'est une démarche complète qui fera l'objet de la suite de ce chapitre.

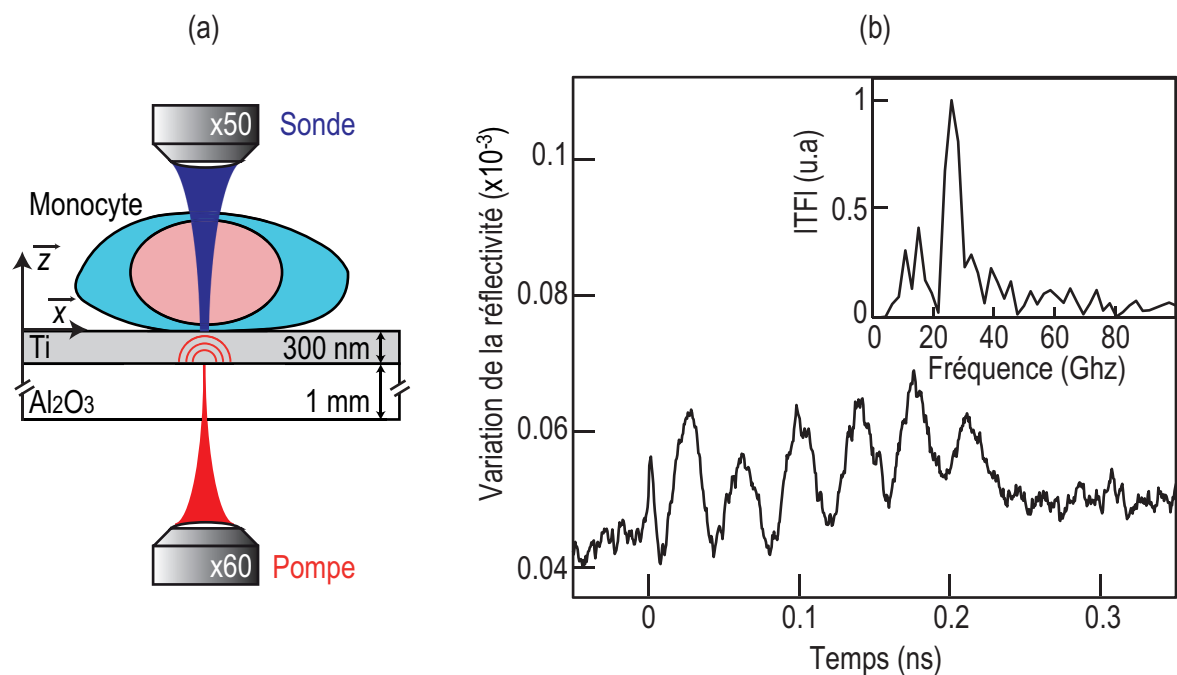


Fig. 4.2 – (a) Configuration bi-latérale pour la mesure de la célérité acoustique : la pompe est focalisée par le dessous à l'interface saphir-titane et la sonde par le dessus à l'interface cellule-titane. (b) Variation de la réflectivité en fonction du temps dans le cas de la configuration bi-latérale et spectre de Fourier associé (encart).

4.1.2 Célérité du son dans la cellule

Pour mesurer la vitesse de propagation du son dans un monocyte et vérifier qu'il y a transmission des ondes acoustiques du film de titane vers la cellule, nous nous sommes placés dans la configuration bi-latérale (Fig. 4.2(a)). La tache focale de pompe a un rayon $\chi_{pompe} \approx 2 \mu\text{m}$ et celle de la sonde un rayon $\chi_{sonde} \approx 1 \mu\text{m}$ à $1/e^2$. Les paramètres du laser (taux de répétition, durée d'impulsion, puissances pompe et sonde) sont ceux mentionnés dans la première partie (sec. 1.1 et sec. 2.1.2). La variation de la réflectivité représentée sur la figure 4.2(b) montre que cette configuration permet de supprimer la contribution thermique due au faisceau pompe. En effet, on remarque que le pic de température à $t = 0$ ainsi que la décroissance thermique, qui étaient visibles lorsque la pompe était focalisée à l'interface cellule-titane (voir la variation de réflectivité dans le PLGA, Fig. 1.3(b)), ont disparus. Ceci illustre que la cellule est maintenant isolée de tout phénomène thermique provenant de la pompe.

Les oscillations visibles sur la figure 4.2(b) sont les oscillations Brillouin dues aux interactions entre l'onde acoustique partiellement transmise du titane dans la cellule et le faisceau sonde

e. La lignée cellulaire est une population homogène de cellules, ayant la capacité de proliférer infiniment. On étudie des lignées parce qu'on maîtrise leurs paramètres vitaux plus qu'une cellule primaire.

focalisé à l'interface cellule-titane (ce phénomène est décrit dans la première partie). Le spectre de Fourier de ces oscillations, tracé dans l'encart, montre un pic à la fréquence $f_b = 25.9$ GHz, ce qui correspond à une vitesse des ondes acoustiques dans la cellule $v_c = 3700$ m/s pour un indice optique $n_c = 1.4$.¹²⁵ Cette même fréquence a été trouvée par M. Ducouso *et al.* dans des cellules ostéoblastes⁴² mais à travers la configuration traditionnelle dans laquelle la pompe et la sonde étaient focalisées à l'interface cellule-titane (uni-latérale supérieure).

Les oscillations Brillouin dans la cellule obtenues à travers la configuration bi-latérale nous ont donnés accès à la vitesse des ondes acoustiques v_c dans les monocytes. Elles nous ont également permis de nous assurer que la cellule est en contact avec le titane et que l'alignement axial (suivant $\vec{z}$) entre la pompe et la sonde est optimisé. Cet alignement va nous servir par la suite pour localiser les faisceaux lasers quand on se place dans des configurations où aucun laser n'est visible sur la caméra du microscope (voir section 4.2). Dans la section suivante, nous étudions le coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule pour accéder à l'impédance acoustique, ce qui nous donnera également une information sur la qualité de contact entre la cellule et le titane.

4.2 Coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule

Afin de déterminer précisément le coefficient de réflexion à l'interface titane-cellule, nous avons focalisé la sonde à l'interface saphir-titane, en gardant la pompe au même endroit (interface saphir-titane) (Fig. 4.3(a)). Cette configuration uni-latérale permet en outre d'isoler la cellule thermiquement et d'avoir ainsi une technique pompe-sonde complètement non-invasive.¹²⁴

L'image en lumière blanche obtenue à travers un objectif 50x (Fig. 4.3(b)), montre trois différents monocytes adhérents sur le biotransducteur. Afin d'étudier l'adhésion, nous avons procédé à un échantillonnage spatial latéral suivant une ligne passant par le centre de l'un de ces monocytes. Cette ligne suivant $\vec{x}$ est symbolisée en pointillés rouges sur l'image en lumière blanche (Fig. 4.3(b)). Un pas de $1 \mu\text{m}$ est obtenu à l'aide d'une platine de translation motorisée de haute précision. La résolution latérale est définie par le rayon de la sonde à $1/e^2$ estimé à $1 \mu\text{m}$. Comme les deux faisceaux lasers ne sont pas visibles sur la caméra, on se sert du faisceau sonde déjà aligné avec la pompe dans la configuration bi-latérale (section 4.1.2) pour localiser la position du laser par rapport à la cellule. Les mesures sont réalisées sur une distance de $30 \mu\text{m}$ avec 31 points de mesure espacés de $1 \mu\text{m}$. La variation de la réflectivité est enregistrée à chaque point.

Nous avons tracé sur la figure 4.4(a) la variation de la réflectivité $\Delta R/R$ mesurée en un point de l'échantillon où il n'y a pas de cellule en regard (point A de la figure 4.3(b)) et celle

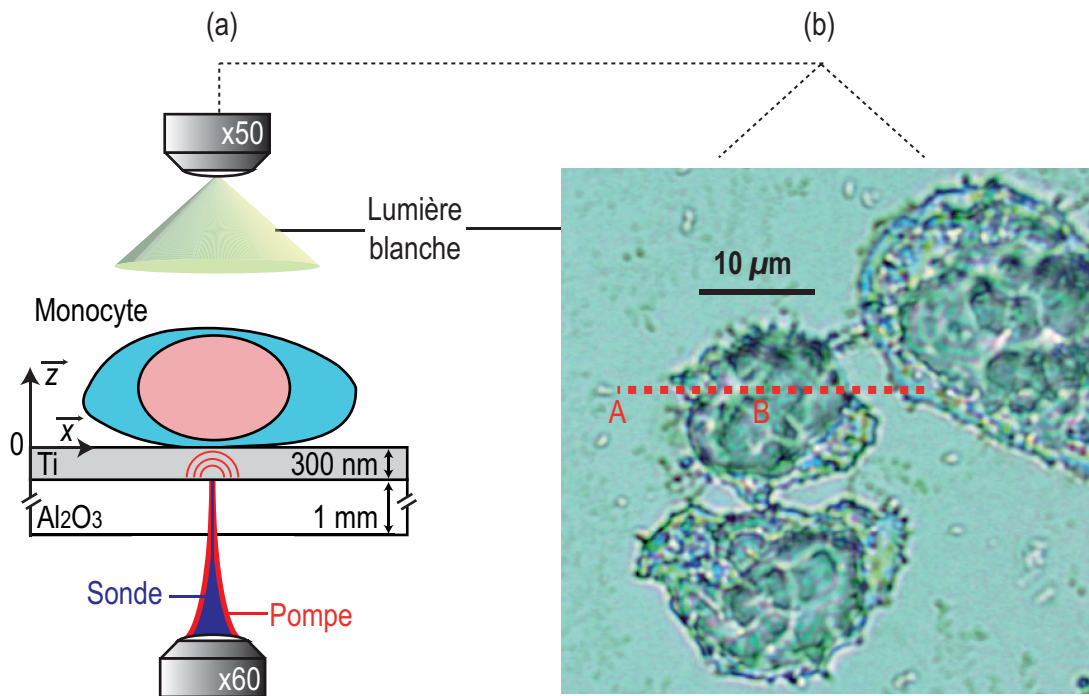


Fig. 4.3 – (a) Configuration uni-latérale inférieure pour la mesure du coefficient de réflexion : la pompe et la sonde sont focalisées à l'interface saphir-titane avec un objectif 60x. (b) La lumière blanche est focalisée avec un objectif 50x et l'image des cellules est obtenue à travers une caméra CCD. Les pointillés rouges sur l'image indiquent la ligne du balayage 1D.

issue d'un point situé sous le centre de la cellule (point B de la figure 4.3(b)). Commençons tout d'abord par commenter les éléments communs à ces deux courbes. On remarque que pour $t < 0$, une composante constante est visible sur $\Delta R/R$. Elle provient de l'élévation de température à l'interface saphir-titane mesurée à la fréquence de modulation $f_m = 1$ MHz. À $t > 0$, la lente décroissance de la réflectivité, de temps caractéristique ~ 0.2 ns, indique une contribution qui correspond à la diffusion thermique dans le film de titane et dans le saphir. Le pic de coïncidence à $t = 0$ ainsi que la décroissance thermique au delà de ce temps ne varient pas quelle que soit la région sondée que ce soit en vis à vis de la cellule ou non. Cela confirme qu'il n'y a pas diffusion d'ondes thermiques (de fréquence > 80 MHz^f) dans la cellule et que par conséquent la cellule est complètement isolée.

On remarque également sur les deux courbes de la figure 4.4(a) l'apparition de deux échos à 85 et 170 ps (indiqués par des flèches) provenant des allers-retours de l'onde acoustique dans la couche mince de titane. En effet, un champ de contraintes compressives est généré grâce à la dilatation thermique due à l'absorption du faisceau pompe dans le titane. Ce champ se propage suivant $\vec{z}$ de part et d'autre de l'interface titane-saphir. Il est détecté sous forme d'échos

f. La fréquence 80 MHz est le taux de répétition du laser, c'est donc l'inverse de la fenêtre temporelle (12.5 ns) sur laquelle les signaux sont enregistrés. Elle correspond à la fréquence minimale pouvant être visualisée sur les variations de réflectivité mesurées.

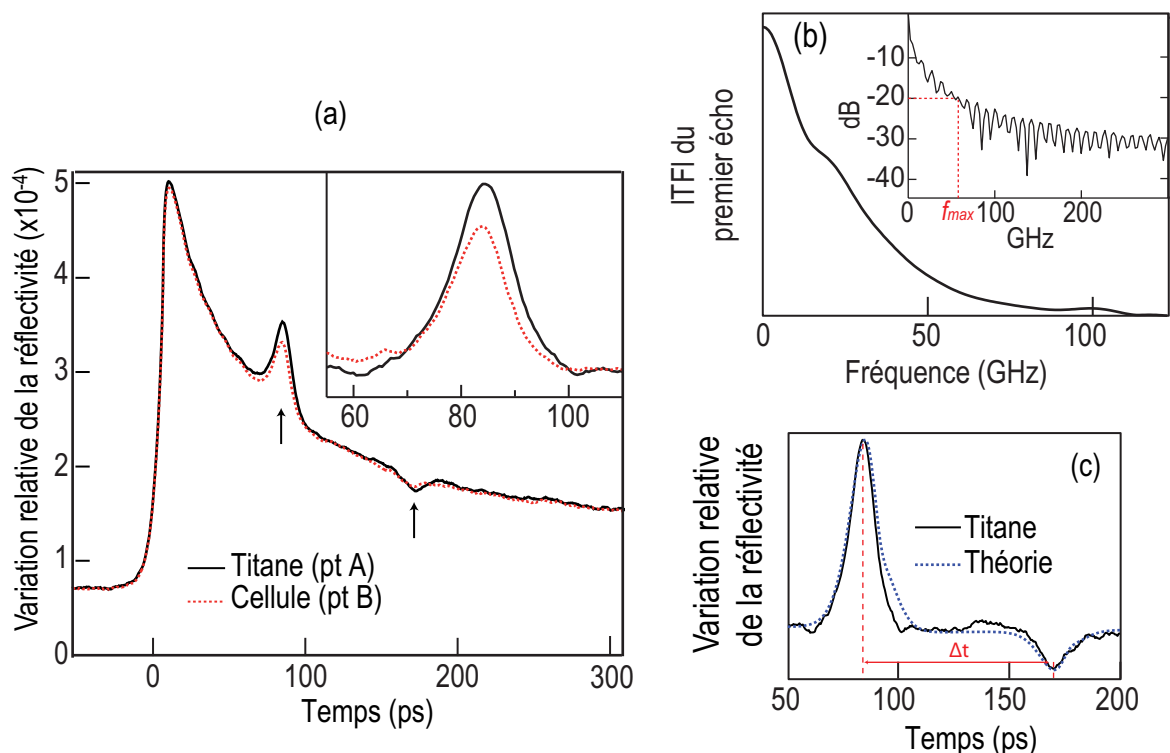


Fig. 4.4 – (a) Variation relative de la réflectivité en fonction du temps issue d'un point à l'interface titane-air (courbe noire) et d'un point à l'interface titane-cellule (pointillés rouges). Les échos dus aux allers retours dans le film de titane sont indiqués par des flèches à 85 ps et 170 ps. Un zoom sur le premier écho est illustré dans l'encart. (b) Module de la transformée de Fourier du premier écho. L'encart montre le spectre normalisé de l'écho en dB. (c) Signal acoustique obtenu après soustraction du fond thermique (noir) et signal acoustique calculé à partir des propriétés mécaniques du titane et du saphir. La durée Δt correspond au temps séparant les deux échos.

acoustiques monopolaires.¹²⁶ En zoomant sur le premier écho (encart de la figure 4.4(a)), nous observons que son amplitude lors de la réflexion sur l'interface titane-cellule est plus petite (pointillés) que celle obtenue quand il est réfléchi à la surface libre du titane (trait plein). Cette variation d'amplitude en fonction de la position, provenant de la transmission acoustique dans la cellule, montre que cette dernière peut être imagée à travers le coefficient de réflexion à l'interface. En outre, le module de la transformée de Fourier du premier écho, tracé dans la figure 4.4(b), montre que son contenu spectral s'étend jusqu'à ~ 100 GHz. Ceci offre une vaste plage d'analyse du coefficient de réflexion dans le domaine fréquentiel. Nous exploitons cette information à travers une analyse temps-fréquence dans la suite.

Pour examiner la variation de l'amplitude de l'écho en fonction de la position sur la ligne d'échantillonnage spatial en fonction de la fréquence (Fig. 4.4(b)), nous avons utilisé une analyse temps-fréquence basée sur une transformée en ondelettes. La transformée en ondelettes permet de décomposer un signal temporel $s(t)$ sur une famille de fonctions, localisées en temps et en

fréquence, appelées ondelettes. Elle est définie par¹²⁷ :

$$\mathcal{W}_s(\tau, u) = |u|^{-\frac{1}{2}} \int_{-\infty}^{+\infty} s(t) \psi^*\left(\frac{t-\tau}{u}\right) dt \quad (4.1)$$

où $s(t)$ et $\psi(t)$ désignent dans le domaine temporel le signal à analyser et la fonction dite ondelette mère. $\psi^*(t)$ désigne le complexe conjugué de $\psi(t)$. Le paramètre u est le facteur de dilatation de l'ondelette qui permet de changer sa fréquence centrale ω_0 . Le paramètre τ indique une translation de $\psi(t)$ dans le temps. L'équation 4.1 traduit ainsi une convolution entre $s(t)$ et $\psi(t/u)$. Une façon simple de calculer cette convolution consiste à utiliser une transformée de Fourier. Calculons la transformée en ondelette $\mathcal{W}_s(\tau, u)$ à partir du spectre du signal $\tilde{s}(\omega)$ et du spectre de l'ondelette $\tilde{\psi}(\omega)$. Pour analyser l'évolution temporelle de chaque composante fréquentielle du signal, nous avons utilisé une ondelette analytique.¹²⁸ Cette ondelette permet de séparer les composantes du signal en module et en phase. Une ondelette est rendue analytique en imposant que sa transformée de Fourier soit nulle, $\tilde{\psi}(\omega) = 0$, pour $\omega \leq 0$. Dans ce cas le module de $\mathcal{W}_s(\tau, u)$ permet de définir directement une distribution temps-fréquence de la densité d'énergie du signal. Cette distribution est appelée scalogramme, et s'exprime par :

$$\mathcal{P} = |\mathcal{W}_s(\tau, u)|^2 \quad (4.2)$$

Le scalogramme $\mathcal{P}$ représente l'image de l'intensité du signal s en fonction de la fréquence centrale de l'ondelette, ω_0 , et du temps.

Détaillons la façon d'évaluer numériquement l'équation 4.1 que nous avons retenue. En utilisant la notation

$$\psi_{\tau,u}(t) = |u|^{-\frac{1}{2}} \psi\left(\frac{t-\tau}{u}\right), \quad (4.3)$$

et la définition de la transformée de Fourier suivante :

$$\tilde{f}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-j\omega t} dt, \quad (4.4)$$

on obtient la transformée de Fourier de $\psi_{\tau,u}(t)$:

$$\tilde{\psi}_{\tau,u}(\omega) = |u|^{\frac{1}{2}} e^{-j\omega\tau} \tilde{\psi}(u\omega) \quad (4.5)$$

En utilisant la relation de Parseval définie par :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} x(t) y^*(t) dt = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{x}(\omega) \tilde{y}^*(\omega) d\omega, \quad (4.6)$$

la transformée en ondelettes s'écrit donc comme suit :

$$\mathcal{W}_s(\tau, u) = |u|^{\frac{1}{2}} \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{s}(\omega) \tilde{\psi}^*(u\omega) e^{j\omega\tau} d\omega \quad (4.7)$$

L'équation 4.7 nous permet de calculer $\mathcal{W}_s(\tau, u)$ à l'aide d'une transformée de Fourier inverse du produit des spectres $\tilde{s}(\omega) \tilde{\psi}^*(u\omega)$.

Une famille d'ondelettes est construite en dilatant l'ondelette de base appelée l'ondelette mère. L'ondelette mère que nous avons utilisée dans nos traitements est l'ondelette de Morlet,¹²⁸ la plus couramment employée.^{129,130} Elle est définie dans l'espace de Fourier par¹²⁷ :

$$\tilde{\psi}(\omega) = e^{-\frac{\gamma^2}{2\omega_0^2}(\omega-\omega_0)^2} \quad (4.8)$$

avec γ le paramètre qui impose le nombre de cycles dans l'ondelette. L'ondelette de Morlet possède une enveloppe gaussienne de largeur $2\omega_0/\gamma$ à $1/e^2$ centrée en ω_0 . Le choix de γ impose donc de faire un compromis entre la résolution temporelle et la résolution fréquentielle. Ici nous considérons $\gamma = 4$.¹²³

Afin d'analyser la variation de l'amplitude de l'écho avec la fréquence, nous avons représenté sur la figure 4.5 les scalogrammes $\mathcal{P}$ des deux courbes de réflectivité tracées dans la figure 4.4(a). La contribution de haute énergie apparaissant à $t = 0$ correspond au pic de coïncidence. Son amplitude est très élevée par rapport à l'amplitude correspondant aux échos. Le contraste doit donc être diminué pour révéler le premier écho à $t \approx 85$ ps. C'est pourquoi la contribution du pic de coïncidence apparaît saturée. Le temps d'arrivée du premier écho ne varie pas en fonction de la fréquence, ce qui indique que toutes les composantes fréquentielles de l'écho arrivent au même instant. D'autre part, l'amplitude de l'écho diminue avec la fréquence comme le montre également le spectre de Fourier du premier écho (Fig. 4.4(b)). Le deuxième écho qui arrive à 170 ps est peu marqué sur les deux scalogrammes en raison de sa faible intensité. On remarque également que l'amplitude du premier écho (à 85 ps) visible sur le scalogramme obtenu pour le cas d'une surface libre (Fig. 4.5(a)), est plus grande que celle du scalogramme obtenu lorsque la réflexion a lieu sur l'interface titane-cellule (Fig. 4.5(b)).

Afin de choisir la fréquence maximale des scalogrammes, nous avons tracé dans l'encart de la figure 4.4(b) le spectre normalisé de l'écho en dB. En fixant de façon arbitraire la valeur -20 dB comme valeur seuil au delà de laquelle le signal n'est plus exploitable, nous obtenons la fréquence maximale $f_{max} = 60$ GHz. D'autre part la fréquence minimale du scalogramme (30 GHz) est calculée à partir du temps Δt séparant les deux échos (Fig. 4.4(c)). En effet, pour extraire le contenu spectral propre au premier écho, il faut que l'enveloppe temporelle de l'ondelette soit

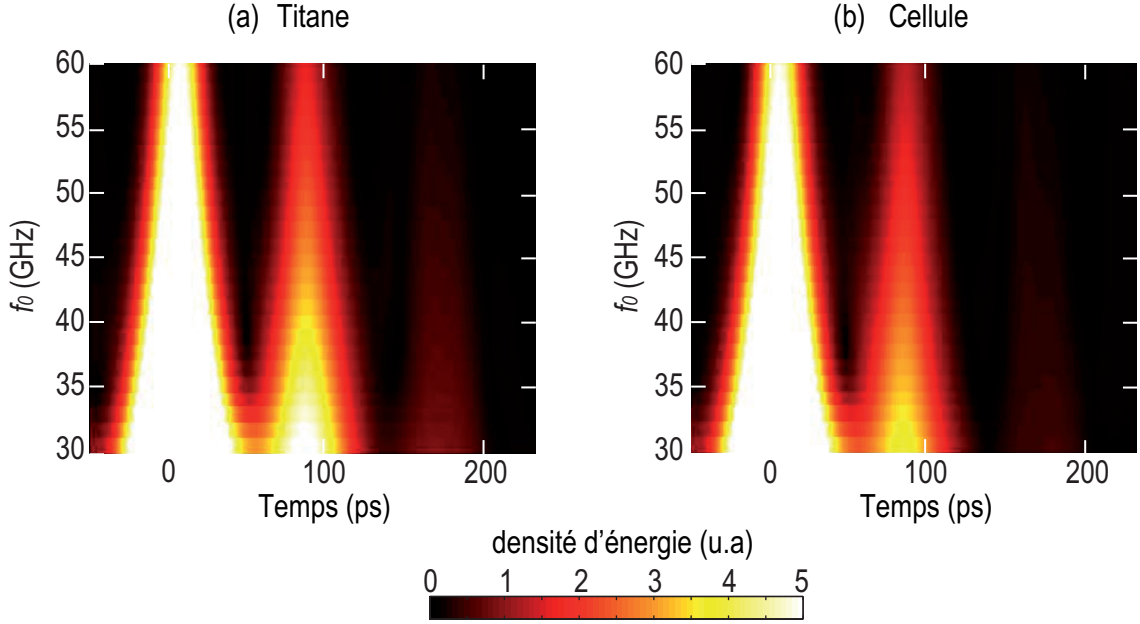


Fig. 4.5 – (a) Scalogramme de la variation de la réflectivité à l'interface titane-air (b) Scalogramme de la variation de la réflectivité à l'interface titane-cellule.

assez étroite pour pouvoir séparer les deux échos. On cherche alors la fréquence f_{min} telle que la largeur de l'ondelette à $1/e^2$ soit inférieure à Δt :

$$\frac{\gamma}{2\pi f_{min}} < \Delta t \quad (4.9)$$

Puisque $\gamma = 4$ et $\Delta t \approx 85$ ps (Fig. 4.4(c)), f_{min} doit être supérieure à 8 GHz. Par suite, nous avons choisi une fréquence minimale $f_{min} = 30$ GHz pour nous assurer que l'information en fréquence est propre au premier écho. Ainsi, la bande passante obtenue se situe entre 30 et 60 GHz. Comme l'amplitude du deuxième écho est inférieure au seuil que nous avons fixé (-20 dB), nous procédons à l'extraction du coefficient de réflexion acoustique à l'aide du premier écho uniquement.

Pour obtenir le coefficient de réflexion r_{ac}^p à une fréquence contrôlée f_0 au point de mesure p , nous convoluons le signal expérimental par une ondelette centrée en f_0 . Le module de cette convolution est l'intensité de l'image (ou densité d'énergie) $\mathcal{P}^p$. Nous sélectionnons la valeur $\mathcal{P}^p(t_{echo}, f_0)$ de ce module à l'instant d'arrivée du premier écho $t_{echo} = 85$ ps. De façon similaire, nous extrayons une valeur de référence $\mathcal{P}^{ref}(t_{echo}, f_0)$ de la densité d'énergie $\mathcal{P}^{ref}$ correspondant à un point de mesure à l'interface titane-air (loin de la région où se trouve la cellule, typiquement le scalogramme du point A (Fig. 4.3(b))). Nous utilisons $\mathcal{P}^{ref}(t_{echo}, f_0)$ pour normaliser $\mathcal{P}^p(t_{echo}, f_0)$ et calculer le coefficient de réflexion acoustique au point p . La racine carrée de la

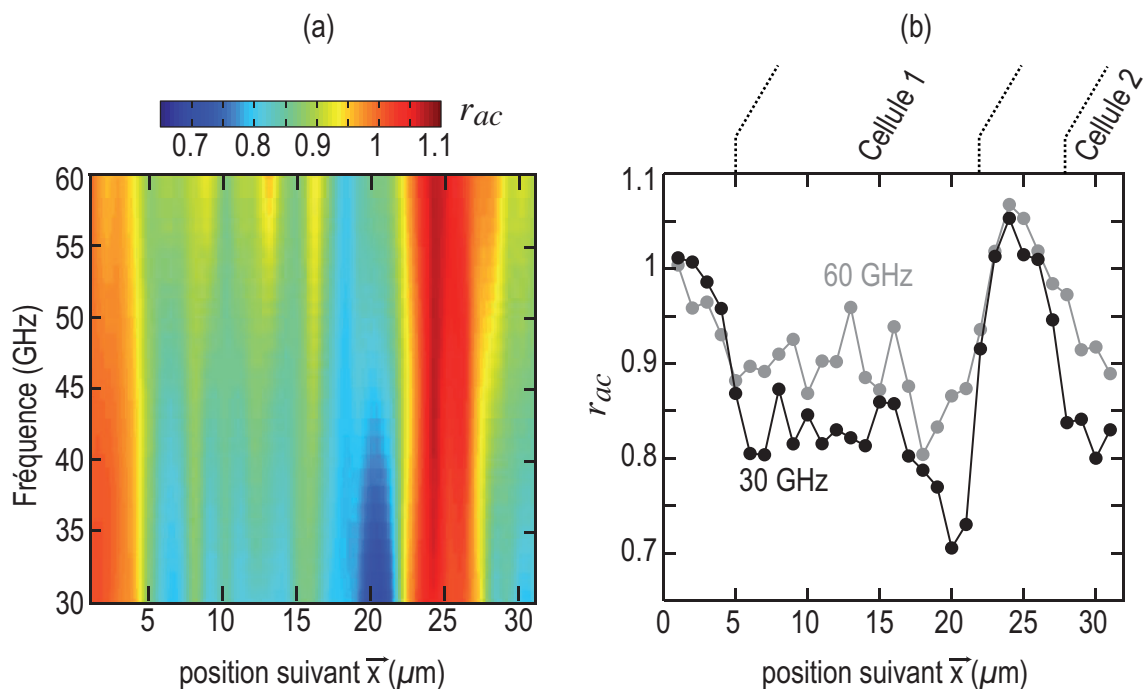


Fig. 4.6 – (a) Cartographie position-fréquence de l'amplitude du coefficient de réflexion acoustique (b) Variation du coefficient de réflexion r_{ac} pour les fréquences 30 GHz (courbe noire) et 60 GHz (courbe grise) en fonction de la position sur la ligne de balayage.

normalisation donne accès au coefficient de réflexion r_{ac}^p relatif aux déformations :

$$r_{ac}^p(f_0) = \sqrt{\frac{\mathcal{P}^p(t_{echo}, f_0)}{\mathcal{P}^{ref}(t_{echo}, f_0)}} \quad (4.10)$$

Le temps d'arrivée de l'amplitude maximale du premier écho t_{echo} est déterminé à partir du maximum de densité d'énergie sur le scalogramme. Chercher les maxima des transformées en ondelettes, au lieu de fixer un temps invariant pour lequel on extrait l'intensité à chaque fois, permet de détecter les variations de temps d'arrivée dues à des variations de phase du signal. Pour les cellules étudiées dans ce chapitre, le temps d'arrivée t_{echo} est invariant puisque la variation de phase est quasi-nulle. Nous verrons plus tard que ce n'est pas toujours le cas.

La figure 4.6(a) montre une cartographie position-fréquence du coefficient de réflexion acoustique r_{ac} ainsi obtenu. Le pas en position est de 1 μm . Le pas en fréquence est de 2 GHz et l'intervalle s'étend de 30 à 60 GHz. En observant la position de la ligne sur la figure 4.3(b) par rapport aux cellules, une corrélation entre la diminution de la valeur de r_{ac} et la présence de cellules est révélée. Les zones correspondant au Ti nu sont observées entre 1 et 4 μm d'une part, et entre 23 et 27 μm d'autre part, avec un coefficient de réflexion $r_{ac} > 0.95$. Nous observons également une diminution de r_{ac} entre 5 et 22 μm et entre 28 et 31 μm . En effet la présence d'une cellule engendre une diminution dans l'amplitude du coefficient de réflexion acoustique à

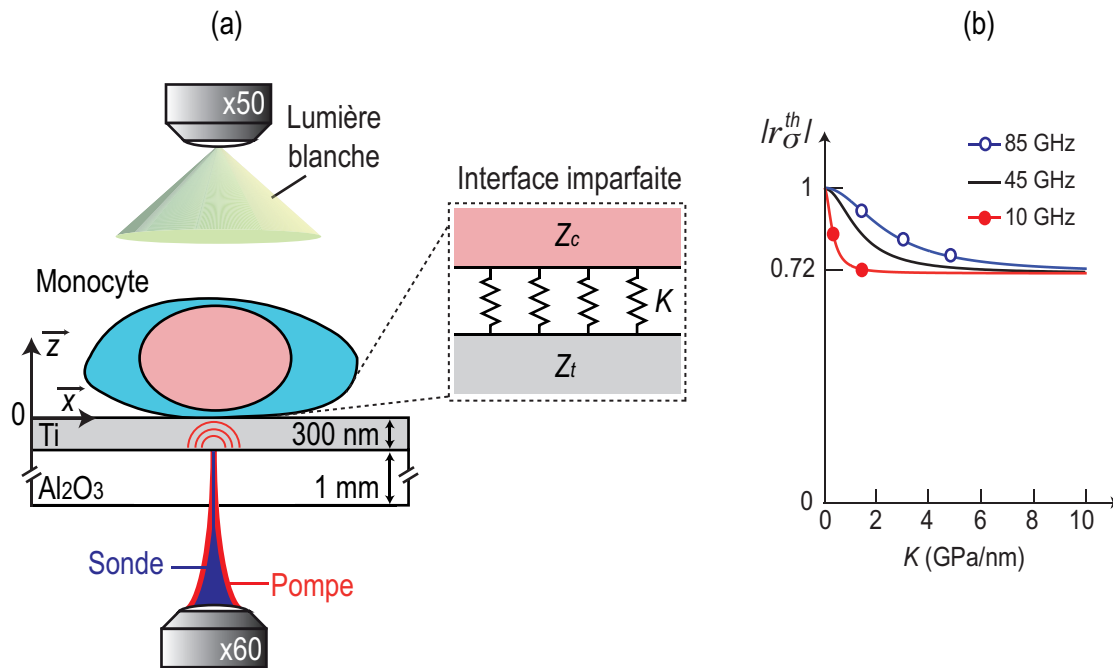


Fig. 4.7 – (a) Interface imparfaite titane-cellule de type ressort (b) Variation de $|r_{\sigma}^{th}|$ en fonction de la raideur K du ressort pour une impédance $Z_t = 32$ MPa.s/m, une impédance $Z_c = 5$ MPa.s/m et trois fréquences acoustiques 10 GHz (rouge avec des ronds pleins), 45 GHz (noir) et 85 GHz (bleu avec des ronds creux).

l'interface titane-cellule due à la transmission acoustique dans la cellule. Cette observation est parfaitement corrélée à la position de la ligne sondée sur l'image en lumière blanche (Fig. 4.3).

Outre sa variation en fonction de la position, l'amplitude de r_{ac} montre une importante dépendance en fréquence. Pour illustrer cette dépendance, nous avons sélectionné les deux fréquences extrêmes de l'intervalle, 30 et 60 GHz, et avons tracé sur la figure 4.6(b) les coefficients de réflexion à ces fréquences en fonction de la position. La valeur moyenne de r_{ac} observée dans les cellules passe de 0.8 à 30 GHz à 0.9 à 60 GHz. Par ailleurs, on distingue à $20 \mu\text{m}$ un passage d'une amplitude égale à ~ 0.7 à 30 GHz jusqu'à une amplitude de ~ 0.85 à 60 GHz (Fig. 4.8)(a). Pour élucider cette dépendance en fréquence, nous modélisons la réflexion à l'interface titane-cellule dans la section suivante.

4.3 Mesure de l'impédance acoustique et de la raideur d'interface

4.3.1 Interface imparfaite : modèle de type ressort

La dépendance en fréquence du coefficient de réflexion acoustique est souvent attribuée à des défauts de contact entre deux solides.^{108,109,131,132} Dans le cas des interactions cellule-

biomatériau, l'adhésion peut être hétérogène, par exemple à cause de la présence d'adhésions focales^{81,133} qui peuvent exister à l'interface entre la cellule et le film de titane, comme il a été présenté dans le chapitre 3. Elles entraînent des variations de contact entre ces deux milieux : l'interface titane-cellule est dite imparfaite. Une façon classique de modéliser cette interface consiste à supposer une discontinuité du déplacement à travers l'interface^{g,135}. Le saut de déplacement Δu à l'interface est relié à la contrainte par un simple ressort de masse négligeable et de raideur par unité de surface K ¹³⁶ comme illustré dans la figure 4.7(a). Cette raideur dépend de la position sur la ligne de l'échantillonnage spatial. La continuité des contraintes à l'interface, en $z = 0$ (Fig. 4.7(a)), permet d'écrire :

$$\sigma_t(0, \omega) = \sigma_c(0, \omega) = -K\Delta u \quad (4.11)$$

σ_t et σ_c étant les contraintes respectives dans le titane et dans la cellule. Expérimentalement, on mesure des déformations.³⁸ L'amplitude du coefficient de réflexion des déformations r_{ac} est égal à l'amplitude de celui des contraintes r_{σ}^{th} . Ce dernier s'écrit^{136 h} :

$$r_{\sigma}^{th} = -\frac{Z_t - Z_c + j\omega Z_t Z_c / K}{Z_t + Z_c + j\omega Z_t Z_c / K} \quad (4.12)$$

où Z_t est l'impédance acoustique du titane et Z_c l'impédance acoustique de la cellule. L'équation 4.12 montre que ce coefficient est complexe. Il dépend de la fréquence de l'onde ω et de la raideur K du ressort. Modéliser le contact par un ressort revient à faire l'hypothèse que d'une part la contrainte élastique est suffisamment petite pour ne pas modifier la nature du contact, et d'autre part que les dimensions caractéristiques de l'interface sont très petites devant les longueurs d'onde acoustiques.^{137,138} La valeur de la raideur du ressort renseigne sur la qualité de contact.

La figure 4.7(b) montre la variation de l'amplitude du coefficient de réflexion $|r_{\sigma}^{th}|$ en fonction de la raideur K du ressort. Pour illustration, cette variation est tracée en considérant l'impédance $Z_t = 32$ MPa.s/m du titane, celle de la cellule $Z_c = 5$ MPa.s/mⁱ et trois fréquences différentes de l'onde acoustique $f = 10, 45$ et 85 GHz. On remarque d'abord que lorsque $K=0$, l'amplitude du coefficient de réflexion est égale à l'unité et son argument vaut π : c'est le cas d'une réflexion sur une surface libre.¹⁴⁰ En d'autres termes, quand la raideur du ressort est nulle, les deux

g. Une interface imparfaite peut également être modélisée autrement en considérant que le déplacement est continu alors que la contrainte est discontinue à cause de la présence des tensions de surface à cette interface.¹³⁴

h. L'exposant th dans r_{σ}^{th} est utilisé pour désigner le coefficient de réflexion théorique.

i. La valeur de l'impédance acoustique de la cellule Z_c est choisie comme étant le produit entre la vitesse des ondes acoustiques mesurée dans la cellule $v_c = 3700$ m/s (Sec. 4.1.2) et la densité d'un monocyte prédite par la littérature.¹³⁹

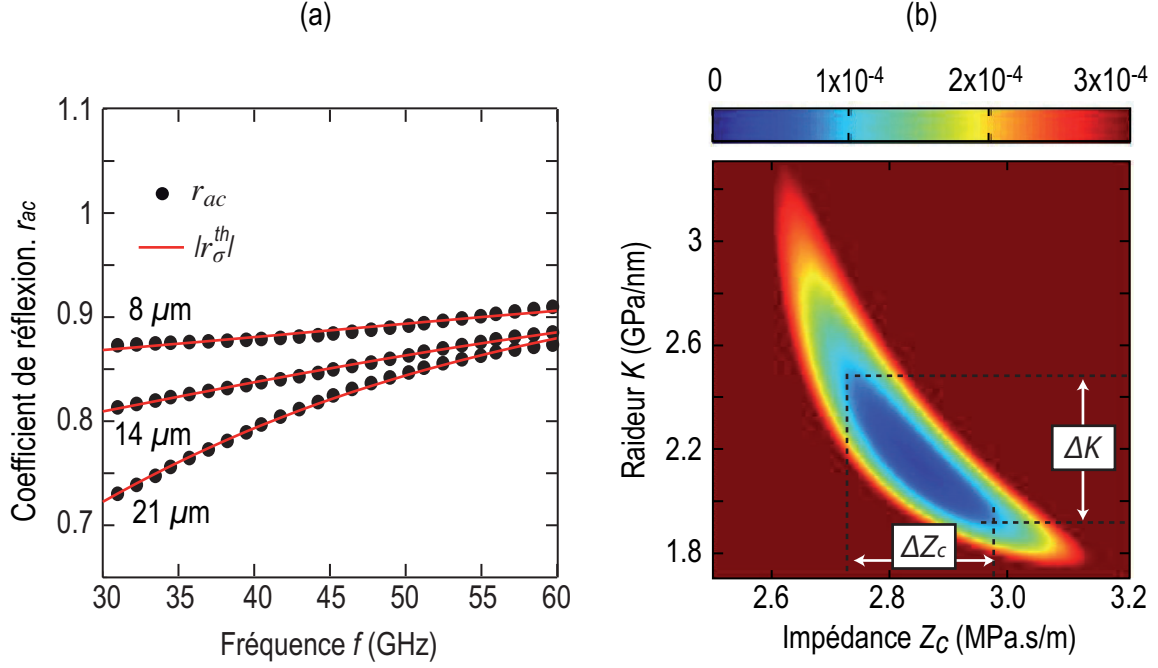


Fig. 4.8 – (a) Variation expérimentale de r_{ac} en fonction de la fréquence (points noirs) et théorique (ligne rouge) pour 3 points dans la cellule (b) sse en fonction de Z_c et K pour un point dans la cellule.

milieux ne sont pas connectés entre eux et l'onde acoustique n'est pas sensible à la présence de la cellule. Deuxièmement, $|r_{\sigma}^{th}|$ diminue quand la raideur K augmente pour atteindre, à l'infini, la valeur de l'amplitude du coefficient de réflexion obtenue dans le cas d'un contact parfait $|(Z_c - Z_t)/(Z_c + Z_t)|$. Par conséquent, un ressort possédant une raideur infinie équivaut à une interface parfaite entre les deux milieux. Ainsi la raideur K quantifie la qualité du contact : plus la raideur K est grande, meilleur le contact est. D'autre part, la variation de $|r_{\sigma}^{th}|$ en fonction de K dépend fortement de la fréquence acoustique comme nous pouvons le remarquer en observant les variations des trois courbes présentées sur la figure 4.7(b). Plus la fréquence est élevée, plus la gamme de raideurs auxquelles notre mesure est sensible est élevée.

4.3.2 Processus numérique pour l'extraction de l'impédance acoustique et de la raideur d'interface

L'équation 4.12 montre la possibilité de déterminer l'impédance de la cellule Z_c et la raideur K à l'aide du coefficient de réflexion acoustique r_{ac} , une fois l'impédance du titane Z_t connue. Afin d'extraire l'impédance de la cellule à partir du coefficient de réflexion acoustique, une première étape consiste à déterminer l'impédance acoustique du film de titane. Pour ce faire, nous avons calculé la variation de la réflectivité obtenue quand la réflexion de l'onde acoustique a lieu sur la surface libre du titane, dans une région loin de la cellule (point A de la figure 4.3(a)).

A l'aide d'un code de calcul semi-analytique existant au sein du groupe, nous avons obtenu le champ de déformation dans le titane en résolvant l'équation d'onde.¹⁴¹ Nous avons ensuite calculé la variation de la réflectivité théorique $\Delta R/R$. Connaissant l'impédance du saphir, $Z_s = 44 \text{ MPa.s.m}^{-1}$, et la vitesse des ondes acoustiques dans le titane, $v_t = 2e/\Delta t \approx 7000 \text{ m.s}^{-1}$ ^j mesurée à partir du temps séparant les deux échos $\Delta t = 85 \text{ ps}$, nous avons déterminé $\Delta R/R$ théorique (courbe en pointillés bleus sur la Fig. 4.4(c)) en ajustant la densité du titane pour représenter au mieux la réflectivité mesurée. La comparaison entre le calcul (pointillés bleus) et les mesures au niveau du point A (courbe noire) est illustrée sur la figure 4.4(c). Nous trouvons une densité de titane de 4500 kg.m^{-3} similaire à celle du titane massif,¹⁴² ce qui correspond à une impédance acoustique $Z_t = 32 \text{ MPa.s.m}^{-1}$. Cette valeur d'impédance Z_t mesurée sera considérée dans tout le travail qui suit.

Afin d'ajuster le coefficient de réflexion théorique $|r_\sigma^{th}|$ à la valeur mesurée r_{ac} , nous utilisons un algorithme d'optimisation existant dans le logiciel MATLAB qui s'appuie sur une régression non linéaire multiple pour minimiser la somme des carrés des résidus sse (écarts entre les mesures et les prédictions) définie par :

$$sse = \sum_i \left[r_{ac}^p(\omega_i) - |r_\sigma^{th}(\omega_i)| \right]^2 \quad (4.13)$$

où i est l'indice du point en fréquence et $|r_\sigma^{th}|$ désigne le coefficient de réflexion théorique. Le minimum de sse est atteint en faisant varier les deux paramètres inconnus, Z_c et K , dans l'expression de l'amplitude du coefficient de réflexion $|r_\sigma^{th}|$. La figure 4.8(a) montre les ajustements optimaux $|r_\sigma^{th}|$ obtenus pour trois différents points sur la ligne d'échantillonnage spatial. On observe un très bon accord entre les données expérimentales (points) et les ajustements issus de la procédure d'optimisation (lignes). Cet accord confirme que le modèle décrit par l'équation 4.12 est adapté pour représenter la variation mesurée du coefficient de réflexion avec la fréquence. Cette méthode permet donc de convertir la valeur expérimentale du coefficient de réflexion en deux valeurs distinctes Z_c et K , et ainsi d'obtenir l'impédance de la cellule et la raideur d'interface titane-cellule le long d'une ligne.

Pour estimer l'erreur sur les valeurs de Z_c et K issues de l'ajustement numérique, nous avons tracé la fonction sse sur la figure 4.8(b) pour un point typique dans la cellule en fonction des deux paramètres variables Z_c et K . Premièrement, on n'observe qu'un seul minimum, ce qui démontre que l'algorithme converge vers un couple de paramètres unique. Deuxièmement, nous pouvons estimer l'erreur induite par le fit sur Z_c et K en localisant la zone pour laquelle $|sse|$

j. La vitesse des ondes acoustiques dans le titane massif est d'environ 6000 m/s.⁴⁰ Nous trouvons une vitesse d'environ 7000 m/s supérieure à 6000 m/s à cause de la structure collonnaire du titane utilisé dans nos expériences.

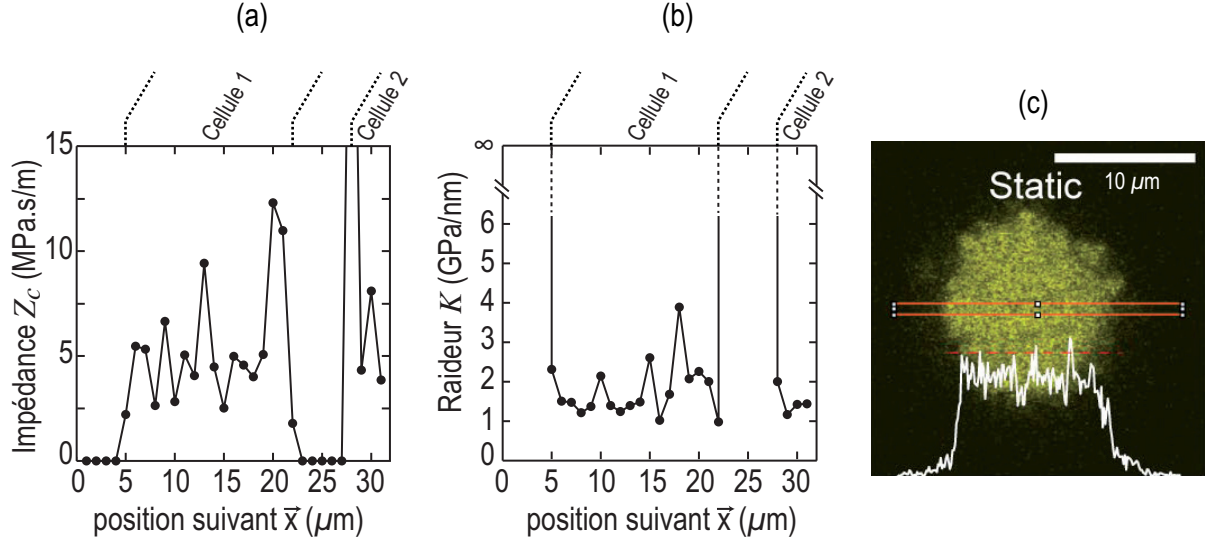


Fig. 4.9 – (a) Impédance acoustique Z_c suivant la position (b) Raideur d'interface K suivant la position. (c) Image fluorescente d'un monocyte montrant une adhésion homogène sur tout la zone cellulaire, adapté d'après Rullo *et al.*¹²²

$\leq 10^{-4}$ (Fig. 4.8(b)). À travers cette procédure, nous trouvons que $1.8 < K < 2.6$ GPa/nm et $2.7 < Z_c < 3.1$ MPa.s/m, ce qui correspond à une erreur de 15% sur K et de 5% sur Z_c . L'incertitude sur l'impédance est donc plus petite que l'incertitude sur la raideur d'interface.

4.3.3 Impédance acoustique Z_c des monocytes et raideur d'interface titane-monocytes K

Nous représentons sur la figure 4.9 les variations d'impédance Z_c (Fig. 4.9(a)) et de raideur K (Fig. 4.9(b)) ainsi obtenues à partir de r_{ac} en fonction de la position. En ce qui concerne l'interface titane-air, la valeur d'impédance obtenue par l'algorithme est proche de 0. Cette valeur indique la présence de l'air dans cette région. Par conséquent, la surface libre peut être identifiée *a posteriori* à travers l'algorithme. Pour ces points, l'algorithme prédit une raideur K infinie ce qui est aberrant, mais pas surprenant car lorsque Z_c est nul, r_{ac} ne dépend plus de K , comme le montre l'équation 4.12. Cette valeur n'a pas de sens puisque l'interface est libre. Elle est indiquée sur la figure 4.9(b) uniquement pour délimiter la cellule.

Les mesures correspondant à l'interface titane-cellule révèlent une impédance de valeur moyenne $Z_c = 4.6$ MPa.s/m presque homogène sur toute l'interface titane-cellule (Fig. 4.9(a)). Puisque les monocytes sont presque entièrement formés d'un noyau,¹²² considérons la vitesse des ondes acoustiques déjà mesurée dans le noyau dans la configuration bi-latérale, $v_c = 3700$ m/s. La densité de la cellule est $\rho_c = Z_c/v_c = 1250$ kg.m⁻³. Cette valeur correspond à celle

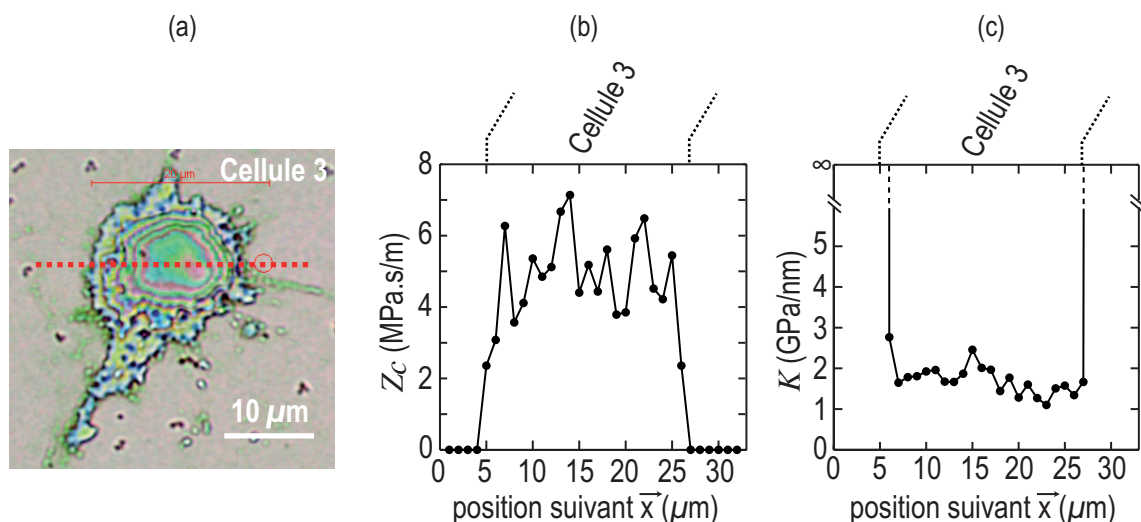


Fig. 4.10 – (a) Balayage 1D d'un monocyte. (b) Impédance acoustique et (c) Raideur d'interface en fonction de la position.

prévue par spectroscopie électronique dans une région nucléaire,¹³⁹ ce qui accrédite le résultat obtenu.

La valeur de la raideur d'interface K est également homogène sous toute la région cellulaire et égale à $K \simeq 1.8$ GPa/nm. En comparant K avec des raideurs d'interface mesurées par la technique de l'acoustique picoseconde entre deux solides, nous trouvons que la raideur d'interface titane-cellule est huit fois plus petite que celle mesurée entre l'or et le silicium.¹⁰⁸ Elle est de plus trois fois plus petite que celle mesurée entre des molécules d'octadecanethiolate.¹⁴³ Des mesures de fluorescence faites par Rullo *et al.*¹²² ont révélé un profil d'adhésion homogène (Fig. 4.9(c)) pour ce même type cellulaire (monocytes). La valeur constante de K est donc consistante avec la littérature, et sa valeur indique un contact plus faible qu'entre deux solides.

La reproductibilité de la mesure a été également vérifiée sur plusieurs monocytes. Pour illustration, les résultats obtenus sur un autre monocyte sont présentés. La figure 4.10 montre l'image en lumière blanche de la cellule (Fig. 4.10(a)). La variation d'impédance (Fig. 4.10(b)) et la variation de la raideur (Fig. 4.10(c)) en fonction de la position donnent des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus dans la première expérience (Fig. 4.9(a) et 4.9(b)), ce qui valide les valeurs trouvées.

4.3.4 Analyse thermique

Enfin, nous avons étudié l'élévation de la température à la fréquence de modulation f_m^k tout au long de la ligne sondée. Pour cela, nous avons prélevé à chaque position la valeur de

k. On rappelle que $f_m = 1$ MHz.

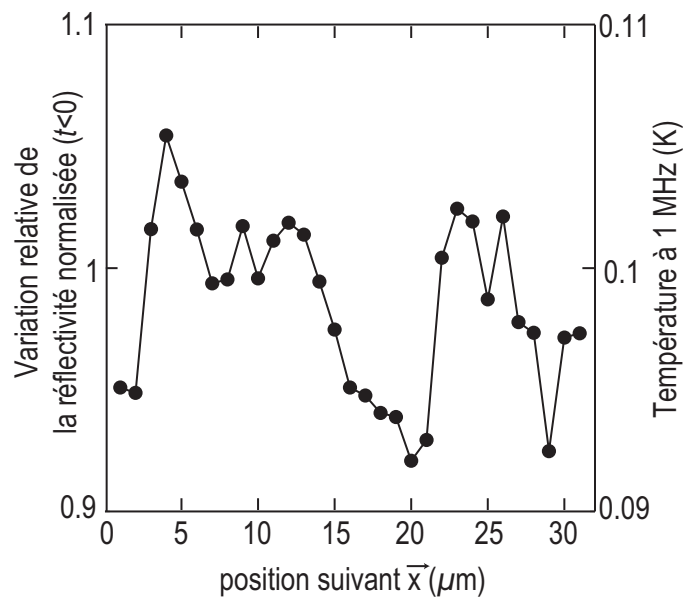


Fig. 4.11 – Variation de la température en fonction de la position

la composante continue à $t < 0$ du changement de réflectivité. Cette valeur est proportionnelle à la température à l'interface. Nous avons estimé une température maximale de 0.1 K atteinte à la surface libre du Ti en se servant d'un programme de simulation développé par l'équipe¹²³ permettant de résoudre l'équation de la chaleur pour des géométries similaires à celle de notre échantillon (Fig. 4.3(a)). La figure 4.11 montre la réflectivité à $t < 0$, en fonction de la position, normalisée par la valeur moyenne correspondant à l'interface titane-air. L'échelle verticale de gauche représente la variation de la valeur normalisée tandis que celle de droite désigne l'élévation de la température (en K) dans la cellule. Nous observons une légère diminution de température, ~ 0.01 K (de 0.1 à 0.09 K), à l'intérieur de la zone correspondant à la première cellule entre 13 et 21 μm (Fig. 4.9(a)). Cette faible variation de température démontre l'efficacité du biotransducteur à isoler thermiquement la cellule. Malgré tout, l'évolution de la température mesurée au long de la ligne d'auscultation suggère la possibilité de déterminer la résistance thermique à l'interface titane-cellule, comme dans le cas du contact solide-solide.¹²⁶ En modulant à une fréquence plus basse que celle pour laquelle le transducteur a été conçu, l'échauffement de la cellule pourrait être légèrement supérieur et la sensibilité à la résistance thermique de l'interface meilleure.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré la capacité de l'acoustique picoseconde à sonder les interactions cellule-biomatériau. Cette technique a l'avantage de quantifier, sans contact, et de

manière non-invasive, les interactions cellule-substrat. Une étude sur des cellules monocytes dont la structure de l'adhésion est simple a été réalisée.

Après avoir présenté le film mince de titane utilisé comme transducteur adapté aux applications biologiques, nous avons mesuré la vitesse des ondes acoustiques dans la cellule en se plaçant dans une configuration bi-latérale. Ensuite la configuration uni-latérale inférieure a permis de faire un échantillonnage spatial 1D et de déterminer le coefficient de réflexion acoustique entre le titane et la cellule le long d'une ligne. Un traitement en ondelettes a donné accès à la variation en fréquence de ce coefficient de réflexion acoustique. Afin de décrire cette dépendance en fréquence, nous avons modélisé l'interface titane-cellule par des ressorts de raideur K . Un algorithme de calcul a permis d'extraire deux grandeurs caractéristiques en analysant la valeur expérimentale du coefficient de réflexion : l'impédance acoustique de la cellule Z_c et la raideur du ressort K . La valeur moyenne de l'impédance acoustique que nous avons trouvée a pu être comparée à des valeurs issues de la littérature. La variation de K est consistante avec les profils d'adhésion issus de la littérature. Cependant, il reste difficile de relier cette valeur à une énergie d'adhésion. A cette fin, il serait intéressant d'étudier l'adhésion des objets biomimétiques évoqués dans la première partie à l'aide de l'acoustique picoseconde. Une étude pourrait servir de calibration du dispositif pour l'évaluation de l'adhésion cellulaire. D'autre part, l'algorithme d'optimisation utilisé pour la prédiction de Z_c et K pourrait également être amélioré en lui adjoignant un calcul plus rigoureux de l'incertitude liée à l'identification numérique.¹⁴⁴ Pour aller plus loin, nous avons aussi déterminé l'élévation de la température tout au long de la ligne. Cette étude prospective suggère la possibilité d'explorer, dans le futur, les propriétés thermiques de la cellule ainsi que la résistance thermique à l'interface de la cellule.¹²⁶

Dans la partie suivante, la méthode opto-acoustique, par laquelle on génère des ondes acoustiques au travers d'un film de titane, sera intégrée à un dispositif expérimental asynchrone en vue d'imager l'adhésion, l'impédance et la topographie de plusieurs types cellulaires à la structure plus complexe.

Conclusion de la deuxième partie

Le principe de l'adhésion cellulaire évoqué de manière générale dans le chapitre 3 a montré à quel point ce processus biologique est primordial pour le fonctionnement et le maintien d'une cellule. L'introduction du processus de migration nous a permis d'appréhender les mécanismes complexes que la cellule met en œuvre pour s'attacher au milieu extracellulaire. Il est apparu clairement que le cytosquelette est la structure cellulaire principale impliquée dans l'adhésion, permettant à la cellule de sentir la mécanique de son entourage à travers le phénomène de mécanotransduction. Afin d'étudier l'adhésion à l'échelle d'une cellule individuelle, des méthodes optiques basées sur la microscopie à fluorescence ou bien des techniques de micromanipulation nécessitant souvent un contact avec la cellule sont couramment utilisées. Les méthodes optiques sont dans la plupart des cas qualitatives alors que les techniques de contact telles que l'AFM et les micro-plaques sont capables de quantifier les forces mécaniques mises en jeu durant l'adhésion. Cependant, le contact requis par ces méthodes peut affecter les mesures d'adhésion et ne reflète pas tout à fait les interactions cellule-environnement ayant lieu sans facteurs extérieurs, d'autant plus que la cellule est très sensible à toute modification mécanique de l'environnement à travers la mécanotransduction. Pour s'affranchir de ce problème et mesurer l'adhésion cellule-substrat sans appliquer aucune force extérieure, des techniques se basant sur la microstructuration de substrats déformables peuvent être employées. Mais l'inconvénient de ces méthodes est qu'elles ne sont pas représentatives d'un biomatériau utilisé dans des applications biomédicales.

En se basant sur la capacité de l'acoustique picoseconde à sonder le contact et la qualité d'interface entre deux solides, nous avons employé l'acoustique picoseconde comme technique alternative pour étudier l'adhésion cellulaire. L'étude a fait l'objet du chapitre 4 dans lequel une évaluation quantitative, à distance, du contact cellule-biomatériau a été abordée, pour la première fois, avec des ondes acoustiques GHz. Dans ce chapitre, les expériences ont été menées sur des monocytes, des cellules animales possédant une géométrie sphérique et une adhésion homogène sur toute leur surface en contact avec le substrat. Le choix du transducteur de titane adapté aux applications biologiques et permettant de mesurer séparément les oscillations Brillouin dans la cellule et le coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule, a été

ensuite discuté. Ce biotransducteur a permis de procéder à la mesure opto-acoustique en différents points le long d'une ligne à l'interface titane-cellule. Ensuite, l'amplitude du coefficient de réflexion acoustique r_{ac} a été mesurée tout au long de la ligne sondée. Une diminution de la valeur de r_{ac} en fonction de la position a permis de localiser la cellule sur la ligne. De plus, un traitement du signal basé sur une transformée en ondelettes a montré que le coefficient de réflexion présente une dépendance en fréquence. Cette dépendance en fréquence a été attribuée à la qualité de contact titane-cellule et modélisée par un ressort de raideur K . Grâce à une procédure d'optimisation, nous avons pu trouver une raideur d'interface moyenne $K = 1.8 \text{ GPa/nm}$ entre les monocytes et le titane et une impédance moyenne des monocytes $Z_c = 4.6 \text{ MPa.s/m}$.¹⁴⁵ L'homogénéité de K sur toute la surface de la cellule est en bon accord avec le profil d'adhésion des monocytes obtenu par ailleurs par microscopie à fluorescence.¹²² La valeur de K fournit une mesure quantifiée de l'adhésion entre la cellule et le film de titane, tandis que l'impédance moyenne Z_c donne accès à la densité des monocytes connaissant la vitesse des ondes acoustiques dans ce type de cellules. Par ailleurs, l'étude de l'élévation de la température tout au long de la ligne montre que le biotransducteur utilisé est adapté à de telles mesures opto-acoustiques puisque la diffusion thermique à 1 MHz dans la cellule est presque nulle. En outre, cette étude thermique pourrait dans le futur être exploitée dans le but de caractériser le transport thermique à l'interface titane-cellule en diminuant la fréquence de modulation.

Nous sommes parvenus dans cette partie à concevoir un montage opto-acoustique et un biotransducteur adaptés à l'étude quantitative, sans contact, de l'adhésion cellule-substrat ainsi qu'à la caractérisation des propriétés mécaniques des cellules. De plus, nous avons mis en place les outils de traitement de signal nécessaires pour analyser nos mesures dans les domaines temporel et fréquentiel. Par ailleurs, nous avons utilisé une modélisation du contact cellule-biotransducteur. La comparaison avec la littérature a permis de valider les résultats que nous avons obtenus sur des cellules modèles à l'aide de cette modélisation. La mise en place de tous ces éléments théoriques et expérimentaux permet maintenant d'étudier l'adhésion cellulaire en 2D. La nouvelle dimension spatiale offrira un moyen pour explorer la forme et la mécanique des structures cellulaires impliquées dans l'adhésion, en particulier le cytosquelette. Elle permettra en outre d'observer l'évolution de l'adhésion dans des processus biologiques complexes comme la migration. Cette analyse fera l'objet de la troisième partie de ce manuscrit. Nous y étendrons l'approche opto-acoustique développée à un montage asynchrone en vue d'obtenir une image 2D des propriétés mécaniques de la cellule d'une part, et de la qualité d'interface cellule-substrat d'autre part.

Troisième partie

Echographie cellulaire à l'aide d'un microscope opto-acoustique inversé

Introduction

Le faible contraste optique que présentent les cellules limite la qualité d'observation par microscopie optique. Pour cela, on a souvent recours à des techniques de microscopie plus sophistiquées comme par exemple la microscopie à champ sombre, la microscopie à contraste de phase ou la microscopie à fluorescence.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Cependant, grâce aux variations locales de leurs propriétés mécaniques, les cellules possèdent un contraste acoustique meilleur que le contraste optique offert par les techniques optiques classiques sans marquage.¹⁴⁹ De plus, les ondes acoustiques ont l'avantage de pénétrer dans le milieu et sonder la structure interne des cellules ce qui n'est pas possible au moyen d'ondes lumineuses. Ces ondes permettent de déterminer quantitativement, à la surface et dans le volume, les propriétés mécaniques des cellules.

Il a été introduit dans la partie précédente que plusieurs processus biologiques, comme par exemple la migration et l'adhésion cellulaire, entraînent, par leur dynamique, des modifications dans la mécanique cellulaire. La mesure quantitative des propriétés mécaniques qu'offre la microscopie acoustique est donc un outil très puissant qui permet de suivre l'évolution des processus biologiques à l'échelle cellulaire. Jusqu'à présent, l'imagerie acoustique de cellules individuelles était obtenue à l'aide de microscopes acoustiques, opérationnels jusqu'à quelques GHz.¹⁵⁰ À ces fréquences, la résolution en profondeur des images acoustiques de cellules individuelles était micrométrique et les structures intracellulaires comme les fibres d'actine, le noyau et les organites, ne pouvaient pas être révélées. Afin d'améliorer cette résolution, il est donc nécessaire d'accéder à des fréquences supérieures à quelques GHz. Pour cela, nous proposons dans cette partie l'acoustique picoseconde comme outil d'imagerie cellulaire complémentaire à la microscopie acoustique.

L'observation des oscillations Brillouin à une position fixée dans une cellule a permis à l'équipe bordelaise ces dernières années de quantifier les propriétés mécaniques telles que la densité, la vitesse des ondes acoustiques, la viscosité ainsi que l'épaisseur des cellules.^{15,42,117,151} L'échantillonnage opto-acoustique spatial 1D mené sur des monocytes et présenté dans la deuxième partie de ce manuscrit, a étendu sur une zone cellulaire plus grande l'évaluation quantitative par acoustique picoseconde des propriétés mécaniques des cellules, donnant accès à une

distribution spatiale de l'impédance acoustique au sein d'une même cellule.¹⁴⁵ De plus, il a montré sa capacité à évaluer la qualité du contact cellule-biomatériau. La détermination des propriétés mécaniques locales d'une cellule par acoustique picoseconde a ainsi ouvert la voie vers l'imagerie cellulaire au GHz. Il reste cependant à diminuer les longs temps d'acquisition afin que cette imagerie soit réalisable dans un temps compatible avec la réalisation pratique des expériences.

Utilisant un échantillonnage optique asynchrone développé en 2009 et 2012 au sein de l'équipe en collaboration avec le laboratoire LOMA,^{152,153} un dispositif pompe-sonde permettant de diminuer considérablement le temps d'acquisition a été mis en place par A. Abbas pendant ses travaux de thèse dans le but de réaliser de l'imagerie en acoustique picoseconde.¹⁵³ En utilisant ce dispositif, nous réaliserons dans cette dernière partie une échographie à l'échelle cellulaire en produisant des images acoustiques de haute résolution avec un contraste créé par les propriétés mécaniques locales des cellules. Pour cela, cette partie sera divisée en trois chapitres et articulée autour des cinq objectifs suivants :

- introduire le contexte de l'imagerie acoustique à l'échelle cellulaire,
- présenter le dispositif pompe-sonde asynchrone développé pour l'application à l'imagerie en acoustique picoseconde,
- réaliser une image acoustique de cellules animales adhérentes sur un biomatériau de titane,
- mettre en place d'indicateurs quantitatifs nécessaires pour l'évaluation des propriétés mécaniques et de l'adhésion des cellules,
- démontrer la sensibilité de la technique d'imagerie développée à détecter des variations de propriétés mécaniques d'un même type cellulaire à différents temps de son cycle de vie ainsi que des variations d'un type cellulaire à un autre,
- réaliser une image topographique des zones fines (< 50 nm) d'une cellule.

Le chapitre 5, constitué de deux sections, introduira cette troisième partie portant sur l'imagerie acoustique à l'échelle cellulaire. La première section sera consacrée à la présentation des innovations technologiques qui ont permis le développement de l'imagerie acoustique à l'échelle cellulaire. Pour cela, un état de l'art de la microscopie acoustique ainsi que les principes de fonctionnement de cette technique seront présentés. Ensuite, en exposant quelques exemples d'application, la nécessité d'utiliser la microscopie acoustique comme outil d'imagerie sera révélée. Dans le but d'améliorer la résolution axiale de cette technique, nous présenterons dans

la deuxième section de ce chapitre le microscope opto-acoustique inversé développé grâce à un dispositif optique asynchrone d'acoustique picoseconde.

Les images acoustiques produites par ce microscope, seront ensuite détaillées dans le chapitre 6. En imageant à deux différents stades de sa vie les propriétés mécaniques d'un même type cellulaire, ainsi qu'en détectant des variations de ces propriétés d'un type cellulaire à un autre, la sensibilité du microscope développé sera discutée. Des indicateurs permettant de quantifier les propriétés mécaniques des cellules, seront enfin définis dans le but de suivre des processus biologiques complexes comme l'adhésion par exemple.

L'analyse du contraste acoustique observé dans les zones fines d'une cellule sera réalisée dans le chapitre 7. L'identification et la modélisation de résonances mécaniques de ces zones seront tout d'abord présentées. Grâce à ces résonances, la topographie de la lamelle d'une cellule en migration sera ensuite imagée et la rhéologie de cette région fine sera discutée. Ainsi, une loi de comportement entre 10 GHz et 100 GHz sera présentée offrant ainsi la possibilité de quantifier la viscosité et l'adhésion de couches cellulaires de moins de 50 nm d'épaisseur.

Chapitre 5

Montage asynchrone d'acoustique picoseconde pour un microscope opto-acoustique inversé

La microscopie acoustique a prouvé qu'elle est un outil biologique multifonctionnel. Elle est en effet capable de fournir des images acoustiques avec une résolution latérale proche de celle obtenue par microscopie optique.¹⁵⁴ De plus, elle offre la possibilité d'étudier quantitativement les propriétés mécaniques des cellules comme par exemple la densité, l'épaisseur, la rigidité et l'atténuation.¹⁵⁵ En utilisant des fréquences acoustiques comprises entre ~ 100 MHz et quelques GHz^a, cette technique permet de suivre l'évolution des propriétés mécaniques au cours d'un processus biologique.¹⁵⁸ Cependant, la résolution axiale de la microscopie acoustique est limitée, et ne permet pas d'imager des zones cellulaires de faibles épaisseurs.

Grâce aux impulsions lumineuses femtosecondes, les fréquences générées en acoustique picoseconde atteignent classiquement plusieurs centaines de GHz, supérieures de 2 ordres de grandeurs à celles offertes par la microscopie acoustique. Ces hautes fréquences acoustiques permettent alors une résolution nanométrique en profondeur, inaccessible par les techniques de microscopie acoustique. Cependant, l'inconvénient majeur qui empêche l'application de l'acoustique picoseconde à l'imagerie cellulaire est le long temps d'acquisition (s'étendant sur plusieurs heures) que nécessitent ces expériences. Pour surmonter ce problème, il est nécessaire de s'affranchir de la ligne à retard mécanique (Fig. 1.1) et de trouver une méthode alternative pour contrôler le retard pompe-sonde. Pour cela, nous faisons appel à un dispositif optique asynchrone.

a. ~ 3 GHz pour les microscopes acoustiques piézoélectriques les plus performants,¹⁵⁶ 8 GHz dans l'hélium superfluide.¹⁵⁷

En décrivant le nouveau montage asynchrone permettant l'application de l'acoustique picoseconde à l'imagerie cellulaire, ce chapitre complète l'introduction à la troisième partie de ce manuscrit. Pour cela, il sera divisé en deux sections. Dans la première section, afin de décrire les travaux portant sur l'imagerie acoustique des cellules qui ont été effectués pendant une cinquantaine d'années, un bref historique sur la microscopie acoustique des cellules sera exposé. Ensuite, nous présenterons les principes physiques à la base de cette technique et soulignerons l'intérêt d'imager les cellules à l'aide d'un microscope acoustique. Nous exposerons les différentes approches quantitatives développées en microscopie acoustique dans le but de suivre l'évolution et la dynamique de plusieurs processus biologiques, comme par exemple l'adhésion cellulaire. Nous proposerons ensuite l'utilisation de l'acoustique picoseconde pour améliorer la résolution axiale pour l'imagerie acoustique. Pour cela, nous présenterons dans la deuxième section le montage pompe-sonde asynchrone développé au sein de l'équipe en collaboration avec le LOMA. Nous décrirons le principe de l'échantillonnage utilisé dans un tel montage et nous mettrons en évidence ses caractéristiques principales. Nous finirons par introduire le microscope opto-acoustique inversé dont nous allons nous servir pour imager les propriétés mécaniques et l'adhésion d'une cellule.

5.1 Microscopie acoustique

5.1.1 Historique

En 1929, Sokolov a proposé, pour la première fois, d'utiliser des ondes acoustiques hautes fréquences pour acquérir des images.¹⁵⁹ C'est en 1937 qu'il est parvenu à créer le premier outil d'imagerie ultrasonore haute fréquence pour détecter les défauts en profondeur dans les matériaux.¹⁶⁰ Ensuite, des avancées significatives en microscopie acoustique ont permis à Kessler *et al.*, de développer en 1972, un microscope acoustique à balayage laser, fonctionnant à 100 MHz, et capable de fournir simultanément des images optiques et acoustiques de systèmes biologiques.¹⁵⁴ Deux ans plus tard, en générant des ultrasons à 100 MHz par un élément piézoélectrique, et en les focalisant à l'aide d'une lentille acoustique à travers un liquide de couplage, R. A. Lemons et C. F. Quate ont conçu un microscope acoustique à balayage, avec une résolution latérale de 10 μm , opérationnel en mode transmission¹¹ (Fig. 5.1(a)). En mode transmission, deux transducteurs sont utilisés, un pour la génération et un pour la réception. De façon alternative, un microscope fonctionnel en mode réflexion a été développé par Johnston *et al.*¹⁵⁶ (Fig. 5.1(b)). Ce dernier n'utilise qu'un seul transducteur agissant comme émetteur et récepteur simultanément. Notons que la résolution latérale est pilotée par la longueur d'onde des ultrasons dans le liquide

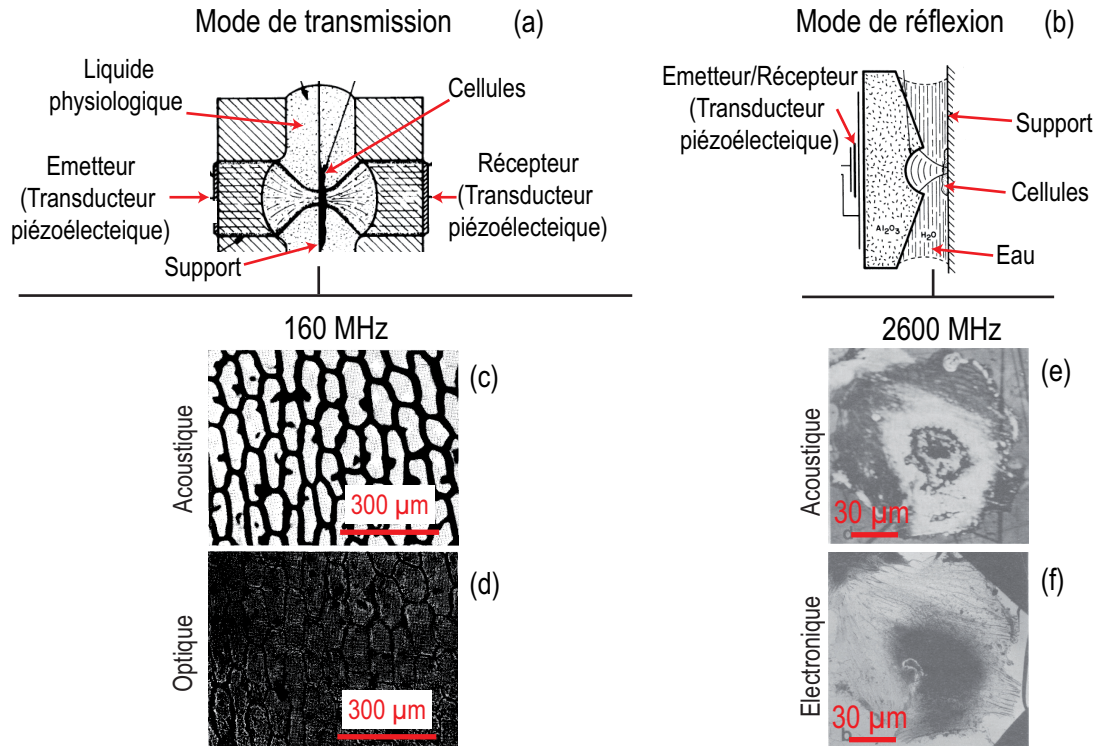


Fig. 5.1 – (a) Microscope acoustique opérationnel en mode de transmission d'après Lemons *et al.*¹⁴⁹ (b) Microscope acoustique opérationnel en mode de réflexion d'après Johnston *et al.*¹⁵⁶ (c) Image obtenue par microscope acoustique à 160 MHz et (d) par microscope optique de cellules d'oignon d'après Lemons *et al.*¹¹ (e) Image obtenue par microscope acoustique à 2600 MHz et (f) par microscope électronique à balayage d'une cellule fibroblaste d'après Johnston *et al.*¹⁵⁶

de couplage qui, dans la plupart des cas, est de l'eau. Dès lors, plusieurs applications au contrôle non-destructif dans les matériaux micrométriques sont devenues envisageables.^{161–164} En parallèle, l'imagerie de systèmes biologiques micrométriques, comme des cellules d'oignon (Fig. 5.1(c)) pouvait être réalisée¹¹ avec une résolution meilleure que celle obtenue par un microscope optique (Fig. 5.1(d)). En 1975, des images acoustiques haute résolution de cellules fixées ainsi que de cellules vivantes, obtenues à différentes fréquences allant jusqu'à 900 MHz, ont été publiées pour la première fois par R. A. Lemons et C. F. Quate.¹⁴⁹ Les travaux de Johnston *et al.* en 1979 et d'Hildebrand *et al.* en 1981 ont ensuite permis d'imager à une fréquence acoustique ~ 2 GHz, des cellules fixées¹⁵⁶ (Fig. 5.1(e)) et vivantes¹² avec une résolution sub-micronique ($< 0.9 \mu\text{m}$) à l'aide d'un microscope acoustique en mode de réflexion (Fig. 5.1(b)). La comparaison entre les images acoustiques et les images obtenues par microscopie optique (Fig. 5.1(d)) et électronique (Fig. 5.1(f)) démontre la haute résolution latérale atteinte par microscopie acoustique. Afin d'améliorer cette résolution, Hadimioglu *et al.* ont utilisé l'hélium superfluide à très basse température (0.1 K) comme milieu de couplage.¹⁵⁷ En employant des ondes acoustiques

de fréquence 8 GHz, ils ont atteint une résolution latérale de 20 nm et sont ainsi parvenus à imager une bactérie de quelques micromètres.

Ces différentes études ont marqué les débuts de la microscopie acoustique et ont montré la capacité de cette approche ultrasonore, complètement non-invasive, à imager des cellules vivantes ou fixées avec une résolution sub-cellulaire. En se basant sur ces premières publications, plusieurs travaux ont ensuite été réalisés des années 90 jusqu'à aujourd'hui^{165–167} dans le but de développer l'utilisation de la microscopie acoustique en biologie cellulaire. Toutes ces études tirent parti du fait que la microscopie acoustique, contrairement aux méthodes optiques, permet de quantifier les propriétés mécaniques des cellules et de suivre les processus biologiques au cours du temps.^{168,169}

5.1.2 Principes de la microscopie acoustique

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de recueillir une information quantitative à partir des images produites par microscopie acoustique. Une première approche consiste à tirer parti des interférences créées par l'interaction entre l'onde acoustique réfléchi à la surface libre du substrat et celle réfléchi à la surface de la cellule.^{165,170,171} La figure 5.2(a) montre l'image acoustique d'une cellule, obtenue par la méthode d'interférences. Les interférences mesurées le long d'une ligne de balayage (ligne blanche sur la figure 5.2(a)) sont tracées sur l'image pour illustration. La comparaison avec l'image obtenue par microscopie à fluorescence 5.2(b) montre une corrélation entre la position des franges d'interférences et le centre de la cellule. L'épaisseur, l'impédance acoustique ainsi que l'atténuation acoustique au sein de la cellule peuvent être estimées à partir de la position des franges d'interférence. L'inconvénient de cette méthode quantitative réside dans la nécessité de connaître soit la vitesse des ondes acoustiques, soit la distribution d'épaisseur dans la cellule.

Une deuxième technique de mesure couramment employée en microscopie acoustique consiste à enregistrer la variation de l'amplitude du signal réfléchi en fonction de la position axiale du point de focalisation du faisceau acoustique. L'onde incidente peut subir une conversion de mode en onde de surface lorsque l'angle d'incidence est supérieur à un angle critique. L'onde de surface rayonne alors de l'énergie vers le transducteur piézoélectrique, provoquant une variation dans l'intensité du signal enregistré.¹⁶⁸ Ces variations, dites $V(z)$, peuvent être utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules. La figure 5.2(c) montre l'image acoustique d'une cellule obtenue à une position axiale fixée. Le signal mesuré le long d'une ligne (droite blanche sur la figure 5.2(c)) est tracé en blanc sur l'image acoustique. La modification de la position axiale permet de produire des images acoustiques avec un contraste différent à chaque fois, comme

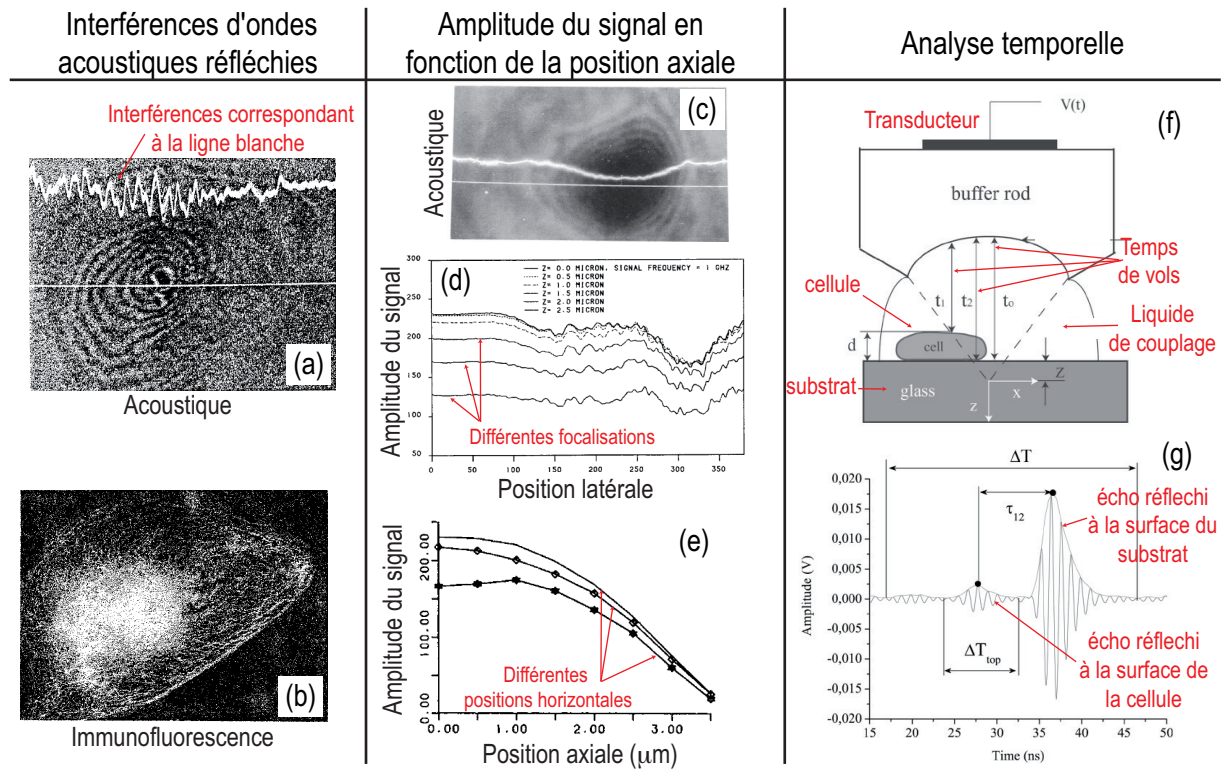


Fig. 5.2 – (a) Image acoustique obtenue par la méthode d'interférences et (b) image obtenue par immunofluorescence d'une cellule endothéliale. Les interférences issues d'une ligne de balayage (ligne droite en blanc sur la figure 5.2(a)) sont tracées sur l'image acoustique pour illustration. Figures adaptés d'après Luers *et al.*¹⁷⁰ (c) Image acoustique obtenue à travers la variation de l'amplitude du signal en fonction de la position axiale. La variation en blanc correspond au balayage effectué suivant la droite blanche. (d) Variation de l'amplitude du signal en fonction de la position latérale sur l'échantillon pour différentes positions axiales. (e) Variation de l'amplitude du signal en fonction de la position axiale pour différentes positions latérales sur l'échantillon. Figures adaptées d'après Kundu *et al.*¹⁶⁸ (f) Principe de détection temporelle des échos réfléchis. (g) Signal temporel montrant deux échos réfléchis à l'interface cellule-liquide et à l'interface cellule-substrat. Figures adaptées d'après Weiss *et al.*¹⁵⁵

illustré sur la figure 5.2(d). Les variations d'amplitude en fonction de la position axiale $V(z)$ (Fig. 5.2(e)) peuvent être exploitées pour déterminer la vitesse des ondes acoustiques, l'épaisseur, la densité et l'atténuation acoustique au sein d'une cellule.¹⁶⁸ Par ailleurs, ces propriétés mécaniques peuvent être obtenues en mesurant la variation de l'amplitude du signal en fonction de la fréquence acoustique.¹⁶⁷

D'autre part, des mesures temporelles peuvent également être développées. Plutôt qu'une excitation harmonique, une impulsion acoustique est générée. Dans ce cas, l'analyse de l'amplitude et du temps d'arrivée des échos permet de déterminer l'épaisseur, l'impédance acoustique, la vitesse des ondes acoustiques et l'atténuation dans les cellules (Fig. 5.2(f) et 5.2(g)).¹⁵⁵

5.1.3 Exemples d'applications

Les approches quantitatives de la microscopie acoustique ont été appliquées à des cellules vivantes en vue d'imager d'éventuels changements dans la structure cellulaire. Linder *et al.* ont sondé les propriétés mécaniques des cellules durant la mitose¹⁷² en 1992. C'est ce que Strohm *et al.* ont repris en 2010 pour observer une augmentation statistique de l'épaisseur des cellules et une diminution de leur module d'élasticité et de leur atténuation entre l'interphase et la métaphase.¹⁵⁸ De plus, Strohm *et al.* ont étudié l'apoptose par microscopie acoustique^{158,173} et ont pu observer une augmentation de l'atténuation acoustique dans les cellules entre un stade précoce et un stade avancé de l'apoptose. Ils ont également détecté entre ces deux stades une augmentation de l'épaisseur des cellules qu'ils ont attribuée à une modification de la morphologie des cellules. En effet, étant étalées et adhérentes à un stade précoce de l'apoptose, les cellules changent de forme et deviennent sphériques et plus épaisses à des stades avancés.¹⁷³

En outre, la motilité^{174,175} et l'adhésion cellulaire^{150,176,177} ont été étudiées par plusieurs équipes de recherche à l'aide d'un microscope acoustique à balayage. Tittmann *et al.* ont observé que l'adhésion de cellules pré-ostéoblastes se dégrade lorsque ces cellules sont cultivées avec des cellules cancéreuses.¹⁷⁶ Cette dégradation a été plus tard attribuée à une perte de surface de contact de la cellule sur le substrat.¹⁷⁸ Par ailleurs, Hildebrand *et al.* ont employé un microscope acoustique fonctionnant à 1.7 GHz pour observer les contacts entre des cellules vivantes et le substrat sur lequel elles sont adhérentes.¹⁷⁷ L'analyse quantitative des images produites a montré que la présence de sites d'adhésion augmente l'impédance acoustique des régions intracellulaires où ils apparaissent, et que l'impédance acoustique relative aux sites d'adhésion peut varier avec la motilité de la cellule. De plus, Weiss *et al.* ont démontré la possibilité d'étudier la dynamique des points focaux d'adhésion grâce à la microscopie acoustique, sans avoir recours à des techniques de marquage de protéines d'adhésion.¹⁵⁰

Les différents travaux présentés dans cette section montrent le potentiel de la microscopie acoustique pour l'étude de la mécanique à l'échelle cellulaire. Cependant, les fréquences acoustiques, de l'ordre de quelques GHz, accessibles à température ambiante par des transducteurs piézoélectriques limitent les capacités d'études. En effet, à ces fréquences, il est difficile de distinguer les structures fines des cellules, en particulier les régions comme le lamellipode et la lamelle. Par conséquent, l'analyse des propriétés mécaniques de cellules individuelles à l'aide d'un microscope acoustique est restreinte par la résolution axiale micrométrique de ce microscope dans des conditions normales de température et de pression. L'acoustique picoseconde, ayant la faculté de fournir des images acoustiques avec une haute résolution en profondeur (résolution axiale nanométrique), pourrait alors être une technique d'imagerie complémentaire

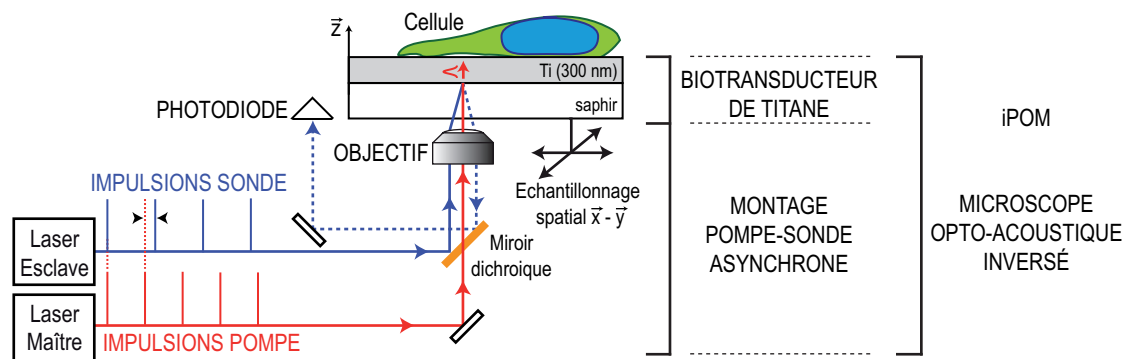


Fig. 5.3 – Dispositif expérimental du montage pompe-sonde asynchrone utilisé pour l'application de l'acoustique picoseconde à l'imagerie cellulaire.

à la microscopie acoustique. Dans la section suivante, nous introduisons un dispositif expérimental d'acoustique picoseconde permettant l'imagerie de cellules uniques avec une résolution sub-cellulaire.

5.2 Caractéristiques du montage pompe-sonde asynchrone

La résolution axiale nanométrique qu'offre l'acoustique picoseconde est nécessaire pour l'évolution de la microscopie acoustique qui est pour l'instant limitée à une résolution micrométrique, imposée par des fréquences acoustiques générées à l'aide d'éléments piézo-électriques. Afin d'étendre l'imagerie acoustique vers une échelle sub-micronique, il est donc intéressant de développer un microscope acoustique basé sur l'acoustique picoseconde. Cependant, l'utilisation classique d'un dispositif pompe-sonde synchrone en acoustique picoseconde (où un seul laser est utilisé pour générer et détecter les ondes acoustiques et le décalage temporel entre la pompe et la sonde est assuré par une ligne à retard mécanique), conduit à des temps d'acquisition très longs, pouvant atteindre plusieurs heures, pour obtenir un signal temporel avec un bon rapport signal sur bruit. De plus, l'utilisation d'une ligne à retard mécanique rend compliquée la manipulation d'un dispositif synchrone d'acoustique picoseconde. Citons par exemple la variation de la focalisation des faisceaux pompe et sonde sur l'échantillon causée par le déplacement mécanique de la ligne à retard et qui impose un réglage fin de celle-ci. Ajoutons à cela les vibrations mécaniques engendrées par le déplacement de la ligne à retard qui nécessitent de moyenner plusieurs acquisitions afin d'extraire des signaux avec le minimum de bruit. Dans de telles conditions expérimentales et avec de telles durées d'enregistrement, la réalisation d'une cartographie de structures micrométriques reste complexe. Par conséquent, l'application de l'acoustique picoseconde à l'imagerie cellulaire nécessite l'utilisation d'une technologie alternative.

En 2005, afin de gagner considérablement en temps d'acquisition et d'ouvrir l'acoustique picoseconde à l'imagerie biologique, le Laboratoire d'Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA) et l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M) ont développé une technique de décalage temporel remplaçant la ligne à retard contrôlée mécaniquement. Ils ont mis en place un dispositif asynchrone permettant un échantillonnage optique asynchrone. Ce montage expérimental, utilisant deux lasers femtosecondes ayant des fréquences de répétition légèrement différentes, a été breveté en 2007.¹⁵² Il est schématisé dans la figure 5.3. Il a été implémenté à l'I2M par A. Abbas lors de sa thèse en 2012.¹⁵³ Deux lasers émettent des impulsions d'une durée de ~ 400 fs. Le laser dit maître, de fréquence de répétition $f_M = 48$ MHz et de longueur d'onde $\lambda_M = 1040$ nm, est utilisé comme pompe. La réponse de l'échantillon à l'impulsion pompe est détectée par les impulsions sondes émises par le laser dit esclave de longueur d'onde $\lambda_E = 1028$ nm. La fréquence de répétition du laser esclave f_E est légèrement décalée de celle du laser maître d'une quantité $\Delta f = 500$ Hz,

$$f_E = f_M + \Delta f \quad (5.1)$$

Le maintien du décalage Δf est assuré par un dispositif électronique d'asservissement permettant l'ajustement de la longueur de la cavité laser esclave grâce à un miroir fixé sur un élément piézoélectrique. Le principe de l'échantillonnage hétérodyne du montage asynchrone est illustré dans la figure 5.4. La différence de fréquence Δf entre f_E et f_M , appelée fréquence de battement, permet d'augmenter le retard pompe-sonde d'une quantité $dt = 1/f_E - 1/f_M \simeq \Delta f / f_M^2 \sim 200$ fs à chaque impulsion laser. La période de battement correspond au temps nécessaire pour qu'une impulsion sonde arrive de nouveau au même instant qu'une impulsion pompe. Cette période, $T_{bat} = 1/\Delta f = 2$ ms, définit la durée nécessaire pour une acquisition de la variation de réflectivité. En enregistrant la variation en temps de l'intensité sonde pendant une période de battement à l'aide d'une photodiode, nous observons la réponse de l'échantillon dilatée dans le temps t_{dil} par effet stroboscopique. Le temps correspondant à la réponse physique de l'échantillon t_{phy} est ensuite obtenu par la relation

$$t_{phy} = t_{dil} \frac{\Delta f}{f_M} \quad (5.2)$$

Pour une fréquence de répétition $f_M = 48$ MHz, l'équation 5.2 montre que la réponse de l'échantillon peut être enregistrée sur un intervalle temporel $T_{phy} = T_{bat}(\Delta f / f_M) = 1/f_M \sim 20$ ns.

La résolution temporelle d'un montage asynchrone est déterminée par quatre facteurs indépendants^{153,179–181} :

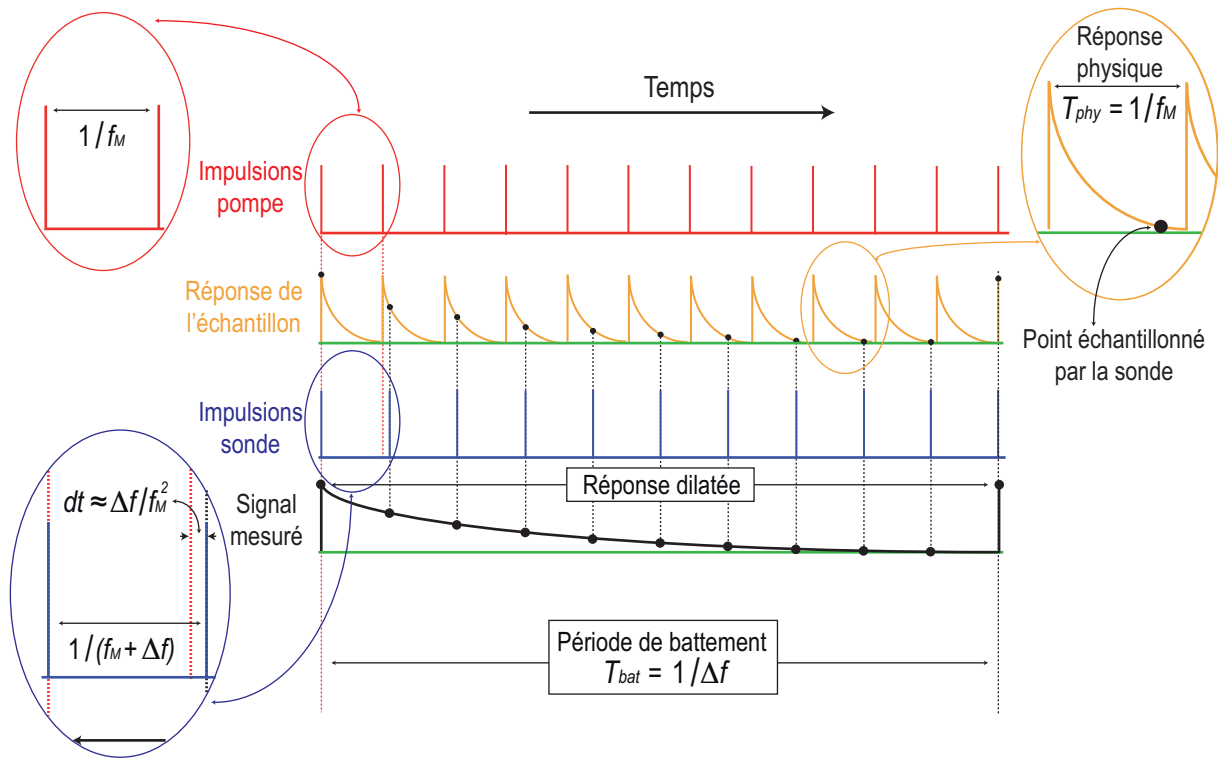


Fig. 5.4 – Principe de l'échantillonnage hétérodyne du montage asynchrone. Inspiré d'après les travaux de thèse d'A. Abbas.¹⁵³

- la bande passante $B = 15$ MHz du photodétecteur qui, étant plus petite que le taux de répétition du laser, $B < f_M$, intègre la réponse de l'échantillon sur plusieurs impulsions sonde pendant une durée δt_{pd} ,
- la durée dt séparant l'impulsion pompe et l'impulsion sonde qui la suit,
- les durées des impulsions pompe et sonde employées,
- la gigue, ou la fluctuation du décalage en fréquence Δf , dépendant des paramètres d'asservissement de la cavité esclave.

Ici, $\delta t_{pd} = \Delta f / (B f_M) \approx 700$ fs, $dt \approx 200$ fs et les durées des impulsions sont de l'ordre de 400 fs. La gigue de ce montage asynchrone, caractérisée par A. Abbas dans ses travaux de thèse, est égale à 500 fs.¹⁵³ Par conséquent, la résolution temporelle du montage asynchrone développé, calculée comme la somme quadratique de ces quatre durées, est d'environ 1 ps.

Ce dispositif asynchrone se caractérise ainsi par une résolution temporelle de 1 ps, permettant des acquisitions sur une fenêtre de 20 ns. Il offre une résolution spectrale de 48 MHz sur une gamme fréquentielle allant jusqu'au THz. Ce montage optique asynchrone permet d'acquérir 500 signaux par minute, autorisant une acquisition 100 fois plus rapide qu'avec un montage synchrone, à rapport signal sur bruit égal.^{179, 182} Ayant la faculté de détecter des variations

relatives de réflectivité de l'ordre de 10^{-5} à une vitesse d'acquisition typique de 8 points/min, il forme donc un outil d'imagerie très puissant capable de fournir des images acoustiques de haute résolution.

Dans le but de réaliser l'imagerie d'une cellule en acoustique picoseconde, nous nous sommes servis de ce montage asynchrone. En focalisant les faisceaux laser avec un objectif 50x à l'interface du biotransducteur de titane (introduit dans la section 4.1.1 du chapitre 4) comme le montre la figure 5.3, nous avons réalisé un microscope opto-acoustique inversé, opérationnel en mode réflexion, qui se caractérise par une résolution latérale micrométrique imposée par la limite de diffraction, et une résolution en profondeur nanométrique, dictée par la bande spectrale de l'impulsion acoustique dans le titane. Dans ce qui suit, ce microscope sera noté iPOM (pour inverted Pulsed Opto-acoustic Microscope).

5.3 Conclusion

Dans ce chapitre, la microscopie acoustique a été présentée dans la première section. Après avoir évoqué les débuts de cette technique, nous avons montré sa capacité à imager des cellules vivantes d'une manière non-invasive avec une résolution sub-cellulaire. Cette technique permet de quantifier les propriétés mécaniques à l'échelle d'une cellule à travers différentes approches quantitatives (interférence d'ondes acoustiques, mesure de l'intensité du signal suivant la focalisation, analyse temporelle des échos). Nous avons exposé la possibilité de mesurer la célérité et l'atténuation acoustiques dans les cellules ainsi que leurs épaisseurs et leurs impédances acoustiques avec un microscope acoustique. Nous avons également présenté différentes applications de ces approches quantitatives à l'imagerie de processus biologiques dynamiques comme la mitose, l'apoptose et l'adhésion. Cela démontre l'intérêt d'utiliser des ondes acoustiques en biologie cellulaire. Cependant, une meilleure résolution axiale est nécessaire pour certaines applications.

Dans le but de produire des images acoustiques de résolution nanométrique en profondeur, jusqu'à présent inaccessibles par microscopie acoustique, nous avons introduit dans la deuxième section de ce chapitre le montage pompe-sonde asynchrone. Celui-ci offre une résolution temporelle de 1 ps sur une fenêtre de 20 ns, une résolution spectrale de 48 MHz pour une bande passante s'étendant jusqu'au THz et un temps d'acquisition 100 fois plus rapide que celui obtenu sur un banc synchrone. La combinaison de ce montage expérimental avec le biotransducteur de titane a permis de développer un microscope opto-acoustique inversé (iPOM), se caractérisant par une résolution latérale micrométrique et une résolution axiale nanométrique. Dans le chapitre suivant, les caractéristiques de iPOM seront détaillées. L'imagerie acoustique d'une cellule sera réalisée avec iPOM et les propriétés mécaniques mesurées seront ensuite discutées.

Chapitre 6

Imagerie acoustique de cellules individuelles

Basée sur la détection asynchrone introduite dans le chapitre 5, la technique iPOM a permis de réduire considérablement le temps d’acquisition d’un signal réflectométrique obtenu lors d’une expérience d’acoustique picoseconde. En passant d’une durée d’acquisition de quelques dizaines de minutes (comme c’est le cas pour un montage synchrone typique) à quelques secondes pour un point de mesure, nous sommes maintenant capables d’étendre le balayage opto-acoustique 1D présenté dans le chapitre 4 à un balayage 2D, pour créer une image acoustique.

Dans la première section de ce chapitre, nous expliquerons comment l’image acoustique est formée à l’aide de iPOM. Nous présenterons également des images extraites d’un film montrant la réponse temporelle de la cellule à une impulsion acoustique GHz. A l’aide de l’analyse en ondelette introduite dans le chapitre 4, nous utiliserons cette réponse acoustique pour cartographier l’impédance de la cellule et le contact cellule-titane. En analysant le contenu de ces cartographies, nous discuterons l’effet du temps de culture. Nous comparons ensuite l’adhésion de différents types cellulaires. Nous discuterons enfin l’effet de l’interaction cellule-cellule sur l’adhésion cellule-substrat.

6.1 Obtention de l’image acoustique

Comme exposé dans le chapitre 5, le microscope opto-acoustique inversé (iPOM) que nous avons développé est opérationnel en mode réflexion, lorsque les deux faisceaux pompe et sonde sont focalisés du même côté. L’image acoustique d’une cellule adhérente sur le titane est formée par les ondes acoustiques réfléchies à l’interface titane-cellule. Nous étendons le cas 1D présenté au chapitre 4 (section 4.2) pour obtenir une image 2D en déplaçant les faisceaux laser suivant $\vec{x}$

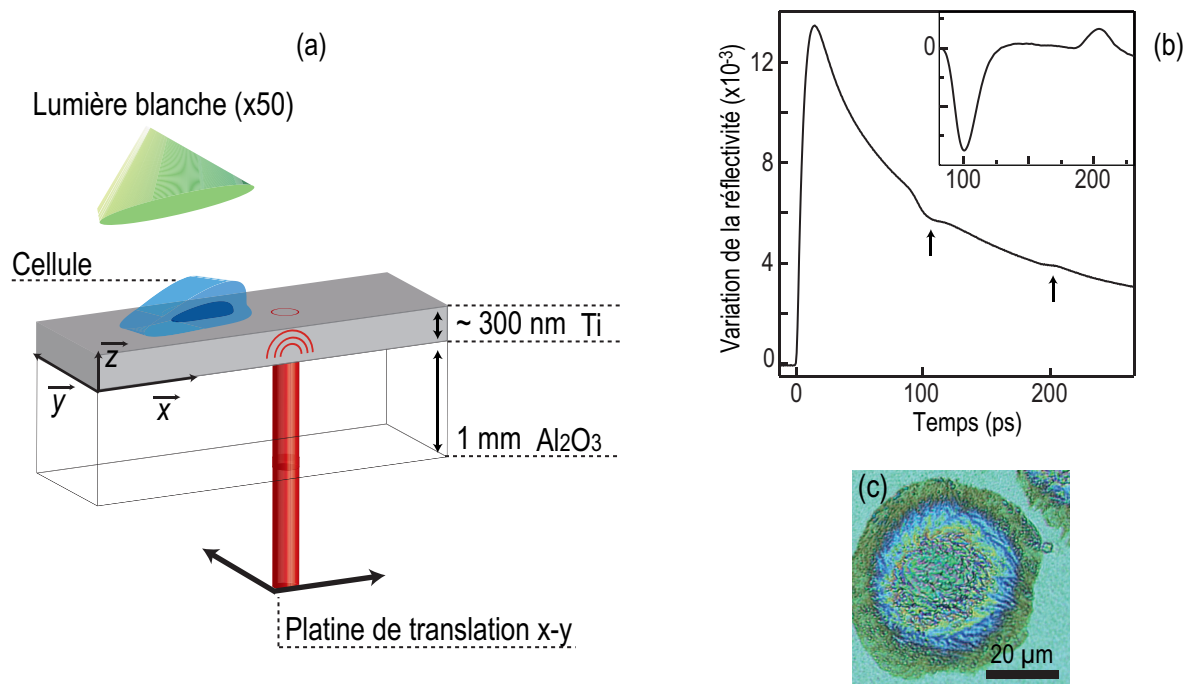


Fig. 6.1 – (a) Montage iPOM et procédure de balayage acoustique. (b) Variation de la réflectivité en fonction du temps et signal acoustique résultant après soustraction de la contribution thermique (encart). (c) Vue de dessus d’une cellule hMEC en lumière blanche.

et $\vec{y}$ à l’interface saphir-titane (Fig. 6.1(a)). Des ondes acoustiques sont générées à chaque point de mesure. Le déplacement est assuré par deux platines de translation motorisées avec un pas de $1 \mu\text{m}$ suivant chaque direction. La résolution est dictée par le rayon du faisceau sonde $\approx 2 \mu\text{m}$ (à $1/e^2$). En analysant les résultats de la même manière qu’au chapitre 4 à l’aide d’un traitement en ondelette, nous obtenons l’image du coefficient de réflexion acoustique à l’interface titane-cellule. Notons que, contrairement aux chapitres 1 à 4 où le montage synchrone était utilisé, nous utilisons ici et dans la suite de ce manuscrit le montage asynchrone décrit au chapitre 5.

La variation de la réflectivité en fonction du temps est enregistrée à chaque point sondé. La figure 6.1(b) montre une variation de réflectivité typique, obtenue en 8 secondes en moyennant 4000 fois le signal mesuré pour une position, afin d’améliorer le rapport signal sur bruit. Les caractéristiques de la variation de réflectivité obtenue ici sont les mêmes que celles présentées dans le chapitre 4 (Fig. 4.4(a)). Les échos acoustiques dus aux allers retours dans le film de titane sont indiqués par des flèches à 100 et 200 ps et possèdent un contenu spectral qui s’étend jusqu’à ≈ 100 GHz. Cette fréquence définit la limite supérieure de la gamme spectrale pour laquelle iPOM est opérationnel. La soustraction de la contribution thermique basse fréquence (~ 1 GHz) du Ti au signal réflectométrique à l’aide d’un polynôme permet d’obtenir uniquement la réponse acoustique en chaque point, comme illustré dans l’encart de la figure 6.1(c). Ainsi, le contraste à haute fréquence (≥ 10 GHz) de l’image provient uniquement des variations d’amplitude des

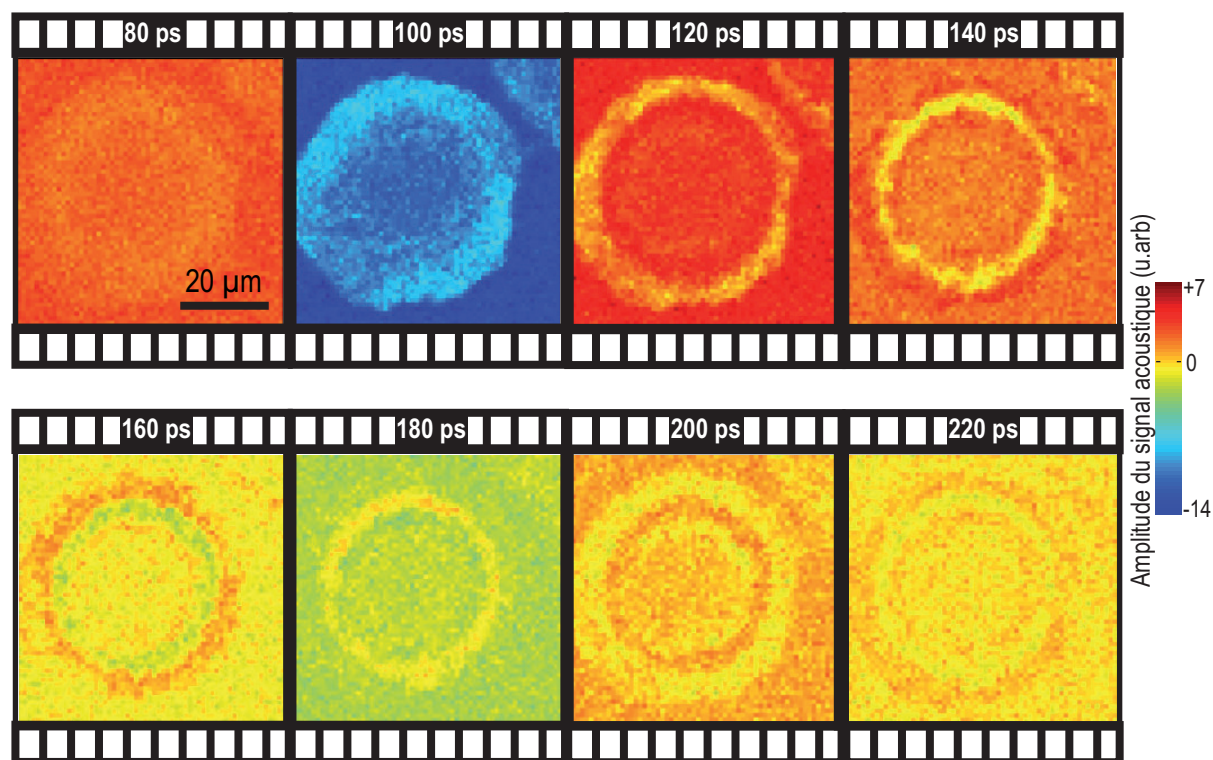


Fig. 6.2 – Images extraites d'un film montrant l'évolution des signaux acoustiques enregistrés en fonction du temps.

signaux acoustiques. Pour illustrer cela, une cellule endothéliale humaine (hMEC)^a cultivée à la surface du film de titane est imagée avec iPOM en sondant une zone de $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$. La figure 6.1(c) montre une image optique de la cellule (vue de dessus) obtenue en lumière blanche avec un objectif 50x. La visualisation du défilement temporel des signaux acoustiques enregistrés sur toute la surface imagée permet d'obtenir un film de la déformation à l'interface saphir-titane qui contient la signature de la propagation acoustique dans le titane. La figure 6.2 montre des images extraites de ce film à différents temps. Avant l'arrivée du premier écho, aucune structure n'apparaît : c'est le cas de l'image à 80 ps (le faible contraste observé est la signature du début de l'impulsion acoustique). À 100 ps, temps d'arrivée du premier écho, la structure cellulaire apparaît clairement. La transmission acoustique dans la cellule induit une diminution de l'amplitude de l'écho réfléchi à l'interface titane-cellule et permet ainsi d'imager la cellule. Le signal acoustique est fortement atténué au delà de 200 ps après l'arrivée et le départ du deuxième écho, ce qui explique le faible contraste de l'image à 220 ps. Pour un temps compris entre les temps d'arrivée des deux premiers échos (100 et 200 ps) la cellule est toujours visible sur les images acoustiques. Cette variation d'amplitude acoustique à ces instants intermédiaires

a. Pour human Microvascular Endothelial Cell.

provient d'une résonance mécanique de zones fines de la cellule. Cette réponse particulière sera traitée en détail dans le chapitre 7.

Afin d'obtenir, pour chaque pixel, le coefficient de réflexion acoustique à une fréquence contrôlée f_0 , nous convoluons le signal expérimental par une ondelette de fréquence centrale f_0 . Le résultat de cette convolution est complexe et son module représente l'intensité de l'image ou la densité d'énergie d'interaction entre l'ondelette et le signal. Nous extrayons la valeur $\mathcal{P}^p(t_{echo}, f_0)$ de ce module à l'instant t_{echo} d'arrivée du premier écho.

La même information est ensuite extraite des signaux mesurés pour un grand nombre de pixels correspondant à la surface libre. La moyenne de ces énergies d'interaction $\mathcal{P}^{Ti}(t_{echo}, f_0)$ est utilisée pour normaliser la valeur obtenue au point p sous la cellule et pour calculer ainsi le coefficient de réflexion acoustique r_{ac}^p :

$$r_{ac}^p(f_0) = \sqrt{\frac{\mathcal{P}^p(t_{echo}, f_0)}{\mathcal{P}^{Ti}(t_{echo}, f_0)}} \quad (6.1)$$

où $\mathcal{P}^p$ désigne la densité d'énergie à t_{echo} de chaque pixel p de l'image et $\mathcal{P}^{Ti}$ la densité d'énergie moyenne t_{echo} de la surface libre de titane.

L'intervalle de fréquence accessible par la transformée en ondelette s'étend de 10 à 85 GHz. Notons que la gamme de fréquence est déterminée de la même manière qu'au chapitre 4. Ici, jusqu'à 85 GHz, le rapport signal sur bruit dans le spectre du premier écho est supérieur à -20 dB grâce au moyennage d'un grand nombre de signaux permis par le montage asynchrone. En comparaison avec les mesures présentées au chapitre 4 (sec. 4.2), le montage asynchrone a donc permis d'étendre le spectre jusqu'à 85 GHz contre 60 GHz avec le montage synchrone. Par ailleurs, la durée séparant le temps d'arrivée du premier écho et celui du deuxième écho est cette fois $\Delta t \approx 100$ ps car le film de titane est plus épais, ce qui permet d'atteindre 10 GHz comme limite basse du spectre.

La figure 6.3 montre la cellule hMEC imagée à 6 différentes fréquences acoustiques (10, 25, 40, 55, 70 et 85 GHz). Un coefficient $r_{ac} = 1 \pm 0.05$ (couleur rouge) obtenu sur toute la gamme fréquentielle exploitée (de 10 à 85 GHz) indique une réflexion totale, ce qui correspond à la réflexion sur une surface libre du titane (section 4.2). La zone où se situe la cellule (interface titane-cellule) se distingue de la zone où seule le Ti est présent (interface titane-air) par un coefficient de réflexion acoustique $r_{ac} < 0.95$. Nous observons de plus que le contraste acoustique au sein même de la cellule varie avec la fréquence. À 10 GHz par exemple, une zone circulaire possédant un coefficient de réflexion d'amplitude $r_{ac} < 0.6$ se dessine en bleu à l'intérieur de la cellule tandis qu'à 25 GHz, ce contour bleu est observé vers le bord de la cellule, montrant

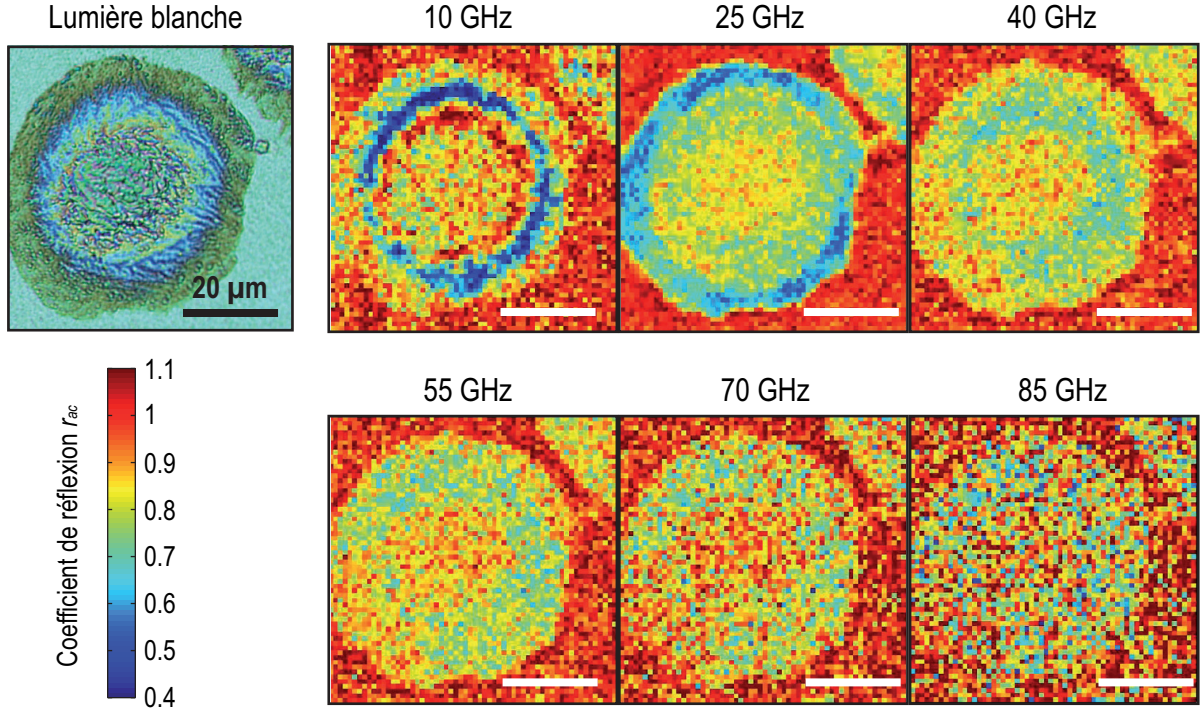


Fig. 6.3 – Image en lumière blanche de la cellule (à gauche) et images acoustiques de la cellule obtenues à partir du coefficient de réflexion à 10, 25, 40, 55, 70 et 85 GHz (à droite).

ainsi une forte dépendance en fréquence. Ce contraste très marqué, apparaissant sur une gamme fréquentielle très étroite, correspond à des résonances. Le phénomène de résonance a lieu lorsque l'épaisseur de la cellule (suivant $\vec{z}$ dans la figure 6.1) devient comparable à la longueur d'onde acoustique. Dans ce cas, aux fréquences de résonances, la transmission de l'énergie acoustique dans la cellule est amplifiée et ceci se traduit par une très faible amplitude du coefficient de réflexion à des fréquences précises. Le chapitre 7 sera consacré à l'analyse détaillée de ce phénomène. Ainsi nous excluons dans ce chapitre les zones fines de la cellule où des résonances sont observées entre 20 GHz et 85 GHz. Par conséquent, la dispersion en fréquence du coefficient de réflexion sera uniquement due aux effets de contact entre la cellule et le titane. Les images à 55, 70 et 85 GHz, montrent qu'au fur et à mesure que la fréquence augmente, le contraste acoustique diminue, ce qui correspond à une augmentation de l'amplitude du coefficient de réflexion avec la fréquence. Dans un premier temps, nous analyserons cette variation avec la fréquence du coefficient de réflexion.

Afin de modéliser la dépendance en fréquence de r_{ac} entre 15 GHz et 85 GHz, nous considérons à nouveau la cellule et le titane comme deux milieux semi-infinis connectés par un ressort de masse négligeable et de raideur K , comme dans le cas 1D (section 4.3.1). En se servant de l'algorithme d'optimisation développé précédemment, nous déterminons pour chaque pixel l'impédance de la cellule Z_c et la raideur du ressort K . L'ajustement théorique pour l'obtention de

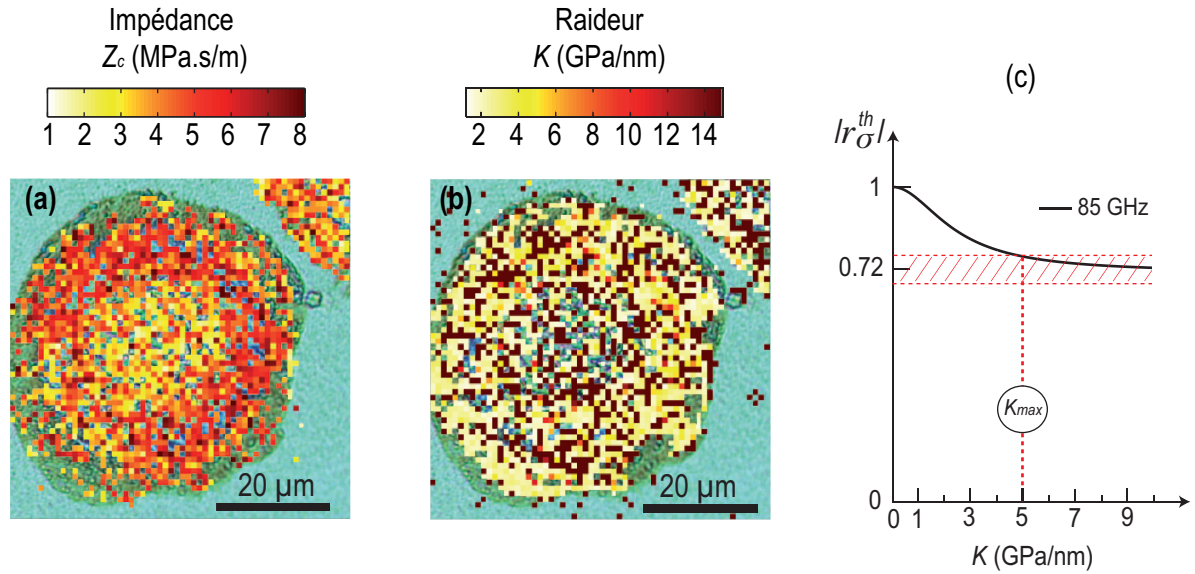


Fig. 6.4 – (a) Image de l'impédance acoustique Z_c . (b) Image du contact cellule-titane à travers la raideur du ressort K . (c) Variations du coefficient de réflexion en fonction de la raideur K du ressort pour une fréquence acoustique de 85 GHz.

Z_c et de K est réalisé sur une gamme de fréquence s'étendant de 15 à 85 GHz lorsqu'aucune résonance n'est observée. Dans le cas où une résonance est observée à une fréquence comprise entre 15 et 20 GHz, cet ajustement commence à partir de 30 GHz, loin de la fréquence de résonance. Cette procédure assure que la variation de l'amplitude du coefficient de réflexion est uniquement due aux variations d'adhésion, et non pas aux résonances. Ainsi, nous pouvons imager séparément l'impédance acoustique de la cellule et le contact cellule-titane. La figure 6.4 montre les images d'impédance (Fig. 6.4(a)) et de raideur (Fig. 6.4(b)) de la cellule hMEC superposées à l'image en lumière blanche. Une observation générale de l'image de l'impédance montre que la zone du centre de la cellule possède une impédance plus petite (environ 3 MPa.s/m) que l'impédance trouvée aux bords (> 5 MPa.s/m). Par ailleurs, l'image de la raideur K de la surface titane-cellule montre une variation entre 1 GPa/nm et des valeurs grandes, au delà de 14 GPa/nm sur la figure 6.4(b) (pixels rouges foncés) dépassant la limite de sensibilité de iPOM (voir l'analyse de la section 4.3.1 du chapitre 4). Cela indique que l'adhésion varie sur la surface cellulaire entre mauvaise ($K < 2$ GPa/nm) et parfaite ($K > K_{max} = 5$ GPa/nm), suivant une statistique que nous analyserons ultérieurement.

Rappelons qu'à une fréquence donnée, la courbe d'évolution du coefficient de réflexion avec la raideur atteint un plateau signifiant qu'au delà d'une certaine raideur, le coefficient de réflexion est indépendant de la raideur. On notera K_{max} la valeur critique de la raideur d'interface au delà de laquelle aucune variation du coefficient de réflexion ne peut être détectée à la fréquence maximale du spectre acoustique $f = 85$ GHz. Cette raideur maximale est donc estimée à l'aide

de la variation du coefficient de réflexion à 85 GHz en fonction de K comme illustré dans la figure 6.4(c) (la variation est tracée en se servant des données de la figure 4.7(b)). En considérant une précision de mesure de ± 0.05 sur $|r_\sigma^{th}|$ (cadre hachuré rouge), la détection d'une variation de $|r_\sigma^{th}|$ en fonction de K n'est possible que lorsque $K < 5$ GPa/nm, c'est-à-dire quand $|r_\sigma^{th}| > 0.72 + 0.05$. Par conséquent, nous supposons que la dépendance de $|r_\sigma^{th}|$ à la raideur n'est pas mesurable au delà de 5 GPa/nm pour une bande passante s'étendant jusqu'à 85 GHz, ce qui permet de considérer que le contact est parfait lorsque $K > K_{max}$. Il est important de remarquer que les contrastes des images en Z_c et K ne sont pas corrélés, ce qui suggère que l'algorithme d'optimisation fonctionne correctement sur ces gammes de fréquences. Dans la section suivante, nous analyserons de plus près les fluctuations de Z_c et de K dans les hMEC. Nous regarderons l'effet du temps de culture sur l'impédance et l'adhésion de ce type cellulaire.

6.2 Variations d'impédance et d'adhésion pendant le temps de culture cellulaire

Les premières images obtenues avec iPOM montrent une grande sensibilité aux fluctuations d'adhésion ainsi qu'aux variations d'impédance dans une cellule individuelle. Afin d'étudier l'adhésion des cellules et les propriétés mécaniques de leurs noyaux à différents stades du cycle cellulaire, nous avons fait varier le temps de culture des hMEC sur le film de titane. Le temps de culture est la durée pendant laquelle les cellules sont libres d'accomplir leur cycle de vie avant d'être fixées par la paraformaldéhyde. Nous avons effectué deux séries de mesures à deux différents temps de culture. La première série est réalisée sur 7 cellules cultivées pendant 30 minutes avant leur fixation sur le titane et la deuxième comporte 8 cellules cultivées pendant 12 heures avant fixation sur le même substrat de titane.

6.2.1 Evolution de l'impédance des hMEC

Nous avons regardé l'effet du temps de culture sur l'impédance du noyau des cellules hMEC là où l'épaisseur des cellules est la plus grande. Notons que pour définir une impédance nucléaire, nous avons repéré tout d'abord le noyau dans le plan xy à partir de l'image en lumière blanche (Fig. 6.5(a)), puis nous avons considéré que, comme dans le cas des cellules ostéoblastes,¹⁵¹ aux longueurs d'onde acoustiques de notre système de mesure, nous ne sondons que la contribution du noyau suivant $\vec{z}$. Dans ce qui suit, nous étendons cette hypothèse vérifiée sur des cellules ostéoblastes aux différents types cellulaires que nous étudierons. Pour cela, nous avons sélectionné une zone rectangulaire à l'intérieur de chaque cellule imagée (pour s'affranchir des

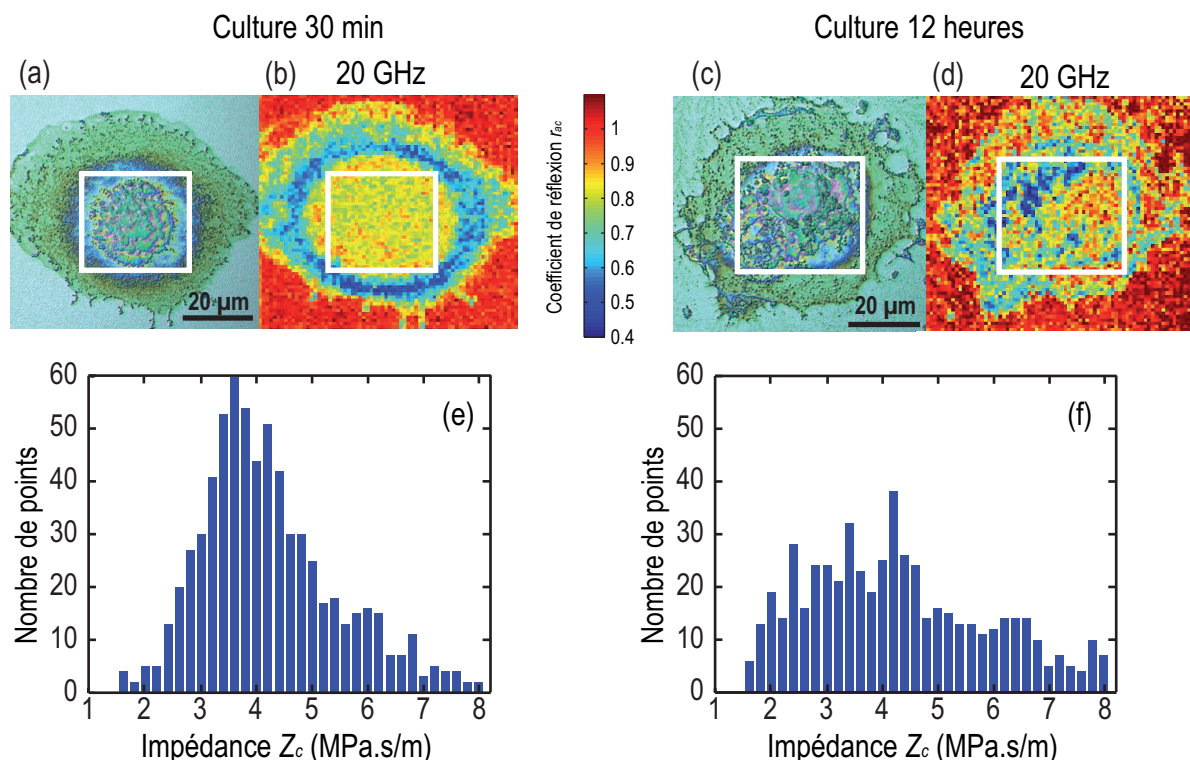


Fig. 6.5 – (a) Vue de dessus en lumière blanche et (b) image acoustique à 20 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 30 minutes sur un film de titane. (c) Vue de dessus en lumière blanche et (d) image acoustique à 20 GHz d'une cellule hMEC cultivée pendant 12 heures sur un film de titane. Distributions des impédances acoustiques mesurées à l'intérieur de la cellule après un temps de culture de (e) 30 minutes et de (f) 12 heures. Les cadres blancs sur les images des cellules délimitent les zones sur lesquelles l'étude statistique d'impédance et de raideur a été faite.

parties membranaires comme les lamelles et les lamellipodes et se focaliser sur le contenu nucléaire de chaque cellule) comme illustré sur les figures 6.5(a) et 6.5(b). L'image acoustique (Fig. 6.5(b)) à 20 GHz (pour illustration), correspondant à la cellule visualisée sur la figure 6.5(a). Cette image contient 4900 pixels. Nous avons extrait la distribution des valeurs d'impédances des 930 pixels contenus dans la zone encadrée. De façon similaire, nous avons traité la cellule visualisée sur la figure 6.5(c) en extrayant la distribution d'impédances des 1085 pixels issus de l'image acoustique composée de 5250 pixels (Fig. 6.5(d)). La figure 6.5 montre les distributions d'impédance obtenues pour ces deux cellules typiques aux deux temps de culture considérés. La distribution obtenue pour la cellule cultivée pendant 30 minutes (Fig. 6.5(e)) montre une répartition gaussienne autour d'une impédance centrale de 4 MPa.s/m. Dans le cas des cellules cultivées pendant 12 heures (Fig. 6.5(f)), la valeur centrale de la distribution n'est plus marquée à cause de la grande dispersion des valeurs d'impédance mesurées allant de 1.5 à 8 MPa.s/m. Cette différence entre l'allure de la distribution à 30 minutes et celle à 12 heures indique que le

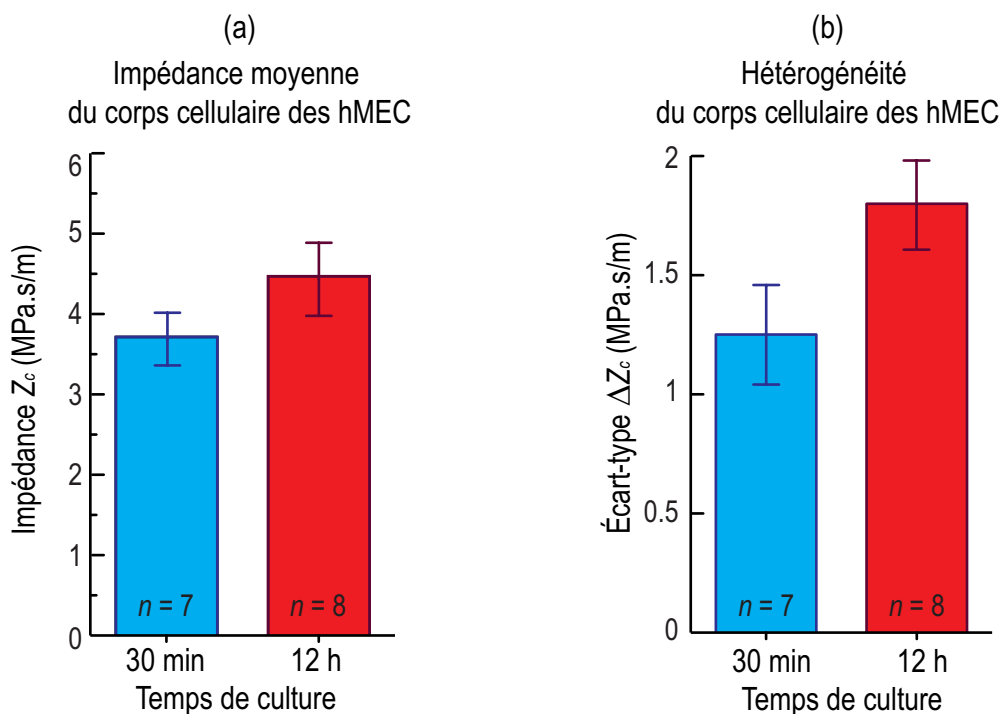


Fig. 6.6 – (a) Impédance moyenne et (b) hétérogénéité du corps cellulaire des hMEC en fonction du temps de culture.

contenu de la cellule, en particulier le contenu nucléaire, devient plus hétérogène d'un point de vue mécanique.

Afin de confirmer cette observation, nous avons effectué une étude statistique de l'évolution de l'impédance Z_c des hMEC pour les 2 temps de culture. Nous avons enregistré les films échographiques sous le noyau de 7 cellules hMEC cultivées pendant 30 minutes et de 8 autres cultivées pendant 12 heures sur le titane. La figure 6.6(a) montre les moyennes des impédances mesurées à chaque temps de culture et les écarts-types qui correspondent aux variations d'une cellule à l'autre. Il s'agit de la moyenne des valeurs centrales des distributions d'impédances obtenues dans chaque lot de cellules. Nous avons également calculé pour chaque temps de culture la moyenne des écarts-types ΔZ_c issus des distributions d'impédances (Fig. 6.6(b)). Cette valeur renseigne sur l'hétérogénéité mécanique moyenne au sein de la population de cellules.

Les valeurs moyennes montrent que l'impédance des hMEC augmente avec le temps de culture et passe de 3.7 à 4.5 MPa.s/m entre 30 minutes et 12 heures. Cette augmentation indique que le contenu nucléaire de ce type cellulaire devient plus rigide (ou plus dense) lorsque le temps de culture augmente. D'un point de vue statistique, cette différence d'impédances moyennes est significative puisque le nombre de valeurs mesurées est suffisant ($p = 0.0033$)^b.

b. La valeur p est utilisée en statistiques pour conclure sur le résultat d'un test (ici on utilise le test de Student). La procédure couramment adoptée consiste à comparer la valeur p à une valeur seuil définie préalablement. Généralement ce seuil est égal à 0.05. Lorsque $p < 0.05$, le résultat du test est statistiquement significatif.

L'écart-type relatif à chaque valeur moyenne de Z_c (Fig. 6.6(a)) indique la statistique de la variation d'impédance d'une cellule à une autre pour un même temps de culture.

L'augmentation de ΔZ_c de 1.25 à 1.8 indique que le corps cellulaire des hMEC devient plus hétérogène mécaniquement au cours du temps de culture ($p = 0.0001$). Les faibles dispersions sur ΔZ_c (~ 0.2) indiquent que l'augmentation de l'hétérogénéité spatiale en fonction du temps est observée sur tous les échantillons étudiés.

Les barres d'erreurs des deux histogrammes de la figure 6.6(a) montrent une faible dispersion de l'impédance moyenne d'une cellule à l'autre au sein d'un même lot. Nos mesures indiquent une augmentation de l'impédance moyenne, cependant cette augmentation est difficile à analyser. En effet, la forte hétérogénéité au sein de chaque cellule, en particulier celles cultivées pendant 12 heures, conduit à des distributions étalées qui ne sont plus rigoureusement gaussiennes (Fig. 6.6(b)). Cela peut entacher l'interprétation de la valeur moyenne de Z_c . Il n'en reste pas moins que les résultats indiquent clairement une augmentation de l'hétérogénéité avec le temps de culture.

6.2.2 Evolution de l'adhésion des hMEC en fonction du temps

Nous avons également analysé l'adhésion des cellules hMEC cultivées pendant 30 minutes et pendant 12 heures sur le titane. Pour cela, nous avons étudié la dépendance en fréquence de r_{ac} . Nous abordons d'abord l'analyse de l'adhésion des cellules hMEC de façon qualitative en comparant les images du coefficient de réflexion de ces cellules à 80 GHz (valeur proche de la fréquence maximale 85 GHz accessible par notre système). La figure 6.7 montre à côté des photos en lumière blanche de deux cellules imagées (Fig. 6.7(a) et Fig. 6.7(c)), deux images du coefficient de réflexion obtenues pour une fréquence acoustique de 80 GHz (Fig. 6.7(b) et Fig. 6.7(d)). Ces deux images révèlent des contrastes différents. Dans le cas de la cellule cultivée pendant une durée de 30 minutes, $r_{ac} < 0.9$ à 80 GHz au centre de la cellule. Les contours de la cellule sont clairement observés (Fig. 6.7(b)). A l'inverse, dans le cas de la cellule cultivée pendant 12 heures (Fig. 6.7(d)), $r_{ac} \sim 1$. L'absence de contraste acoustique à 80 GHz indique une faible valeur de la raideur d'interface. En effet, plus la valeur de K est faible, plus r_{ac} atteint l'asymptote $r_{ac} = 1$ rapidement lorsque f augmente. Ceci est illustré sur la figure 6.8 qui montre la variation de $|r_{\sigma}^{th}|$ en fonction de la fréquence pour trois valeurs de raideurs K_1, K_2 et K_3 , avec $K_1 < K_2 < K_{max} < K_3$. Par conséquent, à une fréquence fixée, la diminution du contraste acoustique avec le temps de culture indique que la raideur d'interface K diminue. Or une mauvaise adhésion est attribuée à une faible raideur d'interface K comme détaillé dans le

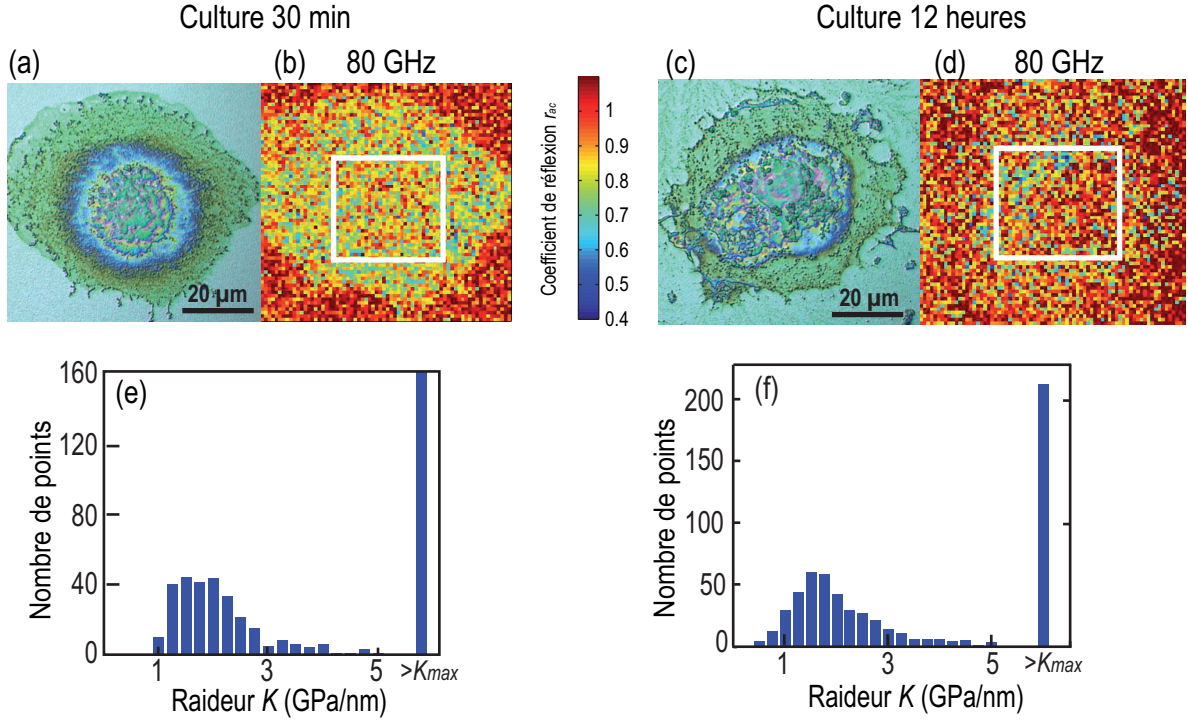


Fig. 6.7 – (a) Photo en lumière blanche et (b) image acoustique à 80 GHz d’une cellule hMEC cultivée pendant 30 minutes. (c) Photo en lumière blanche et (d) image acoustique à 80 GHz d’une cellule hMEC cultivée pendant 12 heures sur un film de titane. (e) Distributions des raideurs d’interface K mesurées à l’intérieur d’une cellule cultivée pendant 30 minutes. (f) Distributions des raideurs d’interface K mesurées à l’intérieur d’une cellule cultivée pendant 12 heures.

paragraphe 4.3.1 du chapitre 4. Cela veut dire que l’adhésion mesurée à 12 heures dans la cellule hMEC est plus faible que l’adhésion de la cellule hMEC mesurée à 30 minutes.

Notons que cette analyse qualitative est présentée pour illustrer le changement de la qualité d’adhésion des hMEC entre 30 minutes et 12 heures à partir du contraste, et pour montrer la sensibilité de iPOM à détecter ce changement. Il est important de signaler qu’une telle analyse qualitative est grossière puisqu’elle ne prend pas en compte une éventuelle variation de l’impédance acoustique qui induirait une variation de l’amplitude du coefficient de réflexion à basse fréquence. Cette variation, si elle existe, peut affecter la pente de $|r_{\sigma}^{th}(f)|$. Dans le cas que nous venons de discuter, nous considérons que la variation de l’impédance acoustique moyenne Z_c de la cellule entre 30 minutes et 12 heures n’affecte pas notre analyse qualitative puisqu’elle est très faible, comme il a été déjà montré dans la section précédente (Fig. 6.6(a)). Pour cette raison, la comparaison de la qualité d’adhésion au travers des images du coefficient de réflexion acoustique à une fréquence fixée est pertinente.

Pour quantifier cette observation, nous avons relevé les valeurs des raideurs d’interface K obtenues dans les deux zones repérées sur les figures 6.7(b) et 6.7(d) par des rectangles blancs

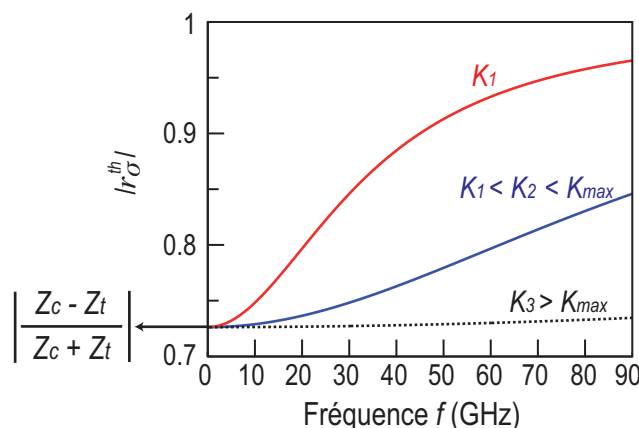


Fig. 6.8 – Variation de $|r_\sigma^{th}|$ en fonction de la fréquence pour trois différentes valeurs de K . A une fréquence élevée fixée, plus la raideur K est faible, plus $|r_\sigma^{th}|$ est grand.

(930 et 1085 pixels respectivement). Les figures 6.7(e) et 6.7(f) montrent les distributions des raideurs d'interface Ti-hMEC obtenues pour un temps de culture de 30 minutes et de 12 heures respectivement. Nous observons une répartition comprises entre 0 et 5 GPa/nm et un pic de points correspondant à des valeurs $K > K_{max}$. Nous rappelons que la valeur K_{max} a été définie dans la section précédente comme la valeur critique au delà de laquelle aucune variation du coefficient de réflexion ne peut être détectée à nos fréquences de mesure (Fig. 6.4(c)). Ainsi nous considérons que, pour notre bande passante, quand $K > K_{max} = 5$ GPa/nm, l'adhésion est parfaite puisqu'on ne peut plus la quantifier à l'aide de la variation de r_{ac} en fonction de la fréquence. Nous qualifierons dans la suite ce type d'adhésion comme une adhésion « forte ». Dans le but de comparer l'adhésion des hMEC entre 30 minutes et 12 heures, deux grandeurs de raideurs vont donc pouvoir être définies à partir de la distribution de K illustrée ici dans les figures 6.7(e) et 6.7(f) : une première associée au nombre de points pour lesquels l'adhésion est « forte » et une deuxième associée à une valeur de raideur pour l'adhésion moyenne imparfaite qualifiée d'adhésion « faible » quantifiable.

Nous définissons la première grandeur à partir d'une analyse surfacique de l'adhésion. Sachant que chaque valeur de K a été obtenue pour un pixel de $1 \mu\text{m}^2$, le nombre de points où $K > K_{max}$ peut être converti en une surface S_a où l'adhésion est considérée forte. Cette surface S_a est évidemment à comparer à la surface totale de mesure, S_t (correspondant à l'aire du rectangle blanc sur la figure 6.7(b)). Le rapport S_a/S_t (Fig. 6.9(b)) renseigne alors sur la qualité d'adhésion entre la cellule et le titane. Plus sa valeur est élevée, meilleure est l'adhésion cellule-titane. Un rapport $S_a/S_t = 1$ indique que l'adhésion est forte sur toute la surface étudiée alors qu'un rapport $S_a/S_t = 0$ indique qu'aucun point n'adhère fortement. Ici nous trouvons, pour la cellule cultivée pendant 30 minutes $S_a/S_t = 0.36$ et pour celle cultivée pendant 12 heures $S_a/S_t = 0.27$. La

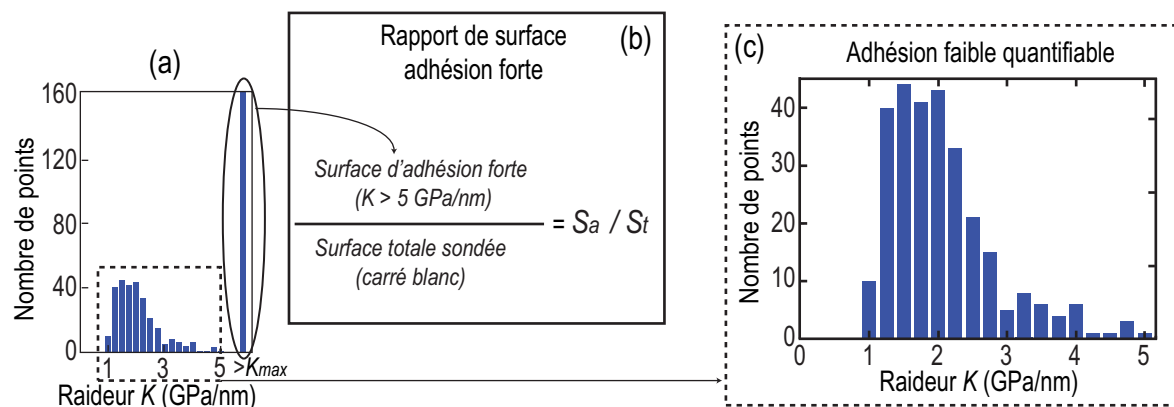


Fig. 6.9 – (a) Distributions des raideurs d’interface K mesurées à l’intérieur d’une cellule cultivée pendant 30 minutes. (b) Procédure d’obtention du rapport de surface d’adhésion forte à partir de la distribution des raideurs K illustrée dans (a). (c) zoom sur la distribution des raideurs K entre 0 et 5 GPa/nm.

deuxième grandeur d’adhésion pouvant être déduite de la distribution des raideurs d’interface K (Fig. 6.9(a)) est la valeur moyenne d’adhésion faible K_m . Elle est égale à la moyenne de la répartition des raideurs pouvant être quantifiées entre 1 et 5 GPa/nm. La figure 6.9(c) montre un zoom sur cette répartition. La valeur moyenne de cette distribution est dans ce cas égale à 2 GPa/nm. Cette valeur exprime la qualité d’adhésion des zones cellulaires montrant une adhésion faible (< 5 GPa/nm).

Nous traçons le rapport de surface d’adhésion forte S_a/S_t sur la figure 6.10(b) et la valeur moyenne K_m quand l’adhésion est faible sur la figure 6.10(a) pour chaque temps de culture. Tout d’abord, nous observons que la valeur moyenne K_m obtenue à partir des surfaces possédant une adhésion faible est la même ≈ 2 GPa/nm aux deux temps de culture. Cela indique que la qualité du contact dans les zones cellulaires qui ne sont pas en contact parfait ne varie pas avec le temps de culture. D’autre part, nous observons dans la figure 6.10(b) une forte diminution de la moyenne du rapport S_a/S_t entre 30 minutes et 12 heures ($p = 0.0035$). Cette diminution montre que l’aire de la surface où l’adhésion était forte a subi une diminution au cours du temps de culture et que des régions des cellules, en adhésion forte avec le titane à 30 minutes, sont devenues faibles à 12 heures. L’observation de l’évolution du rapport S_a/S_t (Fig. 6.10(b)) montre que ce rapport décrit l’adhésion due à des processus actifs de la cellule, qui varient avec les conditions physiologiques. En revanche, l’adhésion faible quantifiable K_m (Fig. 6.10(a)), qui ne dépend pas du temps de culture, semble dictée uniquement par la géométrie du contact et les propriétés mécaniques moyennes de la cellule.

Pour conclure, l’analyse de l’impédance a montré que l’homogénéité mécanique de la région nucléaire des hMEC a évolué d’une culture à 30 minutes à une autre à 12 heures. L’analyse de

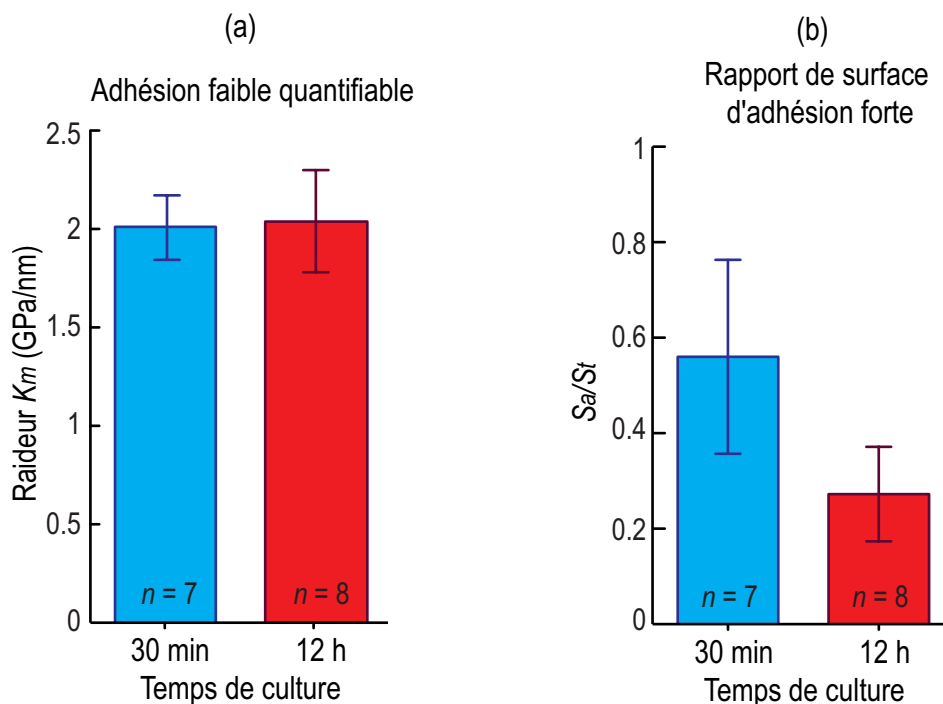


Fig. 6.10 – (a) Adhésion faible quantifiable et (b) rapport de surface d'adhésion forte du corps cellulaire des hMEC en fonction du temps de culture.

K a permis de séparer un contact « passif » de la cellule, lié à la géométrie et aux propriétés moyennes de la cellule, d'un contact « actif » lié à l'adhésion de la cellule. Nous avons observé d'une part une conservation dans le contact passif entre 30 minutes et 12 heures et d'autre part une évolution du contact actif entre ces deux temps de culture. Afin d'arriver à suivre le passage d'une adhésion faible à une adhésion forte (ou vice versa) dans une région, il serait intéressant d'effectuer une analyse d'adhésion similaire sur une même cellule à plusieurs temps pendant la culture. Les évolutions dans l'homogénéité mécanique de la zone nucléaire ainsi que dans sa surface d'adhésion forte suggèrent qu'un ou plusieurs processus biologiques se sont déclenchés dans cette région entre ces deux temps de culture. Parmi les processus qui peuvent avoir lieu, citons par exemple la mitose ou la migration cellulaire. Cependant, ces hypothèses restent à vérifier dans de futurs travaux en induisant un de ces processus de façon contrôlée.

Dans la suite de ce chapitre, nous imagerons d'autres types cellulaires et analyserons l'impédance acoustique et l'adhésion de chacun de ces types en vue de démontrer la robustesse de notre technique d'imagerie et d'arriver à mieux approfondir les résultats qu'elle fournit.

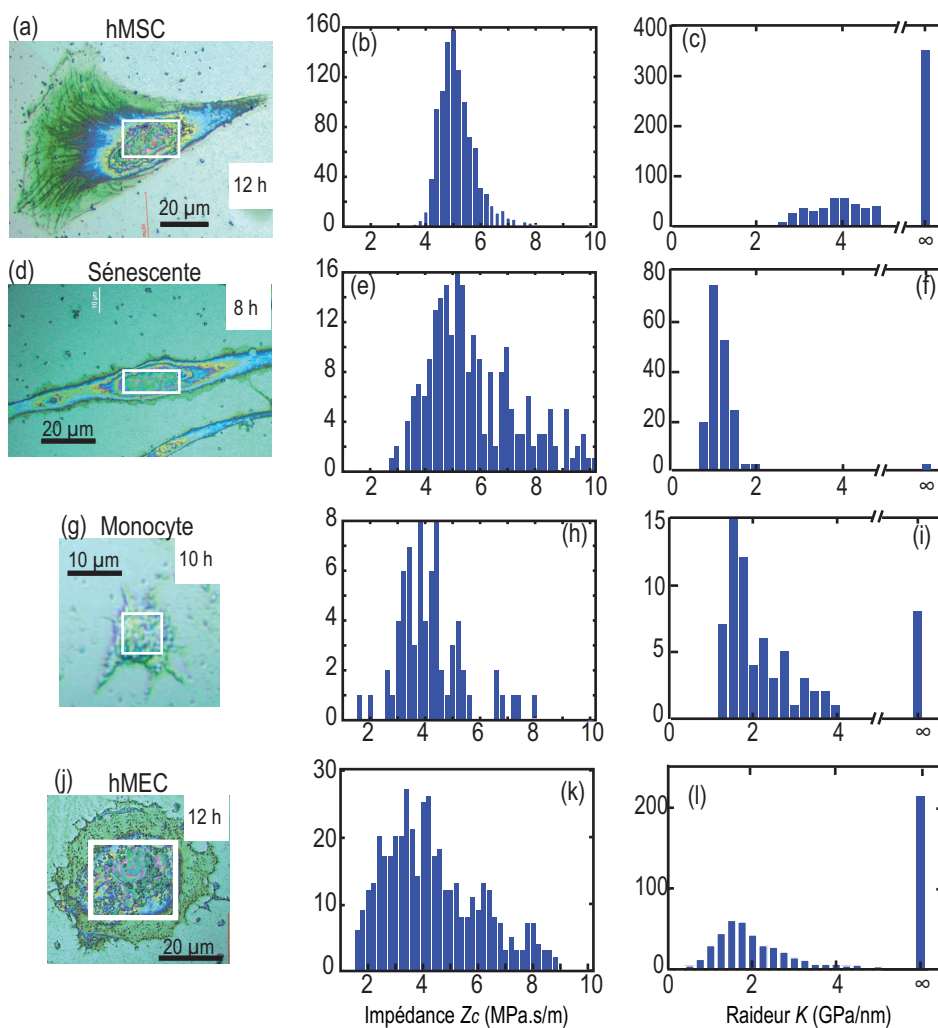


Fig. 6.11 – (a) Vue de face en lumière blanche d’une cellule hMSC cultivée pendant 24 heures, (d) d’une cellule sénescence cultivée pendant 8 heures, (g) d’un monocyte cultivé pendant 12 heures et (j) d’une hMEC cultivée pendant 12 heures sur le titane. (b) Distributions des impédances acoustiques dans les hMSC, (e) les cellules sénescences, (h) les monocytes et (k) les hMEC à 12 heures. (c) Distributions des raideurs dans les hMSC, (f) les cellules sénescences, (i) les monocytes et (l) les hMEC à 12 heures.

6.3 Impédance acoustique et adhésion de différents types cellulaires

Nous avons montré la capacité de iPOM à détecter des variations de propriétés mécaniques intracellulaires ainsi que des changements dans l’adhésion cellule-titane au sein d’un même type de cellules à différents temps de culture. Afin d’observer si iPOM est également sensible aux faibles variations mécaniques d’un type cellulaire à un autre, nous avons effectué des mesures sur 3 types cellulaires en plus des hMEC. Les expériences ont été menées sur des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC)^c, des cellules fibroblastes sénescents et des monocytes,

c. Pour human Mesenchymal Stem Cell.

toutes cultivées entre 8 et 12 heures. La culture des cellules sénescents sur le titane est réalisée par T. Mangeat du laboratoire LBCMCP (UMR CNRS 5088). Contrairement aux cellules sénescents qui sont des cellules « âgées » (Fig. 6.11(d)), les hMSC sont des cellules capables de se différencier en de nombreux types cellulaires.¹⁸³ Pour illustration, nous présentons ici l'image en lumière blanche d'une cellule représentative de chaque type. Les figures 6.11(a), 6.11(d), 6.11(g) et 6.11(j) montrent les photos en lumière blanche. Les mesures ont été effectuées sur 2 hMSC, 3 monocytes et 6 cellules sénescents. Nous avons sélectionné à chaque fois une région intracellulaire contenant le noyau comme pour les hMEC (cadres blancs sur les figures en lumière blanche), et avons tracé les distributions d'impédances et de raideurs correspondant à ces zones choisies. Les figures 6.11(b), 6.11(e), 6.11(h) et 6.11(k) (deuxième colonne) présentent des distributions de Z_c obtenues dans les hMSC, les cellules sénescents, les monocytes et les hMEC (12 heures) respectivement. Les figures 6.11(c), 6.11(f), 6.11(i) et 6.11(l) (troisième colonne) présentent des distributions de K obtenues dans les hMSC, les cellules sénescents, les monocytes et les hMEC (12 heures) respectivement. Afin d'analyser la variation de l'impédance acoustique du contenu de la cellule suivant le type cellulaire ainsi que la qualité d'adhésion, nous avons effectué la même étude statistique que celle décrite dans le paragraphe précédent. De cette manière, nous obtenons une impédance moyenne caractéristique de chaque type cellulaire ainsi qu'une valeur moyenne d'écart-type indiquant son hétérogénéité. De plus, nous avons extrait une valeur moyenne K_m quantifiant l'adhésion faible de chaque type cellulaire, et une valeur du rapport S_a/S_t quantifiant l'adhésion forte. Nous analysons l'impédance et l'adhésion dans les deux paragraphes suivants.

6.3.1 Impédance acoustique et type cellulaire

Commençons tout d'abord par analyser l'impédance de la zone nucléaire pour chaque type cellulaire. Les figures 6.12(a) et 6.12(b) montrent respectivement l'impédance moyenne Z_c et l'écart-type ΔZ_c . Regardons la variation de ΔZ_c d'un type cellulaire à un autre. Nous observons que la distribution de Z_c des hMSC est la plus étroite avec $\Delta Z_c \approx 0.7$ MPa.s/m tandis que celle des hMEC est la plus étalée avec $\Delta Z_c \approx 1.7$ MPa.s/m. Les cellules sénescents et les monocytes viennent ensuite avec $\Delta Z_c \approx 1.6$ et 1.3 MPa.s/m respectivement. Cela montre que les hMSC possèdent le contenu nucléaire le plus homogène, suivis des monocytes, des cellules sénescents et des hMEC qui présentent une zone intracellulaire très hétérogène. De plus, nous observons sur la figure 6.12(a) que les cellules sénescents possèdent l'impédance moyenne la plus élevée avec $Z_c \approx 5.6$ MPa.s/m et que les monocytes ont l'impédance la plus faible $Z_c \approx 3.5$ MPa.s/m.

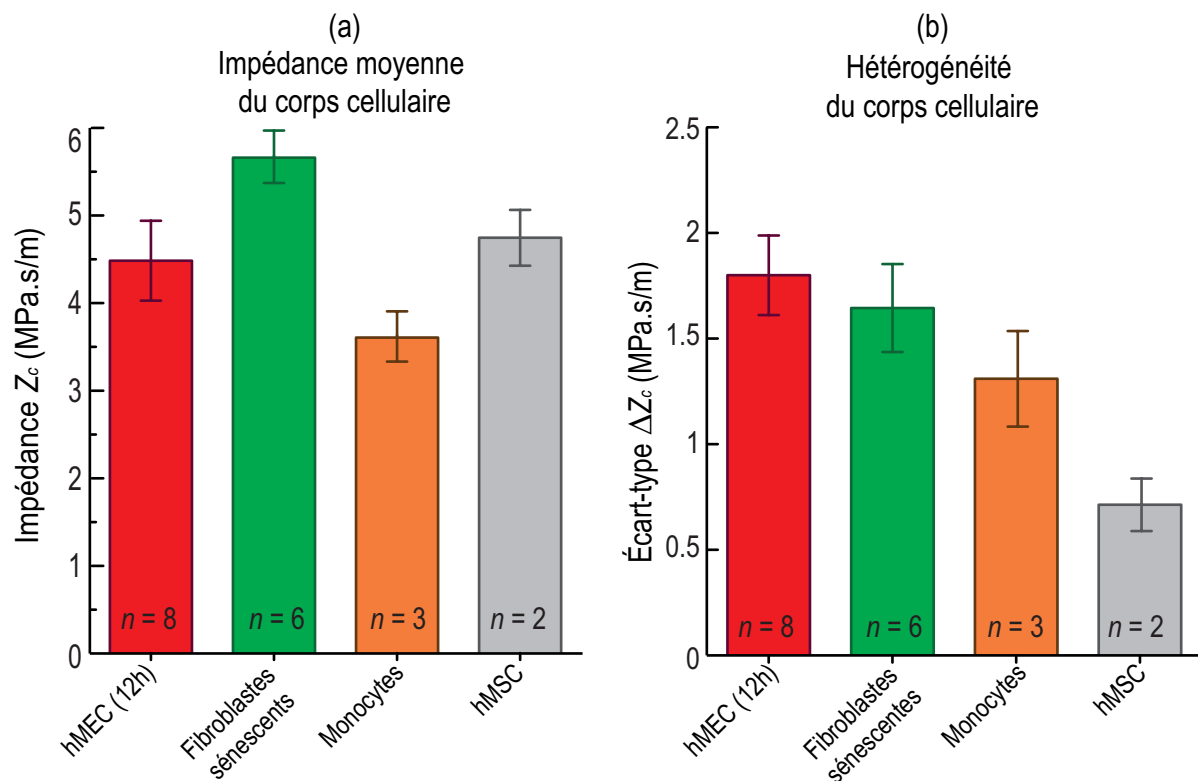


Fig. 6.12 – (a) Impédance moyenne et (b) hétérogénéité du corps cellulaire des différents types cellulaires étudiés.

Il faut noter cependant la grande hétérogénéité détectée au sein d'une même cellule (comme dans le cas des hMEC) (Fig. 6.11(k)). Par conséquent, les variations de Z_c d'un type cellulaire à l'autre sont difficiles à interpréter. En revanche, pour les cellules hMSC (Fig. 6.11(b)), la distribution de Z_c est très étroite. La valeur de Z_c peut être considérée comme fiable ($Z_c \approx 4.75$ MPa.s/m) puisque la distribution de la population est rigoureusement gaussienne. L'observation d'une telle distribution étroite démontre la précision de notre mesure. Cela permet en outre de s'assurer que l'étalement des valeurs de Z_c dans d'autres types cellulaires est relié à des faits biologiques et non pas à la précision de la mesure.

6.3.2 Adhésion de différents types cellulaires

Passons maintenant à l'analyse de l'adhésion des différents types cellulaires. La variation des raideurs d'interface K_m en fonction du type cellulaire est présentée dans la figure 6.13(a) et la variation du rapport de surface d'adhésion S_a/S_t dans la figure 6.13(b). On remarque que l'adhésion faible quantifiable $K_m \approx 1.4$ GPa/nm et le rapport $S_a/S_t \approx 0.05$ des cellules sénescents sont les plus mauvais parmi toutes les cellules étudiées. À l'autre extrême, la qualité d'adhésion des cellules souches est la meilleure de tous les types cellulaires étudiés. Cela se

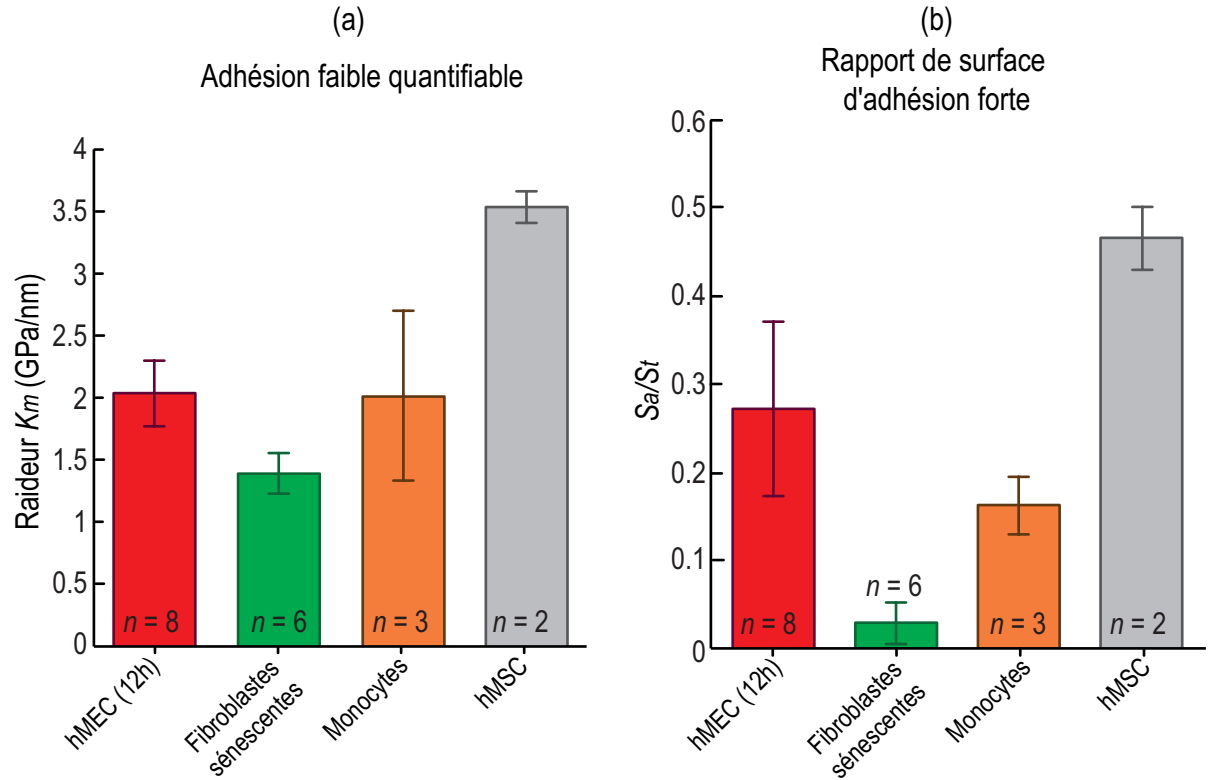


Fig. 6.13 – (a) Adhésion faible quantifiable et (b) rapport de surface d'adhésion forte du corps cellulaire des différents types cellulaires étudiés.

traduit par le rapport $S_a/S_t \approx 0.45$ le plus élevé et la raideur moyenne d'adhésion imparfaite la plus élevée $K_m \approx 3.5$ GPa/nm.

6.4 Perspectives : Effet de l'interaction cellule-cellule sur l'adhésion cellule-substrat

Pour aller plus loin, nous avons également comparé, dans le cas des cellules hMEC cultivées 30 minutes, des cellules présentant des contacts cellule-cellule (dites « en interaction ») avec des cellules individuelles adhérentes sur le titane. Des images de cellules en interaction entre elles obtenues en lumière blanche sont présentées sur la figure 6.14(a). Les figures 6.14(b) et 6.14(c) montrent respectivement les images du coefficient de réflexion à 10 et 80 GHz. A la fréquence minimale 10 GHz de notre dispositif, nous distinguons, chacune des quatre cellules en interaction, tandis qu'à une fréquence maximale de 80 GHz, nous ne pouvons plus distinguer les bords de chaque cellule. En revanche, tout le contour de la zone de contact est encore clairement révélé à cette fréquence, indiquant qu'une adhésion forte a lieu entre ces quatre cellules et le titane.

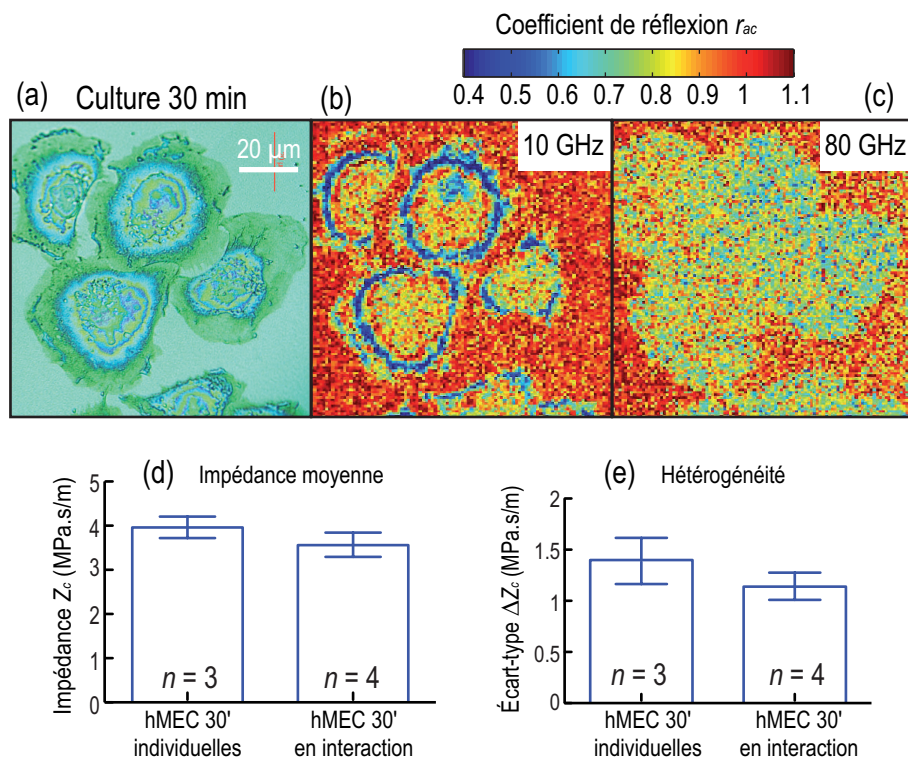


Fig. 6.14 – (a) Vue de face en lumière blanche des cellules hMEC adhérentes entre elles. (b) Image acoustique à 10 GHz et (c) à 80 GHz de ces cellules. (d) Impédance moyenne et (e) hétérogénéité du corps cellulaire de hMEC individuelles et en interaction cultivées pendant 30 minutes.

Analysons quantitativement l'effet de l'interaction cellule-cellule sur l'impédance et l'adhésion. Tout d'abord, les comparaisons des impédances moyennes Z_c et des hétérogénéités ΔZ_c obtenues pour des cellules individuelles et obtenues pour des cellules en interaction sont illustrées respectivement par les figures 6.14(d) et 6.14(e). Cependant, compte tenu du faible nombre de cellules testées ($n = 3$ individuelles et $n = 4$ en interaction) et de la dispersion de la mesure ($p > 0.05$)^d, l'homogénéité et l'impédance moyenne du contenu cellulaire ne peuvent pas être discutées.

Ensuite, nous avons tracé sur les figures 6.15(a) et 6.15(b) la variation de raideur faible K_m et la variation du rapport d'adhésion forte S_a/S_t pour des cellules en interaction et des cellules individuelles. Nous observons que l'adhésion faible quantifiable K_m est la même dans les deux cas (≈ 2 GPa/nm). Cependant, une grande différence entre le rapport d'adhésion forte S_a/S_t des cellules individuelles (≈ 0.4) et celui des cellules en interaction (≈ 0.65) est clairement observée ($p = 0.0286$). Ceci suggère que l'adhésion cellule-cellule favorise l'adhésion cellule-substrat. Cela suggère également que K_m soit lié au contact « passif », alors que S_a/S_t révèle

d. Le test utilisé dans ce cas est celui de Mann Whitney employé couramment quand le nombre d'échantillons est faible.

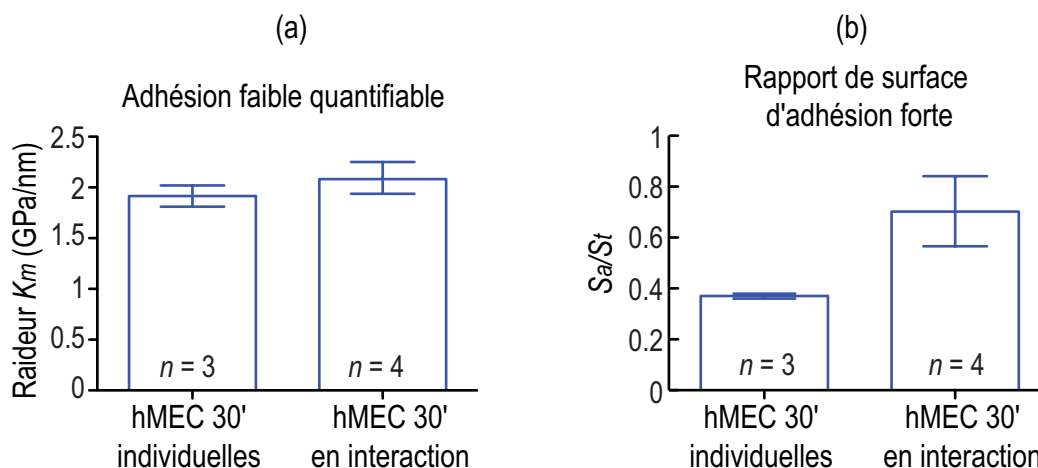


Fig. 6.15 – (a) Adhésion moyenne imparfaite (b) rapport de surface d'adhésion parfaite du corps cellulaire de hMEC individuelles et en interaction cultivées pendant 30 minutes.

l'adhésion « active » de la cellule. Le rapport S_a/S_t apparaît donc être un critère pertinent pour évaluer l'adhésion.

6.5 Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre pour la première fois des images échographiques de cellules individuelles adhérentes obtenues à l'aide de la technique iPOM. En sondant à distance l'interface titane-cellule, nous sommes parvenus à imagier l'impédance acoustique de la cellule et la qualité du contact cellule-biomatériau. Le contraste des images d'impédance Z_c et de raideur d'interface K montre la capacité de iPOM   détecter des variations de propriétés mécaniques au sein d'une même cellule. Ces variations ont révélé que la cellule n'est pas un milieu homogène d'un point de vue mécanique, contrairement à ce qui est couramment supposé dans des applications de microscopie acoustique classique. Les images d'impédance ont montré qu'il est possible de suivre l'évolution de la cellule en fonction du temps de culture, ou encore de caractériser un type cellulaire à partir de son hétérogénéité mécanique. D'autre part, les images de raideurs d'interface ont permis de quantifier la qualité de l'adhésion avec le substrat de titane.

Pour cela, plusieurs études statistiques ont été effectuées afin d'analyser le contenu des images d'impédance et de raideurs obtenues. L'analyse menée sur des hMEC cultivées pendant 30 minutes et 12 heures a montré une évolution de l'hétérogénéité du contenu nucléaire de ces cellules entre deux temps de culture différents. Cette analyse a également révélé une évolution de la qualité de l'adhésion des régions nucléaires des hMEC avec le titane entre 30 minutes et 12 heures. Une étude menée sur plusieurs types cellulaires a montré que les cellules souches possèdent le contenu nucléaire le plus homogène et que les cellules fibroblastes sénescentes possèdent

la surface d'adhésion forte la plus mauvaise. Ces résultats ont révélé la sensibilité de iPOM aux faibles variations mécaniques d'un type cellulaire à un autre. Par ailleurs, nous avons pu dégager une hypothèse importante à travers une troisième étude statistique : l'existence d'un effet de l'interaction cellule-cellule sur l'adhésion cellule-substrat. Dans la suite, il serait intéressant d'étudier une mitose contrôlée, de vérifier par des expériences supplémentaires l'effet de l'interaction cellule-cellule, ou même d'imager un type cellulaire en état jeune et en état sénescence et d'observer l'évolution des propriétés mécaniques des cellules avec l'âge.

Les observations réalisées sur les images de raideurs ont suggéré que l'adhésion faible K_m ne soit dictée que par la géométrie du contact et les propriétés mécaniques moyennes de la cellule. En revanche, le rapport S_a/S_t semble décrire l'adhésion due à des processus actifs de la cellule, qui varient avec les conditions physiologiques. L'analyse de K a permis donc de séparer un contact « passif » de la cellule, lié à la géométrie et aux propriétés moyennes de la cellule, d'un contact « actif » lié à l'adhésion de la cellule. Le rapport S_a/S_t défini dans ce chapitre est donc un critère pertinent pour évaluer l'adhésion.

Dans le chapitre suivant, nous montrerons la capacité de iPOM à imager des zones cellulaires très fines, de l'ordre d'une dizaine de nm. Nous exploiterons cette capacité pour étudier la topographie d'une cellule migrante et la viscosité du contenu cellulaire.

Chapitre 7

Topographie et viscosité des zones fines d'une cellule

Jusqu'ici, nous avons étudié l'impédance et l'adhésion des régions intracellulaires, en particulier la zone nucléaire de la cellule. Dans ces régions, la cellule a une épaisseur de plusieurs microns, et peut être considérée comme un milieu semi-infini au regard de la propagation acoustique. Par conséquent, le coefficient de réflexion mesuré ne dépend que de l'impédance et de la raideur d'interface. Mais qu'en est-il des bords de la cellule où l'épaisseur devient comparable aux longueurs d'onde acoustiques ?

Le propos de ce chapitre est d'analyser la dépendance en fréquence du coefficient de réflexion dans les zones fines de la cellule ($\lesssim 100$ nm) où des résonances mécaniques sont observées. Pour ce faire, nous commençons dans un premier temps par modéliser la réflexion acoustique quand la cellule est considérée comme une couche mince d'épaisseur finie. Ensuite, nous introduisons un modèle rhéologique simple de la cellule dans le but de reproduire les observations expérimentales. Ainsi, nous parvenons à imager pour la première fois la topographie de la membrane saillante d'une cellule hMSC en migration. Nous finirons par proposer un modèle rhéologique plus complet capable de décrire le comportement de la cellule au GHz par analogie avec les microcapsules biomimétiques présentées dans la première partie de ce manuscrit. Nous montrerons enfin que iPOM est capable d'imager la mécanique des couches très fines (≈ 15 nm) d'une cellule.

7.1 Énergie acoustique réfléchie

Lorsque la longueur d'onde acoustique λ_{ac} devient comparable à l'épaisseur de la cellule (suivant $\vec{z}$ dans la figure 6.1(a)), la cellule entre en résonance. La réflexion de l'onde acoustique sur l'interface titane-cellule diminue alors fortement, et l'énergie transmise dans la cellule est

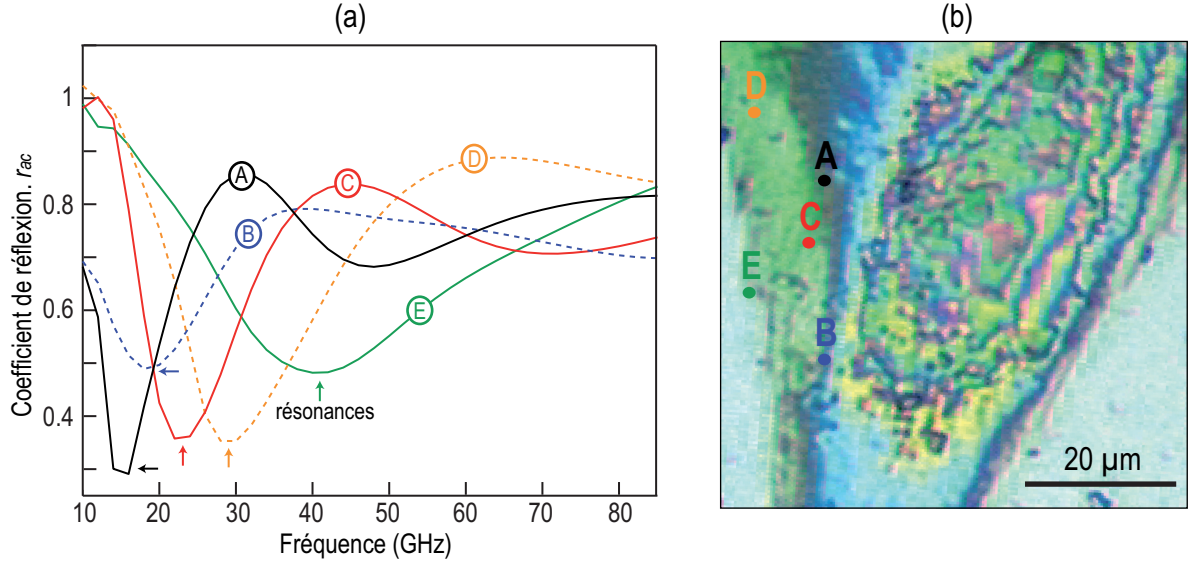


Fig. 7.1 – (a) Variation de l’amplitude du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence mesuré à différentes positions repérées par les lettres A à E. Les flèches indiquent les résonances acoustiques. (b) Image en lumière blanche de la région cellulaire d’une cellule hMSC imagée par iPAM. Les lettres A à E indiquent la position des mesures tracées sur la figure 7.1(a).

amplifiée par la résonance. Cette résonance peut alors être vue comme un effet de dissipation de l’énergie acoustique réfléchie. Dans le cas de la réflexion d’une impulsion possédant une large bande spectrale (comme par exemple le contenu spectral de l’impulsion acoustique générée dans nos expériences qui s’étend de 10 à 85 GHz), cet effet induit une diminution brusque de l’amplitude du coefficient de réflexion autour de la fréquence de résonance f_n . Ceci est illustré par la figure 7.1(a) qui montre les variations de r_{ac} en fonction de la fréquence, mesurées à 5 positions différentes (notées A à E) sous une cellule hMSC imagée par iPOM et dont l’image est tracée sur la figure 7.1(b). Un minimum très localisé, indiqué par une flèche, est identifié sur chaque courbe. Afin de déterminer l’épaisseur des zones cellulaires à partir de ces fréquences de résonance, modélisons le coefficient de réflexion à l’interface titane-cellule, en considérant cette fois que la cellule est un milieu d’épaisseur finie d .

7.1.1 Modélisation des résonances mécaniques de la cellule

Afin de modéliser la réflexion acoustique à l’interface entre le substrat de titane et les couches fines de la cellule, nous considérons le cas unidimensionnel illustré par la figure 7.2. Le titane est assimilé à un milieu semi-infini, tandis que la cellule est considérée comme une couche mince d’épaisseur d . L’interface entre les deux milieux, notée Σ , en $z = 0$, est considérée parfaite. La propagation acoustique s’effectue suivant l’axe $\vec{z}$, perpendiculairement à Σ .

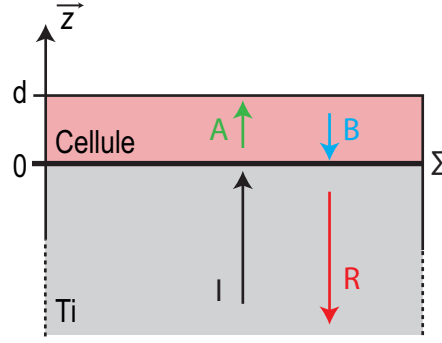


Fig. 7.2 – Géométrie du modèle proposé. Le substrat de titane est considéré comme milieu semi infini et la cellule comme un milieu fini d'épaisseur d . L'interface Σ entre les deux milieux est située en $z = 0$. L'onde acoustique est incidente en Σ du côté titane avec une amplitude I (flèche noire). L'onde réfléchie en Σ , possédant une amplitude R , est indiquée par une flèche rouge. Les ondes d'amplitudes A (flèche verte) et B (flèche bleue), correspondent aux ondes progressives et rétrogrades dans la cellule.

Pour obtenir le coefficient de réflexion acoustique en fonction de la fréquence, on résout l'équation d'onde acoustique analytiquement dans l'espace de Fourier. On utilise la transformation directe de Fourier définie par :

$$\tilde{f}(z, \omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(z, t) e^{-j\omega t} dt \quad (7.1)$$

où t et ω représentent le temps et la pulsation. L'équation d'onde dans le milieu $i = t, c$ (t : titane, c : cellule) s'écrit

$$\frac{\partial^2 \tilde{u}_i(z, \omega)}{\partial z^2} + k_i^2 \tilde{u}_i(z, \omega) = 0 \quad (7.2)$$

$\tilde{u}_i(z, \omega)$ est le champ de déplacement. $k_i = \omega \sqrt{\rho_i / C_i}$ est le nombre d'onde avec C_i la rigidité et ρ_i la densité. Les champs de déplacements s'écrivent dans chaque milieu comme :

$$\tilde{u}_t(z, \omega) = I e^{+jk_t z} + R e^{-jk_t z}, \quad (7.3a)$$

$$\tilde{u}_c(z, \omega) = A e^{+jk_c z} + B e^{-jk_c z}. \quad (7.3b)$$

Comme la génération acoustique se fait dans le titane, on identifie une onde d'amplitude I , incidente sur Σ , et une onde réfléchie d'amplitude R dans le titane. Dans la cellule, des réflexions multiples apparaissent du fait de la présence des interfaces. Ceci est illustré sur la figure 7.2.

Pour déterminer le coefficient de réflexion acoustique sur Σ , il est nécessaire d'imposer des conditions aux limites. Nous considérons dans un premier temps que le contact entre la cellule et le titane est parfait. Par suite, les déplacements et les contraintes sont continus de part et d'autre de Σ :

$$\tilde{u}_t(0, \omega) = \tilde{u}_c(0, \omega), \quad (7.4a)$$

$$\tilde{\sigma}_t(0, \omega) = \tilde{\sigma}_c(0, \omega). \quad (7.4b)$$

De plus, la surface de la cellule est libre, ce qui impose une contrainte nulle en $z = d$

$$\tilde{\sigma}_c(d, \omega) = 0 \quad (7.5)$$

En résolvant le système formé par les équations 7.4 et 7.5, on accède au coefficient de réflexion relatif aux contraintes r_σ^{th} ¹⁰⁹ :

$$r_\sigma^{th} = -\frac{Z_t \cos(k_c d) + j Z_c \sin(k_c d)}{Z_t \cos(k_c d) - j Z_c \sin(k_c d)} \quad (7.6)$$

L'impédance acoustique Z_i s'exprime comme le rapport entre la contrainte σ_i et la vitesse particulaire $V_i = \partial u_i / \partial t$:

$$Z_i = \frac{\sigma_i}{V_i} = \rho_i \frac{\omega}{k_i} \quad (7.7)$$

Dans un milieu purement élastique, le nombre d'onde est réel et égal au rapport entre la fréquence et la vitesse du son v_i dans le milieu : $k_i = \omega / v_i$. L'impédance acoustique devient alors

$$Z_i = \rho_i v_i \quad (7.8)$$

En considérant la cellule comme un milieu non dissipatif (k_c et Z_c réels), l'équation 7.6 montre que l'amplitude du coefficient de réflexion $|r_\sigma^{th}|$ est indépendante de la fréquence et est toujours égale à l'unité. En effet, comme la cellule est un milieu fini, toute l'énergie acoustique qui lui est transmise est ensuite réfléchie à l'interface cellule-air et transmise de nouveau entièrement à l'interface titane-cellule. Afin de modéliser les variations de r_{ac} mesurées en fonction de la fréquence, il est donc nécessaire de considérer une approche plus générale qui prend en compte l'atténuation acoustique dans la cellule.

7.1.2 Attribution d'une loi simple de comportement

L'approche consiste à introduire de la dissipation visqueuse dans la couche cellulaire d'épaisseur finie. La cellule n'est donc plus considérée comme un milieu purement élastique possédant une rigidité réelle, mais comme un matériau viscoélastique caractérisé par une rigidité complexe

M_c :

$$M_c = M_R + jM_I \quad (7.9)$$

où M_R représente le coefficient d'élasticité de la cellule et M_I exprime la contribution visqueuse du milieu. Le nombre d'onde est donc également complexe :

$$k_c^*(\omega) = k_R(\omega) + j\alpha(\omega) \quad (7.10)$$

où k_R et α sont deux quantités réelles qui décrivent la propagation et l'atténuation de l'onde. Ces quantités sont reliées aux propriétés mécaniques du matériau viscoélastique à travers les relations suivantes¹⁸⁴ :

$$k_R = \omega \sqrt{\rho_c} \sqrt{\frac{|M_c| + M_R}{2|M_c|^2}}, \quad (7.11a)$$

$$\alpha = \omega \sqrt{\rho_c} \sqrt{\frac{|M_c| - M_R}{2|M_c|^2}}. \quad (7.11b)$$

L'impédance acoustique de la cellule n'est plus réelle non plus, elle devient d'après 7.7³¹ :

$$Z_c^*(\omega) = \rho_c \frac{\omega}{k_R(\omega) + j\alpha(\omega)} \quad (7.12)$$

L'expression 7.12 de l'impédance acoustique est une formulation générale de l'équation 7.8.

Pour expliciter les dépendances en fréquences de k_R et α , il est nécessaire de définir un modèle rhéologique décrivant le comportement de la cellule. Pour cela, on considère le modèle simple de Kelvin-Voigt dans lequel les constituants de la matière sont décrits comme étant reliés entre eux par un ressort de raideur C_c/ρ_c et un amortisseur η/ρ_c en parallèle.¹⁸⁴ Cela permet d'exprimer la rigidité complexe M_c de la cellule comme

$$M_c = C_c + j\omega\eta \quad (7.13)$$

où η représente la viscosité de la cellule en Pa.s. En supposant que les effets visqueux sont faibles devant les effets élastiques, $M_I \ll M_R$, les équations 7.11 se simplifient¹⁸⁴ :

$$k_R = \frac{\omega}{v_c}, \quad (7.14a)$$

$$\alpha = \frac{\omega^2 \eta}{2\rho_c v_c^3}. \quad (7.14b)$$

avec $v_c = \sqrt{C_c/\rho_c}$.

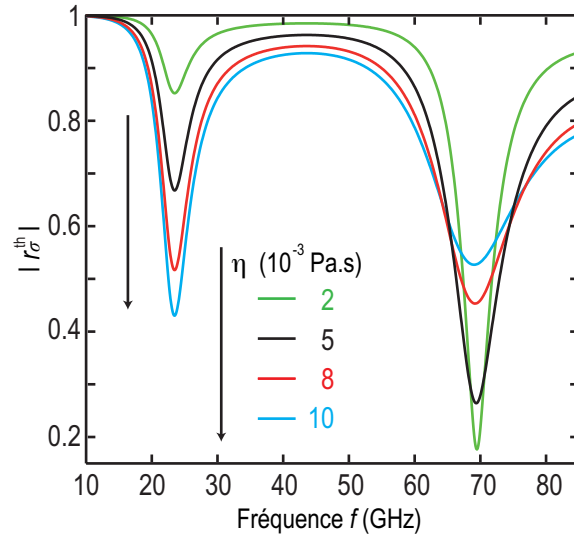


Fig. 7.3 – Variation de $|r_\sigma|$ en fonction de la fréquence pour quatre valeurs de viscosité.

Pour montrer l'effet de la viscosité sur l'amplitude de r_σ , nous remplaçons k_c et Z_c par les nouvelles valeurs complexes k_c^* et Z_c^* dans 7.6. Afin d'étudier la variation de $|r_\sigma^{th}|$ en fonction de la fréquence acoustique et de la viscosité, nous considérons une couche cellulaire d'épaisseur $d = 40$ nm, valeur typique pour les régions aux bords d'une cellule.⁴¹ La vitesse des ondes acoustiques dans la cellule $v_c = 3700$ m/s et l'impédance du titane $Z_t = 32$ MPa.s/m correspondent aux valeurs déjà trouvées dans les chapitres 4. La densité de la couche $\rho_c = 1350$ kg.m⁻³ est choisie de façon à avoir une composante réelle de Z_c^* égale 5 MPa.s/m, valeur moyenne obtenue dans le chapitre 6. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 7.1.

Tab. 7.1 – Données utilisées pour modéliser le coefficient de réflexion acoustique à l'interface entre une couche mince visqueuse et le titane.

Z_t (MPa.s/m)	ρ_c (kg.m ⁻³)	v_c (m/s)	d (nm)
32	1350	3700	40

La figure 7.3 montre l'évolution de $|r_\sigma^{th}|$ en fonction de la fréquence f pour différentes valeurs de la viscosité η . L'intervalle de fréquence choisi correspond à la gamme spectrale pouvant être explorée par iPOM (de 10 à 85 GHz). La valeur maximale de la viscosité, $\eta_{max} = 10^{-2}$ Pa.s, est imposée par la condition $M_I \ll M_R$, au delà de laquelle le modèle de Kelvin-Voigt n'est plus

adapté. Pour une viscosité η_{max} , on a $M_I/M_R \simeq 0.29$ à $f_{max} = 85$ GHz, valeur qu'on considère acceptable mais au delà de laquelle le modèle de Kelvin-Voigt ne serait plus adapté.

Nous observons sur la figure 7.3 deux minima vers 23 et 69 GHz indiquant une résonance de la couche à ces fréquences. En effet, comme la cellule est libre d'un côté et en contact parfait avec le titane ($Z_t \gg Z_c$) de l'autre (en Σ), elle peut être assimilée à une lame quart d'onde et ne résonne qu'à des fréquences égales à :

$$f_n = \frac{v_c}{2d} \left(n - \frac{1}{2} \right) \quad ; \quad n \geq 1 \quad (7.15)$$

$f_1 = v_c/4d$ correspond à la fréquence fondamentale de résonance. Dans le cas présenté ici $d = 40$ nm, la fréquence fondamentale de résonance est $f_1 \simeq 23$ GHz et la première harmonique $f_2 \simeq 69$ GHz. Nous voyons ainsi que l'introduction de l'atténuation dans la cellule fait apparaître des résonances quart d'onde.

On observe que l'amplitude de r_σ à f_1 diminue lorsque η augmente, indiquant que la résonance devient de plus en plus marquée au fur et à mesure que l'atténuation augmente. De plus, pour la valeur la plus petite de η (courbe verte, $\eta = 2.10^{-3}$ Pa.s), la première harmonique est plus marquée que la résonance fondamentale, $|r_\sigma^{th}(f_2)| < |r_\sigma^{th}(f_1)|$. Ceci est dû au modèle de Kelvin-Voigt choisi qui exprime une contribution visqueuse qui augmente linéairement avec la fréquence $M_I(\omega) = \eta\omega$. Par conséquent, pour une même valeur de η , l'atténuation des ondes est plus grande à des fréquences plus élevées. De plus, nous observons que l'augmentation de la viscosité entraîne une diminution du facteur de qualité des résonances à $f_2 \simeq 69$ GHz. L'amplitude de la résonance est moins marquée quand η augmente. Au delà d'une valeur critique de η , telle que $\alpha d \gg 1$, l'onde est atténuée avant d'atteindre l'interface cellule-air et la résonance ne s'établit plus.

En conclusion, l'introduction de l'atténuation dans la couche cellulaire d'épaisseur finie a permis de modéliser les variations d'amplitude du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence. L'atténuation attribuée à la viscosité de la cellule a mis en évidence la sensibilité du coefficient de réflexion à la résonance de la couche qui ne pouvait pas être décrite en considérant que la couche est purement élastique. Nous nous servons de ce modèle dans la section suivante pour imager la topographie des régions fines de la cellule.

7.2 Topographie de la lamelle d'une cellule en migration

La modélisation de la réflexion à l'interface titane-couche mince viscoélastique permet de mesurer l'épaisseur des zones périphériques de la cellule qui sont susceptibles de résonner à

des fréquences comprises entre 10 et 85 GHz. Pour imager la topographie de ces zones, nous identifions la fréquence de résonance à chaque point de mesure à partir de la variation de l'amplitude du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence. Pour éliminer des données non significatives et donc limiter le bruit, nous fixons un seuil de détection des résonances correspondant à un creux avec un minimum inférieur à 0.6 (Fig. 7.1(a)).

La fréquence de résonance dépend de la qualité du contact cellule-substrat. Lorsque le contact se dégrade, la condition limite à l'interface change et la fréquence de résonance se décale pour atteindre asymptotiquement $f_n = nv_c/2d$ (résonateur demi-onde) quand la cellule n'est plus en contact. Il serait donc nécessaire de prendre en compte la qualité d'adhésion à l'interface titane-cellule, et d'écrire une condition limite adaptée pour remonter à l'épaisseur d . Pour simplifier cette démarche, nous choisissons les cellules hMSC dont l'adhésion avec le titane a été identifiée comme forte donc parfaite d'un point de vue acoustique dans la section 6.3.2 du chapitre 5 ($S_a/S_t \approx 0.5$ et $K \approx 3.5$ GPa/nm). Ainsi, nous supposons que l'adhésion ne modifie pas la fréquence de résonance, et que la cellule peut être considérée comme un résonateur quart-d'onde (section 7.1). De plus, nous considérons que la vitesse des ondes acoustiques dans la cellule ne varie pas et correspond à celle déjà mesurée, $v_c = 3700$ m/s. Nous sommes alors capables d'estimer l'épaisseur de la cellule à partir de la formule 7.15, en considérant un comportement de type quart-d'onde.

La partie membranaire saillante d'une cellule en migration, notamment le lamellipode et la lamelle, est une région très fine. Jusqu'à présent, seules les zones les plus épaisses ≥ 100 nm de la partie membranaire ont pu être sondées mécaniquement dans la littérature.¹² Elle constitue donc un exemple idéal pour montrer la capacité de iPOM à imager la topographie des régions fines de cellules individuelles. Les cadres noirs sur la photo en lumière blanche d'une cellule hMSC en migration (Fig. 7.4(a)) indiquent les deux zones imagées par iPOM. La zone à l'avant de la cellule est notée « lamelle », celle du centre « noyau ». Les figures 7.4(b) et 7.4(d) montrent les images de l'épaisseur (calculée à partir de la fréquence de résonance fondamentale f_1) de la lamelle et du noyau respectivement. Les épaisseurs mesurées varient entre 12 et 60 nm, intervalle limité par la bande de fréquence exploitable (15 à 80 GHz). Nous observons que la zone nucléaire a une épaisseur supérieure à 90 nm ce qui est trop épais pour résonner à ces fréquences. Au fur et à mesure qu'on s'éloigne du noyau, la cellule devient plus fine avec des épaisseurs allant de 12 à environ 50 nm sur l'extrême bord du lamellipode.

Comparons maintenant les images topographiques à des images de fluorescence, obtenues par marquage de protéines réalisé par l'équipe de M.-C. Durrieu, pour lesquelles l'actine est marquée en vert et la vinculine en rouge (Fig. 7.4(c)-(e)). Les filaments fins d'actine permettent

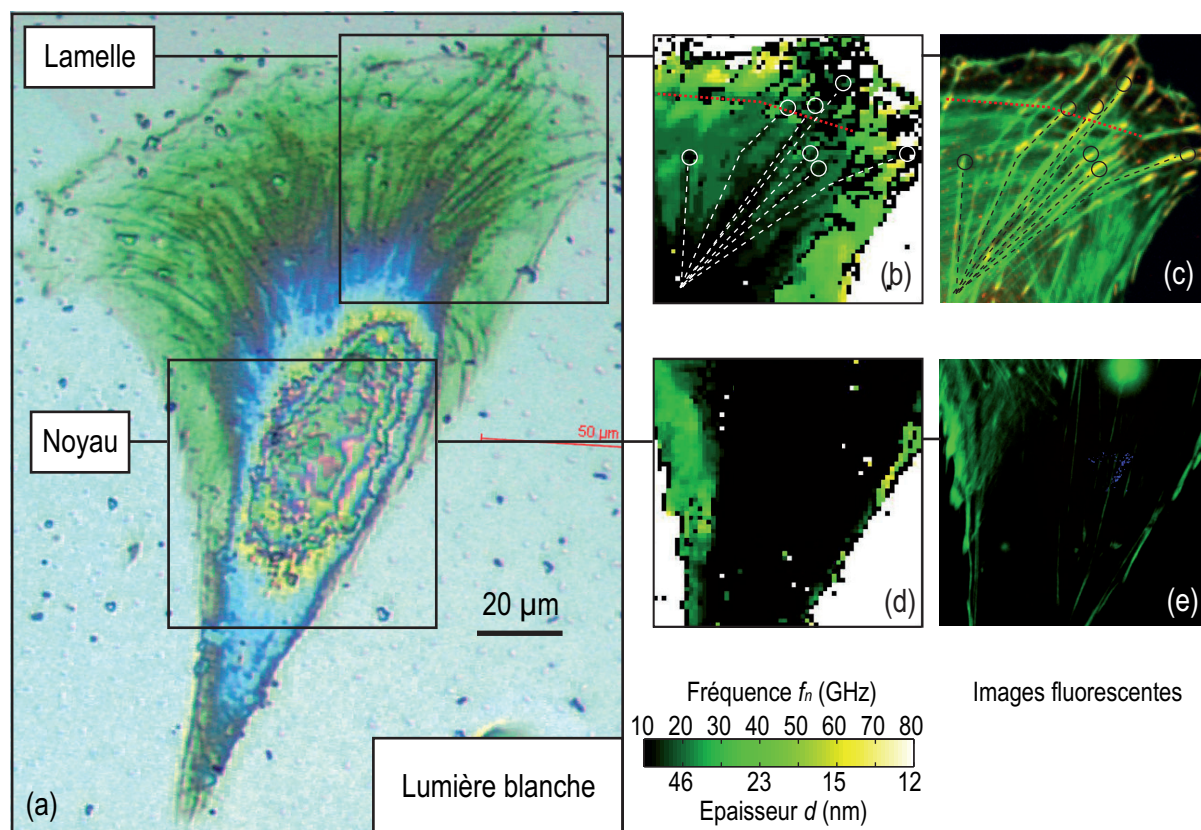


Fig. 7.4 – (a) Image en lumière blanche d'une cellule hMSC en migration. Les zones encadrées correspondent aux zones imagées par iPOM. (b)-(d) Images en épaisseur de la lamelle et du noyau de la cellule. (c)-(e) Images de microscopie à fluorescence de la lamelle et du noyau de la cellule. la protéine d'actine est marquée en vert et la vinculine en rouge.

au lamellipode de se déplacer, alors que les fibres d'actine plus épaisses relient la cellule au substrat à travers les points focaux d'adhésion. Quelques fibres sont indiquées par des pointillés blancs. Les points d'adhésion, révélés sur l'image grâce à la vinculine marquée en rouge, sont entourés par des cercles blancs. En comparant l'image fluorescente à l'image en épaisseur, nous pouvons remarquer que les fibres d'actine possèdent une épaisseur supérieure à ~ 50 nm et peuvent ainsi être identifiées sur l'image topographique. Cette observation est confirmée par la littérature puisque l'épaisseur des rayons des fibres d'actine a été estimée > 100 nm.¹⁸⁵ C'est également le cas des points focaux d'adhésion qui se trouvent au bout de chaque fibre.⁸³ De façon similaire, nous pouvons localiser un arc transverse d'actine indiqué par un trait en pointillés rouges sur les deux images. L'identification d'un arc d'actine permet de distinguer le lamellipode où se trouvent les zones d'adhésion naissantes de la lamelle où se trouvent les points focaux d'adhésion. Par conséquent, l'image en épaisseur nous permet de distinguer clairement les fibres d'actine, impliquées dans l'adhésion dont l'épaisseur est plus grande que ~ 50 nm.

En conclusion, l'imagerie acoustique des régions périphériques a permis d'estimer l'épaisseur des parties saillantes à partir des fréquences de résonance. Ces régions, notamment le lamellipode et la lamelle, peuvent atteindre des épaisseurs plus faibles que ~ 50 nm aux bords de la cellule. De plus, à ces endroits très fins, l'identification sans marquage des fibres d'actine constituant le cytosquelette de la cellule et la reliant aux points focaux d'adhésion est aussi possible. Après avoir imagé l'épaisseur des régions fines, nous nous intéresserons dans la section suivante de ce chapitre à l'étude de la viscosité de ces régions.

7.3 Rhéologie de la cellule : limitation du modèle de Kelvin-Voigt

La modélisation développée dans la première section de ce chapitre a montré que le facteur de qualité des résonances apparaissant sur la variation de $|r_\sigma^{th}|$ en fonction de la fréquence, dépend fortement de la viscosité de la couche mince. Cela suggère la possibilité d'analyser la rhéologie des zones cellulaires les plus fines. Jusqu'ici, nous avons considéré le modèle de Kelvin-Voigt dans le but d'introduire des effets dissipatifs qui sont à l'origine de l'observation des résonances sur l'amplitude du coefficient de réflexion. Dans cette section, nous discutons les limites de validité de ce modèle.

Pour illustrer la discussion, nous considérons deux points de mesures dans une cellule hMSC où des résonances sont observées à 16 et 26 GHz. Ces données sont tracées en pointillés bleus sur la figure 7.5. A partir du temps de vie des oscillations Brillouin détectées dans une cellule ostéoblaste, M. Ducouso *et al.* ont déterminé à l'aide du modèle rhéologique de Kelvin-Voigt une viscosité longitudinale dynamique d'environ 30 cP à 26 GHz.⁴² En considérant le même modèle rhéologique (Kelvin-Voigt) employé par M. Ducouso *et al.* et en prenant une valeur $\eta = 35$ cP proche de celle trouvée à 26 GHz, nous avons tracé sur la figure 7.5(a) les variations théoriques de l'amplitude du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence pour deux couches d'épaisseurs ~ 35 et 58 nm (traits pleins rouges) dans le but de reproduire les données issues de l'expérience (traits bleus pointillés). Nous remarquons une grande similitude entre les mesures et la théorie. Cependant pour que le modèle de Kelvin-Voigt soit valide sur toute la gamme de fréquence explorée, il faut que la partie imaginaire M_I , qui représente la contribution visqueuse, soit très petite devant la partie réelle M_R , qui représente l'élasticité du milieu, $M_I \ll M_R$. Comme dans la cellule, $M_R = \rho_c v_c^2 \simeq 18$ GPa (valeur correspondant aux propriétés mécaniques de la cellule trouvées dans le chapitre 6 et très proche de celle mesurée par M. Ducouso *et al.* dans des cellules ostéoblastes⁴²), et en considérant qu'un rapport $M_I(\omega_{max})/M_R \simeq 0.3$ satisfait

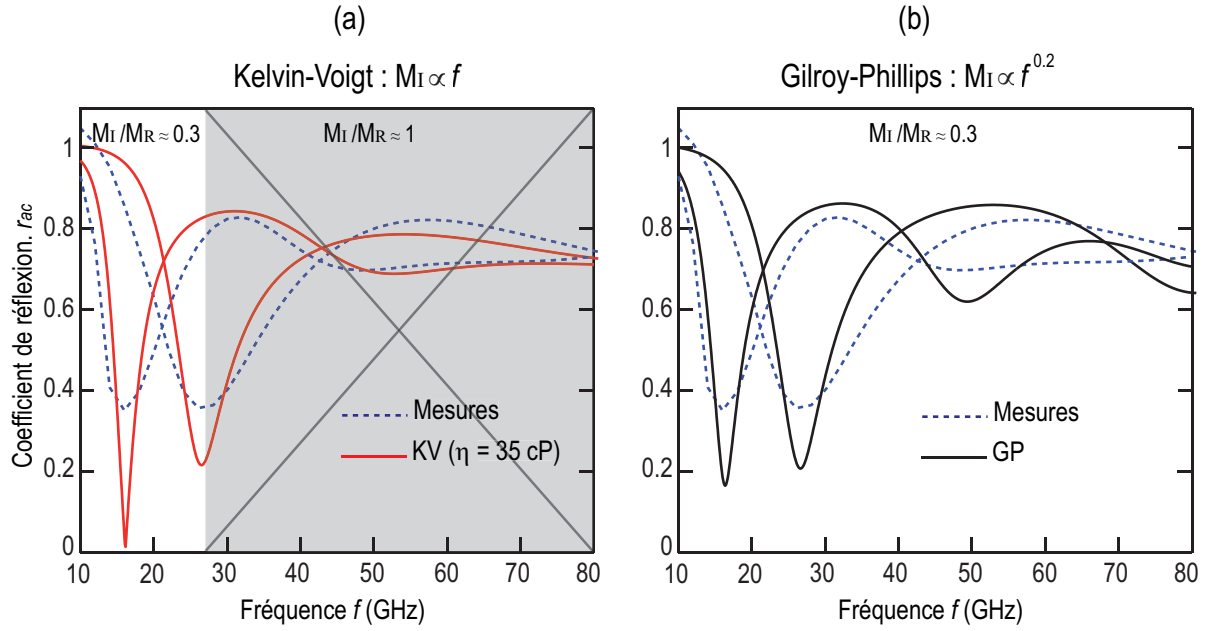


Fig. 7.5 – Variation du coefficient de réflexion acoustique en fonction de la fréquence mesurée (traits discontinus bleus) et modélisée avec le modèle rhéologique de (a) Kelvin-Voigt (rouge) et (b) de Gilroy-Phillips (noir) pour deux positions. La zone barrée dans (a) correspond à l'intervalle de fréquence pour lequel le modèle de Kelvin-Voigt n'est plus adapté.

la condition de validité, on trouve que le modèle de Kelvin-Voigt n'est plus valide au delà de ~ 30 GHz (indiquée en grisé sur la figure 7.5(a)). Dans ce cas, la contribution visqueuse M_I devient comparable à M_R . Le modèle de Kelvin-Voigt n'est donc pas adapté à la description de la rhéologie GHz de la cellule au delà de ~ 30 GHz. Il est par conséquent nécessaire de trouver un modèle rhéologique alternatif qui permette de décrire les mesures jusqu'à 80 GHz.

Dans les cellules, ainsi que dans de nombreux systèmes biologiques métastables, une atténuation avec une faible puissance en fréquence est observée par des techniques de microrhéologie. Par analogie avec les polymères, le consensus actuel consiste à décrire ce type d'atténuation par la rhéologie des verres mous.⁵⁸ C'est pour cette raison que nous avons choisi d'étudier les capsules en PLGA-PFOB dans le chapitre 2 comme objets biomimétiques, car ils se comportent de la même manière que la cellule et possédant des propriétés mécaniques très proches. Par analogie avec les capsules, nous modélisons l'atténuation dans la cellule par le modèle rhéologique de Gilroy-Phillips⁵⁷ qui décrit une atténuation $\alpha \propto f^{1.2}$ dans les polymères vitreux tels que le PLGA.^{28, 56} Au contraire du modèle de Kelvin-Voigt pour lequel $M_I \propto f$, le modèle de Gilroy-Phillips exprime une dépendance de M_I très faible en fréquence, $M_I \propto f^{0.2}$. Une comparaison entre ces deux modèles est réalisée sur la figure 7.6 montrant la variation du rapport M_I/M_R en fonction de la fréquence pour chaque modèle rhéologique. En considérant la même valeur de M_I obtenue à 26 GHz pour une viscosité de 35 cP en utilisant le modèle de Kelvin-Voigt

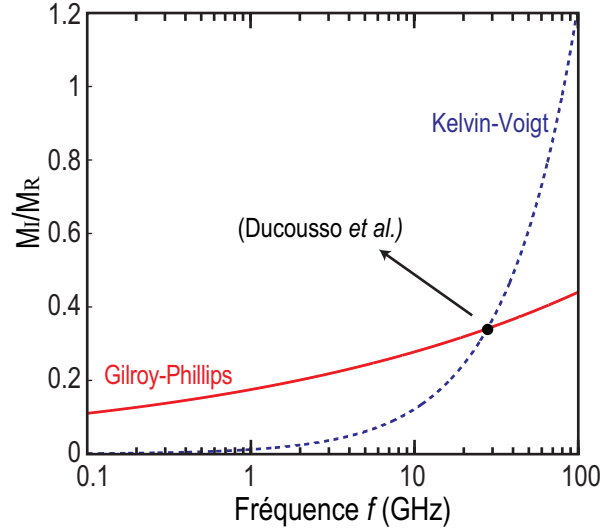


Fig. 7.6 – Variation du rapport M_I/M_R en fonction de la fréquence dans le cas du modèle rhéologique de Kelvin-Voigt (pointillés bleus) et de Gilroy-Phillips (trait plein rouge).

(point de mesure de M. Ducouso *et al.* (Fig. 7.6)), nous avons tracé sur la figure 7.5(b) les variations de l'amplitude du coefficient de réflexion prédites en utilisant le modèle rhéologique de Gilroy-Phillips (courbes noires) pour $M_I/M_R \simeq 0.3$. Les courbes bleues issues des mesures sont les mêmes dans les deux figures 7.5(a) et 7.5(b). Cette fois-ci, toute la gamme de fréquence est exploitable parce que le rapport $M_I(\omega_{max})/M_R$ ne varie quasiment pas sur toute cette gamme grâce à la faible dépendance en fréquence de M_I .

Nous remarquons également que le facteur de qualité prédit pour la résonance à 16 GHz est plus proche de la valeur mesurée que celui obtenu dans le cas de Kelvin-Voigt. L'écart visible entre la théorie et l'expérience peut être expliqué par le fait que les effets de l'interface titane-cellule ne sont pas pris en compte (ressort, amortisseur).

Ainsi, l'analyse du facteur de qualité de la résonance observée sur la variation de l'amplitude du coefficient de réflexion mesurée dans les zones fines de la cellule suggère que le modèle de Gilroy-Phillips est plus adapté que le modèle de Kelvin-Voigt pour décrire la rhéologie de la cellule sur une gamme de fréquence pouvant s'étendre jusqu'à 100 GHz. Il apparaît de plus que l'analogie avec les objets biomimétiques est pertinente en terme de modèle rhéologique.

7.4 Perspectives : propriétés mécaniques et adhésion des zones très fines

Nous avons montré au fil de ce chapitre une étude détaillée des zones cellulaires fines résonantes. En recherchant le minimum local dans l'évolution en fréquence de l'amplitude du

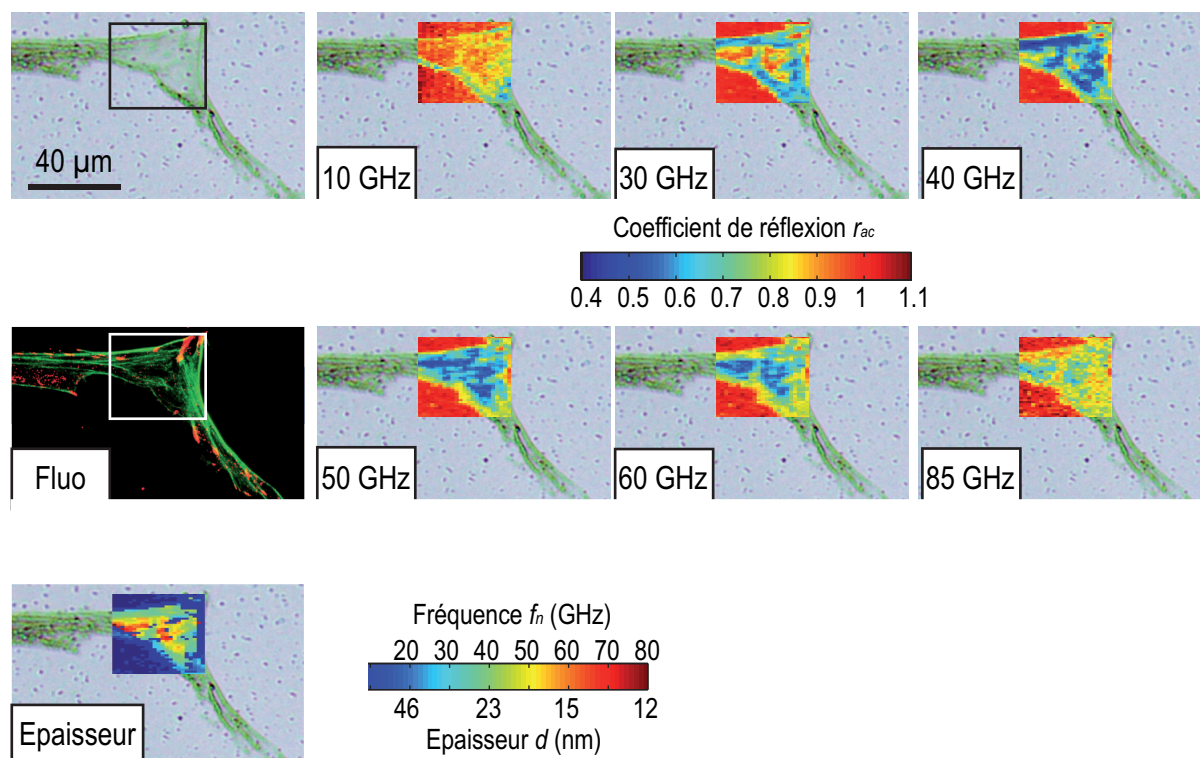


Fig. 7.7 – Images acoustiques d'une partie membranaire très fine d'une cellule hMSC.

coefficient de réflexion acoustique, nous sommes capables d'identifier la fréquence de résonance de la couche et par suite d'en déduire son épaisseur. De plus, nous pouvons analyser la rhéologie de la cellule grâce au facteur de qualité des résonances. La modélisation du coefficient de réflexion à l'interface titane-cellule en considérant que la cellule est un milieu fini viscoélastique d'épaisseur d , a permis, pour la première fois, d'imager la topographie des régions fines de la cellule d'épaisseurs plus faibles que 50 nm, inaccessibles par d'autres techniques d'imagerie actuelles. Les fibres d'actine reliant le noyau aux points focaux d'adhésion ont pu être identifiées dans la lamelle et le lamellipode d'une cellule hMSC en migration. De plus, un arc transverse d'actine, séparant le lamellipode, zone d'adhésions naissantes, de la lamelle, zone d'adhésions matures, a été localisé. Par ailleurs, il s'est avéré que le modèle de Kelvin-Voigt n'est pas adapté pour décrire la rhéologie de la cellule sur une gamme fréquentielle s'étendant jusqu'à 80 GHz. En se basant sur le consensus actuel qui prédit une loi de comportement dans les cellules similaire à celle des verres mous, et par analogie avec les capsules biomimétiques de PLGA, l'adoption du modèle de Gilroy-Philips offre la possibilité d'exploiter toute la bande spectrale du coefficient de réflexion, permettant de déduire la dépendance en fréquence de l'atténuation dans la cellule.

Pour pousser dans ses retranchements les potentialités de iPOM, nous avons présenté dans la figure 7.7 l'image en lumière blanche d'une partie membranaire très fine d'une cellule hMSC. Cette région est tellement fine qu'il est difficile de la distinguer sur l'image en lumière blanche.

Nous avons également montré l'image en fluorescence dans laquelle l'actine est marquée en vert et la vinculine en rouge. Le coefficient de réflexion r_{ac} est représenté pour différentes fréquences allant de 10 à 85 GHz. La figure du bas notée « Epaisseur », montre l'image de l'épaisseur (déterminée à partir de la fréquence de résonance fondamentale f_1) de cette zone. Il est remarquable qu'on puisse imager des structures cellulaires très fines allant jusqu'à 10 nm, inaperçues sur les images en lumière blanche ou en fluorescence. Ceci est particulièrement clair sur la figure 30 GHz qui montre une structure intérieure de la partie membranaire avec un contraste qu'on ne retrouve pas sur la photo en lumière blanche ni en fluorescence. Ces observations montrent la possibilité d'étudier dans le futur les propriétés mécaniques et l'adhésion de couches cellulaires très fines pouvant atteindre quelques dizaines de nanomètres et inaccessibles par d'autres techniques d'imagerie actuelles.

Conclusion de la troisième partie

L'intérêt d'utiliser des ondes acoustiques pour l'imagerie cellulaire a été révélé dans le chapitre 5 à travers la présentation de la microscopie acoustique. En effet, dans la première section de ce chapitre, nous avons montré que cette technique permet de quantifier de manière non-invasive les propriétés mécaniques des cellules. Ayant la possibilité de sonder la structure interne des cellules, la microscopie acoustique a permis de suivre des processus biologiques complexes comme la mitose, l'apoptose ou l'adhésion cellulaire en quantifiant la mécanique des structures cellulaires avec une résolution micrométrique en profondeur. Cependant, il est nécessaire d'affiner cette résolution en vue d'imager des structures cellulaires plus fines, plus dynamiques et plus complexes. Pour cela, nous avons proposé l'acoustique picoseconde comme technique supplémentaire et avons pour cette raison, introduit le dispositif pompe-sonde asynchrone permettant l'application de cette technique à l'imagerie cellulaire grâce aux courts temps d'acquisition qu'il offre. Nous avons ainsi développé iPOM, un microscope opto-acoustique se caractérisant par une résolution latérale micrométrique et une résolution en profondeur nanométrique.

Les images acoustiques haute résolution produites par iPOM ont été présentées dans le chapitre 6. Le contraste de ces images a montré la capacité de cette technique d'échographie large-bande à détecter localement les propriétés mécaniques au sein d'une même cellule à une échelle sub-cellulaire. Cela a permis de réaliser une cartographie de l'impédance acoustique de la cellule ainsi que de la qualité d'adhésion entre la cellule et le titane. En menant des expériences sur des cellules hMEC à deux différents temps de culture ainsi que sur trois autres différents types cellulaires (cellules souches mésenchymateuses, monocytes, fibroblastes sénescents), les images d'impédance Z_c et de raideur K produites ont révélé la sensibilité de iPOM aux faibles variations mécaniques d'un type cellulaire à un autre ainsi que d'un stade d'évolution à un autre au sein d'un même type. D'un point de vue qualitatif, ces images ont montré qu'à partir de l'hétérogénéité spatiale de Z_c ou de K , il est possible de suivre des processus biologiques au cours du temps, ou encore de caractériser un type cellulaire.

Afin d'évaluer le contenu des images d'impédance et de raideurs obtenues par iPOM, nous avons défini quatre indicateurs qui quantifient la mécanique d'une zone intracellulaire. Le premier

indicateur est l'impédance moyenne Z_c qui renseigne sur la rigidité moyenne de cette zone. Le deuxième indicateur est l'écart type ΔZ_c qui traduit l'hétérogénéité mécanique à l'intérieur de cette zone. L'adhésion faible quantifiable K_m est le troisième indicateur qui est attribué à la géométrie du contact entre la zone intracellulaire étudiée et le titane. Enfin, le quatrième indicateur est le rapport S_a/S_t , qualifié de rapport de surface d'adhésion forte, et qui décrit l'adhésion due à des processus actifs dans la cellule, qui varient avec les conditions physiologiques. L'étude de la zone nucléaire des hMEC à l'aide de ces indicateurs à deux temps de culture différents a révélé une augmentation de l'hétérogénéité de cette zone entre 30 minutes et 12 heures ainsi qu'une diminution de sa surface d'adhésion forte. L'augmentation de l'hétérogénéité semble être corrélée à un processus actif pouvant se produire entre ces deux temps de mesure comme par exemple une division cellulaire. Cette division, si elle existe, peut également affecter l'adhésion de la zone nucléaire avec le titane, ce qui peut expliquer la variation de la surface d'adhésion forte. D'autre part, l'étude de différents types cellulaires a montré la possibilité d'identifier dans le futur un type cellulaire à travers sa mécanique en utilisant Z_c , ΔZ_c , K_m et S_a/S_t comme indicateurs.

En identifiant et modélisant les résonances mécaniques des zones fines des cellules, nous avons déduit dans le chapitre 7 l'épaisseur de ces zones comprise entre 15 nm et 50 nm. Ainsi, nous avons été capables d'imager la topographie de structures cellulaires complexes comme le lamellipode et la lamelle. De plus, nous sommes parvenus grâce à cette cartographie à distinguer, sans marquage, les fibres d'actine constituant le cytosquelette de la cellule et la reliant aux points focaux d'adhésion. Par ailleurs, l'identification de l'arc transverse séparant le lamellipode de la lamelle, c'est-à-dire la région où se concentrent les adhésions naissantes de celle où se localisent les adhésions matures, est possible. Ensuite, l'analyse de l'atténuation acoustique dans ces zones fines a montré une faible dépendance en fréquence de cette dernière dans la cellule. Par analogie avec les capsules biomimétiques présentées dans le chapitre 2, nous avons décrit cette dépendance par le modèle rhéologique de Gilroy-Philips et avons ainsi offert la capacité d'étudier la rhéologie des zones fines de la cellule au delà de 10 GHz. Enfin, nous avons montré la possibilité d'exploiter à l'aide d'iPOM la mécanique et l'adhésion des structures membranaires très fines allant jusqu'à 10 nm, ce qui est jusqu'à aujourd'hui inaccessible par les techniques actuelles.

En conclusion, nous sommes parvenus dans cette partie à développer un microscope opto-acoustique, basé sur l'acoustique picoseconde, capable de fournir des images acoustiques de résolution nanométrique allant jusqu'à 40 nm en profondeur et micrométrique de 2 μ m latéralement. La résolution latérale, définie par le rayon de la tache sonde peut être améliorée en utilisant une sonde de longueur d'onde plus petite que 1028 nm et en utilisant des objectifs de

plus forte focalisation. La mise en place des outils quantitatifs (indicateurs quantitatifs de la mécanique et de l'adhésion, modèle rhéologique, modèle d'interface, outils de traitement de signal) permettent d'exploiter les potentialités d'iPOM. Cette technique est un outil très puissant qui permettra dans le futur de réaliser l'imagerie des propriétés mécaniques de cellules vivantes en temps réel et de suivre la dynamique de leurs processus actifs tels que la mécanotransduction, la morphogenèse, la prolifération, la motilité...

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'étudier la mécanique et l'adhésion cellulaire avec une résolution sub-cellulaire à l'aide d'ondes acoustiques GHz. Pour ce faire, nous avons contribué à réaliser l'imagerie d'une cellule par acoustique picoseconde. Avant d'effectuer ce nouveau type d'échographie cellulaire dans la troisième partie de ce manuscrit, il a été nécessaire de passer par deux étapes préliminaires. La première étape a été consacrée à la caractérisation, par acoustique picoseconde, d'objets mous micrométriques mimant les propriétés mécaniques des cellules. Cette étape, nécessaire pour une meilleure compréhension de la mécanique complexe des cellules, a fait l'objet de la première partie de ce manuscrit. La deuxième étape a constitué le corps de la deuxième partie dans laquelle l'étude des propriétés mécaniques et de l'adhésion d'une cellule à structure simple a été réalisée à travers un balayage opto-acoustique 1D.

Dans la première partie de ce mémoire, l'acoustique picoseconde, technique opto-acoustique complètement non-invasive, capable de sonder sans contact les propriétés mécaniques des structures nanométriques a été introduite. En exposant les principes physiques de la génération et de la détection d'ondes acoustiques GHz à l'aide de lasers impulsifs, nous avons présenté le bagage théorique nécessaire pour la modélisation de nos expériences. Après avoir montré l'intérêt de sonder les propriétés mécaniques d'une cellule individuelle au moyen d'ondes acoustiques GHz, et afin de simuler et mieux comprendre cette mécanique complexe, nous nous sommes lancés dans l'étude et la caractérisation de capsules sphériques biomimétiques formées par une coquille polymérique et un cœur liquide. A travers l'analyse des oscillations Brillouin, nous sommes parvenus à déterminer l'épaisseur de ces multicouches viscoélastiques immergées dans un milieu liquide, ainsi que la vitesse et l'atténuation des ondes acoustiques se propageant dans ces systèmes micrométriques. La mesure de l'atténuation dans la coquille à deux fréquences différentes a permis de remonter à une loi de comportement typique de celles trouvée dans les verres mous au GHz. De plus, l'étude de l'atténuation acoustique dans le cœur a révélé une information sur le contact entre la capsule et le substrat. Il est apparu que cette atténuation est corrélée avec le rayon de la capsule et l'épaisseur de la coquille. Cette corrélation, attribuée à la diffraction acoustique, due au passage de l'onde du champ proche en champ lointain, est dictée

par la taille du contact entre la capsule et le substrat. Cette analyse a suggéré que ce contact soit essentiellement dicté par la coquille. La comparaison de nos résultats avec un modèle théorique de contact prenant en compte la contribution de la coquille a supporté cette idée. Elle a ainsi montré que des modèles simples d'adhésion de type JKR ne peuvent pas représenter le nanocontact de telles capsules micrométriques puisqu'ils ne prennent pas en compte l'influence de la coquille. Une modélisation théorique complète de la propagation acoustique en champ proche et en champ lointain dans de tels systèmes viscoélastiques micrométriques serait nécessaire dans le futur afin d'arriver à quantifier ce nanocontact à travers la diffraction acoustique avec plus de précision.

Après la caractérisation des objets biomimétiques, nous sommes passés à la manipulation de cellules animales modèles dans la deuxième partie de ce mémoire. Dans cette partie, une évaluation quantitative et à distance de l'adhésion d'une cellule animale sur un biomatériau ainsi que de ses propriétés mécaniques a été réalisée à l'aide d'ondes acoustiques GHz. Nous avons employé l'acoustique picoseconde pour étudier l'adhésion cellulaire. Pour cela, nous avons développé un montage opto-acoustique permettant d'effectuer un échantillonnage spatial 1D, à l'interface cellule-biomatériau, et offrant la possibilité de caractériser à différentes positions sous la cellule, les propriétés mécaniques et la qualité d'adhésion de cette dernière grâce au coefficient de réflexion acoustique à l'interface cellule-biomatériau. La mise en place des outils d'analyse nécessaires pour le traitement de signal (traitement en ondelettes) et pour la modélisation de l'interface cellule-biomatériau (modèle de type ressort) a permis de déterminer l'impédance acoustique de la cellule et la raideur d'interface tout au long de la ligne auscultée. Une comparaison des résultats obtenus par d'autres techniques a révélé que le dispositif opto-acoustique que nous avons développé dans cette partie ainsi que les outils d'analyse que nous avons mis en place sont adaptés à l'étude des propriétés mécaniques de la cellule par acoustique picoseconde. Ces résultats innovants ont donc suggéré d'appliquer ce travail à une étude 2D plus complète afin de réaliser, pour la première fois, l'imagerie d'une cellule à l'aide d'ondes acoustiques GHz. Cela a fait l'objet de la troisième partie de ce manuscrit.

Dans cette dernière partie, l'étude opto-acoustique de la mécanique et de l'adhésion cellulaire, initiée dans la deuxième partie par une analyse 1D, a été étendue pour être réalisée en 2D. Pour cela, nous avons tout d'abord présenté le dispositif pompe-sonde asynchrone permettant une réduction considérable du temps d'acquisition et donnant ainsi accès à l'imagerie par acoustique picoseconde. En combinant ce dispositif asynchrone avec le montage expérimental (biotransducteur, mode uni-latéral inférieur) décrit dans la deuxième partie, nous sommes parvenus à développer iPOM, un microscope opto-acoustique inversé adapté à l'imagerie cellulaire

par ondes acoustiques GHz. L'un des avantages que présente iPOM sur les techniques classiques de microscopie acoustique est sa résolution axiale qui peut atteindre 40 nm, lui offrant la capacité d'étudier quantitativement des structures cellulaires très fines allant jusqu'à une dizaine de nanomètres. En imageant plusieurs types cellulaires à différents stades de vie, nous avons réussi à montrer la sensibilité de iPOM à détecter des variations mécaniques au sein d'une même cellule, d'un stade de vie à un autre ou bien d'un type de cellule à un autre. Nous avons exploité cette sensibilité pour mettre en place des indicateurs permettant de quantifier quatre aspects mécaniques d'une zone cellulaire : sa rigidité et sa densité (impédance moyenne Z_c), son hétérogénéité mécanique (écart type ΔZ_c), son adhésion faible (K_m) ainsi que son adhésion forte (S_a/S_t). Ces indicateurs quantitatifs pourront dans le futur servir pour caractériser et identifier mécaniquement un type cellulaire ainsi que pour suivre la mécanique de la cellule au cours de processus biologiques comme l'adhésion, la migration, la mitose ou la mort cellulaire. Enfin, nous avons bénéficié de la haute résolution axiale offerte par iPOM pour imager la topographie des zones cellulaires très fines allant jusqu'à 10 nm d'épaisseur. Cela nous a permis d'observer sans marquage les fibres d'actine dans la lamelle d'une cellule en migration. De plus, l'imagerie par iPOM a offert la possibilité d'étudier la rhéologie de ces zones cellulaires très fines. Par analogie avec la rhéologie des objets biomimétiques, il est apparu que la loi de comportement au GHz dans de telles zones cellulaires obéit à celle des verres mous décrivant la rhéologie de la cellule à des fréquences plus basses.⁵⁸ Une modélisation plus complète des résultats obtenues dans les zones fines des cellules, offrira la possibilité de remonter localement, au sein d'une même cellule, à la loi qui décrit le comportement des zones fines dans la cellule. De plus, l'exploration de la phase du coefficient de réflexion en plus de son amplitude pourrait être un outil pour optimiser les ajustements théoriques réalisés et optimiser le contraste.

Ainsi, l'échographie d'une cellule par ondes de compression est réalisée pour la première fois. De nombreuses questions ont été soulevées qui méritent d'être approfondies. Des pistes à court terme pourraient être de vérifier la contribution de la MEC (matrice extra-cellulaire) dans la valeur de raideur d'interface K mesurée. De plus, il serait intéressant de combiner simultanément les deux techniques de mesure (bi-latérale et uni-latérale inférieure) employée dans ce travail pour extraire une information plus complète sur les propriétés mécaniques (mesurer l'impédance et la vitesse des ondes acoustiques simultanément) et l'adhésion (mesurer l'adhésion de deux manières différentes, à travers la raideur K ainsi que l'atténuation due à la diffraction acoustique quand cela est possible) de la cellule. Après avoir imagé par iPOM des cellules fixées et montrer la capacité de notre dispositif à caractériser des objets immergés, l'idée dans le futur serait d'appliquer cette technique à des cellules vivantes dans un milieu de culture liquide. Des

pistes à long terme pourraient être de s'affranchir du biotransducteur métallique en injectant des nanoparticules d'or dans la cellule et en imageant par iPOM la réponse acoustique de ces particules.⁷³ Par ailleurs l'échographie de la cellule avec d'autres types d'ondes^{186,187} (de cisaillement, de surface) pourrait apporter une information supplémentaire et cruciale pour une meilleure compréhension de la mécanique cellulaire. L'optimisation et la mise au point de iPOM feront de lui, dans quelques années, un outil incontournable pour l'étude de la biologie cellulaire, de même qu'un échographe est l'outil incontournable pour presque toutes les spécialités de la médecine.

Bibliographie

- ¹ R. S. C. COBBOLD : *Foundations of biomedical ultrasound*. Oxford University Press, USA, 2007. [1](#)
- ² H. AMMARI, E. BOSSY, V. JUGNON et H. KANG : Mathematical modeling in photoacoustic imaging of small absorbers. *SIAM review*, 52(4):677–695, 2010. [2](#)
- ³ L. V. WANG et S. HU : Photoacoustic tomography : In vivo imaging from organelles to organs. *Science*, 335(6075):1458–1462, 2012. [2](#)
- ⁴ V. NTZIACHRISTOS, J. RIPOLL, L. V. WANG et R. WEISSLEDER : Looking and listening to light : the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotech*, 23(3):313–320, 2005. [2](#)
- ⁵ J. YAO et L. V. WANG : Sensitivity of photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 2(2):87 – 101, 2014. [2](#)
- ⁶ C. M. O’CONNOR, J. U. ADAMS et J. FAIRMAN : *Essentials of Cell Biology*. NPG Education, Cambridge, 2010. [v](#), [3](#), [4](#)
- ⁷ D. BOAL : *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press, 2012. [4](#)
- ⁸ A. RAMAN, S. TRIGUEROS, A. CARTAGENA, A. P. Z. STEVENSON, M. SUSILO, E. NAUMAN et S. ANTORANZ-CONTERA : Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat Nano*, 6(12):809–814, 2011. [4](#), [55](#)
- ⁹ J. RHEINLAENDER et T. E. SCHÄFFER : Mapping the mechanical stiffness of live cells with the scanning ion conductance microscope. *Soft Matter*, 9(12):3230–3236, 2013. [4](#)
- ¹⁰ S. S. SCHAUS et E. R. HENDERSON : Cell viability and probe-cell membrane interactions of xrl glial cells imaged by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 73(3):1205–1214, 1997. [4](#)
- ¹¹ R. A. LEMONS et C. F. QUATE : Acoustic microscope—scanning version. *Applied Physics Letters*, 24(4):163–165, 1974. [viii](#), [4](#), [92](#), [93](#)

- ¹² J. A. HILDEBRAND, D. RUGAR, R. N. JOHNSTON et C. F. QUATE : Acoustic microscopy of living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3):1656–1660, 1981. [4](#), [93](#), [130](#)
- ¹³ C. THOMSEN, J. STRAIT, Z. VARDENY, H. J. MARIS, J. TAUC et J. J. HAUSER : Coherent phonon generation and detection by picosecond light pulses. *Phys. Rev. Lett.*, 53(10):989–992, 1984. [4](#), [9](#), [11](#), [43](#)
- ¹⁴ H. J. MARIS : Picosecond ultrasonics. *Sci. Am.*, 278:64–67, 1998. [5](#)
- ¹⁵ C. ROSSIGNOL, N. CHIGAREV, M. DUCOUSO, B. AUDOIN, G. FORGET, F. GUILLEMOT et M.-C. DURRIEU : *In Vitro* picosecond ultrasonics in a single cell. *Appl. Phys. Lett.*, 93(12):123901, 2008. [5](#), [11](#), [22](#), [25](#), [44](#), [65](#), [87](#)
- ¹⁶ A. G. BELL : Selenium and the photophone. *Nature*, 22(569):500–503, 1880. [9](#)
- ¹⁷ A. G. BELL : On the production and reproduction of sound by light. *American Journal of Science*, 20(118):305–324, 1880. [9](#)
- ¹⁸ T. H. MAIMAN : Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, 187:493–494, 1960. [9](#)
- ¹⁹ C. V. SHANK et E. P. IPPEN : Subpicosecond kilowatt pulses from a mode-locked cw dye laser. *Appl. Phys. Lett.*, 24:373–375, 1974. [9](#)
- ²⁰ G. TAS et H. J. MARIS : Electron diffusion in metals studied by picosecond ultrasonics. *Phys. Rev. B*, 49(21):15046, 1994. [9](#)
- ²¹ H. T. GRAHN, H. J. MARIS et J. TAUC : Picosecond ultrasonics. *IEEE J. Quantum Electron.*, 25(12):2562–2569, 1989. [9](#), [22](#)
- ²² G. TAS, R. J. STONER, H. J. MARIS, G. W. RUBLOFF, G. S. OEHRLEIN et J. M. HALBOUT : Noninvasive picosecond ultrasonic detection of ultrathin interfacial layers : Cf[sub x] at the al/si interface. *Appl. Phys. Lett.*, 61(15):1787–1789, 1992. [9](#)
- ²³ Y. GUILLET, C. ROSSIGNOL, B. AUDOIN, G. CALBRIS et S. RAVAINÉ : Optoacoustic response of a single submicronic gold particle revealed by the picosecond ultrasonics technique. *Appl. Phys. Lett.*, 95(6):061909, 2009. [9](#)
- ²⁴ D. SÉGUR, Y. GUILLET et 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(3):031901, 2010. [10](#)

- ²⁵ A. AYOUCHE, X. DIEUDONNÉ, G. VAUDEL, H. PIOMBINI, K. VALLÉ, V. GUSEV, P. BELLEVILLE et P. RUELLO : Elasticity of an assembly of disordered nanoparticles interacting via either van der waals-bonded or covalent-bonded coating layers. *ACS Nano*, 6(12):10614–10621, 2012. [10](#), [44](#), [59](#)
- ²⁶ A. DEVOS : Colored ultrafast acoustics : From fundamentals to applications. *Ultrasonics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2014.02.009>, 2014. [10](#)
- ²⁷ C. J. MORATH et H. J. MARIS : Phonon attenuation in amorphous solids studied by picosecond ultrasonics. *Phys. Rev. B*, 54(1):203–213, 1996. [10](#)
- ²⁸ T. DEHOUE, N. TSAPIS et B. AUDOIN : Relaxation dynamics in single polymer microcapsules probed with laser-generated ghz acoustic waves. *Soft Matter*, 8:2586–2589, 2012. [10](#), [22](#), [25](#), [26](#), [27](#), [29](#), [30](#), [32](#), [33](#), [34](#), [35](#), [44](#), [58](#), [59](#), [133](#)
- ²⁹ L. J. SHELTON, F. YANG, W. K. FORD et H. J. MARIS : Picosecond ultrasonic measurement of the velocity of phonons in water. *Phys. Status Solidi B*, 242(7):1379–1382, 2005. [10](#)
- ³⁰ S. KASHIWADA, O. MATSUDA, J. J. BAUMBERG, R. LI VOTI et O. B. WRIGHT : In situ monitoring of the growth of ice films by laser picosecond acoustics. *J. Appl. Phys.*, 100(7):073506, 2006. [10](#)
- ³¹ P.-A. MANTE, C.-C. CHEN, Y.-C. WEN, J.-K. SHEU et C.-K. SUN : Thermal boundary resistance between gan and cubic ice and thz acoustic attenuation spectrum of cubic ice from complex acoustic impedance measurements. *Phys. Rev. Lett.*, 111:225901, 2013. [10](#), [127](#)
- ³² T. PEZERIL, C. KLIEBER, S. ANDRIEU et K. A. NELSON : Optical generation of gigahertz-frequency shear acoustic waves in liquid glycerol. *Phys. Rev. Lett.*, 102(10):107402, 2009. [10](#)
- ³³ O. B. WRIGHT, B. PERRIN, O. MATSUDA et V. E. GUSEV : Optical excitation and detection of picosecond acoustic pulses in liquid mercury. *Phys. Rev. B*, 78(2):024303, 2008. [10](#)
- ³⁴ D. G. CAHILL, W. K. FORD, K. E. GOODSON, G. D. MAHAN, A. MAJUMDAR, H. J. MARIS, R. MERLIN et S. R. PHILLPOT : Nanoscale thermal transport. *J. Appl. Phys.*, 93(2):793–818, 2003. [10](#)
- ³⁵ B. BONELLO, L. BELLARD, J. PIERRE, J. O. VASSEUR, B. PERRIN et O. BOYKO : Negative refraction of surface acoustic waves in the subgigahertz range. *Phys. Rev. B*, 82(10):104109, 2010. [10](#)

- ³⁶ C. THOMSEN, H. T. GRAHN, H. J. MARIS et J. TAUC : Surface generation and detection of phonons by picosecond light pulses. *Phys. Rev. B*, 34(6):4129–4138, 1986. [13](#), [14](#), [16](#), [22](#)
- ³⁷ M. PERTON : *Ultrasons rayonnés par une source laser ponctuelle dans des milieux isotropes transverses et applications à la mesure du tenseur d'élasticité de cylindres et de couches minces*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, n° d'ordre 3294, 2006. [15](#)
- ³⁸ T. DEHOUX : *Génération et détection par couplage élasto-optique tridimensionnel de champs acoustiques picosecondes diffractés*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, n° d'ordre 3431, 2007. [17](#), [18](#), [23](#), [76](#)
- ³⁹ L. BRILLOUIN : Diffusion de la lumière et des rayons x par un corps transparent homogène. influence de l'agitation thermique. *Ann. Phys.(Paris)*, 17:88–122, 1922. [21](#)
- ⁴⁰ B. AUDOIN, C. ROSSIGNOL, N. CHIGAREV, M. DUCOUSSO, G. FORGET, F. GUILLEMOT et M.-C. DURRIEU : Picosecond acoustics in vegetal cells : Non-invasive in vitro measurements at a sub-cell scale. *Ultrasonics*, 50(2):202–207, 2010. [22](#), [30](#), [58](#), [64](#), [78](#)
- ⁴¹ M. DUCOUSSO : *Acoustique picoseconde dans une cellule biologique individuelle*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, n° d'ordre 4082, 2010. [22](#), [25](#), [66](#), [128](#)
- ⁴² M. DUCOUSSO, O. F. ZOUANI, C. CHANSEAU, C. CHOLLET, C. ROSSIGNOL, B. AUDOIN et M.-C. DURRIEU : Evaluation of mechanical properties of fixed bone cells with sub-micrometer thickness by picosecond ultrasonics. *The European Physical Journal - Applied Physics*, 61(doi = 10.1051/epjap/2012120279), 2013. [22](#), [58](#), [64](#), [68](#), [87](#), [132](#)
- ⁴³ G. B. SUKHORUKOV, E. DONATH, S. MOYA, A. S. SUSHA, A. VOIGT, J. HARTMANN et H. MÖHWALD : Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes. *J. Microencapsulation*, 17(2):177–185, 2000. [26](#)
- ⁴⁴ M. DELCEA, H. MÖHWALD et A. G. SKIRTACH : Stimuli-responsive lbl capsules and nanoshells for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 63(9):730–747, 2011. [26](#)
- ⁴⁵ C. GÓMEZ-GAETE, E. FATTAL, L. SILVA, M. BESNARD et N. TSAPIS : Dexamethasone acetate encapsulation into trojan particles. *J. Controlled Release*, 128(1):41–49, 2008. [26](#)
- ⁴⁶ Y. CAPAN, B. H. WOO, S. GEBREKIDAN, S. AHMED et P. P. DELUCA : Influence of formulation parameters on the characteristics of poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres

- containing poly (l-lysine) complexed plasmid dna. *Journal of controlled release*, 60(2):279–286, 1999. [26](#)
- ⁴⁷ E. PISANI, N. TSAPIS, B. GALAZ, M. SANTIN, R. BERTI, N. TAULIER, E. KURTISOVSKI, O. LUCIDARME, M. OUREVITCH, B. T. DOAN, J. C. BELOEIL, B. GILLET, W. URBACH, S. L. BRIDAL et E. FATTAL : Perfluorooctyl bromide polymeric capsules as dual contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Adv. Funct. Mater.*, 18(19):2963–2971, 2008. [26](#), [32](#)
- ⁴⁸ R. DÍAZ-LÓPEZ, N. TSAPIS, M. SANTIN, S. L. BRIDAL, V. NICOLAS, D. JAILLARD, D. LIBONG, P. CHAMINADE, V. MARSAUD, C. VAUTHIER et E. FATTAL : The performance of pegylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials*, 37(7):1723–1731, 2010. [26](#)
- ⁴⁹ J. J. LIN, F. S. BATES, D. A. HAMMER et J. A. SILAS : Adhesion of polymer vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 95(2):026101, 2005. [26](#)
- ⁵⁰ E. PISANI, N. TSAPIS, J. PARIS, V. NICOLAS, L. CATTEL et E. FATTAL : Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging : Physical characterization. *Langmuir*, 22(9):4397–4402, 2006. [26](#)
- ⁵¹ T. DEHOUX, N. CHIGAREV, C. ROSSIGNOL et B. AUDOIN : Three-dimensional elasto-optic interaction for reflectometric detection of diffracted acoustic fields in picosecond ultrasonics. *Phys. Rev. B*, 76(2):024311, 2007. [29](#)
- ⁵² J. G. RIESS : Oxygen carriers ("blood substitutes") - raison d'être, chemistry, and some physiology. *Chem. Rev.*, 101(9):2797–2920, 2001. [30](#), [35](#)
- ⁵³ N. G. PARKER, M. L. MATHER, S. P. MORGAN et M. J. W. POVEY : Longitudinal acoustic properties of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid). *Biomed. Mater.*, 5(5):055004, 2010. [31](#), [33](#)
- ⁵⁴ J. N. MARSH, C. S. HALL, S. A. WICKLINE et G. M. LANZA : Temperature dependence of acoustic impedance for specific fluorocarbon liquids. *J. Acoust. Soc. Am.*, 112(6):2858–2862, 2002. [32](#)
- ⁵⁵ L. MOUSNIER, N. HUANG, E. MORVAN, E. FATTAL et N. TSAPIS : Influence of polymer end-chemistry on the morphology of perfluorohexane polymeric microcapsules intended as ultrasound contrast agents. *International journal of pharmaceutics*, 471(1):10–17, 2014. [32](#)

- ⁵⁶ N. V. SUROVTSEV, J. A. H. WIEDERSICH, V. N. NOVIKOV, E. RÖSSLER et A. P. SOKOLOV : Light-scattering spectra of fast relaxation in glasses. *Physical Review B*, 58(22):14888, 1998. [33](#), [133](#)
- ⁵⁷ K. S. GILROY et W. A. PHILLIPS : An asymmetric double-well potential model for structural relaxation processes in amorphous materials. *Philosophical Magazine B*, 43(5):735–746, 1981. [33](#), [133](#)
- ⁵⁸ B. FABRY, G. N. MAKSYM, J. P. BUTLER, M. GLOGAUER, D. NAVAJAS et J. J. FREDBERG : Scaling the microrheology of living cells. *Physical review letters*, 87(14):148102, 2001. [33](#), [133](#), [143](#)
- ⁵⁹ N. ELSNER, F. DUBREUIL et A. FERY : Tuning of microcapsule adhesion by varying the capsule-wall thickness. *Phys. Rev. E*, 69(3):031802, 2004. [vi](#), [36](#), [38](#)
- ⁶⁰ S. H. CHOI et T. G. PARK : Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 13(10):1163–1173, 2002. [37](#)
- ⁶¹ S. Y. KIM, K. KIM, K. HONG et J.-L. LEE : Investigation of metal peel-off technique for the fabrication of flexible organic light-emitting diodes. *J. Electrochem. Soc.*, 156(9):J253–J257, 2009. [37](#)
- ⁶² N. WANG, J. D. TYTELL et D. E. INGBER : Mechanotransduction at a distance : mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1):75–82, 2009. [43](#)
- ⁶³ A. BUXBOIM, I. L. IVANOVSKA et D. E. DISCHER : Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus : how deeply do cells ‘feel’ outside and in ? *Journal of cell science*, 123(3):297–308, 2010. [43](#)
- ⁶⁴ C. S. CHEN : Mechanotransduction—a field pulling together ? *Journal of cell science*, 121(20): 3285–3292, 2008. [43](#), [47](#), [51](#)
- ⁶⁵ K. GERDES, M. HOWARD et F. SZARDENINGS : Pushing and pulling in prokaryotic dna segregation. *Cell*, 141(6):927–942, 2010. [43](#)
- ⁶⁶ W. T. D’ARCY : *On growth and form*. Cambridge University Press, 1917. [43](#)
- ⁶⁷ J. T. PARSONS, A. R. HORWITZ et M. A. SCHWARTZ : Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9):633–643, 2010. [43](#), [50](#), [51](#), [52](#)

- ⁶⁸ Dennis E. DISCHER, Paul JANMEY et Yu-li WANG : Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–1143, 2005. [43](#), [50](#)
- ⁶⁹ F. CHOWDHURY, S. NA, D. LI, Y.-C. POH, T. S. TANAKA, F. WANG et N. WANG : Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials*, 9(1):82–88, 2010. [43](#)
- ⁷⁰ H.-N. LIN, R. J. STONER et H. J. MARIS : Ultrasonic experiments at ultra-high frequency with picosecond time-resolution. In *Ultrasonics Symposium, 1990. Proceedings., IEEE 1990*, pages 1301–1307 vol.3, 1990. [43](#)
- ⁷¹ O. B. WRIGHT : Laser picosecond acoustics in double-layer transparent films. *Opt. Lett.*, 20(6):632–634, 1995. [43](#)
- ⁷² M. HETTICH, A. BRUCHHAUSEN, S. RIEDEL, T. GELDHAUSER, S. VERLEGER, D. ISSENMANN, O. RISTOW, R. CHAUHAN, J. DUAL, A. ERBE, E. SCHEER, P. LEIDERER et T. DEKORSY : Modification of vibrational damping times in thin gold films by self-assembled molecular layers. *Applied Physics Letters*, 98(26):261908, 2011. [44](#)
- ⁷³ Y. GUILLET, B. AUDOIN, M. FERRIÉ et S. RAVAINÉ : All-optical ultrafast spectroscopy of a single nanoparticle-substrate contact. *Physical Review B*, 86(3):035456, 2012. [44](#), [59](#), [144](#)
- ⁷⁴ B. D. HOFFMAN, C. GRASHOFF et M. A. SCHWARTZ : Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*, 475(7356):316–323, 2011. [47](#)
- ⁷⁵ A Wayne ORR, Brian P HELMKE, Brett R BLACKMAN et Martin A SCHWARTZ : Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental cell*, 10(1):11–20, 2006. [47](#)
- ⁷⁶ U. S. SCHWARZ et M. L. GARDEL : United we stand – integrating the actin cytoskeleton and cell–matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *Journal of Cell Science*, 125(13):3051–3060, 2012. [vi](#), [vii](#), [48](#), [52](#), [56](#)
- ⁷⁷ U. CAVALLARO et G. CHRISTOFORI : Cell adhesion and signalling by cadherins and ig-cams in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2):118–132, 2004. [48](#)
- ⁷⁸ C. C. DUFORT, M. J. PASZEK et V. M. WEAVER : Balancing forces : architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(5):308–319, 2011. [48](#)
- ⁷⁹ M. T. SANTINI, G. RAINALDI et P. L. INDOVINA : Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Critical reviews in oncology/hematology*, 36(2):75–87, 2000. [48](#)

- ⁸⁰ M. M. STEVENS et J. H. GEORGE : Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310(5751):1135–1138, 2005. [48](#), [50](#)
- ⁸¹ I. SCHOEN, B. L. PRUITT et V. VOGEL : The yin-yang of rigidity sensing : How forces and mechanical properties regulate the cellular response to materials. *Annual Review of Materials Research*, 43(1):589–618, 2013. [vi](#), [49](#), [76](#)
- ⁸² W. HE, P. COWIN et D. L. STOKES : Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 302(5642):109–113, 2003. [vi](#), [49](#)
- ⁸³ P. KANCHANAWONG, G. SHTENGEL, A. M. PASAPERA, E. B. RAMKO, M. W. DAVIDSON, H. F. HESS et C. M. WATERMAN : Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323):580–584, 2010. [vi](#), [49](#), [50](#), [54](#), [131](#)
- ⁸⁴ D. A. FLETCHER et R. D. MULLINS : Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, 2010. [48](#)
- ⁸⁵ R. ZAIDEL-BAR et B. GEIGER : The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science*, 123(9):1385–1388, 2010. [50](#), [55](#)
- ⁸⁶ M.-C. PORTÉ-DURRIEU, F. GUILLEMOT, S. PALLU, C. LABRUGÈRE, B. BROUILLAUD, R. BAREILLE, J. AMÉDÉE, N. BARTHE, M. DARD et C. BAQUEY : Cyclo-(dfkrg) peptide grafting onto ti-6al-4v : physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*, 25(19):4837–4846, 2004. [50](#)
- ⁸⁷ G. WEDER, O. GUILLAUME-GENTIL, N. MATTHEY, F. MONTAGNE, H. HEINZELMANN, J. VÖRÖS et M. LILEY : The quantification of single cell adhesion on functionalized surfaces for cell sheet engineering. *Biomaterials*, 31(25):6436–6443, 2010. [50](#)
- ⁸⁸ F. M. WATT et W. T. S. HUCK : Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8):467–473, 2013. [vii](#), [50](#), [56](#), [57](#)
- ⁸⁹ M. GHIBAUDO : *Influence des propriétés mécaniques du substrat sur la migration et l'adhésion cellulaire*. Thèse de doctorat, Thèse de doctorat, Université Paris Diderot (Paris 7), 2008. [50](#)
- ⁹⁰ A. J. ENGLER, S. SEN, H. L. SWEENEY et D. E. DISCHER : Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689, 2006. [50](#)
- ⁹¹ C. HAHN et M. A. SCHWARTZ : Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1):53–62, 2009. [50](#)

- ⁹² B. LADOUX et A. NICOLAS : Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics*, 75(11):116601, 2012. [51](#), [53](#), [57](#), [63](#)
- ⁹³ P. K. MATTILA et P. LAPPALAINEN : Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(6):446–454, 2008. [vi](#), [51](#)
- ⁹⁴ M. J. HUMPHRIES : Cell-substrate adhesion assays. *Current Protocols in Cell Biology*, 9.1(<http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb0901s00>), 2001. [53](#)
- ⁹⁵ W. L. CONNORS et J. HEINO : A duplexed microsphere-based cellular adhesion assay. *Analytical biochemistry*, 337(2):246–255, 2005. [53](#)
- ⁹⁶ J. V. FORRESTER et J. M. LACKIE : Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow. *Journal of cell science*, 70(1):93–110, 1984. [53](#)
- ⁹⁷ F.-C. SU, C.-C. WU et S. CHIEN : Review : roles of microenvironment and mechanical forces in cell and tissue remodeling. *J. Med. Biol. Eng*, 31(4):233–244, 2011. [53](#), [60](#)
- ⁹⁸ L. HU, X. ZHANG, P. MILLER, M. OZKAN, C. OZKAN et J. WANG : Cell adhesion measurement by laser-induced stress waves. *J. Appl. Phys.*, 100(8):084701, 2006. [53](#)
- ⁹⁹ O. ROSSIER, V. OCTEAU, J. B. SIBARITA, C. LEDUC, B. TESSIER, D. NAIR, V. GATTERDAM, O. DESTAING, C. ALBIGÈS-RIZO, R. TAMPÉ *et al.* : Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature cell biology*, 14(10):1057–1067, 2012. [vi](#), [54](#), [55](#)
- ¹⁰⁰ Y. SHEN, M. NAKAJIMA, S. KOJIMA, M. HOMMA, M. KOJIMA et T. FUKUDA : Single cell adhesion force measurement for cell viability identification using an afm cantilever-based micro putter. *Measurement Science and Technology*, 22(11):115802, 2011. [55](#)
- ¹⁰¹ R. M. HOCHMUTH : Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*, 33(1):15–22, 2000. [55](#)
- ¹⁰² O. THOUMINE, A. OTT, O. CARDOSO et J.-J. MEISTER : Microplates : a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39(1–2):47 – 62, 1999. [56](#)
- ¹⁰³ L. TRICHET, J. LE DIGABEL, R. J. HAWKINS, S. R. K. VEDULA, M. GUPTA, C. RIBRAULT, P. HERSEN, R. VOITURIEZ et B. LADOUX : Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18):6933–6938, 2012. [vii](#), [57](#)

- ¹⁰⁴ K. C. NEUMAN et A. NAGY : Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Meth*, 5(6):491–505, 2008. [57](#)
- ¹⁰⁵ D. CHOQUET, D. P. FELSENFELD et M. P. SHEETZ : Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin–cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1):39–48, 1997. [57](#)
- ¹⁰⁶ S. HU, J. CHEN, B. FABRY, Y. NUMAGUCHI, A. GOULDSTONE, D. E. INGBER, J. J. FREDBERG, J. P. BUTLER et N. WANG : Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(5):1082–1090, 2003. [57](#)
- ¹⁰⁷ Z. FAN, Y. SUN, D. CHEN, D. TAY, W. CHEN, C. X. DENG et J. FU : Acoustic tweezing cytometry for live-cell subcellular modulation of intracellular cytoskeleton contractility. *Sci. Rep.*, 3 : <http://dx.doi.org/10.1038/srep02176>, 2013. [vii](#), [58](#)
- ¹⁰⁸ G. TAS, J. J. LOOMIS, H. J. MARIS, A. A. BAILES et L. E. SEIBERLING : Picosecond ultrasonics study of the modification of interfacial bonding by ion implantation. *Appl. Phys. Lett.*, 72(18):2235–2237, 1998. [59](#), [75](#), [80](#)
- ¹⁰⁹ L. ROUAI, B. BONELLO, G. LOUIS, B. PERRIN et P. PERETTI : Elasticity of ultrathin copper-phthalocyanine langmuir–blodgett films by picosecond ultrasonics. *J. Appl. Phys.*, 85(12):8155–8159, 1999. [59](#), [75](#), [126](#)
- ¹¹⁰ B. BONELLO, G. LOUIS et P. BATTIONI : Acoustic investigations of the interface between a metal and an organic compound. *Review of Scientific Instruments*, 74(1):889–891, 2003. [59](#)
- ¹¹¹ G. A. ANTONELLI, B. PERRIN, B. C. DALY et D. G. CAHILL : Characterization of mechanical and thermal properties using ultrafast optical metrology. *MRS Bull.*, 31(8):607–613, 2006. [59](#)
- ¹¹² T. DEHOUX, O. B. WRIGHT et R. LI VOTI : Picosecond time scale imaging of mechanical contacts. *Ultrasonics*, 50(2):197–201, 2009. [59](#)
- ¹¹³ T. DEHOUX, O. B. WRIGHT et R. LI VOTI : Picosecond time scale imaging of mechanical contacts. *Physics Procedia*, 3(1):351–356, 2010. International Congress on Ultrasonics, Santiago de Chile, 2009. [59](#)
- ¹¹⁴ M. D. LOSEGO, M. E. GRADY, N. R. SOTTOS, D. G. CAHILL et P. V. BRAUN : Effects of chemical bonding on heat transport across interfaces. *Nat Mater*, 11(6):502–506, 2012. [59](#)

- ¹¹⁵ M. TOMODA, T. DEHOUX, Y. IWASAKI, O. MATSUDA, V. E. GUSEV et O. B. WRIGHT : Nanoscale mechanical contacts mapped by ultrashort time-scale electron transport. *Sci. Rep.*, 4 :<http://dx.doi.org/10.1038/srep04790>, 2014. [59](#)
- ¹¹⁶ P. ROY, Z. RAJFUR, P. POMORSKI et K. JACOBSON : Microscope-based techniques to study cell adhesion and migration. *Nat Cell Biol*, 4(4):91–96, 2002. [60](#)
- ¹¹⁷ A. GADALLA, T. DEHOUX et B. AUDOIN : Transverse mechanical properties of cell walls of single living plant cells probed by laser-generated acoustic waves. *Planta*, 239(5):1129–1137, 2014. [64](#), [87](#)
- ¹¹⁸ J. STRICKER, T. FALZONE et M. L. GARDEL : Mechanics of the f-actin cytoskeleton. *J. Biomech.*, 43(1):9–14, 2010. [64](#)
- ¹¹⁹ T. KOKUBO, H.-M. KIM et M. KAWASHITA : Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24(13):2161–2175, 2003. [64](#)
- ¹²⁰ K. J. WOOLLARD et F. GEISSMANN : Monocytes in atherosclerosis : subsets and functions. *Nature Reviews Cardiology*, 7(2):77–86, 2010. [64](#)
- ¹²¹ R. VAN FURTH, J. G. HIRSCH et M. E. FEDORKO : Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes, and macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 132(4):794–812, 1970. [65](#)
- ¹²² J. RULLO, H. BECKER, S. J. HYDUK, J. C. WONG, G. DIGBY, P. D. ARORA, A. P. CANO, J. HARTWIG, C. A. MCCULLOCH et M. I. CYBULSKY : Actin polymerization stabilizes $\alpha 4 \beta 1$ integrin anchors that mediate monocyte adhesion. *The Journal of cell biology*, 197(1):115–129, 2012. [viii](#), [65](#), [79](#), [80](#), [84](#)
- ¹²³ T. DEHOUX et B. AUDOIN : Non-invasive optoacoustic probing of the density and stiffness of single biological cells. *Journal of Applied Physics*, 112(12):124702, 2012. [65](#), [72](#), [81](#)
- ¹²⁴ T. DEHOUX, B. AUDOIN, O. ZOUANI et M.-C DURRIEU : Mechanical characterization of temperature-sensitive objects using picosecond ultrasonics. *Journal of Physics : Conference Series*, 278(1):012043, 2011. [66](#), [68](#)
- ¹²⁵ J. BEUTHAN, O. MINET, J. HELFMANN, M. HERRIG et G. MÜLLER : The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Physics in Medicine and Biology*, 41(3):369, 1996. [68](#)

- ¹²⁶ T. DEHOUX, O. B. WRIGHT, R. LI VOTI et V. E. GUSEV : Nanoscale mechanical contacts probed with ultrashort acoustic and thermal waves. *Phys. Rev. B*, 80(23):235409, 2009. [70](#), [81](#), [82](#)
- ¹²⁷ A. MERTINS : *Signal Analysis : Wavelets, Filter Banks, Time-Frequency Transforms and Applications*. John Wiley, Chichester, 1999. [71](#), [72](#)
- ¹²⁸ S. MALLAT : *A wavelet tour of signal processing*. Academic press, London, 1999. [71](#), [72](#)
- ¹²⁹ C. H. BAKER, D. A. JORDAN et P. M. NORRIS : Application of the wavelet transform to nanoscale thermal transport. *Phys. Rev. B*, 86:104306, 2012. [72](#)
- ¹³⁰ R. GANGADHARAN, C. R. L. MURTHY, S. GOPALAKRISHNAN et M. R. BHAT : Time reversal technique for health monitoring of metallic structure using lamb waves. *Ultrasonics*, 49(8): 696–705, 2009. [72](#)
- ¹³¹ T. REDDYHOFF, S. KASOLANG, R. S. DWYER-JOYCE et B. W. DRINKWATER : The phase shift of an ultrasonic pulse at an oil layer and determination of film thickness. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J : Journal of Engineering Tribology*, 219(6):387–400, 2005. [75](#)
- ¹³² BW DRINKWATER, RS DWYERJOYCE et P CAWLEY : A study of the interaction between ultrasound and a partially contacting solid-solid interface. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 452(1955): 2613–2628, 1996. [75](#)
- ¹³³ M. A. SCHWARTZ : Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12):doi = 10.1101/cshperspect.a005066, 2010. [76](#)
- ¹³⁴ F. SONG, G. L. HUANG et V. K. VARADAN : Study of wave propagation in nanowires with surface effects by using a high-order continuum theory. *Acta mechanica*, 209(1-2):129–139, 2010. [76](#)
- ¹³⁵ K. KENDALL et D. TABOR : Ultrasonic study of area of contact between stationary and sliding surfaces. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 323(1554):321–340, 1971. [76](#)
- ¹³⁶ H. G. TATTERSALL : The ultrasonic pulse-echo technique as applied to adhesion testing. *J. Phys. D*, 6:819–832, 1973. [76](#)
- ¹³⁷ A. PILARSKI : The coefficient of reflection of ultrasonic waves from an adhesive bond interface. *Archives of Acoustics*, 8(1):41, 1983. [76](#)

- ¹³⁸ Y. C. ANGEL et J. D. ACHENBACH : Reflection of ultrasonic waves by an array of microcracks. *In Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation*, pages 83–89. Springer, 1985. [76](#)
- ¹³⁹ D. P. BAZETT-JONES, R. LI, E. FUSSNER, R. NISMAN et H. DEGHANI : Elucidating chromatin and nuclear domain architecture with electron spectroscopic imaging. *Chromosome Research*, 16(3):397–412, 2008. [76](#), [80](#)
- ¹⁴⁰ D. ROYER et E. DIEULESAINT : *Ondes élastiques dans les solides*, volume 1. Masson, Paris, 1999. [76](#)
- ¹⁴¹ T. DEHOUX, M. PERTON, N. CHIGAREV, C. ROSSIGNOL, J. M. RAMPNOUX et B. AUDOIN : Effect of laser pulse duration in picosecond ultrasonics. *J. Appl. Phys.*, 100(6):064318, 2006. [78](#)
- ¹⁴² G. T. BURSTEIN, C. LIU et R. M. SOUTO : The effect of temperature on the nucleation of corrosion pits on titanium in ringer’s physiological solution. *Biomaterials*, 26(3):245–256, 2005. [78](#)
- ¹⁴³ P.-A. MANTE, H.-Y. CHEN, M.-H. LIN, Y.-C. WEN, S. GWO et C.-K. SUN : Selectively probing vibrations in a plasmonic supracrystal. *Applied Physics Letters*, 101(10):101903, 2012. [80](#)
- ¹⁴⁴ B. AUDOIN : *Evaluation ultrasonore de l’endommagement anisotrope d’un composite à matrice fragile*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, n° d’ordre 620, 1991. [82](#)
- ¹⁴⁵ M. ABI GHANEM, T. DEHOUX, O. F. ZOUANI, A. GADALLA, M.-C. DURRIEU et B. AUDOIN : Remote opto-acoustic probing of single-cell adhesion on metallic surfaces. *J. Biophotonics*, 7(6):453–459, 2014. [84](#), [88](#)
- ¹⁴⁶ T. HORIO et H. HOTANI : Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature*, 321:605–607, 1986. [87](#)
- ¹⁴⁷ C. MANN, L. YU, C.-M. LO et M. KIM : High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics Express*, 13(22):8693–8698, 2005. [87](#)
- ¹⁴⁸ D. J. STEPHENS et V. J. ALLAN : Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616):82–86, 2003. [87](#)

- 149 R. A. LEMONS et C. F. QUATE : Acoustic microscopy : biomedical applications. *Science*, 188(4191):905–911, 1975. [viii](#), [87](#), [93](#)
- 150 E. C. WEISS, R. M. LEMOR, G. PILARCZYK, P. ANASTASIADIS et P. V. ZININ : Imaging of focal contacts of chicken heart muscle cells by high-frequency acoustic microscopy. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(8):1320–1326, 2007. [87](#), [96](#)
- 151 B. AUDOIN, M. DUCOUSSO, T. DEHOUX, C. CHOLLET, O. ZOUANI, C. CHANSEAU et M.-C. DURRIEU : Picosecond acoustics at 30 ghz in the nucleus of an osteoblast cell. *Proc. SPIE 7899, Photons Plus Ultrasound : Imaging and Sensing*, 2011. [87](#), [107](#)
- 152 S. DILHAIRE, W. CLAEYS, J. M. RAMPNOUX et C. ROSSIGNOL : Optical heterodyne sampling device, 2008. US Patent App. 12/090,893. [88](#), [98](#)
- 153 A. ABBAS : *Développement d'un dispositif pompe-sonde hétérodyne : application à l'imagerie en acoustique picoseconde*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, n° d'ordre 4806, 2013. [ix](#), [88](#), [98](#), [99](#)
- 154 L. W. KESSLER, A. KORPEL et P. R. PALERMO : Simultaneous acoustic and optical microscopy of biological specimens. *Nature*, 239:111–112, 1972. [91](#), [92](#)
- 155 E. C. WEISS, P. ANASTASIADIS, G. PILARCZYK, R. M. LEMOR et P. V. ZININ : Mechanical properties of single cells by high-frequency time-resolved acoustic microscopy. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 54(11):2257–2271, 2007. [ix](#), [91](#), [95](#)
- 156 R. N. JOHNSTON, A. ATALAR, J. HEISERMAN, V. JIPSON et C. F. QUATE : Acoustic microscopy : resolution of subcellular detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7):3325–3329, 1979. [viii](#), [91](#), [92](#), [93](#)
- 157 B. HADIMIOGLU et J. S. FOSTER : Advances in superfluid helium acoustic microscopy. *Journal of Applied Physics*, 56(7):1976–1980, 1984. [91](#), [93](#)
- 158 E. M. STROHM, M. PASTERNAK, M. MERCADO, M. RUI, M. C. KOLIOS et G. J. CZARNOTA : A comparison of cellular ultrasonic properties during apoptosis and mitosis using acoustic microscopy. *Ultrasonics Symposium (IUS), IEEE*, pages 608–611, 2010. [91](#), [96](#)
- 159 S. Y. SOKOLOV : On the problem of the propagation of ultrasonic oscillations in various bodies. *Elek Nachr Tech*, 6:454–460, 1929. [92](#)
- 160 S. SOKOLOFF : Means for indicating flaws in materials, 1939. US Patent 2,164,125. [92](#)

- ¹⁶¹ T. KUNDU : *Ultrasonic nondestructive evaluation : engineering and biological material characterization*. CRC press, 2004. [93](#)
- ¹⁶² P. J. SHULL : *nondestructive evaluation : theory, techniques, and applications*. Marcel Dekker, New York, 2002. [93](#)
- ¹⁶³ C. HELLIER : *Handbook of nondestructive evaluation*. McGraw-Hill, 2001. [93](#)
- ¹⁶⁴ J. L. ROSE : *Ultrasonic waves in solid media*. Cambridge University Press, 2004. [93](#)
- ¹⁶⁵ J. LITNIEWSKI et J. BEREITER-HAHN : Measurements of cells in culture by scanning acoustic microscopy. *Journal of microscopy*, 158(1):95–107, 1990. [94](#)
- ¹⁶⁶ H. KANNGIESSER et M. ANLIKER : Ultrasound microscopy of biological structures with weak reflecting properties. *In Acoustical imaging*, pages 517–522. Springer, 1992. [94](#)
- ¹⁶⁷ T. KUNDU, J. BEREITER-HAHN et I. KARL : Cell property determination from the acoustic microscope generated voltage versus frequency curves. *Biophysical Journal*, 78(5):2270 – 2279, 2000. [94](#), [95](#)
- ¹⁶⁸ T. KUNDU, J. BEREITER-HAHN et K. HILLMANN : Measuring elastic properties of cells by evaluation of scanning acoustic microscopy $\langle v \rangle$ ($\langle z \rangle$) values using simplex algorithm. *Biophysical journal*, 59(6):1194–1207, 1991. [ix](#), [94](#), [95](#)
- ¹⁶⁹ G. J. CZARNOTA et M. C. KOLIOS : Ultrasound detection of cell death. *Imaging in Medicine*, 2(1):17–28, 2010. [94](#)
- ¹⁷⁰ H. LÜERS, K. HILLMANN, J. LITNIEWSKI et J. BEREITER-HAHN : Acoustic microscopy of cultured cells. *Cell biophysics*, 18(3):279–293, 1991. [ix](#), [94](#), [95](#)
- ¹⁷¹ J. A. HILDEBRAND et D. RUGAR : Measurement of cellular elastic properties by acoustic microscopy. *Journal of microscopy*, 134(3):245–260, 1984. [94](#)
- ¹⁷² A. LINDER, S. WINKELHAUS et M. HAUSER : Acoustic imaging of the mitotic spindle in dividing xth2-cells. *Acoustical Imaging*, 19:523–528, 1992. [96](#)
- ¹⁷³ E. M. STROHM, G. J. CZARNOTA et M. C. KOLIOS : Quantitative measurements of apoptotic cell properties using acoustic microscopy. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 57(10):2293–2304, 2010. [96](#)
- ¹⁷⁴ P. VESELÝ, H. LÜERS, M. RIEHLE et J. BEREITER-HAHN : Subtraction scanning acoustic microscopy reveals motility domains in cells in vitro. *Cell motility and the cytoskeleton*, 29(3):231–240, 1994. [96](#)

- ¹⁷⁵ J. ZOLLER, K. BRÄNDLE et J. BEREITER-HAHN : Cellular motility in vitro as revealed by scanning acoustic microscopy depends on cell-cell contacts. *Cell and tissue research*, 290(1):43–50, 1997. [96](#)
- ¹⁷⁶ B. R. TITTMANN, C. MIYASAKA, A. M. MASTRO et R. R. MERCER : Study of cellular adhesion with scanning acoustic microscopy. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 54(8):1502–1513, 2007. [96](#)
- ¹⁷⁷ J. A. HILDEBRAND : Observation of cell-substrate attachment with the acoustic microscope. *IEEE transactions on sonics and ultrasonics*, 32(2):332–340, 1985. [96](#)
- ¹⁷⁸ C. MIYASAKA, B. R. TITTMANN, R. R. MERCER et A. M. MASTRO : Osteoblast adhesion of breast cancer cells with scanned image microscopy. *Health Monitoring and Smart Nondestructive Evaluation of Structural and Biological Systems III*, 5394:273–279, 2004. [96](#)
- ¹⁷⁹ A. ABBAS, Y. GUILLET, J.-M. RAMPNOUX, P. RIGAIL, E. MOTTAY, B. AUDOIN et S. DILHAIRE : Picosecond time resolved opto-acoustic imaging with 48 mhz frequency resolution. *Opt. Express*, 22(7):7831–7843, 2014. [98](#), [99](#)
- ¹⁸⁰ S. DILHAIRE, G. PERNOT, G. CALBRIS, J.-M. RAMPNOUX et S. GRAUBY : Heterodyne picosecond thermoreflectance applied to nanoscale thermal metrology. *Journal of Applied Physics*, 110(11):114314, 2011. [98](#)
- ¹⁸¹ A. BARTELS, R. CERNA, C. KISTNER, A. THOMA, F. HUDERT, C. JANKE et T. DEKORSY : Ultrafast time-domain spectroscopy based on high-speed asynchronous optical sampling. *Review of Scientific Instruments*, 78(3):035107, 2007. [98](#)
- ¹⁸² H. M. M. MICHEL : *Imagerie pompe-sonde femtoseconde : Application à l'étude thermique de nanomatériaux pour la microélectronique*. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2008. [99](#)
- ¹⁸³ T. L. BONFIELD et A. I. CAPLAN : Adult mesenchymal stem cells : an innovative therapeutic for lung diseases. *Discov. Med.*, 9(47):337–345, 2010. [116](#)
- ¹⁸⁴ T. BOURBIÉ, O. COUSSY et B. ZINSZNER : *Acoustique des milieux poreux*. Editions Technip, Paris, 1986. [127](#)
- ¹⁸⁵ L. LU, S. J. OSWALD, H. NGU et F. C.-P. YIN : Mechanical properties of actin stress fibers in living cells. *Biophysical journal*, 95(12):6060–6071, 2008. [131](#)

- ¹⁸⁶ C. ROSSIGNOL, J.-M. RAMPNOUX, M. PERTON, B. AUDOIN et S. DILHAIRE : Generation and detection of shear acoustic waves in metal submicrometric films with ultrashort laser pulses. *Phys. Rev. Lett.*, 94(16):166106, 2005. [144](#)
- ¹⁸⁷ T. VALIER-BRASIER, T. DEHOUX et B. AUDOIN : Scaled behavior of interface waves at an imperfect solid-solid interface. *Journal of Applied Physics*, 112(2):024904, 2012. [144](#)