HAL
open science

Etude de la biomécanique cellulaire à l'aide de MEMS piézoélectriques organiques

Pierre-Henri Ducrot

To cite this version:

Pierre-Henri Ducrot. Etude de la biomécanique cellulaire à l'aide de MEMS piézoélectriques organiques. Autre. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0671 . tel-01654591

HAL Id: tel-01654591

https://theses.hal.science/tel-01654591v1

Submitted on 4 Dec 2017

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 à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

par **Pierre-Henri DUCROT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : ÉLECTRONIQUE

****

ÉTUDE DE LA BIOMÉCANIQUE CELLULAIRE À L'AIDE DE MEMS PIÉZOÉLECTRIQUES ORGANIQUES

****

Soutenue le 27 septembre 2017

Devant la commission d'examen composée de :

M. Olivier Français	Professeur à l'ESIEE Paris	Rapporteur
M. Alain Bosseboeuf	Directeur de Recherche CNRS, C2N	Rapporteur
M. Vincent Senez	Directeur de Recherche CNRS, IEMN	Président du jury
M. Sébastien Sanaur	Maître de Conférence à l'École des Mines de Saint-Etienne	Examinateur
M. Cédric Ayela	Chargé de Recherche CNRS, IMS	Encadrant de thèse
Mme. Marie-Christine Durrieu	Directeur de Recherche, INSERM	Codirectrice de thèse
Mme. Isabelle Dufour	Professeur à l'Université de Bordeaux	Directrice de thèse

À mes parents...

ÉTUDE DE LA BIOMÉCANIQUE CELLULAIRE À L'AIDE DE MEMS ORGANIQUES PIÉZOÉLECTRIQUES

RÉSUMÉ : Ces travaux de thèse sont le fruit d'un constat : le développement des matériaux organiques dans les MEMS ne cesse de croître. Cela est dû à leurs procédés de fabrication à moindre coût et à leurs propriétés qui diffèrent de celles des matériaux inorganiques. D'un point de vue biologique, les propriétés physiques et chimiques des matériaux organiques sont également plus proches des propriétés de l'environnement extra-cellulaire. Les MEMS sont des systèmes très polyvalents permettant de mesurer de nombreuses grandeurs physiques. Leur utilisation dans le domaine biologique n'est donc pas étonnante et il est intéressant de combiner les MEMS avec des matériaux organiques pour l'étude de cellules. L'objectif de ces travaux est de fabriquer et d'utiliser des résonateurs MEMS organiques piézoélectriques dans le but d'étudier la biomécanique et l'adhésion de cellules. En effet, la biomécanique des cellules est un domaine d'étude qui renseigne sur de nombreux processus opérés par les cellules, comme l'adhésion cellulaire, ainsi que sur leur bien être. Dans un premier temps, le procédé de fabrication des résonateurs a été établi et optimisé afin d'obtenir une efficacité d'actionnement piézoélectrique maximale. Dans un deuxième temps, un système d'actionnement et de mesure électrique a été réalisé, comportant une carte électronique ainsi qu'une enceinte étanche. L'influence de la température, de la densité et de la viscosité du milieu sur la résonance des MEMS a également été étudiée. Finalement, les résonateurs créés ont été utilisés dans le suivi en temps réel de l'adhésion de cellules souches mésenchymateuses. D'autres applications ont été réalisées avec les résonateurs piézoélectriques comme l'étude de la position d'une masse sur les résonateurs, la détermination de la rigidité d'un matériau ainsi que de la viscosité d'un liquide.

Mots clés : MEMS Piézoélectrique Organique, Microlevier, Transducteur, Biomécanique Cellulaire

---

STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF CELLS THANKS TO ORGANIC PIEZOELECTRIC RESONATORS

ABSTRACT : This PhD thesis is the result of an assessment : the use of organic materials in MEMS is in a constant increase. Organic materials are attractive because of their low-cost fabrication process and their properties that are different from the inorganic ones. From a biological point of view, their physical and chemical properties are closer to the properties of extracellular environment. MEMS are very versatile systems that are able to measure a lot of physical quantities. Therefore, it is not surprising to use them in biology, and combining MEMS with organic materials is really promising to study biological cells behavior. The objective of this work is to fabricate and use piezoelectric organic MEMS resonators to study cell biomechanics and adhesion. In fact, the study of cell biomechanics gives information on a lot of cellular processes, like the cellular adhesion, as well as on their well-being. Firstly, the resonators fabrication process has been developed and optimized in order to maximize the piezoelectric actuation. Secondly, an electronic actuation and measurement system has been realized, including an electronic card and a watertight enclosure. The influence of the temperature, mass density and viscosity of the environment on the dynamic response of the resonators has also been evaluated. Finally, real time measurements of the adhesion of mesenchymal stem cells have been carried out using the resonators. The resonators have also been used to study the influence of the position of a mass on the resonators, to determine the rigidity of a deposited material as well as the viscosity of liquid media.

Key words : Organic Piezoelectric MEMS, Microcantilever, Transducer, Cellular Biomechanics

---

Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système
Université de Bordeaux et CNRS, UMR 5218, F-33400 Talence, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Isabelle Dufour qui m'a accueilli très chaleureusement au sein de l'IMS et qui a bien voulu être ma directrice de thèse. C'est une personne qui prend toujours le temps de bien expliquer les choses et de très pertinente lorsqu'il s'agit de questions scientifiques. Même si je n'ai pas fait beaucoup de théorie pendant ma thèse, le peu que j'ai fait m'a toujours été très clairement expliqué. Au-delà de ses compétences scientifiques, Isabelle est quelqu'un qui a le cœur sur la main, très souvent souriante et de bonne humeur. Même si elle pense le contraire, je pense qu'il faut qu'elle reste toujours aussi "cool" car les relations humaines et la bonne humeur dans le travail reste pour moi l'essentiel. Et je n'oublierai pas sa magnifique tarte tatin que je n'ai que trop peu eu le plaisir de manger.

Je tiens également à remercier Cédric Ayela, mon mentor. Cédric a encadré ma thèse de près et a toujours été présent. C'est quelqu'un de très investi dans le travail de ses étudiants, ce qui est fort appréciable. Il est toujours de très bon conseil lorsqu'il s'agit de nouvelles expériences à mener et de pistes intéressantes à explorer. Il est toujours prêt à plaisanter lors des poses café et à balancer une petite pique sarcastique qui, mine de rien, peut vous rebooster sur le coup. C'est quelqu'un de très appréciable dans le travail et je suis content de l'avoir eu comme encadrant.

Je voudrais remercier Marie-Christine Durrieu qui a été ma co-directrice durant cette aventure. J'ai surtout travaillé avec elle dans la dernière partie de ma thèse mais cela ne m'a pas empêché de remarquer et d'apprécier ses qualités humaines et professionnelles. Elle a su nous apporter sa vision de la biologie et chercher à comprendre les difficultés du côté de l'électronique afin de pouvoir concilier au mieux les deux domaines. Je n'oublierai pas sa bonne humeur ainsi que sa pendaison de crémaillère.

Parmi les personnes qui m'ont encadré, je finirai pas remercier Laurent Plawinski. Laurent est la personne qui m'a initié à la culture cellulaire alors que je n'y connaissais rien. Il a pris le temps de m'expliquer et de me montrer comment prendre soin des cellules. Malgré son emploi du temps très chargé, il a toujours fait au mieux pour m'assister lorsque j'avais besoin de lui. Toujours le mot pour rire, je le remercie et tiens à le féliciter de réussir à travailler entouré essentiellement de femmes.

Je souhaiterais également remercier Fabrice Mathieu qui est le concepteur de la carte électronique utilisée pour faire les mesures. J'ai pu le côtoyer un peu plus lors d'une conférence à Taïwan et on y a passé de bons moments.

Mes remerciements vont aussi à Stephen Heinrich avec qui j'ai travaillé pour essayer de lui fournir des données qui puissent étayer sa théorie et ses simulations sur l'influence des propriétés et de la position d'une particule adsorbée. Je tiens à souligner sa précision et son organisation du travail qui permettent une compréhension très rapide.

Je tiens ensuite à remercier le groupe organique de l'IMS avec qui j'ai passé ces trois années. Je ne citerai pas les noms car il y en a beaucoup et je ne voudrais pas en oublier, mais je suis sûr qu'il se reconnaitront. Je remercie tous les permanents pour leurs conseils et leur aide, notamment lorsqu'il s'agissait d'utiliser ou de réparer de l'équipement essentiel pour mener à bien ces travaux. Je remercie également tous les post-docs, tous les thésards et tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé. Grâce à eux, il a régné au labo une très bonne ambiance composée de plaisanteries et de discussions plus sérieuses, sans parler des soirées en dehors du labo qui ont pu être mémorables.

Mes prochains remerciements vont à ce que j'aime appeler la team Marie du CBMN. Pour la partie biologie, j'ai travaillé avec une équipe formidable en y prenant beaucoup de plaisirs. Je les remercie pour leur aide, plus particulièrement Marion Petitet qui m'a beaucoup aidé lorsque Laurent n'était

pas disponible. Au-delà du travail, j'ai passé de bons moments au CBMN, notamment lors des jours de gâteaux, même si le planning n'a pas toujours été très respecté. Et de très bons moments également en dehors du travail.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler sur d'autres projets ou que j'ai pu côtoyer lors de conférences ou de séminaires.

Je voudrais remercier Olivier Français qui a été mon professeur à l'ENS. J'ai effectué un stage avec lui durant mes études et c'est quelqu'un que j'apprécie beaucoup. Sans lui, je n'aurais peut-être pas fait ma thèse à l'IMS car c'est lui qui m'a mis en relation avec Isabelle après avoir su que je voulais revenir sur Bordeaux.

Des remerciements également pour les membres du jury qui ont bien voulu accepter d'examiner mes travaux et d'être présents lors de la défense.

Enfin, mes pensées vont à ma famille et à mes amis qui sont présents dans ma vie et qui sont pour moi, au-delà du travail et de tout le reste, ce qu'il y a de plus important dans la vie.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction **1**

I De la Biomécanique Cellulaire aux MEMS **3**
I.1 Généralités sur la biomécanique cellulaire 4
I.1.1 Intérêt de l'étude des cellules 4
I.1.2 La biomécanique cellulaire 5
I.1.3 Modèles mécaniques 8
I.2 Techniques de mesures de la biomécanique cellulaire 11
I.2.1 Microscopie à Force Atomique 12
I.2.2 Piège optique 19
I.2.3 Pinces magnétiques 23
I.2.4 Aspiration par micropipette 26
I.2.5 D'autres techniques 30
I.2.6 Conclusions 38
I.3 Utilisation des MEMS 39
I.3.1 Généralités sur les MEMS 39
I.3.2 Les MEMS pour l'étude des cellules 42
I.3.3 Vers les MEMS organiques 47
I.4 Conclusions 52
Références 54

II Procédé de Fabrication et son Optimisation **63**
II.1 Structure des résonateurs MEMS 63
II.1.1 Type d'actionnement 63
II.1.2 Piézoélectricité 64
II.1.3 Choix des matériaux 66
II.1.4 Structure des résonateurs 68
II.2 Procédé de fabrication 68
II.2.1 Enjeux de la fabrication des MEMS organiques 68
II.2.2 Xurographie : une technique alternative 69
II.2.3 Étapes de fabrication 71
II.2.4 Polarisation 73
II.3 Optimisation du procédé de fabrication 74
II.3.1 Détermination du coefficient $\mathbf{d_{31}}$ 76
II.3.2 Influence du champ de polarisation 78
II.3.3 Influence de la durée de polarisation 79
II.3.4 Influence de la durée de recuit 81
II.4 Autres paramètres d'influence 84
II.4.1 Épaisseur du PVDF-TrFE 84

II.4.2 PVDF-TrFE-CTFE . . . 85
II.5 Conclusions . . . 87
Références . . . 88

III Système de Mesure **89**
III.1 Technique de mesure de la résonance . . . 90
III.1.1 Type de détection . . . 90
III.1.2 Mesure de la résonance piézoélectrique . . . 90
III.2 Système de mesure . . . 95
III.2.1 Principe de la carte électronique . . . 95
III.2.2 Enceinte de mesure étanche . . . 100
III.2.3 Détermination de la fréquence de résonance . . . 102
III.3 Paramètres d'influence . . . 103
III.3.1 Viscosité et densité du milieu environnant . . . 104
III.3.2 Température . . . 107
III.3.3 Bruit de mesure . . . 111
III.4 Conclusions . . . 112
Références . . . 113

IV Applications **115**
IV.1 Mesure du module d'Young d'un matériau . . . 115
IV.2 Mesure d'une masse en fonction de sa position . . . 117
IV.3 Mesure de la viscosité d'un liquide . . . 123
IV.4 Étude de l'adhésion cellulaire . . . 126
IV.5 Conclusions . . . 132
Références . . . 134

Conclusions **135**

Perspectives **136**

Liste des publications **137**

Glossaire **138**

A Évaporation par faisceau d'électrons **141**

B Vibromètre laser **143**

Introduction

La biologie est un domaine d'étude qui ne date pas d'hier. En effet, déjà à la préhistoire, des fossiles de crânes trépanés ont été retrouvés possédant plusieurs trous circulaires. Si on ignore les raisons et la réussite ou non de ces interventions chirurgicales, cela n'en reste pas moins une preuve que les hommes préhistoriques s'intéressaient déjà à la biologie et à la médecine (il est également probable qu'ils savaient déjà utiliser certaines plantes pour se soigner de certains maux).

Au cours de l'histoire, le domaine médical connaît des avancés importantes, allant du savoir égyptien sur la moelle épinière et sur les trois enveloppes qui enveloppent le cerveau jusqu'à la Renaissance et l'invention du microscope par Hans et Zacharias Janssen, en passant par la grande époque grecque avec Hippocrate, le fondateur de la médecine et son fameux serment, ou encore Galien qui a écrit un traité d'anatomie très important de l'antiquité et dont Descarte s'inspirera plus tard pour écrire son discours de la méthode (de nombreuses avancées ont toutefois connu de longues périodes de stagnation à cause de la pression du clergé et des dogmes religieux de manière générale).

En occident, c'est vraiment à partir de la Renaissance que la biologie et la médecine se développent, avec notamment l'invention du microscope qui permet de visualiser ce qui était alors invisible à l'œil. C'est le cas des cellules, l'unité de base du vivant. C'est donc à partir de cette époque que se développe la théorie cellulaire qui ne sera définitivement admise qu'au moment de l'invention du microscope électronique. Finalement, la génétique est le dernier domaine en date qui a vu le jour à la fin du XIXe siècle avec le moine Gregor Mendel qui met en évidence les trois lois de l'hérédité. Puis, dans les années 30, Morgan situe le support de l'hérédité dans les chromosomes cellulaires, et dans les années 50, la structure de l'ADN est découverte par Watson et Crick.

La biologie est un domaine scientifique très vaste car une entité complexe, comme le corps humain, est composée d'une multitude d'éléments, comme les organes, les os, la peau, les muscles, etc., et tous ces éléments fonctionnent de concert afin d'assurer la vie de l'entité entière. Tous ces éléments ont cependant une chose en commun : ils sont tous composés de cellules. C'est pourquoi la cellule est appelée la brique de base de tout être vivant. Aucune entité biologique qui ne comporte pas au moins une cellule (être unicellulaire comme les bactéries) ne peut être considérée comme vivante. La cellule est donc à la base du fonctionnement de tout être vivant mais il existe un très grand nombre de cellules différentes : les cellules qui constituent les os sont différentes de celles des muscles ou des neurones. Chaque type de cellule a une fonction bien particulière et c'est pourquoi la biologie cellulaire est un vaste domaine d'étude. Cependant, même si les cellules sont différentes en taille, en forme, en besoins et en fonctionnalités, elles sont fondamentalement similaires d'un point de vue interne.

Une cellule est une véritable usine miniature très complexe à l'intérieur de laquelle de nombreux éléments s'activent pour permettre à la cellule d'assurer sa fonction. Une cellule peut se déplacer, adhérer sur des surfaces, s'étaler, créer des protéines et les échanger avec le milieu extra-cellulaire, communiquer avec d'autres cellules ou encore se diviser pour se multiplier. Lors de ces processus, les propriétés mécaniques de la cellule ainsi que les forces qu'elle génère jouent un rôle important. Il est établit qu'une cellule est sensible à la rigidité du milieu extra-cellulaire ains qu'aux forces qui lui sont appliquées, permettant par exemple de savoir en quel type de cellule elle doit se différencier, dans le cas des cellules souches. Les propriétés mécaniques d'une cellule sont aussi un marqueur de son bon ou mauvais état. En effet, on sait que des cellules cancéreuses sont moins rigides que des cellules saines, par exemple. C'est pourquoi l'étude de la biomécanique cellulaire est devenu un domaine à part entière, tant dans son utilisation pour le diagnostic que pour la compréhension et le traitement de certaines maladies.

Afin d'étudier les propriétés mécaniques de cellules, de nombreuses techniques ont été adaptées

dans ce but (comme l'AFM ou les pièges optiques) ou créées (comme les micropiliers en PDMS ou la microfluidique). Chacune des techniques ne permet d'étudier que certains aspects de la biomécanique cellulaire, présentant chacune ses avantages et ses défauts. Parmi les techniques utilisées pour l'étude de la biomécanique cellulaire, les MEMS (MicroElectroMechanical Systems) se développent de plus en plus.

Les MEMS sont des systèmes de dimensions très faibles (de la centaine de micromètres, ou même de la centaine de nanomètres avec les NEMS) utilisés comme capteur ou actionneur. Ils sont omniprésents dans les systèmes actuels, comme les smartphones ou les voitures. Leur succès est dû, d'une part, à leurs faibles dimensions, ce qui permet de les intégrés dans des systèmes très petits, et d'autre part, au fait qu'ils sont sensibles à de faibles variations de grandeurs physiques comme la masse, la densité, la viscosité, l'accélération, etc. Leur utilisation pour l'étude de la biomécanique cellulaire semble donc cohérente.

Les MEMS se sont rapidement développés grâce aux technologies de la microélectronique basée sur le silicium déjà présentes et dont les MEMS ont recours. Cependant, de nouveaux matériaux sont de plus en plus utilisés de nos jours : les matériaux organiques. En effet, ces matériaux sont très peu coûteux en terme de production et ils possèdent des propriétés physiques et chimiques qui peuvent être facilement modifiables. Ils sont également intéressant pour les applications biologiques car nombreux d'entre eux sont biocompatibles et, d'un point de vue mécanique, leurs propriétés se rapprochent plus de l'environnement extra-cellulaire que celles des matériaux inorganiques. Si les matériaux organiques ne sont pas (à mon avis) un moyen pour remplacer les systèmes à base de silicium, ils peuvent cependant être développés en parallèle dans des applications où leurs propriétés sont nécessaires (comme les écrans souples par exemple).

Dans ces travaux, des résonateur MEMS organiques piézoélectriques ont été développés dans le but d'étudier la biomécanique de cellules et de suivre leur adhésion. Dans le premier chapitre, une brève description de la composition d'une cellule est faite ainsi que la présentation des différentes techniques existantes, MEMS et autres, dans le but d'étudier la biomécanique de cellules. Le deuxième chapitre présente le procédé de fabrication des résonateurs MEMS organiques piézoélectriques ainsi que son optimisation vis à vis du matériau piézoélectrique. Le troisième chapitre décrit le système électrique qui permet d'actionner les résonateurs et de mesurer leur spectre de résonance en milieu liquide. L'influence de paramètres comme la température, la densité et la viscosité du liquide sur la résonance des résonateurs y est également étudiée. Finalement, le quatrième et dernier chapitre traite de l'application des résonateurs pour mesurer une masse en fonction de sa position, la rigidité d'un matériau, la viscosité d'un liquide et une étude de l'adhésion de cellules y est également menée.

CHAPITRE I

DE LA BIOMÉCANIQUE CELLULAIRE AUX MEMS

La biologie, au sens large du terme, est un domaine scientifique en constante évolution. La biologie fascine l'homme car c'est l'étude du vivant qui nous entoure : plantes, animaux, et surtout nous-mêmes. On ne peut s'empêcher de penser aux reportages animaliers que tout un chacun a déjà regardé, expliquant comment chasse tel animal, ou comment se reproduit telle espèce. L'étude de la faune et de la flore nous enseigne beaucoup de choses, comme l'aérodynamisme des faucons qui plongent sur leurs proies, ou encore des substances chimiques que sécrètent certains insectes ou plantes afin de se protéger. Il est toujours étonnant de voir que bien des technologies d'aujourd'hui sont inspirées de ce qui se fait dans la nature, comme l'effet photovoltaïque inspiré de la photosynthèse des plantes, et que de nombreux procédés ne sont pas facilement reproductibles par l'homme, comme la fabrication du miel par exemple.

Bien que le terme biologie se réfère à l'étude du vivant de manière générale, on pense très souvent à tout ce qui a trait à la médecine, les maladies, les virus, les bactéries, et comment parvenir à utiliser l'étude du vivant pour nous prévenir des méfaits de la nature. La pensée peut se résumer à : mieux comprendre la nature pour mieux s'en protéger. Cela a donné naissance à, par exemple, l'invention du principe du vaccin par Edward Jenner en 1796. En effet, il s'est aperçu que des enfants vivant à proximité de vaches atteintes de la vaccine, une maladie proche de la variole, ne souffraient pas de la maladie. Il a donc eu l'idée de préparer une solution faite à partir de prélèvements effectués sur des vaches malades et d'injecter cette solution chez une personne. Le principe de la vaccination était donc né, et c'est Louis Pasteur qui mit au point les bases de la vaccination que nous connaissons, en s'appuyant sur le travail de Jenner, avec le vaccin contre la rage en 1885.

Un moyen de combattre les méfaits qui peuvent survenir est de comprendre comment fonctionne notre corps à la plus petite échelle biologique : la cellule. La cellule est la brique de base qui constitue toute forme de vie (telle que nous la connaissons). Du simple organisme unicellulaire, comme une bactérie, à des êtres multicellulaires, tel l'homme qui en compte environ 10^{14} (ceci n'est qu'une estimation), la cellule est ce qui permet d'assurer des fonctions nécessaires au développement de ces entités. Un domaine particulier se concentrant sur l'étude de la biomécanique des cellules ne cesse de se développer réellement depuis une quarantaine d'années. L'étude de la biomécanique cellulaire consiste

à mettre en rapport le comportement mécanique des cellules avec les effets biologiques qui y sont associés. Dans ce chapitre, les objectifs sont de mettre en avant l'intérêt de l'étude de la biomécanique cellulaire et de présenter les différentes techniques qui existent déjà pour mener à bien cette étude. Enfin, le but est de montrer l'intérêt de l'utilisation des GlsMEMS pour cette étude, et notamment pourquoi il est intéressant de se tourner vers des matériaux organiques.

I.1 Généralités sur la biomécanique cellulaire

I.1.1 Intérêt de l'étude des cellules

Généralités

On parle très souvent de "la cellule" sans préciser de quelle cellule il s'agit. Cependant, toutes les cellules ne sont pas identiques et il existe un nombre incroyable de différentes cellules, estimé à 100 millions sur notre planète. Les cellules diffèrent dans un premier temps par la taille. Une bactérie unicellulaire peut mesurer quelques micromètres alors qu'un œuf de grenouille, qui est aussi une cellule unique, peut mesurer jusqu'à un millimètre. Deuxièmement, toutes les cellules ne sont pas de forme identique. En effet, la forme des cellules peut varier drastiquement d'une cellule à une autre, comme l'illustre la figure I.1. Une cellule neuronale est composée d'une partie centrale et d'un réseau de filaments qui s'étend comme les racines d'un arbre, lui permettant d'émettre et de capter les signaux électriques. En revanche, la *Chlamydomanas reinhardtii*, qui est une cellule d'algue verte, se compose d'une partie centrale plutôt ronde et de deux flagelles qui lui permettent de se déplacer en milieu liquide. Enfin, les besoins en éléments chimiques et biologiques des cellules diffèrent grandement d'une cellule à une autre : par exemple, l'oxygène, vital pour certaines cellules, peut être mortel pour d'autres.

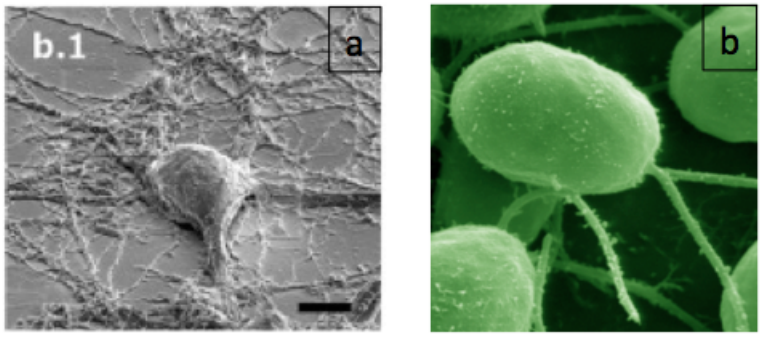

FIGURE I.1 – *Image a) d'un neurone* [1] *et b) de Chlamydomanas reinhardtii, une cellule d'algue verte (image issue de National Science Foundation).*

Bien que toutes les cellules soient très différentes en apparence et en fonction, il existe une base commune à toutes les cellules qui permet de les définir comme des organismes vivants. Elle sont différentes vues de l'extérieur mais fondamentalement similaires vues de l'intérieur. L'information génétique de toutes les cellules est portée par les molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui sont elles-mêmes composées de quatre monomères appelés nucléotides. L'ADN est ensuite transcrit en molécules d'acide ribonucléique (ARN) qui sont ensuite traduites en protéines. Cet écoulement de l'information de l'ADN aux protéines est au cœur de la vie telle que nous la définissons.

Étude des cellules

Les cellules sont les briques de base de corps plus complexes. Leur étude est donc primordiale pour comprendre le comportement globale de ces corps, et notamment comment des maladies surgissent, se répandent et les moyens que nous pouvons mettre en œuvre afin de les diagnostiquer et les combattre.

On sait par exemple que certaines maladies sont codées dans les gènes : il se peut qu'une anomalie génétique apparaisse et bloque la production d'une protéine ou au contraire produise trop de protéines. Il est donc possible de prévoir les risques que possède une personne en décodant son matériel génétique. Dans le cas de la maladie de Parkinson, il est reconnu que la mutation des gènes PINK1 et PARK2 est responsable dans la moitié des cas précoces de la maladie car le renouvellement des mitochondries est altéré. Cependant, pour l'autre moitié des cas, les gènes responsables ne sont pas identifiés.

Les gènes qui se trouvent dans le noyau des cellules peuvent être responsables de maladies. Cependant, d'autres propriétés de la cellule peuvent indiquer le bon ou le mauvais état de cette dernière. En effet, depuis ces dernières années, beaucoup de recherches ont montré qu'il existe un lien entre la biomécanique des cellules et certaines maladies humaines comme le cancer. Il a, par exemple, été déterminé que des cellules cancéreuses sont 70 % plus souples que des cellules saines [2]. De façon plus générale, le cytosquelette, qui donne sa forme et sa rigidité à la cellule (voir section I.1.2), est remodelé de façon dynamique lors de la migration, de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation des cellules. Le cytosquelette apporte également d'autres fonctions à la cellule comme le maintien de sa morphologie ainsi que le transport intracellulaire. La compréhension de la mécanique associée à tous ces processus est primordiale pour comprendre la relation qui existe entre la structure et la fonction d'une cellule.

Comprendre le rôle de la biomécanique dans le dysfonctionnement de cellules cancéreuses peut, dans un premier temps, aider au diagnostic de cette maladie. En effet, les tests qui permettent généralement de diagnostiquer un cancer reposent sur des examens morphologiques de cellules ou de tissus prélevés sur un patient. Cependant, ces tests peuvent être lourds car ils sont invasifs pour les patients [3] et ils ne sont pas toujours fiables [4]. Il faut alors recouper l'information avec d'autres tests, ce qui demande une grande quantité de matériels et du temps pour un résultat qui peut être erroné. De plus, certains tests ne sont utilisés que pour un certain type de cellules cancéreuses. Il faut donc d'autre méthodes plus efficaces afin d'augmenter l'exactitude du diagnostic.

Si les propriétés mécaniques des cellules jouent un rôle essentiel dans leur fonctionnement, on sait également que l'environnement des cellules a un impact sur leur comportement. En effet, les cellules sont très sensibles aux propriétés mécaniques du substrat sur lequel elles se trouvent et peuvent changer leur comportement en réaction à la rigidité de ce substrat [5]. De même, un chargement mécanique déforme et remodèle les cellules, ce qui influence leur bon fonctionnement. Dans le cas d'un étirement sévère d'un axone d'une cellule neuronale, la cellule peut mourir alors qu'un faible et lent étirement d'un axone aide la cellule neuronale à se développer [6]. La rigidité du substrat a une influence primordiale sur la différentiation de cellules souches [7]. En effet, en préparant des surfaces de culture avec différentes rigidités, le développement d'une cellule souche n'est pas le même et s'adapte au substrat pour devenir une cellule bien spécifique (figure I.2).

I.1.2 La biomécanique cellulaire

Dans cette section, les connaissances qui sont rapportées ont été extraites de la référence [8].

Le domaine de la biomécanique est l'étude de l'interaction entre des forces physiques et des systèmes vivants. C'est un domaine important car la biomécanique joue un rôle important dans la croissance, le développement, le remodelage de tissus et dans l'homéostasie (l'aptitude à maintenir le système interne en équilibre). De plus, la biomécanique a un rôle central dans la pathologie de certaines maladies et dans leur traitement. Par exemple, il est intéressant de se demander comment une artère "sait" quelle taille elle doit faire pour délivrer la bonne quantité de sang. Des études ont montré que la contrainte mécanique exercée par le sang qui transite sur les parois de l'artère est ressentie par les cellules endothéliales de la paroi interne. Elles envoient alors un signal aux cellules qui se trouvent

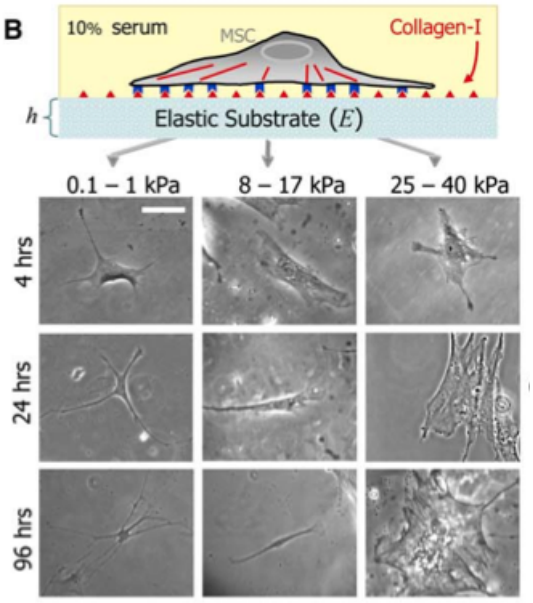

FIGURE I.2 – *Différentiation de cellules souches mésenchymateuses pour trois rigidités différentes du substrat et pour trois étapes de développement. La cellule sur le substrat ayant la rigidité la plus faible se développe en adoptant la structure d'un neurone. La cellule sur le substrat intermédiaire adopte une morphologie très allongée comme les myoblastes. Enfin, la cellule sur le substrat le plus dur adopte la même morphologie que des ostéoblastes* [7].

plus en profondeur dans l'artère afin d'élargir ou de réduire le diamètre de l'artère [9].

La biomécanique est un domaine assez récent dans le sens où cela ne fait qu'une quarantaine d'années qu'il a été reconnu comme un domaine à part entière, avec ses propres conférences et journaux. Cependant, l'étude de la biomécanique remonte à bien plus longtemps. On peut estimer que les débuts de la biomécanique ont réellement débuté à la fin du XVIe siècle avec William Harvey et son étude de la physiologie du système cardiovasculaire. Depuis, bien des scientifiques ont étudié la biomécanique pour comprendre ce domaine. De nos jours, les études dans ce domaine se font de plus en plus précises, utilisant des techniques de caractérisation toujours plus pointues et participant à la dynamique du domaine qui ne fléchit pas.

Dans cette section, nous allons nous concentrer sur la structure et la biomécanique de cellules eucaryotes. Il existe en fait deux grandes catégories de cellules : les procaryotes et les eucaryotes. Les procaryotes sont des cellules qui ne possèdent pas de noyaux, comme les bactéries. Les eucaryotes sont des cellules possédant un noyau et qui composent des organismes plus complexes, comme les mammifères.

Structure d'une cellule eucaryote

Afin de comprendre la biomécanique des cellules, il est important d'avoir une connaissance de la structure des cellules. Une cellule est composée de sous-systèmes spécialisés que l'on appelle organelles ou organites. Les organelles fonctionnent de concert entre elles afin d'assurer le bon fonctionnement de la cellule et pour qu'elle puisse réaliser sa mission. Une brève revue des organelles est proposée en figure I.3.

Il y a tout d'abord les membranes. Les membranes sont composées d'une bicouche lipidique et servent à enfermer la cellule, le noyau et les organelles individuelles. Elles protègent et compartimentent ainsi différentes entités biologiques, avec toutefois la possibilité de communiquer à travers des protéines

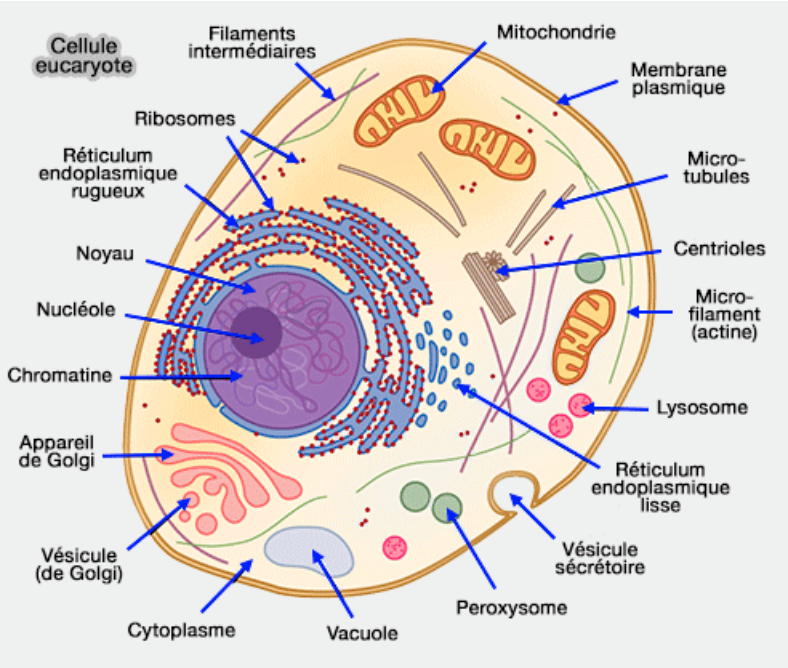

FIGURE I.3 – *Structure d'une cellule avec identification des organelles (source : http ://objectifconcoursiade.com).*

qui se trouvent dans la membrane.

On trouve ensuite le cytosquelette qui est composé de longues tiges moléculaires attachées les unes aux autres et à d'autres organelles. Le cytosquelette est l'élément qui donne sa forme à la cellule et qui lui permet de se déplacer, l'aide à s'accrocher à son substrat et aux autres cellules. Il est composé de microtubules, de filaments intermédiaires et de microfilaments.

Pour que toute cette machinerie fonctionne, il lui faut de l'énergie. Pour cela, les mitochondries sont les "usines" où est fabriquée l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate) à partir notamment du glucose. Les molécules d'ATP sont ensuite utilisées par d'autres organelles pour réaliser leurs fonctions.

Comme dans tout système complexe, il faut une entité qui dicte les tâches à accomplir : c'est le rôle du noyau. La quasi totalité du matériel génétique est contenu dans le noyau sous forme d'ADN. Le code contenu dans l'ADN est transcrit en ARN messager qui quitte le noyau pour être traduit en protéines par le réticulum endoplasmique.

Cependant, les protéines qui viennent d'être créées ne sont pas utilisables tout de suite. Pour y remédier, l'appareil de Goldi se charge de récupérer les protéines fraichement fabriquées et opère tout un tas de changements afin que les protéines soient biologiquement actives, notamment en les enfermant dans une membrane avant de les envoyer à différents endroits à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Il permet aussi d'écarter les protéines défaillantes.

Enfin, pour se débarrasser de toutes les substances indésirables, les lysosomes sont là pour décomposer les protéines défaillantes, les sous-produits et le matériel extracellulaire ingéré.

Il existe encore d'autres entités biologiques à l'intérieur d'une cellule qui ne seront pas décrites, l'idée étant d'avoir une vue d'ensemble basique d'une cellule eucaryote. On se rend tout de même compte que c'est une machinerie très complexe et très miniaturisée qui tient typiquement dans une entité qui fait entre 10 µm et 30 µm de diamètre.

Le cytosquelette

Comme il a été dit précédemment, le cytosquelette est l'élément qui donne sa forme à la cellule et lui permet d'assurer certaines fonctions. Afin de comprendre la biomécanique, il est essentiel de

comprendre de quoi est composé le cytosquelette et comment il fonctionne. En effet, le cytosquelette assure un grand nombre de fonctions : il établit et maintient la forme de la cellule, il permet le déplacement de la cellule, il assure une rigidité mécanique à la cellule, il permet le transport d'organelles à l'intérieur de la cellule et il joue un rôle majeur lors de la division des cellules.

Le cytosquelette est composé de trois types de filaments, assurant chacun des fonctions différentes : les microfilaments (ou les filaments d'actine), les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces trois types de filaments sont en interaction les uns avec les autres et déterminent le comportement mécanique de la cellule. Il est donc important de comprendre leur rôle.

Les microfilaments sont les plus petits ($\sim 8\,\mathrm{nm}$ de diamètre) des trois types. Les microfilaments existent sous deux formes : comme protéine globulaire (actine G) et comme protéine fibrillaire (actine F). L'actine G est un monomère qui se polymérise en actine F (qui sont les filaments d'actine). L'actine G s'attache à une molécule de calcium et à une molécule d'ATP pour former l'ATP-actine. L'actine F est formée par la polymérisation de l'actine G, ce qui à tendance à causer l'hydrolyse de son ATP en ADP (Adénosine DiPhosphate) pour former l'ADP-actine. L'ATP-actine favorise la polymérisation en comparaison avec l'ADP-actine. De plus, le filament créé par la polymérisation possède une polarité électrique positive d'un côté et négative de l'autre. La partie positive capte en majorité de l'ATP-actine, ce qui favorise la polymérisation de ce côté alors que la partie négative est beaucoup moins active, favorisant ainsi la transformation de l'ATP-actine en ADP-actine due à l'hydrolyse et donc la dépolymérisation. Si on se focalise sur un monomère central du filament, on a alors l'impression d'un tapis roulant où des monomères se détachent d'un côté et d'autres monomères s'attachent de l'autre, créant ainsi un moteur moléculaire qui permet à certaines cellules de se déplacer grâce à un lamellipode. Un lamellipode est une extension de la membrane faite d'actine F et qui sert à la cellule à explorer son environnement et à interagir avec lui. L'actine F est présente dans les cellules sous différentes formes. Dans toutes les cellules, elle est présente sous forme d'une fine couche proche de la membrane appelée la couche d'actinie corticale. Dans beaucoup de cellules, elle est présente sous forme de faisceaux fibreux appelés fibres de stress et sert à renforcer la couche d'actine corticale, aider le transport d'organelles et à la locomotion cellulaire. Enfin, l'actine est présente dans les cellules musculaires sous forme d'association avec la myosine et est responsable de la contraction musculaire.

Les filaments intermédiaires sont actuellement répertoriés sous six classes, comprenant chacune un grand nombre de filaments intermédiaires spécifiques au type de cellule. La biomécanique des filaments intermédiaires n'est pas aussi bien comprise que celle des microfilaments et des microtubules. Il est cependant reconnu que les filaments intermédiaires sont plus stables que les autres éléments du cytosquelette, apportant ainsi un réseau de soutien pour la cellule. Il est également reconnu qu'un dysfonctionnement des filaments intermédiaires est responsable de l'inaptitude de la cellule à résister à des forces mécaniques [10].

Le dernier élément qui compose le cytosquelette est les microtubules. Ce sont des structures cylindriques creuses formées de dimères de tubuline α et tubuline β. Les microtubules ont la capacité de s'agrandir ou de se rétrécir en ajoutant ou en enlevant des dimères aux extrémités. Ils possèdent une extrémité polarisée positivement et l'autre négativement. Ils jouent un rôle important pour les cils cellulaires et les flagelles en fournissant une rigidité à la structure et en participant à leurs mouvements. Les microtubules sont également les structures sur lesquelles la kynésine et la dynéine se déplacent, formant des moteurs moléculaires. Enfin, les microtubules sont essentiels à la division cellulaire : ils s'attachent aux chromosomes, les orientent puis poussent chaque moitié à part afin de former deux ensembles complets qui donneront deux cellules filles.

I.1.3 Modèles mécaniques

Il est important de développer des modèles mécaniques qui rendent compte des mesures expérimentales. Ces modèles permettent de mieux comprendre et d'interpréter les résultats obtenus, mais

également de pouvoir prédire la réponse d'une cellule à différents stimuli ainsi que de comparer les réponses de différentes cellules. Dans cette étude, trois modèles sont explorés, apportant chacun des informations différentes.

Modèle viscoélastique

Le premier modèle, appelé modèle de Maxwell, permet de considérer la mécanique globale de la cellule et ne tient pas compte de la contribution des différents éléments internes de la cellule. Dans le modèle de Maxwell, les composants ayant un comportement élastique sont représentés par un ressort linéaire de constante de raideur k_0 et les composants ayant un comportement visqueux par un amortisseur de coefficient d'amortissement η_0 (figure I.4). Ce modèle est très basique mais permet une première approche très simple à utiliser pour modéliser la biomécanique des cellules.

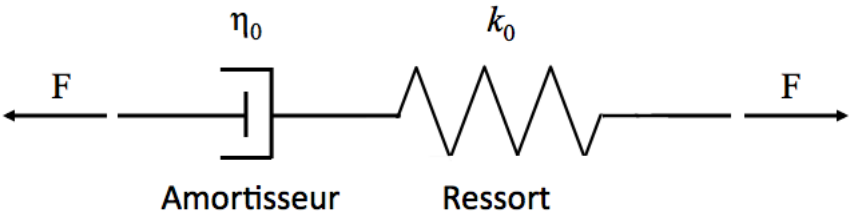

FIGURE I.4 – *Modèle viscoélastique équivalent connu sous le nom de modèle de Maxwell.*

Dans le but de se rapprocher plus fidèlement du comportement mécanique d'une cellule soumise à un échelon de force, ce modèle peut être amélioré en ajoutant des éléments. C'est ce qu'ont fait Bausch *et al.* [11] en ajoutant un ressort en parallèle du modèle de Maxwell ainsi qu'un amortisseur en série avec ce nouvel ensemble (figure I.5). À partir de ce modèle, il est possible d'exprimer le déplacement $x(t)$ par unité de force que subit la cellule lorsqu'elle est soumise à un échelon de force F_0 :

$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_1}\left(1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau}\right) + \frac{t}{\eta_0} \tag{I.1}$$

avec $\tau = \eta_0 \frac{k_0+k_1}{k_0 k_1}$. Bausch et ses co-auteurs ont comparé ce modèle avec des mesures effectuées en applicant une force à l'aide d'une particule manipulée par champ magnétique (figure I.6). Le modèle correspond bien aux mesures et est fidèle à la réponse mécanique d'une cellule soumise à un échelon de force.

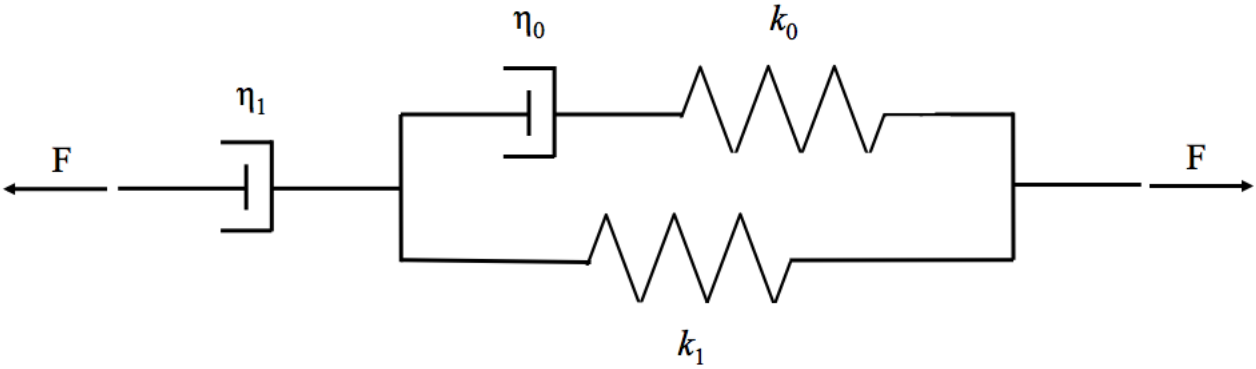

FIGURE I.5 – *Modèle viscoélastique équivalent de Bausch plus proche de la réponse d'une cellule qu'ils ont mesurée à l'aide d'une particule magnétique* [11]

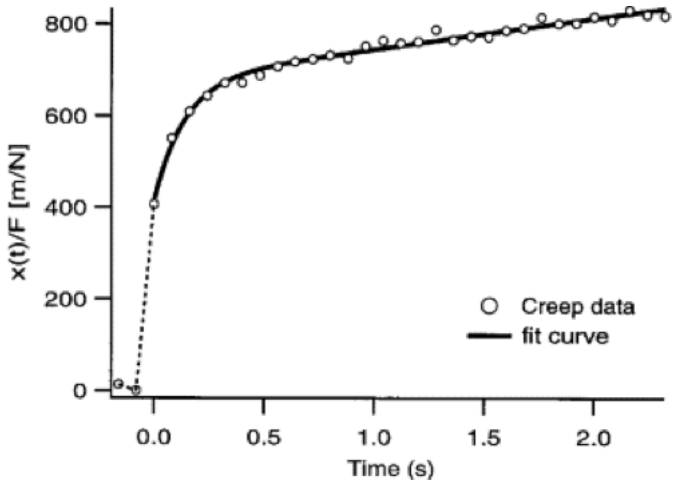

FIGURE I.6 – *Comparaison entre les mesures effectuées grâce à la manipulation d'une microparticule magnétique et le modèle de Bausch* [11].

Modèle de tenségrité du cytosquelette

Le premier modèle présenté précédemment propose un schéma mécanique équivalent pour décrire le comportement mécanique d'une cellule sans prendre en compte les différents éléments qui la constituent. Le modèle de la tenségrité permet de décrire la mécanique du cytosquelette. Le terme de tenségrité est un terme qui vient de la mécanique, et plus précisément de l'architecture. C'est une technique de construction qui permet d'assurer l'intégrité d'une structure en utilisant des éléments internes : certains d'entre eux sont sous pression alors que d'autres sont sous tension. Pour être plus précis, c'est l'interaction entre des éléments isolés sous pression et un ensemble continu d'éléments sous tension. La stabilité de la structure provient alors de la répartition et de l'équilibre des contraintes mécaniques dans la totalité de la structure. Concernant les cellules, ce modèle a été proposé par Ingber *et al.* [12] où les microfilaments jouent le rôle des éléments sous tension et les microtubules celui des éléments sous pression. L'idée vient du fait que les microfilaments peuvent générer une tension, les microtubules peuvent être sous pression et ces deux éléments sont en interconnexions.

L'implication de cette théorie est difficile à évaluer car la topologie des interconnexions des filaments à l'intérieur d'une cellule est très complexe. Cependant, il est possible d'avoir un aperçu des mécanismes de la tenségrité en utilisant un modèle simple comprenant 6 éléments sous pressions liés par 24 éléments sous tension (figure I.7). Les équations liées à ce modèle ne sont pas triviales et ne seront pas développées ici. Mais il est possible de trouver la démarche afin de résoudre le système dans [13]. Ce modèle permet de déterminer le module d'Young d'une cellule en supposant que les éléments sous tension agissent comme des ressorts linéaires et que les éléments sous pression sont parfaitement rigides.

Bien que ce modèle donne une première approximation du comportement mécanique du cytosquelette, il ne prend pas en compte un certain nombres d'éléments. Tout d'abord, sous une contrainte en pression très importante, les microfilaments doivent fléchir et ne sont donc plus parfaitement rigides. De plus, ce modèle ne prend pas en compte les filaments intermédiaires qui ont sûrement un rôle dans le comportement mécanique du cytosquelette puisqu'ils se déforment sous l'effet d'une contrainte de cisaillement fluidique [14]. De même, le rôle de la membrane n'est pas pris en compte par ce modèle. Ce modèle est donc valable sous certaines conditions, notamment pour de faibles chargements.

Modèle de mousse des microfilaments

Si le modèle de tenségrité permet de modéliser le comportement mécanique du cytosquelette, il en existe d'autres utilisant une autre approche. Le modèle de mousse des microfilaments considère que le

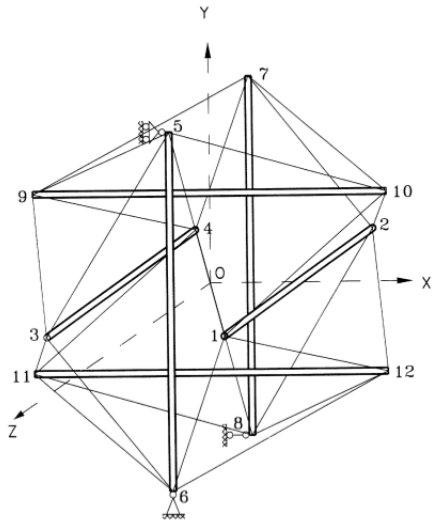

FIGURE I.7 – *Modèle de tenségrité simple d'une cellule comprenant 6 éléments sous pression (représentés par des tubes) liés à 24 éléments sous tension* [13]

réseau des filaments d'actine interconnectés est équivalent à une matrice de solides poreux rangés aléatoirement avec des pores ouverts. Ce raisonnement vient du fait que de nombreux matériaux possèdent également une microstructure de fibres interconnectées, comme le papier, le coton ou encore le feutre, et leur comportement mécanique peut être modélisé par un modèle simplifié en idéalisant la connexion entre les fibres (figure I.8). Il est alors possible d'exprimer le module d'Young du cytosquelette E_c :

$$\frac{E_c}{E_f} = C_1 \left(\frac{\rho_c}{\rho_f}\right)^2 \tag{I.2}$$

avec E_f le module d'Young des fibres, ρ_f la densité des fibres, ρ_c la densité du cytosquelette et C_1 un coefficient de proportionnalité. Cependant, de nombreuses suppositions sont nécessaires pour arriver à ce résultat et il n'est pas évident de déterminer des valeurs pour C_1. Ainsi, les valeurs trouvées pour le module d'Young en utilisant ce modèle sont de l'ordre de 100 kPa, ce qui est bien plus grand que la plupart des mesures de rigidité globale de cellules. Le modèle dans son état actuel n'est donc pas représentatif de la structure réelle du cytosquelette et ne prend pas en compte les autres éléments du cytosquelette.

La modélisation du comportement global d'une cellule par le modèle de Bausch est pertinente puisque les données expérimentales confirment son efficacité. En revanche, lorsqu'il s'agit de modéliser le cytosquelette, la difficulté augmente et les modèles existants ne sont que partiels dans le sens où ils ne prennent pas en compte tous les éléments du cytosquelette. Leur validité peut alors être discutée, notamment le modèle de mousse des microfilaments qui ne satisfait pas les mesures expérimentales de rigidité des cellules. De plus, ces trois modèles sont utilisés dans le cas d'une cellule unique sans interaction avec un substrat ou d'autres cellules, ce qui, le cas échéant, complique encore la modélisation du comportement mécanique de la cellule. De nouveaux modèles doivent donc être développés afin d'affiner la compréhension du comportement mécanique des cellules.

I.2 Techniques de mesures de la biomécanique cellulaire

Afin de comprendre la biomécanique des cellules, il est important d'avoir des données expérimentales sur des cellules individuelles comme leurs modules d'Young par exemple. Étant donné la faible

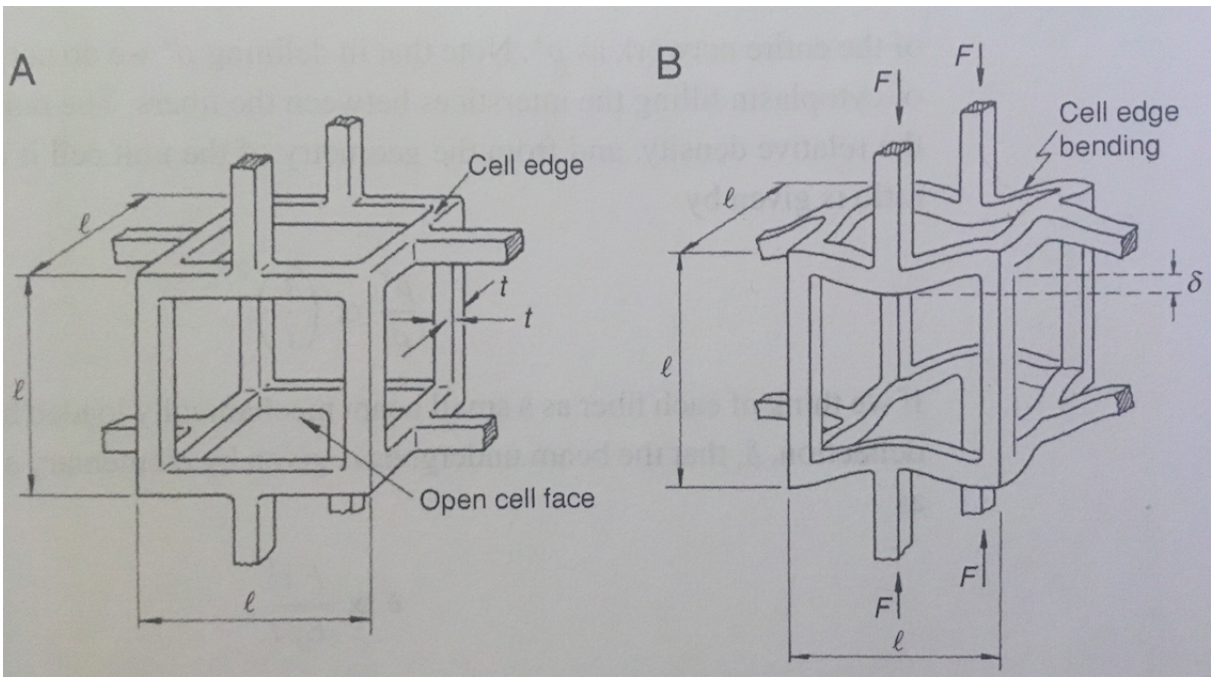

FIGURE I.8 – *Modèle simplifié de l'interconnexion des fibres a) lorsqu'il n'y a pas de force appliquée et b) lorsqu'une force F est appliquée* [15].

taille des cellules (dizaines de micromètres) et les faibles forces qui sont mises en jeu (pN et kPa), la mesure de la biomécanique de cellules n'est pas chose aisée. Néanmoins, il existe plusieurs techniques qui permettent d'étudier les cellules, donnant chacune une information correspondant à différentes gammes de mesure.

Il est possible de séparer les techniques de mesures en deux catégories : les techniques qui permettent d'étudier les propriétés mécaniques des cellules et celles qui permettent d'étudier la distribution des forces qu'exercent les cellules sur le substrat lors de leur adhésion ou de leur migration. Bien entendu, une seule technique de mesure ne peut pas mesurer à la fois les propriétés mécaniques et les forces d'adhésion. La propriété que l'on veut mesurer est donc primordiale dans le choix de la technique utilisée. Les techniques les plus couramment utilisées sont décrites dans cette section afin de comprendre ce qui existe déjà et de voir leurs avantages et inconvénients.

I.2.1 Microscopie à Force Atomique

La première de ces techniques est la microscopie à force atomique (AFM). L'AFM est un outil de mesure performant inventé en 1986 [16], qui est utilisé dans de nombreux domaines [17]. Le principe de l'AFM est de cartographier une surface. Pour cela, une pointe, généralement en silicium ou en nitrure de silicium, solidaire d'un levier est utilisée. Lorsque la pointe interagit avec un échantillon, le levier subit une déflexion qui est mesurée grâce à un laser qui se réfléchit sur le levier et dont la position est ainsi mesurée. Le levier est attaché à un élément piézoélectrique qui permet d'avoir des déplacements verticaux et latéraux très précis. À partir de ce principe de base, il existe différents modes de mesure mais aussi différents types de mesure. En effet, la première fonction d'un AFM est d'obtenir une topographie de la surface que l'on sonde. Cependant, en modifiant les propriétés de la pointe ou de l'échantillon, il est possible d'obtenir d'autres informations. Il est possible, par exemple, de mesurer l'état d'aimantation d'un échantillon si la pointe utilisée possède des propriétés magnétiques : c'est la microscopie de force magnétique (MFM) [18]. Il est aussi possible d'obtenir des informations sur les propriétés électriques [19], mécaniques à l'échelle nanométrique [20] , physico-chimiques [21], etc. L'AFM peut aussi être utilisée pour l'étude de cellules vivantes en milieu aqueux, ce qui est un

avantage certain.

Mode contact

Comme mentionné précédemment, il existe plusieurs modes d'utilisation de l'AFM. Le mode le plus ancien est le mode contact (figure I.9). Comme son nom l'indique, la pointe entre en contact avec l'échantillon, ce qui crée une déflexion verticale du levier. Pour de faibles déflexions, le levier peut être évalué comme un ressort linéaire de constante de rigidité k_c, et la force F nécessaire pour créer une déflexion δ peut ainsi s'exprimer :

$$F = k_c \delta \tag{I.3}$$

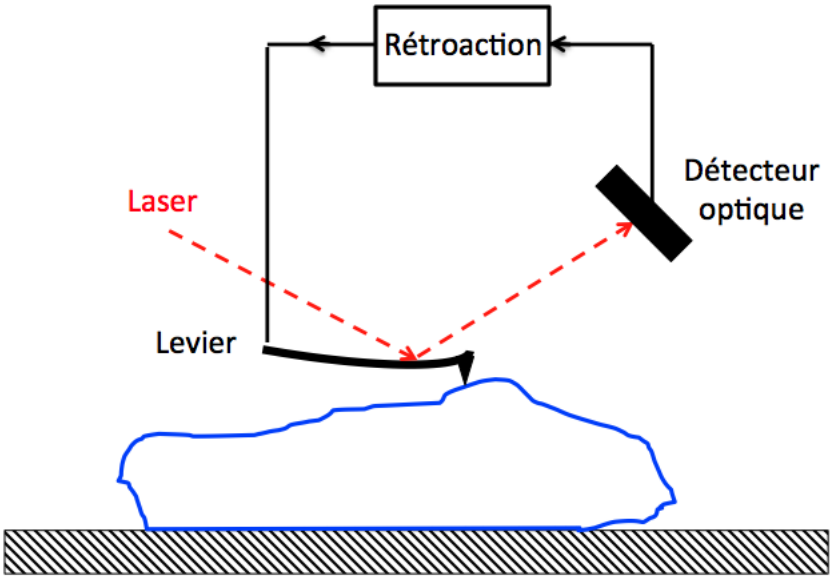

FIGURE I.9 – *Principe du mode contact de l'AFM. La pointe entre en contact avec l'échantillon, ce qui crée une déflexion du levier. Cette déflexion est mesurée optiquement et le système asservit la position verticale du levier afin d'avoir tout le temps la même déflexion. Cela donne donc une mesure de la topographie de l'échantillon.*

La mesure peut se faire à déflexion constante : pour chaque point de mesure, la position verticale du levier est ajustée afin d'obtenir toujours la même déflexion. Grâce à cet asservissement en position verticale, il est possible de remonter à la topographie de la surface étudiée. Ce mode peut être utilisé pour cartographier des cellules [22]. Comme indiqué par l'équation I.3, une déflexion constante implique une force constante. Donc, en réalité, dans le cas des cellules, on obtient des valeurs de hauteurs pour lesquelles la cellule exerce une force constante (la force exercée par la cellule n'étant pas forcément la même à chaque endroit). Néanmoins, cette technique de mesure présente un désavantage important : le contact de la pointe avec la cellule peut déformer cette dernière et même l'endommager [23].

Mode "tapping"

Bien que le mode contact soit très largement utilisé pour caractériser des échantillons solides, il en est autrement lorsqu'il s'agit d'échantillons biologiques. En effet, afin de ne pas endommager l'entité biologique, de faibles forces doivent être appliquées (<100 pN) [24]. C'est pourquoi le mode d'imagerie dynamique a été inventé (appelé "tapping" mode), permettant de diminuer les frictions et les forces

appliquées (figure I.10). Dans le principe, le levier oscille à une fréquence proche de sa fréquence de résonance tout en parcourant la surface à caractériser. Dans le but de minimiser au maximum les frictions avec l'échantillon, la pointe ne doit idéalement toucher ce dernier qu'à la fin de son mouvement descendant. Lorsque la pointe se trouve proche de la surface de l'échantillon et interagit avec celui-ci, son amplitude d'oscillation ainsi que sa fréquence s'en trouvent modifiées. Il est alors possible d'asservir le système en amplitude ou en fréquence afin de suivre le contour fragile d'une entité biologique, même en milieu liquide [25, 26]. D'un point de vue technique, il est plus aisé de réaliser un asservissement en amplitude qu'en fréquence, c'est pourquoi l'AFM à modulation d'amplitude est plus souvent utilisé. Grâce aux modes dynamiques qui permettent de réduire considérablement les forces et les frictions sur l'échantillon, il est possible d'imager des entités biologiques qui sont faiblement adsorbées sur le support, comme des protéines ou de l'ADN [27] (figure I.11), sans risquer de les arracher du support. Dans le cas de l'imagerie d'entités biologiques, la résolution de l'AFM va de 1 nm à 50 nm, en fonction de ce que l'on veut imager [28].

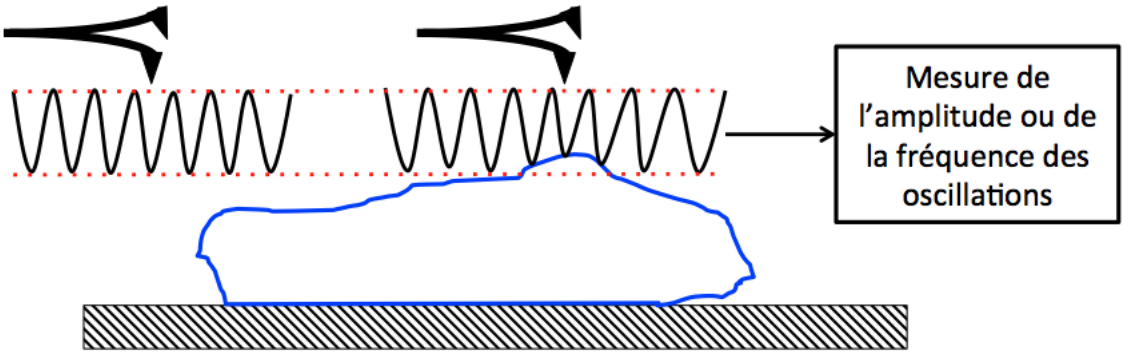

FIGURE I.10 – *Principe du mode "tapping" de l'AFM. Le levier est excité aux alentours de sa fréquence de résonance. Sans interactions avec l'échantillon, les oscillations du levier se font à amplitude et à fréquence constantes. Lorsque la pointe entre en interaction avec l'échantillon, l'amplitude et la fréquence des oscillations varient, ce qui permet de déterminer la topographie de l'échantillon.*

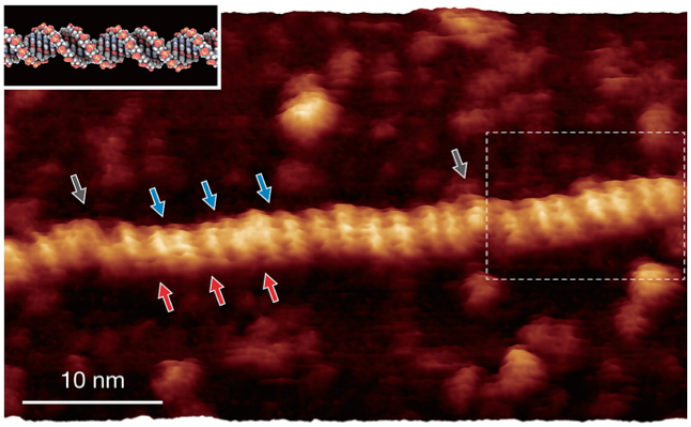

FIGURE I.11 – *Image d'une molécule d'ADN mesurée par AFM par modulation de fréquence* [27].

Mode basé sur les courbes Force-Distance

Les deux modes qui viennent d'être présentés sont utilisés pour obtenir une topographie de l'échantillon sondé. Cependant, dans le but de mesurer les propriétés mécaniques d'un échantillon, et dans le cas qui nous intéresse ici, d'une cellule, une autre approche est utilisée. La méthode qui est très souvent utilisée consiste à amener la pointe au contact de la cellule et à continuer d'abaisser le levier. La déflexion du levier est alors de plus en plus importante et on relève ainsi la courbe de force qui correspond à la déflexion du levier (image de la force appliquée) en fonction de sa position verticale. Il en va de même lorsque que l'on retire la pointe de l'échantillon (figure I.12a) [29]. Ce type de mesure est appelé courbe FD (Force-Distance) et est illustré dans la figure I.12b. La phase d'approche de la pointe et d'indentation permet d'obtenir des informations sur la hauteur, les forces surfaciques et la déformation mécanique de l'échantillon. La phase d'enlèvement de la pointe permet de mesurer les forces d'adhésion et de déterminer le module d'Young local. L'indentation Δ de la pointe dans l'échantillon peut s'exprimer :

$$\Delta = (z_0 - z) - \delta \tag{I.4}$$

avec z la position verticale du levier par rapport au support et z_0 la position verticale du levier à partir de laquelle il y a contact avec l'échantillon. Il est alors possible d'exprimer la force de contact F par le modèle de Hertz, dans le cas d'une pointe sphérique de rayon R [30] :

$$F = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\upsilon^2)}\Delta^{3/2} \tag{I.5}$$

avec E le module d'Young et υ le coefficient de Poisson de l'échantillon. Pour que cette équation soit valable, il existe des restrictions. Dans le cas d'un échantillon d'épaisseur h, il faut alors :

$$h \longrightarrow \infty \qquad \Delta << R, h \qquad R << h \tag{I.6}$$

Dans le cas où l'échantillon est très fin (<10 µm), ces hypothèses ne conviennent plus et il faut alors modifier le modèle de Hertz, ce qui a été fait par Dimitriadis *et al.* [31]. Cependant, ce modèle considère toujours une élasticité linéaire de l'échantillon, ce qui n'est pas le cas pour de nombreuses entités biologiques. C'est pourquoi Long *et al.* ont retravaillé l'approche de Dimitriadis pour prendre en compte des effets d'hyperélasticité [32].

Grâce à l'acquisition des courbes FD, il est possible de remonter à de nombreux paramètres par la phase d'approche et celle d'éloignement de la pointe. Aussi, il est donc possible par une seule mesure de déterminer tous les paramètres mentionnés précédemment. On parle alors de mode d'imagerie AFM basé sur les courbes FD (FD curve-based imaging mode) qui permet, tout en imageant la topographie d'un échantillon, de déterminer ses propriétés mécaniques. Si une seule courbe FD permet d'obtenir des informations locales sur l'échantillon, il est alors possible de faire une mesure point par point afin d'obtenir une cartographie des propriétés physiques de l'échantillon comme sa rigidité et son adhésion avec un ligand (figure I.12c). C'est donc une technique très intéressante qui permet d'imager des entités biologiques complexes, tant en topographie qu'en forces d'adhésion et rigidité.

Il existe cependant deux problèmes qui sont liés lors de l'utilisation de l'AFM basé sur les courbes FD : la résolution latérale et temporelle. La résolution latérale est théoriquement limitée par le nombre de points de meure. Cependant, cette limite est en fait fixée par la durée d'acquisition car chaque point de mesure passe par l'acquisition de la courbe FD, ce qui prend un temps certain. Dans les premières utilisation de l'AFM basé sur les courbes FD, une image de 32 pixels × 32 pixels pouvait prendre

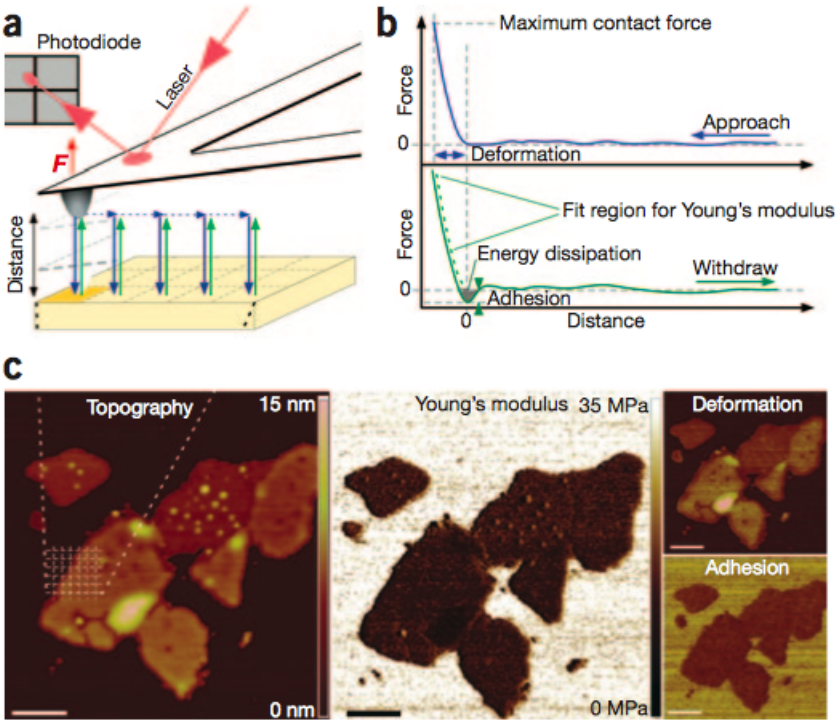

FIGURE I.12 – *Exemple de mesure multiparamétrique basée sur les courbes FD : a) Principe de la mesure où la pointe approche la surface, entre en interaction, puis se retire, b) Une courbe FD d'approche et d'éloignement, c) Différentes images de l'échantillon (membrane pourpre native) en fonction de sa topographie, son module d'Young, sa déformation et son adhésion* [29].

jusqu'à 3 h. De nos jours, grâce à des éléments piézoélectriques ainsi que des boucles de retour plus rapides, des systèmes d'acquisitions toujours plus préformants et des leviers plus hydrodynamiques, il est possible d'obtenir une image de 512 pixels × 512 pixels avec une résolution de l'ordre du nanomètre en seulement 30 min [29]. Même si la durée d'acquisition a grandement été améliorée, il faut encore la réduire dans l'espoir de faire de l'imagerie multiparamétrique d'entités biologiques complexes dynamiques. Cette technique a quand même permis d'imager la topographie et les propriétés mécaniques de nombreuses entités biologiques comme des bactéries [33], des protéines [34], des virus [35] dans leur état natif.

Dans le but de caractériser correctement l'échantillon, il est à noter qu'il faut contrôler précisément l'interaction entre la pointe et l'échantillon, ce qui implique un contrôle très précis de la géométrie et des propriétés chimiques de la pointe. De nos jours, des leviers et des pointes commerciaux dont la forme, la taille et les propriétés physiques et chimiques sont facilement personnalisables sont accessibles. En fonctionnalisant la pointe de l'AFM, il est possible de cartographier des propriétés chimiques et biologiques bien précises. Ainsi, l'AFM permet de mesurer des interactions biologiques spécifiques, allant des anticorps aux cellules humaines [36].

Imagerie multifréquence

L'imagerie AFM basée sur les courbes FD permet d'effectuer des images multiparamétriques et offre de grandes possibilités quant à l'étude d'entités biologiques. Mais comme nous l'avons vu, son plus gros inconvénient reste le temps d'acquisition qui, même s'il est de plus en plus faible, reste important, rendant la mesure de phénomènes biologiques dynamiques très difficile. Afin de réduire le temps d'acquisition, l'AFM n'est pas utilisé en mode statique mais en mode dynamique (la modulation de fréquence ou d'amplitude). Une stratégie relativement récente consiste à faire osciller le levier à plusieurs fréquences de résonance ou à mesurer une fréquence et ses harmoniques [37] : on parle alors

d'AFM multifréquence.

Il existe plusieurs approches différentes. Une de ces approches consiste à utiliser deux modes de résonance du levier. Le nombre de phénomènes observables est alors multiplié par deux et moins de points de mesure sont nécessaires. De plus, par la mesure de la modulation d'amplitude et de fréquence pour les deux modes, il est possible de décorréler les effets topographiques des effets de rigidité par exemple. Ce mode d'imagerie a été utilisé avec des anticorps avec une résolution de 2 nm [38] (figure I.13). Les auteurs ont montré que la partie la plus élevée présente une rigidité plus importante (18 MPa) que les parties périphériques (8 MPa), et que les valeurs correspondent aux mesures faites par les courbes FD (16 MPa pour la partie la plus élevée).

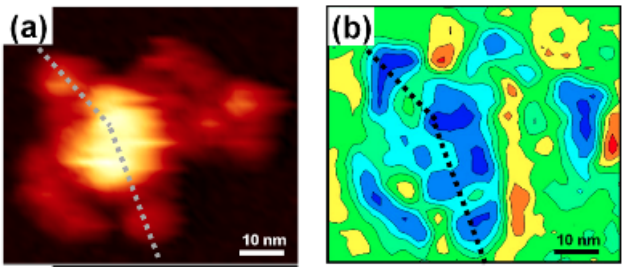

FIGURE I.13 – *Mesure a) de la topographie et b) de la rigidité d'un anticorps grâce à l'AFM bimodale* [38].

D'autres approches existent comme l'imagerie multiharmonique ou l'holographie nanomécanique. Pour cette dernière technique, le levier et l'échantillon sont simultanément excités. L'excitation de l'échantillon provoque des ondes qui se propagent à travers lui. Ces ondes sont dispersées par la structure interne de l'échantillon, modifiant leur amplitude et leur fréquence et donnant ainsi des informations sur les propriétés mécaniques internes locales [39]. Cette technique a été utilisé dans le cas de globules rouges infectés par la malaria (figure I.14). Grâce aux images réalisées par holographie, le parasite de la malaria est très nettement visible à l'intérieur du globule rouge. Cette technique pose cependant un problème : peut-on encore parler d'une mesure d'entité biologique dans leur état natif ? En effet, les forces appliquées sont relativement importantes (100 nN), ce qui perturbe sûrement l'état de l'entité biologique.

Imagerie à grande vitesse

Bien que très performant, l'AFM est principalement limité par sa résolution temporelle, comparée à la microscopie par fluorescence. Cependant, grâce aux avancées techniques de ces dernières années, la vitesse d'imagerie a grandement augmenté, donnant naissance à l'AFM à grande vitesse (High-Speed AFM). L'un des paramètres limitant la vitesse d'imagerie est le levier en lui-même. En effet, le temps de réponse d'un levier lorsqu'il tape la surface est $\tau = \frac{Q}{\pi f_0}$, avec Q le facteur de qualité et f_0 la fréquence de résonance du levier dans l'eau. Afin de diminuer ce temps de réponse, il faut donc augmenter la fréquence de résonance des leviers. Dans ce but précis, la taille des leviers est diminuée mais il faut aussi garder une constante de raideur faible afin de ne pas abîmer les spécimens biologiques. Des leviers commerciaux sont disponibles, mesurant 9 µm de long, 2 µm de large et 130 nm d'épaisseur, avec une fréquence de résonance de 600 kHz dans l'eau pour un facteur de qualité de 2 et une constante de raideur de 0,1 N/m. Leur temps de réponse est donc aux alentours de la microseconde [40]. La diminution de la taille des leviers permet également de diminuer le bruit thermique. D'autres paramètres doivent être pris en compte comme la suppression des vibrations suivant l'axe Z ainsi qu'un contrôleur qui puisse régler de façon dynamique le gain de la boucle de retour afin de minimiser la force entre la pointe et l'échantillon. Grâce à l'AFM à grande vitesse, le déplacement d'une protéine de myosine V le long d'un filament d'actine a été enregistré [41]. On voit clairement la myosine se déplacer

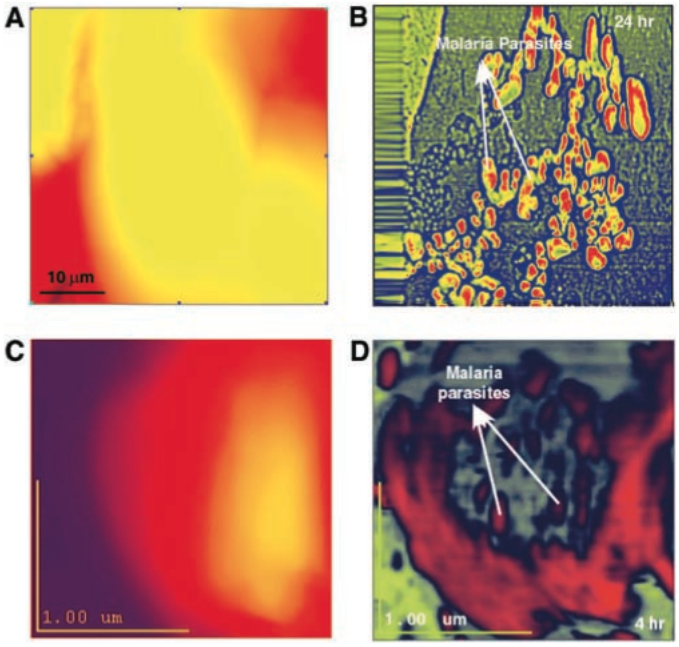

FIGURE I.14 – *Mesure de la topographie après a) 24 h et c) 4 h d'incubation de globules rouges infectés de la malaria. Les images b) et d) montrent l'intérieur des globules rouges par holographie nanomécanique où les parasites sont bien visibles* [39].

et une vidéo est même disponible. D'autres mesures de processus dynamiques ont été enregistrés pour des bactéries [42] et des cellules [43] par exemple.

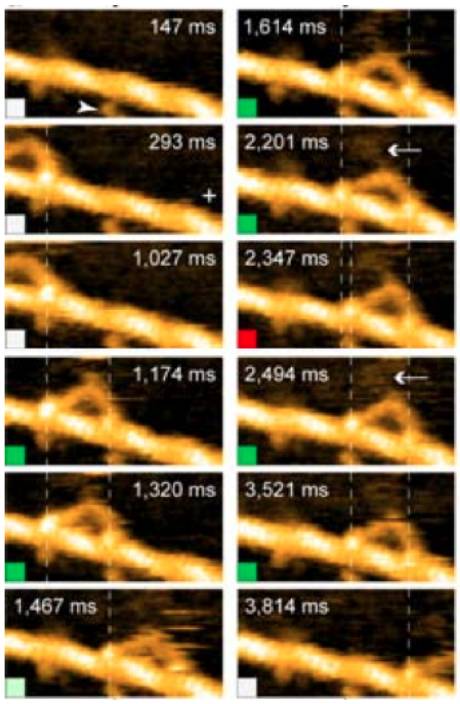

FIGURE I.15 – *Enregistrement du déplacement de la myosine V le long d'un filament par AFM à grande vitesse* [41].

Toutes ces techniques de mesure par AFM permettent de réaliser un grand nombre de mesures différentes, donnant chacune des informations particulières sur l'échantillon qui est sondé. Cela va de la

topographie aux propriétés mécaniques, en passant par les forces d'adhésion. Il est ainsi possible de faire des mesures multiparamétriques par mesure de courbes FD ou par AFM multifréquence. Des mesures des propriétés mécaniques à l'intérieur d'entités biologiques sont même possibles (holographie) ainsi que des mesures de processus dynamiques par AFM à grande vitesse. De plus, la fonctionnalisation chimique ou biologique des pointes permet de mesurer de nombreuses interactions différentes, faisant de l'AFM une boîte à outils très utile dans l'exploration de spécimens biologiques. C'est d'ailleurs la méthode la plus utilisée en biomécanique cellulaire.

I.2.2 Piège optique

Le domaine des pièges optiques a débuté dans les années 70 avec Arthur Ashkin. Il a démontré que les forces optiques peuvent déplacer et faire léviter des particules diélectriques micrométriques dans l'air et dans l'eau [44]. Il a ainsi développé un système stable de piégeage 3D à base de rayons lasers [45]. Ses travaux ont conduit aux pièges optiques à gradient de force à un seul rayon, appelés "optical tweezers", qui sont employés de nos jours [46]. Ashkin *et al.* ont utilisé les pièges optiques dans un grand nombre de mesures, allant du refroidissement et du piégeage d'atomes neutres [47] à la manipulation de bactéries et de virus vivants [48]. De nos jours, les pièges optiques sont toujours utilisés, aussi bien en physique qu'en biologie. La possibilité d'appliquer des forces de l'ordre du picoNewton sur des particules micrométriques tout en mesurant des déplacements avec une précision nanométrique (et même en dessous) permet d'étudier les moteurs moléculaires au niveau cellulaire [49] ou encore les propriétés mécaniques de polymères et biopolymères (comme l'ADN) [50]. En parallèle de toutes ces applications, des recherches théoriques et expérimentales sur des aspects fondamentaux des pièges optiques ont été menées [51].

Le principe d'un piège optique consiste à focaliser très étroitement un rayon laser en utilisant un objectif à grande ouverture numérique (figure I.16) [51]. Les particules plus petites que la longueur d'onde du faisceau laser développent alors un moment électrique dipolaire en réponse au champ électrique de la lumière et sont alors attirées par le gradient d'intensité vers le point focal. En fait, il y a une compétition entre les forces dues au gradient d'intensité et la pression de radiation qui exerce une force en direction de l'axe optique sur les particules par transfert du moment des photons aux particules. Afin que le piège optique fonctionne, il faut donc que les forces dues au gradient d'intensité soient plus importantes que la pression de radiation qui tend à éjecter les particules.

Les pièges optiques peuvent piéger des particules de l'ordre du nanomètre [52] et exercer des forces supérieures à 100 pN [53] avec une résolution de 100 aN [54]. Cette technique est donc très intéressante pour étudier des entités biologiques. Il existe différentes techniques pour étudier l'adhésion d'entités biologiques (figure I.17) [55]. Dans toutes les techniques, l'entité biologique est attachée d'un côté à une microparticule qui est piégée optiquement. D'un autre côté, l'entité biologique peut être attachée à un substrat (figure I.17a), à une autre microparticule manipulée par micropipette (figure I.17b) ou à une autre microparticule elle aussi piégée optiquement (figure I.17c). Dans tous les cas, l'entité biologique exerce une force sur la microparticule piégée, ce qui a pour conséquence de déplacer la particule. Le déplacement de la particule par rapport à sa position d'équilibre est alors mesuré et est relié à la force exercée, en considérant le piège optique comme un ressort de raideur k, par $F = k\Delta x$, avec Δx le déplacement de la particule.

Le premier des cas où l'entité biologique est attachée à un support est le plus simple à mettre en place. Cependant, cette méthode est soumise à des dérives relatives du support et du piège optique à cause d'un échauffement de l'objectif, des fluctuations du laser ou d'un bruit acoustique. Mais il est possible de réduire ce bruit à 0,1 nm [56] en mesurant de façon indépendante la position relative du piège optique et du support. La configuration utilisant une micropipette permet des manipulations plus polyvalentes de l'entité biologique et augmente la sensibilité en position. Cependant, cette configuration est également soumise au même bruit que dans le cas où l'entité biologique est attachée à un support à cause des connexions mécaniques de la micropipette. Enfin, la méthode utilisant deux

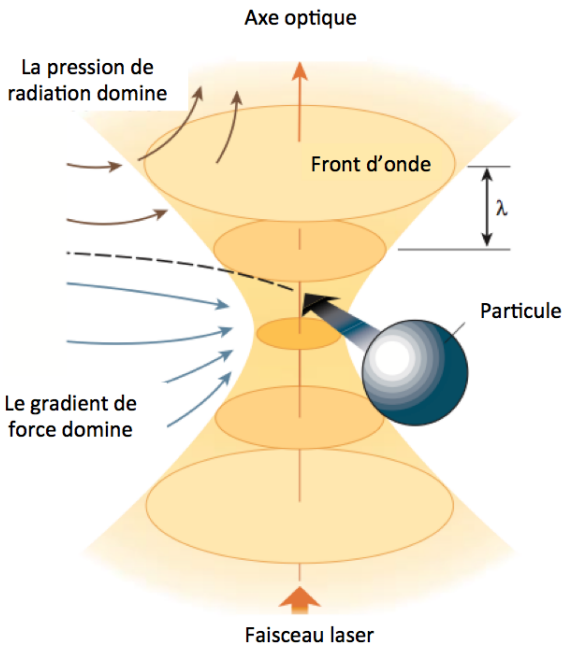

FIGURE I.16 – *Principe d'un piège optique. Le gradient d'intensité à l'intérieur du faisceau attire les particules vers le point focal alors que la pression de radiation tend à les éjecter le long de l'axe optique. Il faut alors que le gradient de force domine afin de piéger les particules* [51].

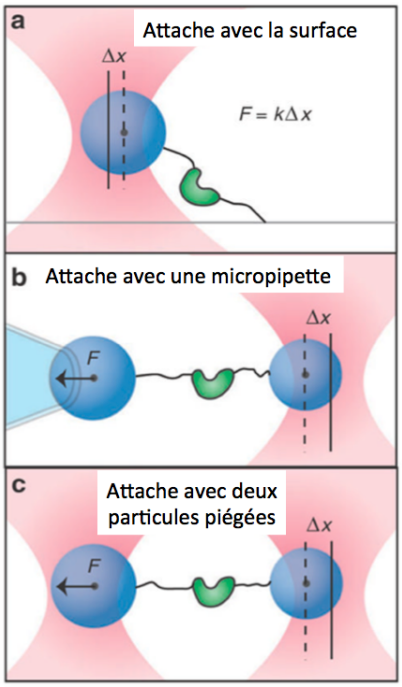

FIGURE I.17 – *Différentes techniques pour étudier des entités biologiques par piégeage optique a) où cette dernière est attachée à une microparticule d'un côté et à un support de l'autre, b) où elle est attachée à deux microparticules, l'une piégée optiquement et l'autre manipulée par micropipette et c) où elle est attachée à deux microparticules piégées optiquement* [55].

pièges optiques est la plus stable et réduit grandement le bruit mécanique [57]. Le bruit est alors dû aux fluctuations de la position relative des faisceaux laser à cause des courants d'air et à lieu pour les

basses fréquences. Dans le but d'éliminer ce bruit, il faut alors travailler dans des gaz à faible indice de réfraction, comme l'hélium ($n = 1{,}000035$). Il est à noter qu'il est possible d'utiliser cette configuration avec plus de deux pièges optiques [58].

Les pièges optiques sont très utilisés pour suivre le mouvement de molécules comme, par exemple, lors de la synthèse d'ARN par la polymérase [59]. Pour cela, l'ARN polymérase est attachée à une microparticule piégée et le bout de l'ADN libre est attaché à une autre microparticule piégée ou à un support (figure I.18) [59]. Lors de la transcription de l'ADN, la microparticule est alors poussée le long du brin d'ADN par la polymérase. Ce mouvement est alors compensé en bougeant le piège optique ou le support afin de garder la microparticule à la même position dans le piège, et l'acquisition de la transcription se fait alors à force constante.

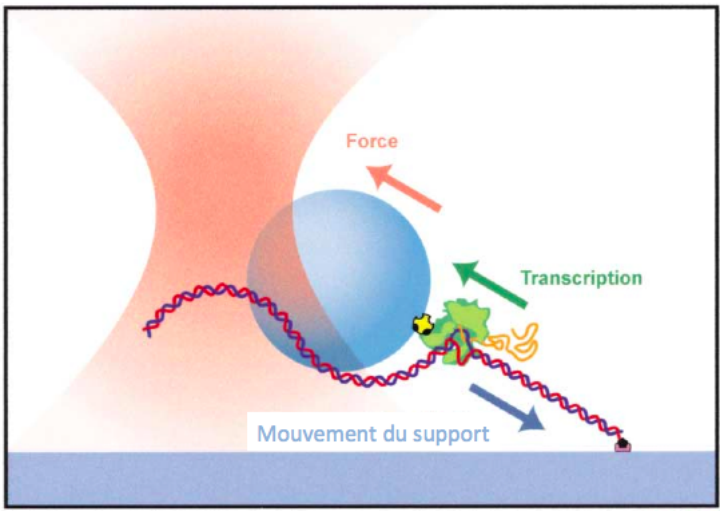

FIGURE I.18 – *Enregistrement du mouvement de la polymérase lors de la transcription d'un brin d'ADN. Le piège optique exerce une force sur une microparticule attachée à la polymérase. Lors de la transcription, la polymérase bouge le long du brin d'ADN et donc la microparticule bouge aussi. Afin de garder la microparticule à la même position dans le piège optique, et donc exerçant toujours la même force sur la polymérase, le support bouge en conséquence* [59].

Les pièges optiques sont donc très utilisés pour suivre le mouvement et pour exercer des forces sur des molécules biologiques. Il est cependant également possible d'étudier les propriétés mécaniques d'entités biologiques [60]. Dans le cas cité, la microparticule piégée est utilisée pour faire des mesures d'indentations longitudinales sur un globule rouge (figure I.19). La valeur de l'indentation est alors reliée à la force appliquée et au module d'Young du globule rouge. Une valeur de 12,85 Pa a été déterminée. Il est également possible de faire des mesures d'indentations verticales (figure I.20) [61]. Les auteurs de l'article cité ont ainsi montré que la rigidité de cellules épithéliales humaines (HBL-100) dépend du substrat sur lequel elles se trouvent. Une autre méthode consiste à injecter des particules à l'intérieur d'une cellule et à suivre leurs mouvements dans la cellule en fonction de la force appliquée par le piège optique [62]. Les particules injectées dans le cas cité font 500 nm de diamètre. Une particule est alors mise en mouvement par le piège optique de façon sinusoïdale et, connaissant la force appliquée par le piège optique, il est possible de déterminer la constante de raideur du milieu intracellulaire (figure I.21).

La résolution dans le déplacement d'une microparticule piégée optiquement atteint de nos jours l'ångström [63], voir même en dessous. La configuration utilisant deux pièges optiques est complexe à mettre en place, nécessitant des mécanismes pour contrôler précisément la position d'au moins un piège optique et un environnement à faibles vibrations et stabilisé en température pour l'équipement. Les

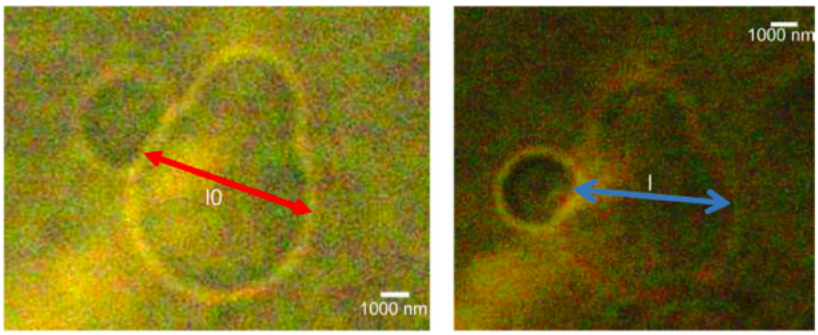

FIGURE I.19 – *Utilisation d'une microparticule piégée optiquement pour faire des mesures d'indentation dans un globule rouge* [60].

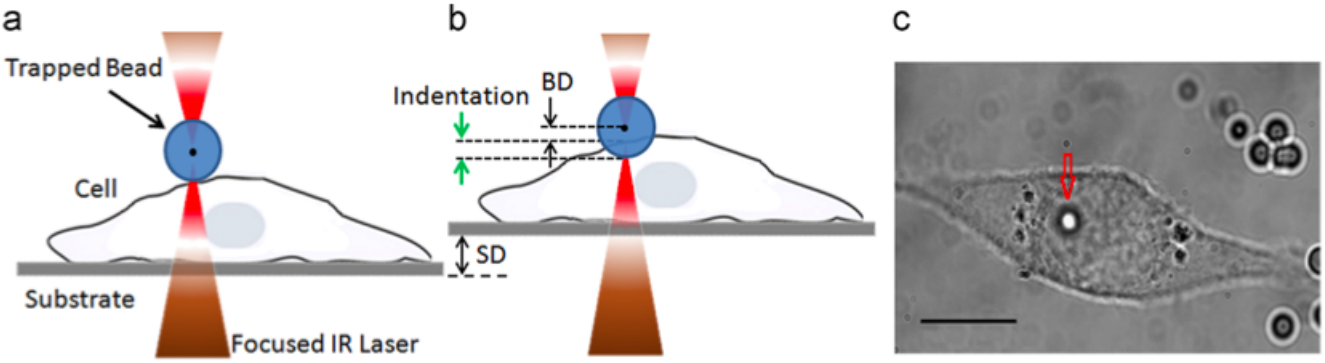

FIGURE I.20 – *Représentation schématique de l'expérience avec a) le positionnement de la cellule sous la microparticule piégée et b) l'élévation du support afin que la cellule interagisse avec la microparticule. c) Image au microscope de la microparticule qui se trouve au-dessus de la cellule* [61].

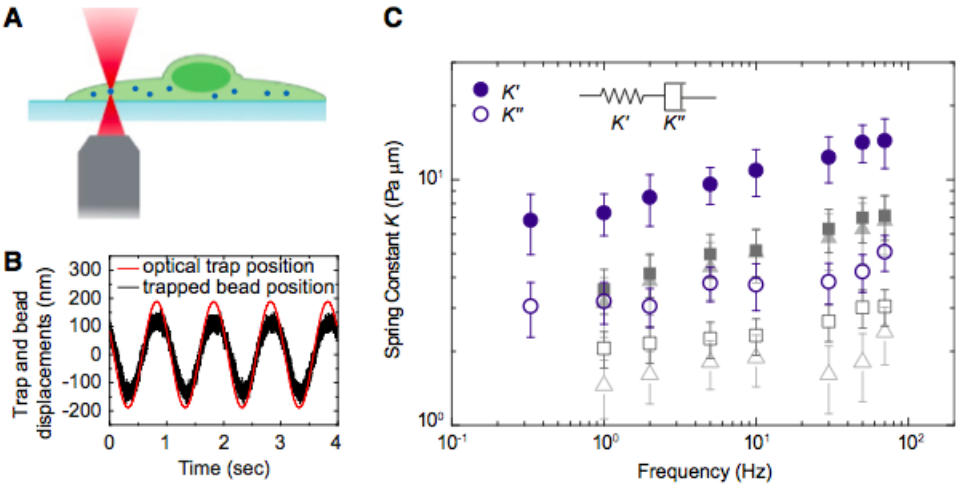

FIGURE I.21 – *Expérience menée afin de déterminer les propriétés mécaniques intracellulaires. a) Représentation des nanoparticules à l'intérieur de la cellule, b) mouvement sinusoïdal du piège optique ainsi que de la particule et c) détermination de la constante de raideur intracellulaire en fonction de la fréquence* [62].

pièges optiques sont cependant capables d'exercer une large gamme de forces et de suivre le mouvement d'une seule molécule en temps réel, et ce pendant des heures avec une précision atomique. Il est également possible de faire des mesures d'indentations afin de déterminer les propriétés mécaniques des cellules. Toutes ces mesures sont non invasives et font donc des pièges optiques un outil très utile pour l'étude d'entités biologiques.

I.2.3 Pinces magnétiques

Si l'on jette de la paille de fer dans un champ magnétique, on voit clairement les particules de fer s'orienter suivant les lignes de champ et si l'on bouge l'aimant qui crée le champ magnétique, les particules de fer bougent avec le champ magnétique. Partant de se principe, Crick et Hughes ont eu pour la première fois, en 1950, l'idée d'utiliser l'actionnement magnétique pour faire bouger et tourner des particules magnétiques à l'intérieur du cytoplasme de cellules [64]. Quatre décennies plus tard, Smith *et al.* et Strick *et al.* ont effectué une série d'expériences dans lesquelles une molécule d'ADN est étirée [65] ou torsadée [66] par l'actionnement magnétique d'une particule magnétique. Ces travaux ont ainsi permis d'établir les bases de la technique appelée pince magnétique.

Les techniques de pinces magnétiques sont basées sur la manipulation non invasive de particules magnétiques par l'application d'un champ magnétique extérieur. De la même manière que pour les pièges optiques, l'entité biologique d'intérêt est attachée à la particule magnétique d'un coté et à un support de l'autre. Différentes configurations existent et sont présentées dans la figure I.22 [67]. Typiquement, cette technique requiert des aimants permanents ou des électroaimants ainsi qu'un microscope optique pour suivre la particule magnétique dans le champ magnétique externe. Dans la plupart des cas, les particules utilisées sont super-paramagnétiques, i.e. leur aimantation peut basculer spontanément sous l'effet de la température, ou très faiblement ferromagnétiques. Ce sont généralement des nanoparticules de Fe_3O_4 ou de Fe_2O_3 contenues dans une matrice en polymère.

Une particule possédant un moment magnétique $\vec{m}$ dans un champ d'induction magnétique $\vec{B}$ est soumise à un couple $\vec{C} = \vec{m} \times \vec{B}$ qui tend à aligner le moment magnétique de la particule avec le champ magnétique. S'il existe un gradient de champ magnétique, la particule est alors soumise à une force dirigée vers la zone de plus haute intensité du champ magnétique (figure I.22a). C'est donc cet effet qui est utilisé pour manipuler une particule magnétique et ainsi appliquer une force *via* cette particule sur une entité biologique. Des particules super-paramagnétiques sphériques avec une gamme de diamètres de 0,1 µm à 100 µm et un large choix de surfaces chimiquement modifiées sont commercialement disponibles. En revanche, il n'existe pas, à proprement parler, de système de pince magnétique commercialement disponible. Les scientifiques construisent alors leurs propres systèmes, donnant lieu à un grand nombre de systèmes différents et démontrant ainsi l'adaptabilité de la méthode. Chaque système de pince magnétique correspond donc à un type de mesure particulier.

Les pinces magnétiques sont utilisées pour exercer des forces mais aussi des couples sur des entités biologiques, ce qui en fait un outil unique. Les forces appliquées par cette technique vont de 1 pN à 100 pN [68]. Cette force est considérée constante au vu des faibles déplacements de la particule magnétique et de la grande longueur caractéristique à partir de laquelle le gradient de champ magnétique varie (∼1 mm). Les pinces magnétiques ne nécessitent donc pas de boucle de retour en force sophistiquée contrairement aux pièges optiques. Lors de l'application d'un couple, la rigidité angulaire de la particule dans le champ magnétique peut aller de 100 pN.nm/rad^{-1} à 1.10^4 pN.nm/rad^{-1} [69].

Les particules magnétiques sont utilisées à la fois comme transducteur de force et comme sonde de position. La position est déterminée par vidéo au microscope. La position dans le plan est d'abord déterminée par traitement d'images [70, 71, 72]. Afin de déterminer la position verticale de la particule, et donc la longueur d'un bout à l'autre de la molécule sondée, les figures de diffraction de la particule sont utilisées. Avant l'expérience, une calibration est faite avec une particule attachée au support : la position du plan focal de l'objectif du microscope est alors changée et la figure de diffraction (intensité

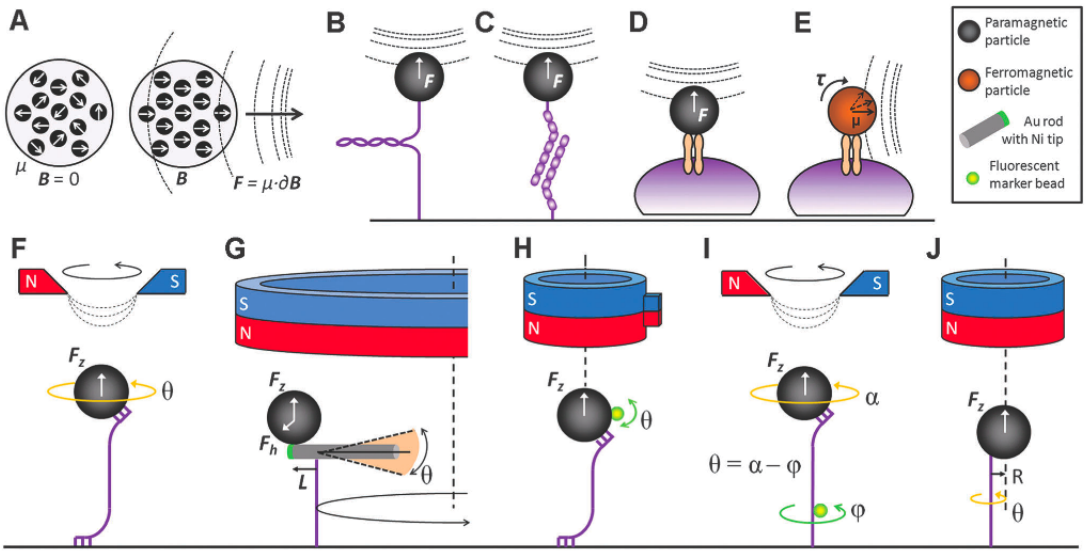

FIGURE I.22 – *a) Les particules super-paramagnétiques contiennent des nanoparticules magnétiques dont le moment magnétique orienté aléatoirement s'oriente avec le champ magnétique externe et une force attire la particule vers les fortes intensités du champ magnétique. Exemples d'utilisation des pinces magnétiques avec des mesures b) d'étirement sur une molécule seule, c) de forces de liaison entre molécules et d) de protéines transmembranaires. Application d'un couple sur e) des protéines transmembranaires grâce à une particule ferromagnétique ou f) sur une molécule en créant un champ magnétique tournant. g) Une sonde hybride composée d'une particule et d'une tige permet d'appliquer un couple. h) Un piège magnétique qui permet d'appliquer un mouvement de torsion grâce à un aimant attaché sur le côté d'un aimant circulaire. Observation de la rotation de la molécule i) en attachant une particule fluorescente ou j) en observant la rotation libre de la particule magnétique* [67].

et taille) est enregistrée en fonction de la position du plan focal par rapport à la particule (figure I.23) [73]. Pendant les expériences, la figure de diffraction de la particule est alors comparée avec les profils enregistrés et la position verticale peut ainsi être déterminée en temps réel avec une précision de l'ordre de 10 nm. La limite de résolution en position provient principalement des fluctuations thermiques intrinsèques de la particule et de la résolution de la caméra qui permet de visualiser la particule.

Bien que les mesures effectuées par pince magnétique souffrent généralement d'une faible cadence, il est possible d'effectuer des mesures en parallèle (figure I.24) [74], contrairement à l'AFM et aux pièges optiques. Ribeck et Saleh ont montré pour la première fois en 2008 la manipulation et la mesure de 34 brins d'ADN en parallèle [75]. La force pour manipuler les particules est calibrée individuellement pour chaque particule. Par la suite, un plus grand nombre de particules ont été manipulées simultanément (jusqu'à 357) [74]. Dans un premier temps, faire des mesures en parallèle signifie qu'il faut pouvoir visualiser un grand nombre de particules, et donc cela nécessite de réduire le grossissement de l'objectif, mais cela conduit à une perte de résolution, ou d'utiliser une caméra plus large, ce qui est préférable. De plus, les particules qui sont visualisées sont attachées à la molécule d'intérêt qui est elle-même attachée à un support. Pour augmenter le nombre de mesures simultanées, il faut donc augmenter la densité de particules attachées aux molécules. Le protocole standard d'attachement des particules aux molécules mène à un faible ratio ($\approx 5\,\%$ [76]) de particules attachées par rapport au nombre de particules visibles. Dans la référence [74], la surface est structurée par impression par microcontact afin d'obtenir un arrangement régulier de molécules d'ADN et ainsi optimiser l'attache des particules magnétiques. Il reste ensuite le problème de pouvoir suivre simultanément et en direct la position dans l'espace de chaque particule. Cela est réalisable lorsque le nombre de particules est raisonnable comme dans [75] où 34 particules sont suivies. En revanche, pour un grand nombre de particules, cela devient

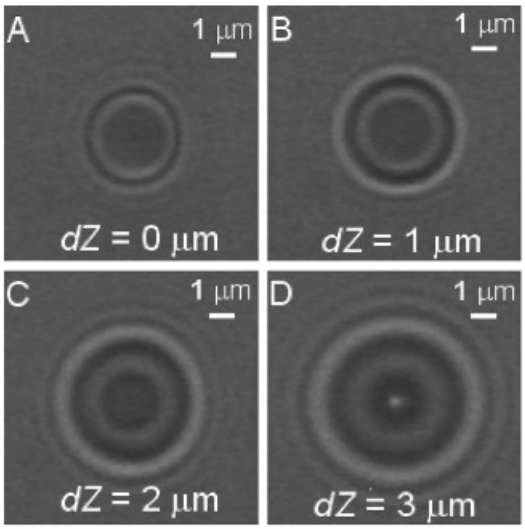

FIGURE I.23 – *Figures de diffraction de la particule attachée au support en fonction de la distance relative du plan focal de l'objectif* [73].

compliqué et une méthode consiste à enregistrer les images et à les traiter après la mesure [74]. Avec l'évolution des caméras et des vitesses de calculs, le suivi de 1 000 particules sera sûrement possible dans les années à venir.

La simplicité d'utilisation des pinces magnétiques ainsi que leur implémentation aisée en font un outil intéressant pour l'étude de molécules. De plus, leur capacité pour appliquer des couples les différencie des autres techniques de mesures. Il reste cependant à optimiser les mesures en parallèle avec des routines de mesures pour étudier jusqu'à 1 000 molécules en même temps. Les pinces magnétiques sont très utilisées dans l'étude de molécules d'ADN pour appliquer des forces ou des couples [77, 78, 79]. Mais elles peuvent aussi être utilisées pour étudier des cellules [80], même si ce n'est pas leur utilisation première.

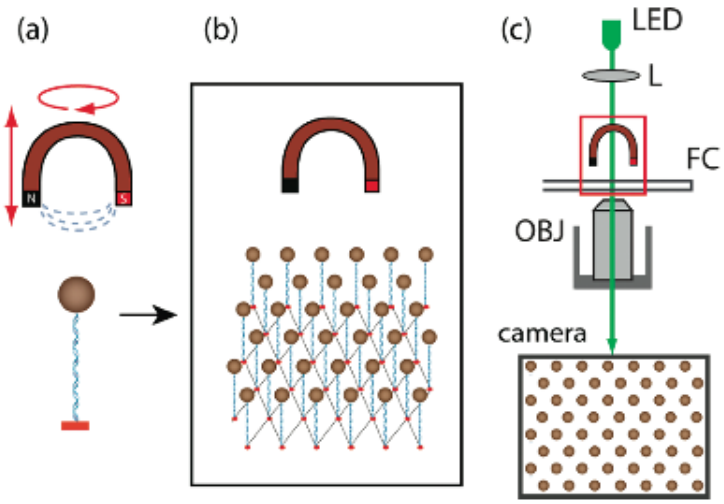

FIGURE I.24 – *Représentation schématique de pinces magnétiques. a) Manipulation d'une molécule d'ADN seule, b) manipulation en parallèle de plusieurs molécules d'ADN et c) représentation du système complet avec visualisation des particules magnétiques* [74].

Dans la dernière référence citée, les auteurs utilisent une pince magnétique afin d'appliquer une tension au niveau de récepteurs trans-membranaires de cellules F9 de carcinome embryonnaire et de cellules de souris F9 Vin (-/-). Les forces appliquées peuvent aller de 10 pN à 1 nN. Le principe utilise une microbille magnétique attachée à la cellule qui permet d'appliquer la force voulue *via* la pince magnétique (figure I.25a). La cellule applique alors une force en retour qui déplace la microbille. Le déplacement de la microbille est alors mesuré optiquement (figure I.25b). Il résulte de cette étude que le déplacement de la microbille est plus important pour les cellules F9 Vin (-/-) (déficientes en vinculine), ce qui traduit le fait qu'elles sont moins rigides que les autres cellules de cette étude.

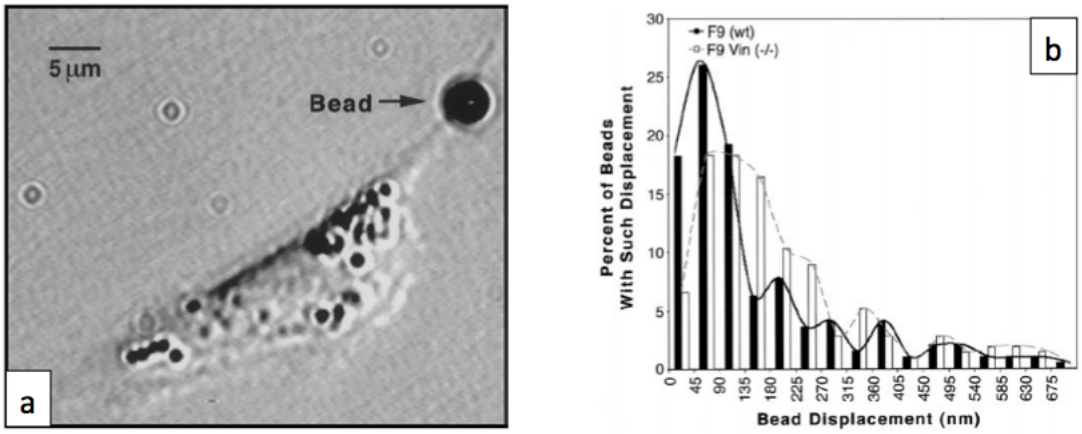

FIGURE I.25 – *a) Image d'une cellule F9 Vin (-/-) attachée à une microbille (dans le coin supérieur droit). b) Distribution du déplacement de la microbille dû à la force appliquée par la cellule en réponse à une force de 180 pN* [80].

I.2.4 Aspiration par micropipette

Dès 1954, Mitchison et Swann ont eu l'idée d'un appareil de microaspiration, appelé "cell elastimeter" [81], dans le but d'étudier les propriétés surfaciques de cellules, ce qu'ils ont fait en 1955 sur une cellule d'oursin [82]. Une décennie après, Rand et Burton ont amélioré cette technique afin d'étudier les propriétés mécaniques des membranes de globules rouges [83]. Dans les années 70 et 80, cette technique a été sophistiquée et utilisée pour de nombreuses études. Depuis, cette technique est toujours très répandue grâce à sa simplicité, bien que cela requiert une analyse et un traitement des images non triviaux. De plus, elle est non destructive, ce qui permet de répéter les mesures sur un même échantillon [84]. L'aspiration par micropipette s'applique généralement sur des cellules non adhérentes et possédant une grande symétrie sphérique [85].

Le principe de cette technique consiste à observer la déformation d'une cellule lorsque celle-ci est aspirée dans une micropipette (figure I.26) [86]. Un système complet pour appliquer cette technique se compose traditionnellement de micromanipulateurs pour positionner la micropipette, d'un générateur de pression, d'un capteur qui mesure la pression de succion et d'un microscope optique pour observer la déformation des cellules. Dans les premières applications de cette technique, le paramètre mesuré était la projection de la longueur de la cellule à l'intérieur de la micropipette (figure I.27) [86]. Afin de traduire cette déformation en propriétés mécaniques, des modèles théoriques ont été développés, se focalisant sur un paramètre d'intérêt.

Les systèmes de manipulation par micropipette constituent un moyen économique et simple pour manipuler des cellules sous microscope. Grâce au développement des micromanipulateurs 3D qui permettent le contrôle du mouvement des micropipettes, ces systèmes sont devenus populaires dans l'étude de la cellule unique. La grande gamme de diamètres disponibles pour les micropipettes (à partir de

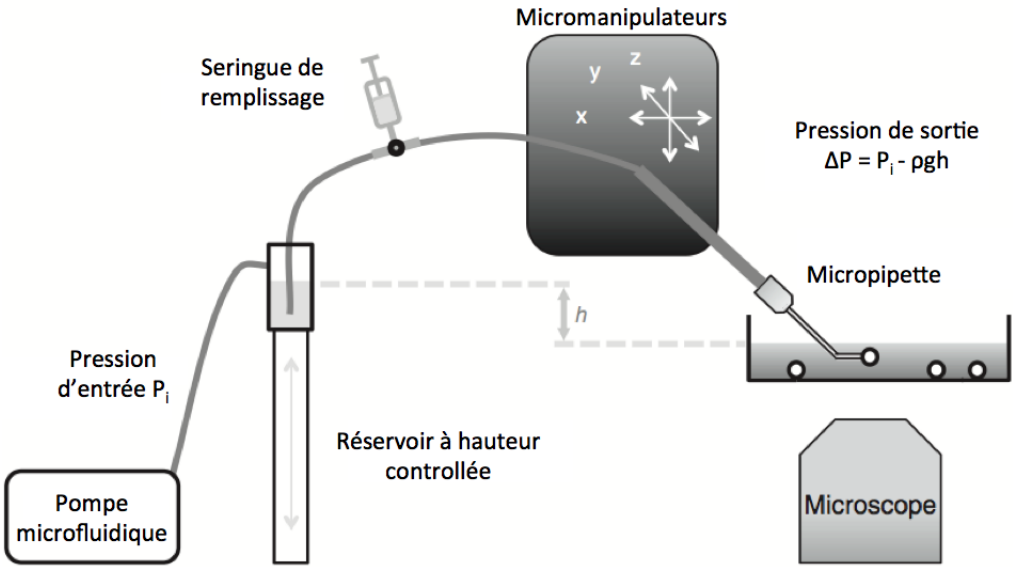

FIGURE I.26 – *Représentation du principe du système d'aspiration par micropipette* [86].

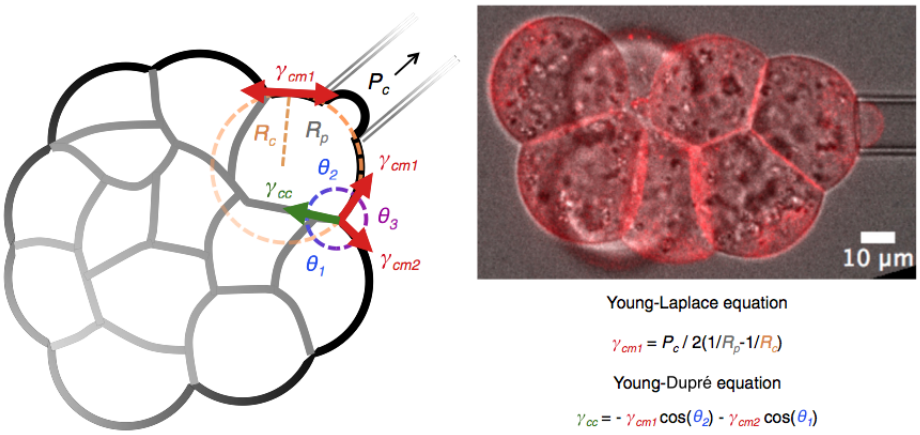

FIGURE I.27 – *Exemple de déformation de cellules par aspiration par micropipette* [86].

1 µm) permet d'étudier tout type de cellule. Les techniques basées sur les micropipettes ont permis de déterminer une grande variété de propriétés de systèmes cellulaires, comme le module d'Young de cellules endothéliales (4 kPa) [87] et de chondrocytes (6,5 kPa) [88], le module de cisaillement de cellules endothéliales bovines (10^{-4} pN/µm) [89], la viscosité de la membrane de globules rouges (3.10^{-4} Pa.s.µm) [90] ou encore la tension corticale de neutrophiles ($3{,}5.10^{-5}$ pN/µm) [91].

Pour que l'aspiration par micropipette permette de déterminer des propriétés mécaniques à partir de la déformation des cellules, il faut pouvoir relier cette dernière à la différence de pression appliquée. Dans ce but, Theret *et al.* ont développé le modèle appelé "half-space model" [87]. Dans ce modèle, l'entité biologique est supposée être un milieu élastique homogène, isotrope et incompressible sous l'effet de faibles contraintes. Il est alors possible de relier la différence de pression ΔP et la longueur aspirée L par :

$$\frac{L}{d} = \frac{3\Delta P}{2\pi E}\phi(\eta) \tag{I.7}$$

avec d le diamètre intérieur de la micropipette, E le module d'Young de l'entité biologique, η le ratio entre l'épaisseur et le rayon intérieur de la micropipette et $\phi(\eta)$ un facteur sans dimension appelé "wall function". Theret *et al.* ont développé deux modèles analytiques afin d'estimer cette "wall function". Par la suite, cette théorie a évolué par une estimation numérique de la "wall function" [92] et il a été notamment montré que la friction entre la pipette et l'échantillon ne joue aucun rôle. Ce modèle a également été étendu en prenant en compte l'épaisseur de la membrane de l'entité biologique [93, 94]. Le "half-space model" a été très largement adopté afin de déterminer la rigidité d'entités biologiques [95, 96]. Cependant, ce modèle présume une incompressibilité de l'entité biologique, ce qui implique un coefficient de Poisson égal à 0,5. Récemment, Esteban-Manzanares *et al.* ont développé une méthode pour mesurer à la fois le module d'Young et le coefficient de Poisson [97]. Pour cela, les auteurs prennent en compte la longueur d'étirement de la cellule L_p mais également la réduction du diamètre ΔD_t de la cellule en dehors de la pipette (figure I.28).

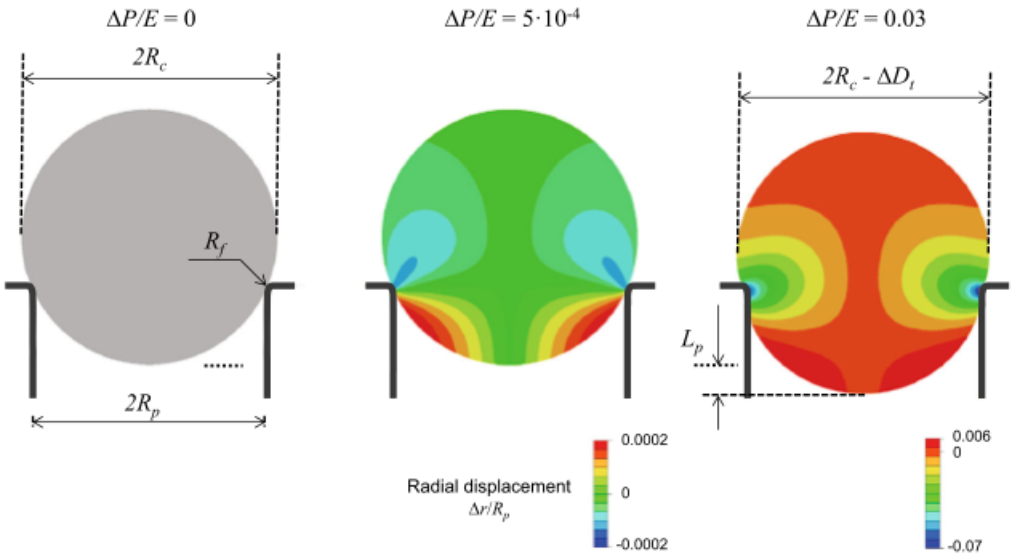

FIGURE I.28 – *Simulation de la déformation d'une cellule par aspiration par micropipette avec la définition des différents paramètres d'intérêt* [97].

Les avancées scientifiques actuelles dans le domaine de l'aspiration par micropipette consistent à améliorer les modèles théoriques afin de prendre en compte plus de paramètres et ainsi caractériser au mieux l'entité biologique. De plus, cette technique requiert beaucoup de manipulations et d'habilité de la part d'un utilisateur. C'est pourquoi des scientifiques travaillent à l'automatisation des mesures afin de transformer la mesure en un système "point-and-click" [98]. La mesure devient alors indépendante vis-à-vis de l'utilisateur et l'aspiration des cellules, l'acquisition des images ainsi que leur traitement se font de façon automatique.

L'aspiration par micropipette est donc une technique très répandue dans l'étude des cellules uniques car c'est un système simple et peu coûteux à mettre en place. Cette technique permet de déterminer les propriétés mécaniques globales de cellules comme le module d'Young, la viscosité ou encore le coefficient de Poisson. Cependant, cette méthode nécessite des modèles théoriques qui comportent des hypothèses qui ne sont pas toujours applicables (comme l'incompressibilité des cellules), et cela nécessite également un traitement d'images performant afin de bien évaluer la déformation de la cellule.

Afin d'avoir une vue d'ensemble sur ces quatre techniques de mesure (AFM, piège optique, pince magnétique et aspiration par micropipette), le tableau I.1 présente un récapitulatif des propriétés que permettent de mesurer ces techniques, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Technique de mesure	Caractéristique mesurée	Avantages	Inconvénients
AFM	• Topographie • Cartographie du module d'Young • Cartographie de la déformation mécanique • Cartographie des forces d'adhésion • Déplacement de protéines	• De nombreuses propriétés mesurables • Cartographie des propriétés mesurées	• Long temps d'acquisition • Parallélisation impossible • Mesure surfacique
Piège optique	• Module d'Young • Indentation verticale et latérale • Forces d'adhésion • Propriétés intracellulaires	• Précision de l'ordre de l'ångström • Mesure non invasive	• Parallélisation impossible • Dispositif non trivial
Pince magnétique	• Application d'un couple • Mesure de rigidité • Forces d'adhésion	• Parallélisation possible • Mesure non invasive • Dispositif relativement simple	• Peu d'études sur les cellules • Optimisation de la parallélisation en cours
Aspiration par micropipette	• Module d'Young • Vicosité • Coefficient de Poisson	• Dispositif très simple • Parallélisation possible • Mesure non invasive	• Modèles théoriques en construction • Dépendant de l'utilisateur • Traitement d'image important

TABLE I.1 – *Récapitulatif des propriétés mesurées, des avantages et des inconvénients pour les quatre techniques principales étudiées.*

I.2.5 D'autres techniques

Les quatre techniques qui ont été présentées (AFM, piège optique, pince magnétique et aspiration par micropipette) sont sûrement les techniques les plus utilisées dans l'étude des propriétés mécaniques des cellules. Il existe cependant d'autres techniques qui vont être brièvement décrites dans ce qui suit.

Microscopie acoustique

La microscopie acoustique appliquée à l'étude de cellules a débuté en 1979 avec les travaux de Johnston *et al.* [99]. Dans ces travaux, les auteurs ont été capables de visualiser la structure interne de cellules. Depuis, cette technique a été améliorée et continue d'être utilisée. Le principe est le suivant (figure I.29) : des ondes acoustiques sont envoyées sur l'entité biologique d'intérêt après avoir été focalisées par une lentille acoustique. Des ondes sont réfléchies par la surface de l'entité biologique alors que d'autres la traversent et sont ensuite réfléchies par le substrat. Les délais de retour des ondes réfléchies sont donc différents et servent à déterminer les propriétés de l'entité biologique. Il est également nécessaire d'avoir un signal de référence sans l'entité biologique.

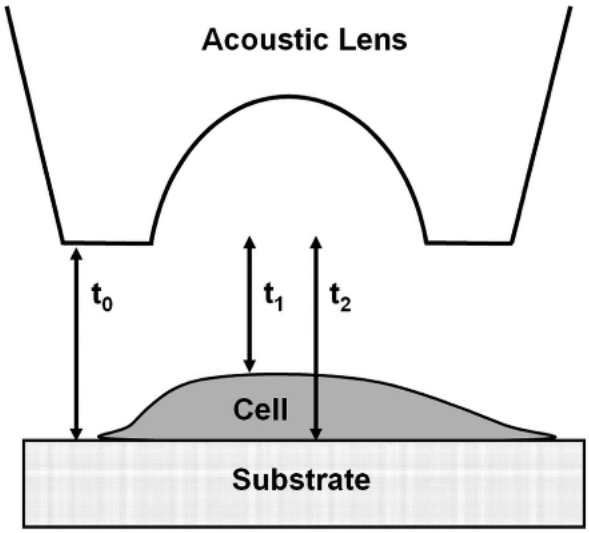

FIGURE I.29 – *Représentation schématique de la microscopie acoustique. Les ondes acoustiques envoyées sur la cellule sont réfléchies par le substrat, la surface de la cellule et au niveau de l'interface cellule/substrat avec des délais t_0, t_1 et t_2 respectivement. Ces délais sont mesurés et servent à déterminer les propriétés internes de la cellule* [100].

Cette technique est non invasive et il n'y a, à proprement parler, aucune interaction avec la cellule, si ce n'est les ondes acoustiques qui la traversent. De plus, cette technique permet de déterminer l'épaisseur, l'impédance acoustique, la vitesse de l'onde, la densité, le module de compressibilité ainsi que l'atténuation due au milieu traversé avec une seule série de mesures [100]. La fréquence des ondes utilisées se trouve généralement entre 100 MHz et 1 GHz et la résolution approche le micromètre à 1 GHz. La microscopie acoustique est utilisée pour imager et déterminer des propriétés physiques et mécaniques de cellules vivantes et peut servir à discriminer des cellules [101].

Microlames

Les expériences effectuées avec des microlames sur des cellules seules ont débuté en 1997 avec les travaux de Thoumine et Ott [102]. Dans le principe, la cellule est coincée entre deux lames de verre : une très rigide et l'autre plus flexible (figure I.30) [103]. Il est alors possible de faire des tests en compression ou en tension sur une cellule. Dans la figure I.30, la cellule est étirée avec une force

constante. Par visualisation directe de la déformation de la cellule, il est possible de déterminer son allongement en fonction du temps.

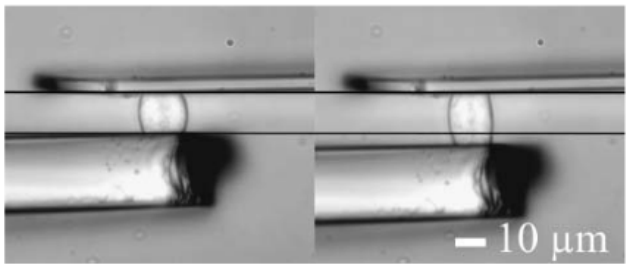

FIGURE I.30 – *Manipulation d'une cellule par microlames. La cellule applique une force qui tend à défléchir la lame moins rigide (celle du dessus). Dans le cas présenté, la lame rigide est déplacée vers le bas afin de garder une déflexion constante de la lame flexible, ce qui se traduit par l'application d'une force constante sur la cellule* [103].

Il est également possible, par exemple, de suivre l'évolution de la force appliquée par la cellule au fur et à mesure qu'elle s'étend (figure I.31) [104]. Plus la cellule s'étend, plus elle applique une force importante, ce qui se traduit par une déflexion plus importante de la lame flexible. Cette expérience a été menée pour deux lames flexibles ayant des rigidités différentes. On voit sur les courbes que la cellule s'adapte à la rigidité de la lame flexible et applique une plus grande force lorsque la rigidité est plus grande. La technique des microlames est surtout utilisée pour mesurer les forces d'adhésion de cellules. Mais elle peut aussi servir à déterminer des propriétés mécaniques comme le module d'élasticité du noyau des cellules [105].

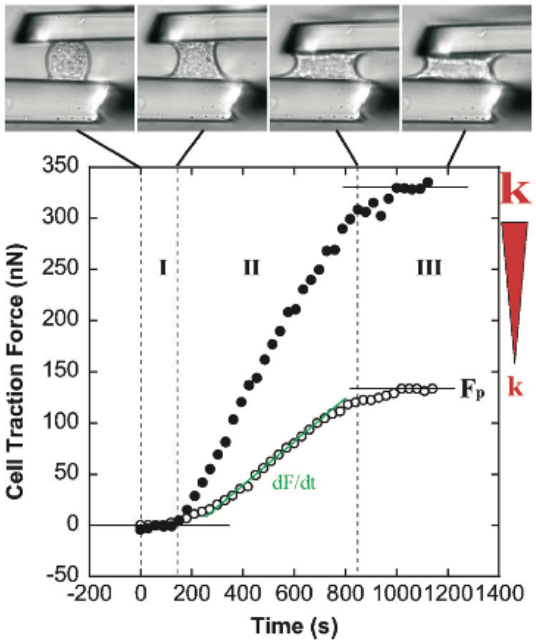

FIGURE I.31 – *Mesure de la force générée par la cellule lorsqu'elle s'étend entre deux lames. La cellule applique une plus grande force lorsque la rigidité de la lame flexible est plus grande* [104].

Déformation microfluidique

La méthode de la déformation microfluidique consiste à faire passer une cellule à travers un canal dont la section est plus petite que la cellule. La cellule doit alors se déformer pour passer dans le canal, ce qui est révélateur de sa rigidité. Une conception simple consiste en deux réservoirs contenant des cellules reliés par un canal. Par l'application d'une différence de pression entre les deux réservoirs, les cellules sont attirées vers le canal. Lorsqu'une cellule se présente à l'entrée du canal, elle va être aspirée dans le canal grâce à la différence de pression. Se faisant, elle se déforme, voyage le long du canal et arrive dans l'autre réservoir. Il a été montré qu'il est possible de différentier des cellules saines de cellules cancéreuses par cette technique [106]. En effet, si leurs vitesses à l'intérieur du canal sont les mêmes, le temps que les cellules mettent pour entrer dans le canal est lui différent (figure I.32). Cela permet donc de discriminer certains types de cellules ou des cellules infectées [107]. Il est possible de jouer sur la structure des canaux pour, par exemple, ajouter des zones de relaxation où la cellule n'est plus contrainte, ce qui améliore la discrimination des cellules [108]. Cette technique n'est cependant pas utilisée pour mesurer la rigidité des cellules.

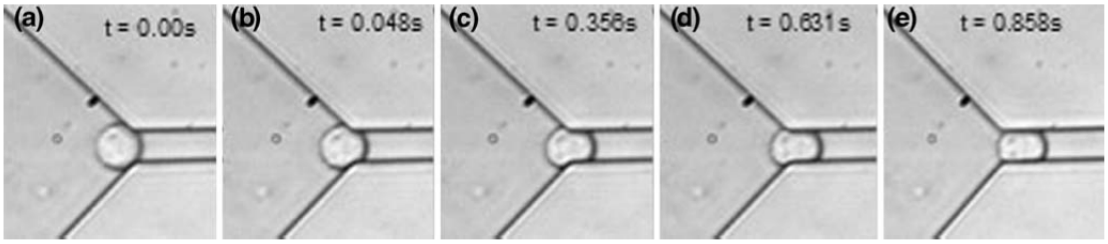

FIGURE I.32 – *Visualisation d'une cellule à l'entrée du canal à différents temps. La durée totale nécessaire pour entrer dans le canal n'est pas la même pour des cellules saines et des cellules cancéreuses faisant la même taille* [106].

Étirement optique

L'étude des pièges optiques montre qu'il est possible de capturer une particule diélectrique en utilisant un faisceau laser et, en attachant cette particule à une cellule, il est possible d'appliquer des forces sur la cellule. La technique d'étirement optique ressemble aux pièges optiques excepté le fait qu'elle nécessite deux faisceaux laser mais ne nécessite pas de particule extérieure à la cellule. En effet, quand un objet diélectrique, ce qui inclut les cellules, est placé entre deux faisceaux laser non focalisés, le total des forces appliquées sur l'objet est nul mais les forces surfaciques sont elles additives (figure I.33) [109]. Cela résulte en l'immobilisation de l'objet et en son étirement s'il est suffisamment élastique.

Cette technique a probablement été utilisée pour la première fois sur des cellules en 2001 par Guck *et al.* (figure I.34) [110]. Les auteurs ont ainsi pu déterminer le module de cisaillement des globules rouges. Depuis, d'autres mesures des propriétés mécaniques de cellules ont été étudiées par étirement optique comme dans [111]. Cette technique permet donc d'étudier des cellules sans contact direct et sans endommager les cellules. En effet, comme les faisceaux laser ne sont pas focalisés, les radiations que subit la cellule sont réduits car la densité de puissance est amoindrie.

Imagerie opto-acoustique

Une technique récente a été développée par B. Audoin de l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M) de Bordeaux et par M.-C. Durrieu de l'institut de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN) de Bordeaux [112]. Les travaux cités présentent la première utilisation de la technique d'acoustique picoseconde pour l'analyse des propriétés mécaniques cellulaires à une échelle subcellulaire. Le principe de cette technique utilise un laser femtoseconde qui envoie des pulsations sur

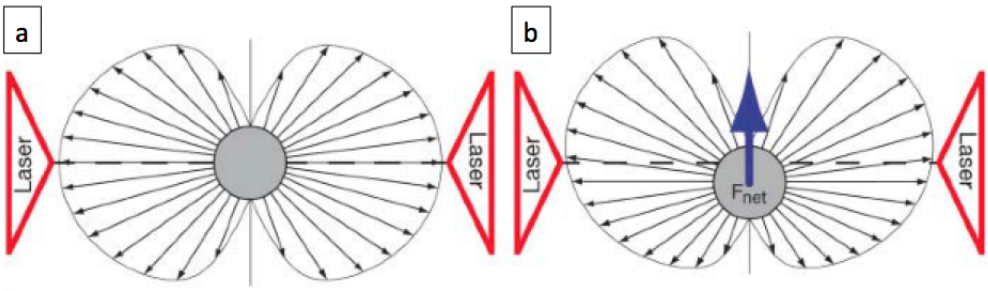

FIGURE I.33 – *Vue schématique des forces appliquées à la particule piégée entre les deux faisceaux laser. a) Les deux faisceaux sont parfaitement alignés et la particule se trouve dans l'axe des deux faisceaux : les forces surfaciques sur la particule sont donc identiques de part et d'autre de la particule, résultant en une force totale nulle. b) La particule n'est pas dans l'axe optique des deux faisceaux laser, ce qui implique que les forces surfaciques ne sont plus symétriques et donc la résultante des forces n'est plus nulle (grosse flèche bleue)* [109].

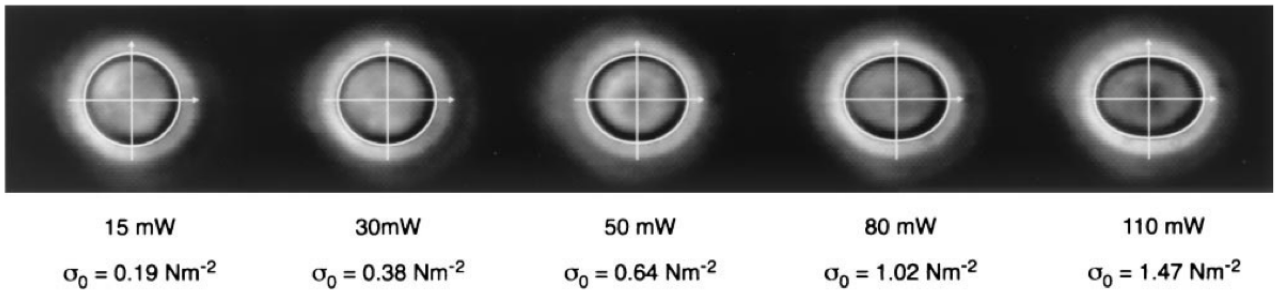

FIGURE I.34 – *Déformation d'un globule rouge par étirement optique pour différentes puissances optiques, et donc pour différentes contraintes mécaniques* [110].

un substrat en titane sur lequel se trouve la cellule d'intérêt (figure I.35). La couche de titane absorbe alors cette énergie et, grâce à la conversion thermoélastique, émet des ondes acoustiques, servant ainsi de transducteur opto-acoustique. Les ondes acoustiques se propagent à travers la cellule et sont réfléchies en fonction des propriétés mécaniques des différents constituants de la cellule. Cette méthode permet donc d'obtenir des images acoustiques qui sont images des propriétés mécaniques de la cellule ainsi que des forces d'adhésions à l'interface cellule/titane avec une résolution inférieure au micromètre.

La microscopie opto-acoustique a été utilisée pour étudier des cellules souches mesenchymateuses (hMSC). La figure I.36 montre les images acquises pour deux régions de la cellule : une région autour du noyau (colonne de gauche) et une région autour du lamellipode (colonne de droite) pour différentes fréquences des pulsations du laser. Les images sont comparées avec des images optiques classiques. On remarque que le contraste n'est pas le même en fonction de la fréquence des ondes. Pour une fréquence donnée, la différence de contraste correspond à une différence d'impédance acoustique, ce qui est révélateur des propriétés mécaniques. À 10 GHz, le noyau est très visible ainsi que la structure fibreuse du lamellipode. À 30 GHz, le noyau n'est plus visible mais on distingue toujours les contours de la cellule et, pour la partie proche du lameliipode, on observe des sites d'adhésion de la cellule avec le substrat. En revanche, à 85 GHz, seuls les contours de la cellule sont visibles. On obtient donc des informations sur les propriétés mécaniques subcellulaires ainsi que sur les forces d'adhésion de manière non invasive et avec une résolution inférieur au micromètre grâce à cette technique innovante.

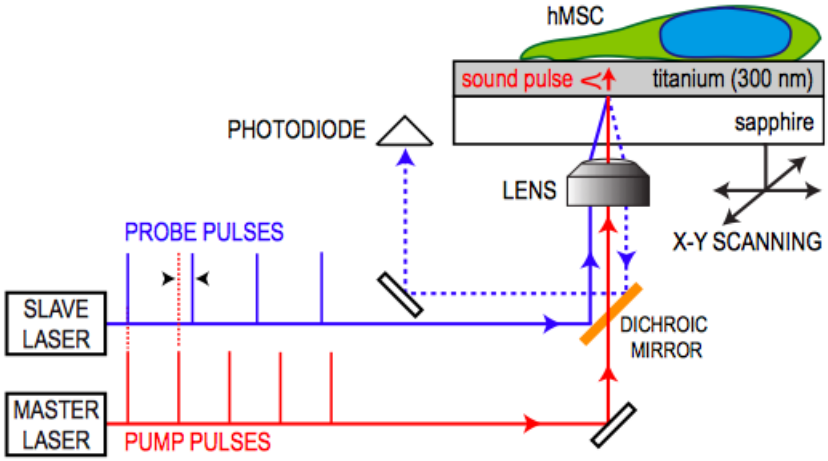

FIGURE I.35 – *Représentation du principe du microscope opto-acoustique. Deux lasers sont utilisés afin de créer des ondes acoustiques à large bande et détecter les ondes réfléchies* [112].

Suivi de l'adhésion des cellules

Une propriété qui peut être intéressante à évaluer est le suivi de l'adhésion de cellules sur une surface en fonction des propriétés physiques et/ou chimiques de cette surface. En effet, cela peut renseigner sur l'affinité qu'ont les cellules avec certaines protéines ou avec certains matériaux ainsi que sur le processus d'adhésion des cellules. Dans ce domaine, de nombreuses études sont faites grâce à l'utilisation de la microbalance à quartz (QCM). La QCM est, depuis les travaux de Sauerbrey [113], très connue et utilisée dans les évaporateurs afin de suivre et déterminer l'épaisseur déposée du matériau évaporé. Le principe repose sur la diminution de la fréquence de résonance du quartz lorsqu'un matériau est déposé dessus. Connaissant la masse volumique du matériau en question et la surface du quartz, il est alors possible de déterminer l'épaisseur déposée.

Parmi les premiers travaux utilisant la QCM pour l'étude de l'adhésion de cellules, on trouve ceux de G. Wegener *et al.* en 1998 [114]. Les auteurs ont ainsi suivi l'adhésion de trois types de cellules : deux types de cellules épithéliales notés MDCK-I et MDCK-II et un type de fibroblastes noté Swiss 3T3 (figure I.37). On peut remarquer dans un premier temps que la fréquence de résonance de la QCM ne suit pas une décroissance monotone et que, notamment pour les plus fortes concentrations de cellules, la fréquence remonte un peu après 100 minutes d'incubation et a tendance à redescendre par la suite. De plus, l'écart maximal en fréquence n'est pas le même en fonction du type de cellule. Les auteurs ont également observé l'influence de trois peptides (RGD, SDGRG et GRGDS) sur la vitesse d'adhésion des cellules MDCK-II. Si la séquence SDGRG ne semble pas affecter la vitesse d'adhésion des cellules, la séquence GRGDS semble inhiber l'adhésion des cellules. Ces premiers travaux ont permis de montrer le potentiel de la QCM pour l'étude de l'adhésion de cellules en temps réel.

Après ces premiers travaux, d'autres études sur l'adhésion des cellules ont vu le jour. On peut citer par exemple les travaux de M. S. Lord *et al.* [115]. Les auteurs mesurent à la fois les changements de fréquence de la QCM et les pertes. Ces deux paramètres dépendent de la masse déposée ainsi que des propriétés viscoélastiques et de la forme des cellules. Leur étude consiste à étudier comment une cellule remodèle la surface sur laquelle elle adhère en générant des protéines structurales en fonction de la protéine qui recouvre la surface de la QCM. Ils ont ainsi utilisé trois protéines différentes (albumine, fibronectine et sérum) sur deux surfaces différentes (tantalum et polystyrène oxydé). Ils ont également utilisé deux types de cellules : des fibroblastes non traitées et d'autres traitées avec de la cycloheximide qui empêche la production de la protéine structurale. Leurs conclusion sont que le procédé de remodelage est unique et dépendant de la protéine sur laquelle adhèrent les cellules ainsi que de la surface sous-jacente. De plus, les cellules traitées avec la cycloheximide semblent adhérer sur la surface

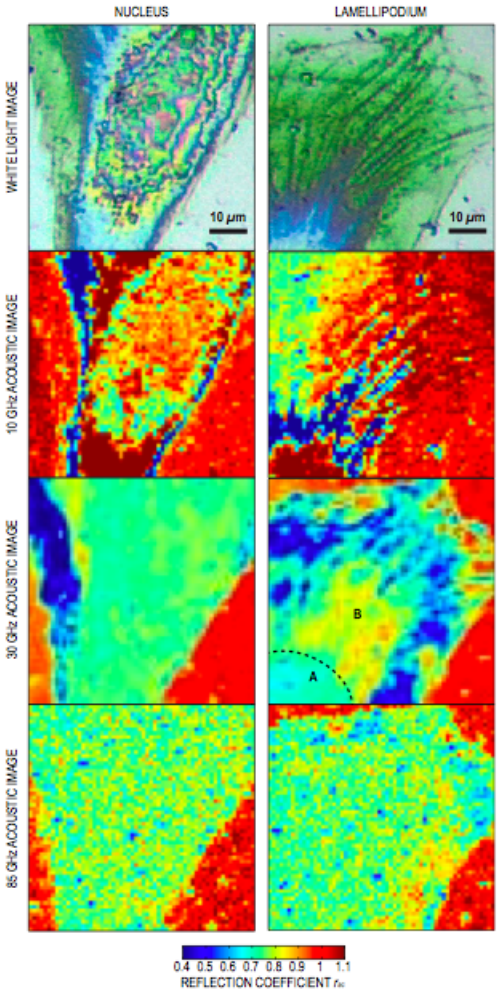

FIGURE I.36 – *Images d'une cellule hMSC proche du noyau (colonne de gauche) et proche du lamellipode (colonne de droite). La première ligne correspond à des images optiques classiques. Les six autres images ont été acquises par microscopie opto-acoustique pour des fréquences de 10 GHz, 30 GHz et 85 GHz* [112].

sans remodeler cette dernière, confirmant la non production de la protéine structurale.

La microbalance à quartz est donc une technique de mesure qui peut s'adapter à l'étude de l'adhésion de cellules en temps réel et peut permettre de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les cellules et la surface d'adhésion. D'autres travaux peuvent être cités dans ce domaine d'étude [116, 117].

De nombreuses études sont faites sur le suivi de l'adhésion de cellules à l'aide de la QCM. Cependant, des mesures d'impédance peuvent également être utilisés dans ce but. Un premier exemple est les travaux de J. M. Atienza *et al.* où une matrice de capteurs est utilisée afin de suivre l'adhésion et l'étalement de cellules fibroblastes NIH3T3 (figure I.38) [118]. Le système développé comporte plusieurs capteurs (figure I.38a) composé eux-mêmes d'une matrice de microélectrodes. Le principe de la mesure repose sur le changement d'impédance électrique lorsqu'une cellule adhère sur les électrodes. Afin de quantifier les changements d'impédance, les auteurs utilisent ce qu'ils appellent l'indice de cellule (cell index) noté CI qui correspond à :

$$CI = \max_{i=1,\dots,N} \left(\frac{R_{cell}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right) \tag{I.8}$$

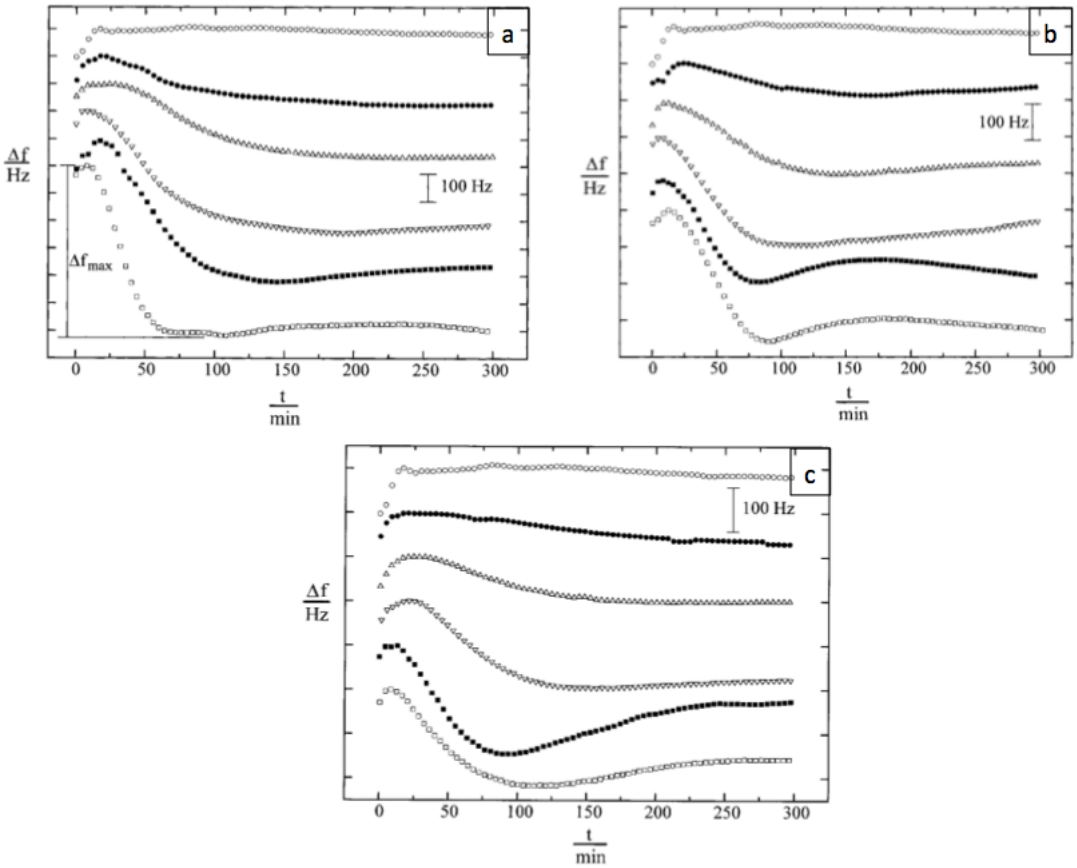

FIGURE I.37 – *Mesure de l'écart en fréquence de la QCM en fonction de la durée d'incubation des cellules pour les cellules a) MDCK-II, b) MDCK-I et c) Swiss 3T3. Pour chaque graphe, la première courbe représentée par des cercles vides correspond à la mesure sans cellule. Les autres courbes correspondent à des mesures pour différentes concentrations de cellules, allant de* 5.10^4 *cellules/cm*^{2} *à* $1,5.10^6$ *cellules/cm*^{2} [114].

avec $R_b(f)$ la résistance d'une électrode sans cellule et $R_{cell}(f)$ la résistance avec présence d'une cellule. Ces résistance dépendent de la fréquence et N est le nombre de fréquences auxquelles la résistance est mesurée.

En utilisant cette technique, l'adhésion et l'évolution des cellules NIH3T3 ont été suivies pour deux types de protéines d'adhésion : la fibronectine et la poly-L-lysine (figure I.39a). On remarque que l'indice de cellule n'augmente que légèrement en ce qui concerne la poly-L-lysisne et semble évoluer plutôt linéairement avec la durée d'incubation. En revanche, avec la fibronectine, l'indice de cellule augmente rapidement pour atteindre un maximum aux alentours de 1h15 d'incubation et pour ensuite diminuer légèrement (cela correspond aux résultats de la QCM de la référence [114] dans la forme de la courbe). Une plus grande élévation de l'indice de cellule signifie que plus de cellules adhèrent sur la surface et/ou que les cellules s'étalent plus facilement. Afin de visualiser la forme des cellules, des images au microscope fluorescent ont été prises pour différentes durées d'incubation (figure I.39b). On observe que les cellules incubée sur la poly-L-lysine sont restées rondes alors que celles incubées sur la fibronectine se sont bien étalées. Cela explique la différence de forme des deux courbes où la mesure faite avec la poly-L-lysine n'est due qu'au nombre de cellules alors que celle effectuée avec la fibronectine prend également en compte l'étalement des cellules qui fait augmenter l'indice de cellule.

Dans cette même étude, les auteurs étudient également l'influence de la protéine-tyrosine kinases de la famille Src qui est connue pour participer à l'attachement et à l'étalement des cellules. Des

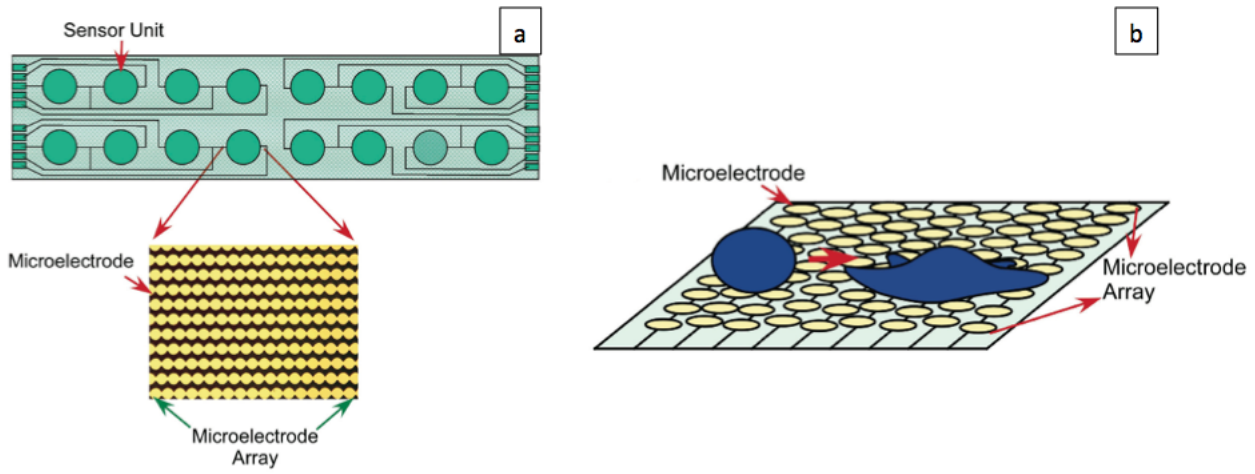

FIGURE I.38 – *a) Représentation du système de mesure comprenant plusieurs capteurs. Chaque capteur est composé d'une matrice de microélectrodes servant à la détection des cellules. b) L'adhésion d'une cellule commence avec une forme ronde pour la cellule, puis cette dernière opère des changements de forme et s'étale sur un plus grand nombre d'électrodes. Ce faisant, la cellule interagit avec plus d'électrodes, ce qui augmente l'impédance mesurée.* [118].

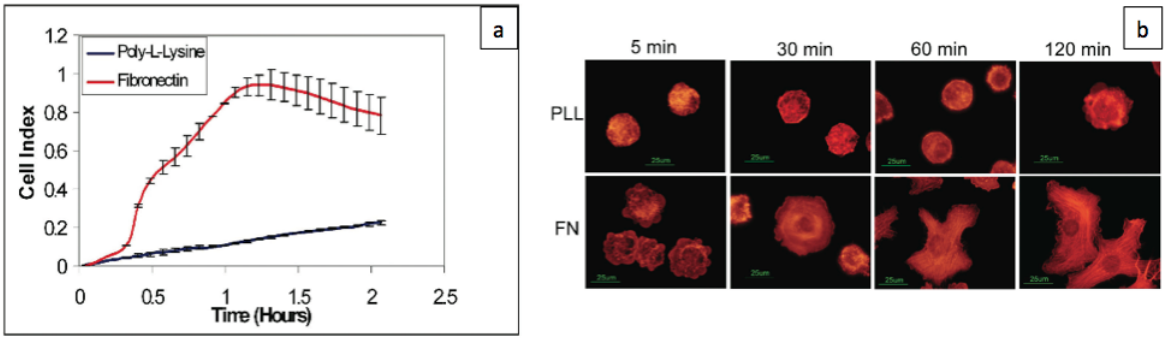

FIGURE I.39 – *a) Mesure de l'indice de cellule en fonction de la durée d'incubation des cellules et pour deux recouvrement de la surface avec de la fibronectine et de la poly-L-lysine. b) Image au microscope fluorescent des cellules à différentes durées d'incubation après fixation* [118].

cellules ont été traitées avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) et servent de mesure de contrôle, alors que d'autres cellules ont été traitées avec du PP2 qui est un inhibiteur de la protéine-tyrosine kinases Src. Les résultats sont présentés sur la figure I.40. On observe effectivement qu'en présence de la PP2 les cellules adhèrent moins bien sur la surface que sans cet inhibiteur, confirmant l'importance de la protéine-tyrosine kinases Src dans le processus d'attachement et d'étalement des cellules.

Dans la même idée, Prakash *et al.* ont étudié l'adhésion de cellules en utilisant des capteurs capacitifs basés sur la technologie CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) [119]. Il ont ainsi suivi l'adhésion de cellules bovines musculaires BAOSMC et les résultats sont présentés sur la figure I.41. On observe qu'il existe une première durée de sédimentation des cellules pour laquelle la capacité ne varie pas. Quand les cellules commencent à adhérer, la capacité augmente et atteint une valeur maximale lorsque les cellules ont fini d'adhérer. Deux remarques peuvent être faites concernant ces mesures : la première est que les durées de sédimentation et d'adhésion sont différentes pour les six mesure effectuées. De plus, contrairement aux résultats de la QCM [114] et de la mesure de la résistance [118], on ne retrouve pas la phase ou la courbe descend (ou monte) après avoir atteint une valeur maximale (ou minimale). Cela semble montrer que le capteur capacitif développé n'est pas

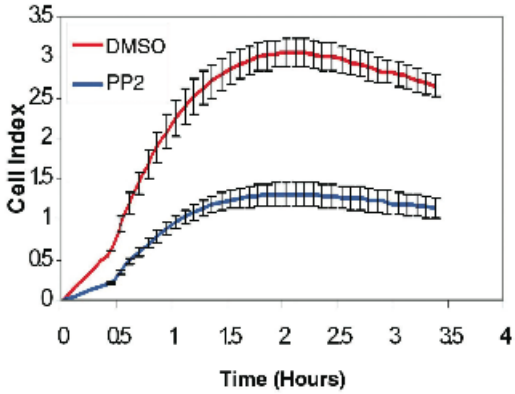

FIGURE I.40 – *Mesure de l'indice de cellule en fonction de la durée d'incubation pour des cellules traitées avec le PP2 et des cellules non traitées* [118].

sensible aux mêmes propriétés, notamment à l'étalement des cellules.

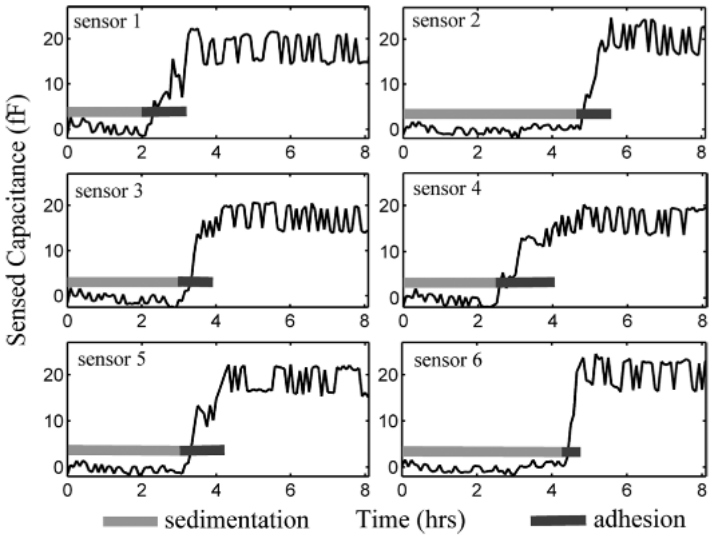

FIGURE I.41 – *Mesure de la capacité en fonction de la durée d'incubation de cellules BAOSMC pour six capteurs différents* [119].

Ces travaux montrent le potentiel des mesures d'impédance pour l'étude et le suivi en temps réel de l'adhésion des cellules sur une surface. Lors de l'adhésion des cellules, la première caractéristique mesurée est le nombre de cellules qui adhèrent, puis vient l'étalement des cellules qui influence aussi les différents systèmes de mesures. Il faudrait pouvoir réussir à décorréler ces deux informations pour mieux comprendre le procédé d'adhésion des cellules.

Le tableau I.2 permet de visualiser ce que permet de mesurer chacune des techniques mentionnées précédemment (hormis les quatre techniques principales).

I.2.6 Conclusions

Bien que l'étude des cellules ne soit pas chose aisée, il existe un grand nombre de différentes techniques qui permettent l'étude de leur biomécanique. D'autres techniques n'ont pas été citées comme l'utilisation d'un écoulement liquide pour appliquer une contrainte de cisaillement aux cellules [120]. Toutes ces techniques permettent d'étudier différents aspects de la biomécanique des cellules et

Technique de mesure	Caractéristique mesurée
Microscopie acoustique	• Densité • Impédance acoustique • Module de compressibilité
Microscopie opto-acoustique	• Caratographie des propriétés mécaniques subcellulaires • Cartographie des forces d'adhésion
Microlames	• Forces générées • Déformabilité
Microfluidique	• Déformabilité • Discrimination de cellules
Étirement optique	• Module de cisaillement • Propriétés viscoélastiques
QCM / Mesure d'impédance	• Suivi de l'adhésion de cellules • Masse

TABLE I.2 – *Récapitulatif des propriétés mesurées pour les autres techniques de mesure.*

de mieux comprendre le rôle que jouent les propriétés mécaniques dans les fonctions des cellules. Parmi les techniques évoquées, l'AFM est sûrement l'outil le plus polyvalent : il permet d'imager une cellule tout en mesurant une cartographie des propriétés mécaniques, le tout en milieu liquide. Mais l'AFM connait également ses limites, comme le temps d'acquisition important, et il ne peut pas, par exemple, appliquer un couple sur les cellules. De plus, l'AFM permet de mesurer des propriétés mécaniques de surface mais ne peut pas mesurer, par exemple, la distribution des forces générées par une cellule. C'est pourquoi d'autres techniques sont développées, comme les pinces magnétiques, et notamment les MEMS qui sont décrits dans la section I.3.

I.3 Utilisation des MEMS

I.3.1 Généralités sur les MEMS

L'acronyme MEMS signifie MicroElectroMechanical Systems (microsystèmes électromécaniques en français). Le développement des MEMS a débuté dans les années 70, en s'appuyant notamment sur la technologie de la microélectronique déjà existante pour le silicium. Ce domaine a alors connu un développement très rapide et des MEMS sont commercialisés dès les années 80, notamment des capteurs de pression. De nos jours, les MEMS sont omniprésents car la quasi totalité des systèmes actuels nécessite des capteurs et/ou des actionneurs de très petite taille, ce que sont les MEMS.

Les MEMS sont des systèmes de petite taille (de la dizaine de micromètres au millimètre) avec au moins une dimension micrométrique. Comme leur nom l'indique, ce sont des systèmes électromécaniques. Cela veut dire qu'ils font la transduction du domaine électrique vers le domaine mécanique, et *vice versa*. Les MEMS sont utilisés en tant qu'actionneurs et en tant que capteurs. Dans les appli-

cations actionneurs, un signal est appliqué au MEMS qui le transforme en un mouvement mécanique. Ce signal est très souvent électrique, mais l'actionnement peut aussi se faire grâce à la température, un signal optique ou encore un signal électromagnétique. Dans les applications capteurs, il se produit l'effet inverse, à savoir qu'un mouvement mécanique dû à l'interaction entre l'entité à mesurer et le MEMS crée un signal qui est mesuré. Ce signal est généralement un signal électrique, mais il peut également être optique.

Le but ici n'est pas de développer toute la théorie sur les MEMS mais plutôt d'avoir un aperçu de leur fonctionnement et de leur utilisation afin de comprendre leur intérêt. Pour plus de précisions, il est possible de se référer à [121, 122, 123, 124].

Types de MEMS

Il existe essentiellement trois types de structures mécaniques de MEMS (figure I.42) : les leviers, les ponts et les membranes. Les leviers sont des structures encastrées mécaniquement à une extrémité et libre de l'autre. Les ponts sont des structures encastrées aux deux extrémités, et les membranes sont des structures encastrées sur tout leur pourtour ou, du moins, à plusieurs endroits.

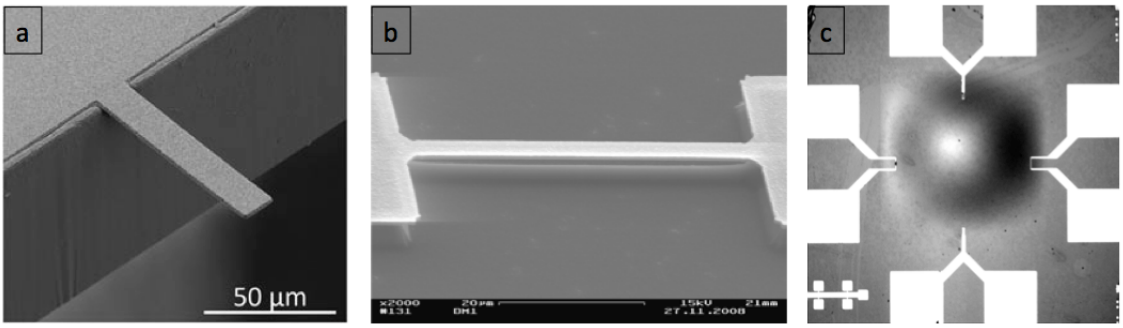

FIGURE I.42 – *Les trois types de MEMS : a) un levier (source : http ://www.microchem.com), b) un pont (source : http ://www.nanodiamond.co.uk) et c) une membrane (source : http ://montes.phelma.grenoble-inp.fr).*

Les MEMS de type pont sont très utilisés comme actionneur pour réaliser des interrupteurs [125, 126] mais ils ne sont pas couramment utilisés comme capteur. On trouve beaucoup de MEMS de type membrane dans les micropompes, où une fine membrane est actionnée afin de créer une dépression puis une surpression et ainsi assurer la fonction d'une pompe. C'est par exemple ce qui est utilisé dans les imprimantes à jet d'encre. Les membranes sont également utilisées dans des applications de type capteur, comme par exemple pour réaliser un capteur de pression [127]. Enfin, les MEMS de type levier sont probablement les plus utilisés pour les applications de type capteur. Les leviers présentent l'avantage d'être facilement réalisables et les équations associées à leurs modes de résonance sont également facilement abordables. À titre d'illustration, les leviers sont utilisés dans l'AFM, pour des capteurs de force [128], de masse [129] ou encore pour la détection de gaz [130]. Étant donné que les MEMS de type levier sont utilisés dans cette étude, une attention particulière sera portée pour ces derniers dans ce qui suit.

Modes statique et dynamique

En tant que capteurs, les MEMS peuvent fonctionner selon deux modes : le mode statique ou le mode dynamique. Dans le mode statique, l'entité que l'on souhaite caractériser modifie les contraintes mécaniques du MEMS de façon asymétrique, ce qui, dans le cas des leviers, se traduit par une déflexion du levier (figure I.43). Ce mode peut également être utilisé pour mesurer une force : la force appliquée crée une déflexion du levier qui est mesurée et permet de déterminer cette force, en connaissant les

propriétés mécaniques et géométriques du levier.

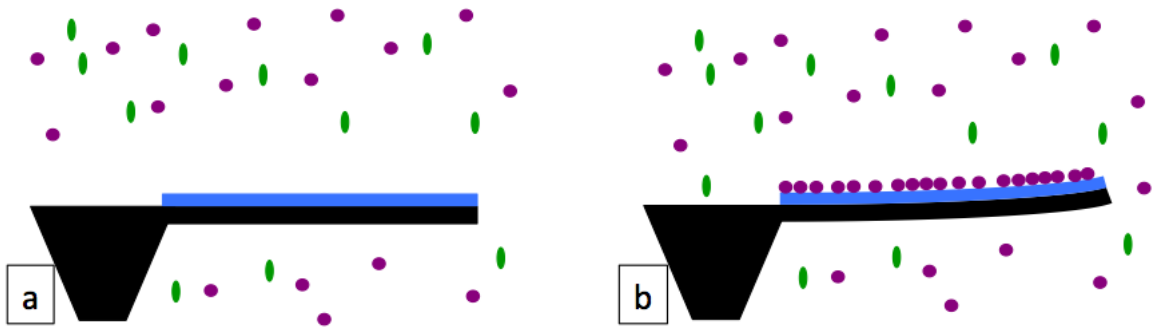

FIGURE I.43 – *Principe de l'utilisation des leviers en mode statique : a) le levier est droit en l'absence de particules adsorbées et b) les contraintes mécaniques dues aux particules adsorbées conduisent à la déflexion du levier qui est mesurée.*

Le mode dynamique consiste à faire entrer les leviers en résonance. En effet, si on excite les leviers avec des signaux alternatifs, ces derniers vibrent. Comme pour toute structure mécanique, il existe des fréquences pour lesquelles les leviers entrent en résonance et leur mouvement est alors amplifié. Les fréquences de résonances dépendent de la géométrie des leviers mais également de leur masse et de leurs propriétés mécaniques. Il existe quatre façons de résonner pour un levier parallélepipédique : en flexion transverse hors plan, en flexion latérale dans le plan, en torsion et en élongation dans le plan (figure I.44). Pour chacun de ces types de vibration, il existe également différents modes de vibration qui ont lieu pour différentes fréquences.

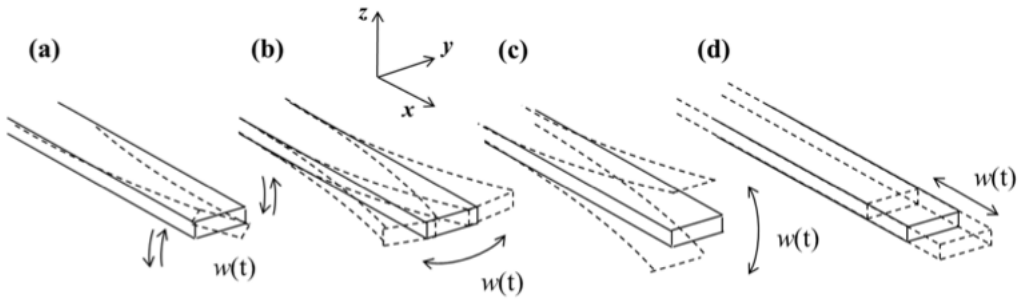

FIGURE I.44 – *Mouvement d'un levier a) en torsion, b) en flexion dans le plan, c) en flexion hors plan et d) en élongation dans le plan* [131].

Étant donné que la fréquence de résonance d'un levier dépend de sa masse et de ses propriétés mécaniques, il est possible de l'utiliser en mode dynamique afin de déterminer la masse d'une entité mesurée ainsi que ses propriétés mécaniques. En effet, si l'on met en vibration un levier et que, par exemple, des entités biologiques se mettent sur ce levier, sa masse globale va être modifiée, ce qui peut être détecté en mesurant les changements de la fréquence de résonance lors de l'ajout des molécules biologiques. La fréquence de résonance dépend aussi de la densité et de la viscosité du milieu dans lequel vibrent les leviers, ce qui permet de déterminer ces deux caractéristiques comme nous le verrons dans le chapitre 4.

Utilisation des MEMS

Les MEMS peuvent être utilisés comme actionneur ou comme capteur. De nos jours, il existe un grand nombre d'applications des MEMS pour réaliser ces deux fonctions. De part leur petite taille et leurs performances, les MEMS sont de parfaits candidats dans les systèmes embarqués. Si l'on pense aux MEMS comme actionneur, l'exemple des micromiroirs vient rapidement en tête. En effet, dans les vidéo-projecteurs, il existe une matrice de micromiroirs qui sont actionnés selon deux positions : une position "on" et une position "off". Chaque miroir correspond à un pixel de l'image. Un exemple de micromiroirs est présenté sur la figure I.45 [132]. L'actionnement de ces micromiroirs se fait à l'aide de MEMS et cela a grandement contribué à la démocratisation des vidéo-projecteurs. Les actionneurs MEMS sont également très utilisés pour réaliser des commutateurs à haute fréquence, où la déformation d'un levier ou d'un pont permet de relier deux pistes conductrices.

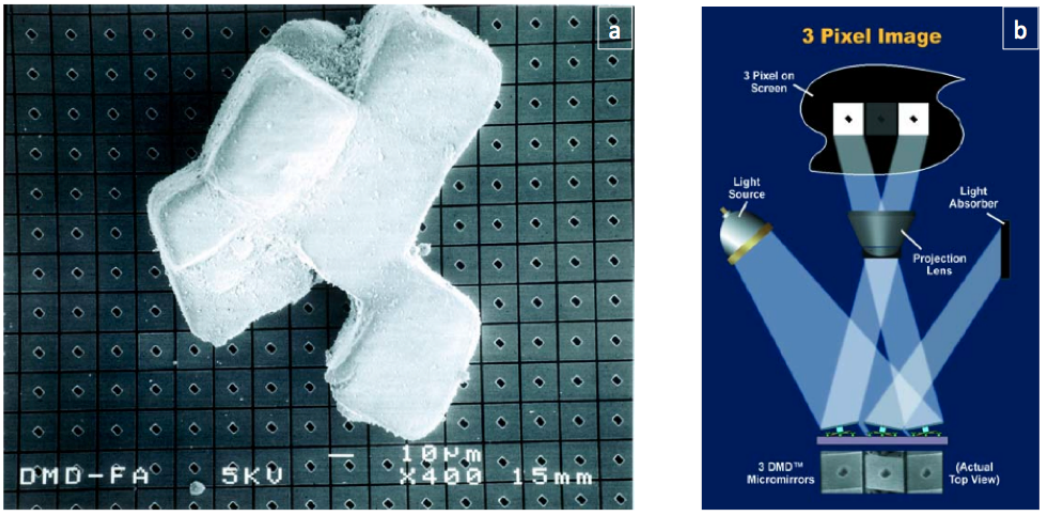

FIGURE I.45 – *a) Une matrice de micromiroirs utilisés dans les video-projecteurs comparés à un grain de sel. b) Principe de fonctionnement où une source lumineuse éclaire les micromiroirs et, en fonction de l'orientation des micromiroirs, ces derniers renvoient la lumière soit vers une lentille, ce qui donne un pixel allumé, soit vers un absorbeur de lumière, ce qui donne un pixel éteint* [132].

Une utilisation très répandue des MEMS se trouve dans les accéléromètres. De nos jours, des accéléromètres sont intégrés dans tous les smartphones ainsi que dans tous les systèmes de déclenchement d'airbags. Une structure type d'un accéléromètre capacitif est présentée sur la figure I.46 [133]. Une masse est accrochée à des leviers qui peuvent se déformer. Sur cette masse se trouvent des doigts qui sont insérés entre des doigts fixes : cela forme des capacités électriques. Sous l'effet d'une accélération, la masse bouge ainsi que les doigts qui y sont accrochés. Se faisant, la distance entre les doigts mobiles et les doigts fixes change, ce qui modifie la valeur de la capacité et permet ainsi de déterminer l'accélération que subit le système. Ceci n'est qu'un exemple de l'utilisation de MEMS en tant que capteur. Les MEMS pouvant être sensibles à beaucoup de paramètres comme la température, l'accélération, la pression, l'humidité, la lumière, etc., de nombreux capteurs à base de MEMS sont créés pour réduire l'encombrement et les puissances consommées et ainsi pouvoir être intégrés dans des systèmes embarqués.

I.3.2 Les MEMS pour l'étude des cellules

Les MEMS permettent l'intégration d'actionneurs et de capteurs miniaturisés et performants, et sont utilisés dans de nombreux domaines. Leurs faibles dimensions les rendent très sensibles à de faibles variations de masse, de température, de pression, etc. Il n'est donc pas surprenant de trouver

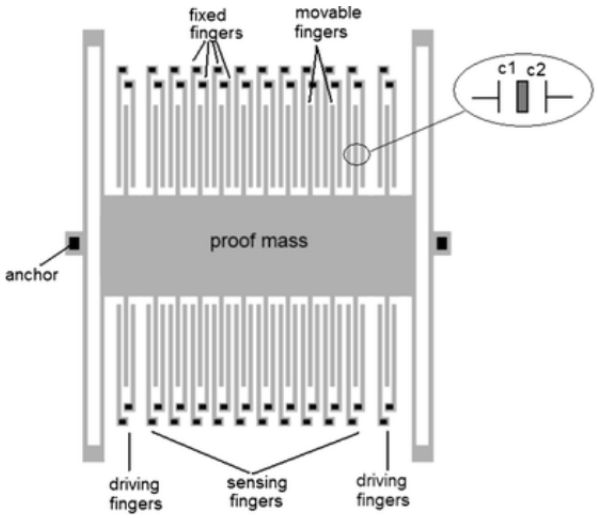

FIGURE I.46 – *Exemple d'un accéléromètre capacitif* [133].

des MEMS dans des applications biologiques. Les applications vont de la délivrance de médicaments *in vivo* [134] à l'étude de la cellule unique [135]. Dans un premier temps, l'étude sera focalisée sur les MEMS en matériaux inorganiques.

Les MEMS sont traditionnellement fabriqués à base de matériaux inorganiques, et notamment à base de silicium. Les MEMS inorganiques sont donc les plus répandus et ils trouvent un grand nombre d'applications dans les domaines biologiques. Même si l'AFM a été traité à part dans ces travaux, il est un exemple de MEMS inorganique qu'on pourrait inclure dans cette section puisque son principe repose sur la mesure de la déformation ou de la fréquence de résonance d'un microlevier.

Mesure des forces de traction

Galbraith et Sheetz sont probablement les premiers à avoir utilisé des MEMS pour mesurer les forces de traction exercées par des fibroblastes [136]. Leur système consiste en une matrice de pads reliés à des microleviers (figure I.47). La surface des pads va de $4\,\mu m^2$ à $25\,\mu m^2$ et la rigidité des leviers est de $75\,nN/\mu m$. Lorsque les cellules migrent sur la surface, elles s'accrochent sur les pads et exercent une force qui déforme les leviers. La déformation des leviers est mesurée optiquement afin de déterminer la force exercée par les cellules. Les auteurs ont ainsi démontré que l'amplitude de la force exercée par les fibroblastes (jusqu'à 100 nN) ainsi que sa direction diffèrent en fonction de la partie du fibroblaste qui exerce cette force. Le problème de cette méthode est que les leviers ne sont sensibles aux forces que selon une seule direction et ne permet pas d'obtenir la distribution des forces sur toute la cellule. Bien que de nos jours ces mesures se font plus volontiers par microscopie à force de traction (TFM) qui permet d'obtenir une cartographie des forces de tractions exercées par une cellule, l'utilisation de leviers offre une méthode simple pour calculer ces forces. La combinaison de ces deux techniques est cependant utilisée en utilisant des micropiliers verticaux en matériau souple et est développée dans la section I.3.3.

Mesure des forces de contraction

Les MEMS ont également été utilisés pour mesurer la force exercée par une seule cellule cardiaque et déterminer comment sa contractilité dépend de la densité, de la structure et de l'organisation sarcomérique. Avant l'avènement des capteurs MEMS, les mesures des forces de contraction des muscles cardiaques se limitaient aux tissus. Afin de mesurer les forces de contraction d'une cellule seule, Lin *et al.* ont développé un capteur de force en polysilicium (figure I.48) [137]. Les auteurs ont ainsi déterminé une force maximale de 12,5 µN. Ils ont également mesuré l'influence de la concentration de calcium

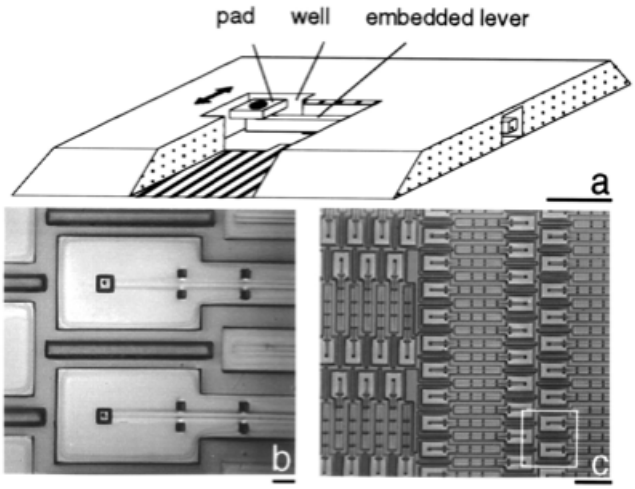

FIGURE I.47 – *Principe du système de mesure avec a) une illustration d'un pad relié à son levier, b) un zoom sur deux pads et c) une vue d'ensemble de la matrice du système* [136].

sur la contractilité de la cellule en immergeant le capteur dans des chambres microfluidiques.

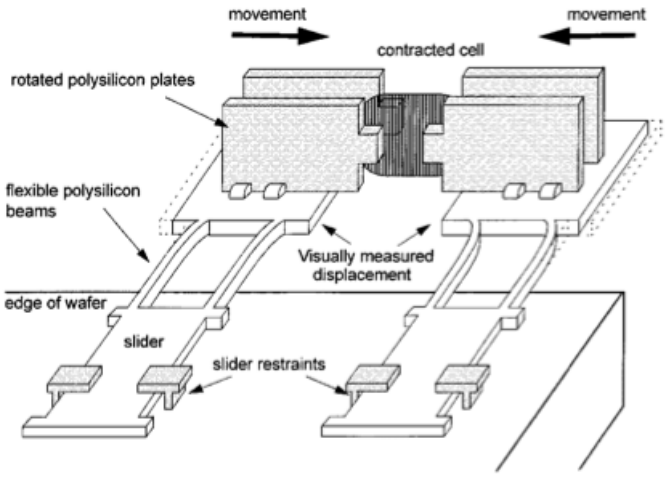

FIGURE I.48 – *Système de mesure des forces de contraction d'une cellule cardiaque développé par Lin et al. où les forces exercées par la cellule déforment les leviers* [137].

Plus récemment, T. D. Nguyen *et al.* ont développé un système de nanorubans piézoélectriques en PZT afin d'étudier la déformation mécanique de cellules neuronales et les forces exercées par ces dernières lorsqu'elles sont soumises à une stimulation électrique [138]. En effet, l'application d'une tension électrique au niveau de la membrane d'une cellule neuronale modifie la tension de la membrane à cause d'une dépolarisation. Afin de maintenir la pression constante le long de la membrane, la cellule se déforme mécaniquement en modifiant son rayon. Afin de mesurer cette déformation et les forces qui en résultent, le système utilise une matrice de nanorubans piézoélectriques en PZT (figure I.49a). La force qu'exerce la cellule lorsqu'elle est stimulée crée une déflexion du nanoruban qui est mesuré par l'effet piézoélectrique direct. De plus, une pipette vient par dessus la cellule afin d'appliquer et mesurer la tension électrique au niveau de la membrane. Les auteurs ont ainsi pu relier la force appliquée par la cellule, qui est une image de la déformation mécanique de celle-ci, en fonction de la tension électrique au niveau de la membrane (figure I.49b).

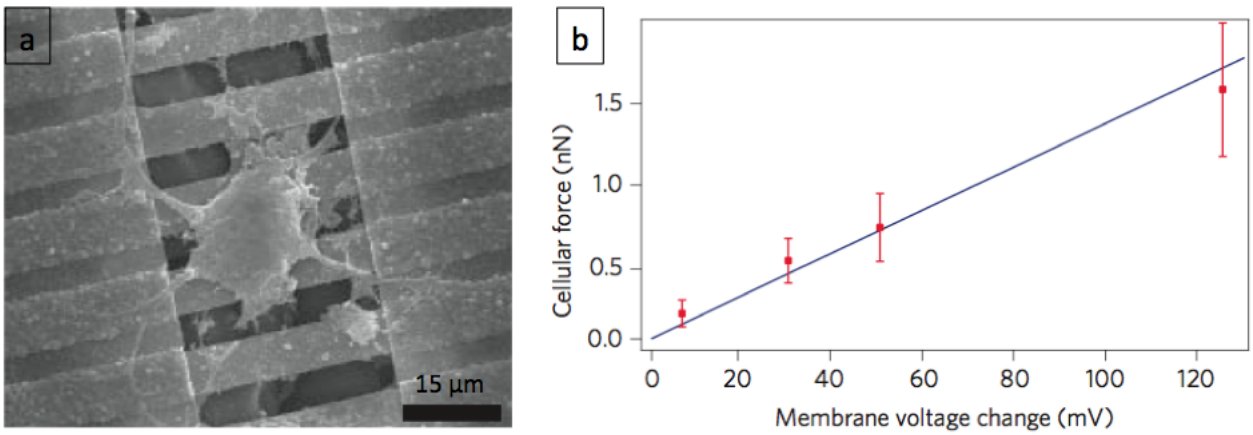

FIGURE I.49 – *a) Image au MEB d'une cellule sur les nanorubans piézoélectriques et b) relation entre le changement de la tension électrique au niveau de la membrane et la force exercée par la cellule lorsqu'elle se déforme* [138].

Mesure de la rigidité

Les capteurs de force MEMS offrent des avantages pour la mesure des propriétés mécaniques de cellules grâce à leurs faibles dimensions et à leur grande résolution en force. Sun *et al.* ont développé un capteur avec une sonde dont la force appliquée est mesurée électrostatiquement (figure I.50) [139]. Les propriétés mécaniques d'ovocytes de souris ont ainsi été mesurées et il a été démontré que ces cellules sont 2,5 fois plus dures après fertilisation, avec un module d'Young passant de 17,9 kPa à 42,2 kPa.

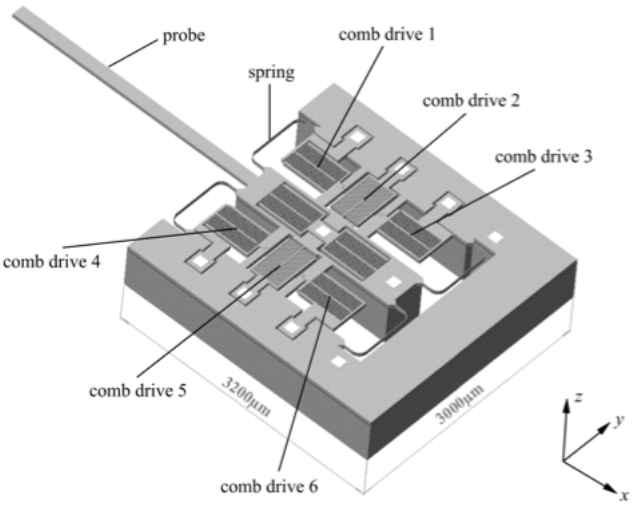

FIGURE I.50 – *Système de mesure des propriétés mécaniques d'ovocytes de souris développé par Sun et al.* [139].

Un autre capteur de force a été développé afin d'appliquer de grandes déformations et de grandes forces pour étudier la réponse d'une cellule soumise à d'importantes contraintes mécaniques [140]. Le principe est de mesurer optiquement la déformation d'une sonde afin de déterminer la réponse en force de la cellule. Il a été trouvé que cette réponse en force en fonction de la déformation est linéaire, réversible et répétable pour des fibroblastes. D'autres systèmes permettent d'appliquer une tension uniaxiale [141] ou encore de pouvoir travailler en milieu liquide électriquement très conducteur [142].

Détection de cellules

Les MEMS sont utilisés pour l'étude des propriétés mécaniques de cellules, mais ils peuvent également servir pour la détection de cellules spécifiques ou pour mesurer leur masse durant leur développement [135]. Dans la publication citée, le capteur consiste en une plateforme carrée reliée à quatre leviers (figure I.51). La plateforme est utilisée dans son premier mode de vibration hors plan et montre une sensibilité en masse très uniforme sur toute sa surface (erreur $< 4\,\%$). L'augmentation de la masse des cellules pendant leur développement a été mesurée (figure I.52). Il a ainsi été déterminé que la masse de cellules épithéliales augmente de 3,25 % par heure. De plus, les auteurs ont pu également déterminer le module d'Young des cellules grâce à leurs mesures et en utilisant un modèle masse-ressort-amortisseur, et une valeur moyenne de 4,09 kPa a été déterminée.

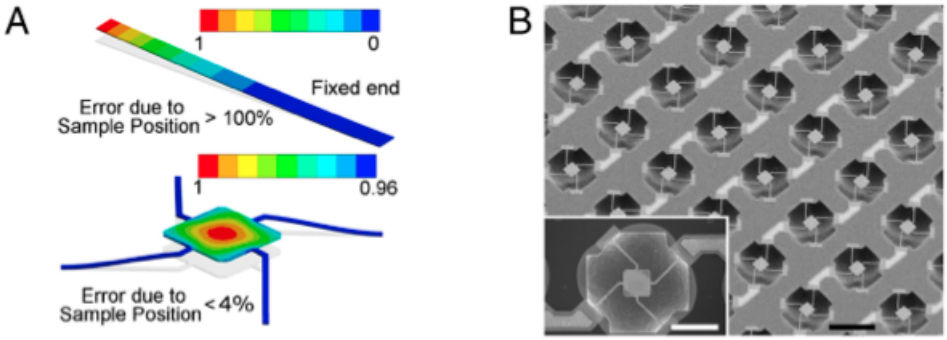

FIGURE I.51 – *a) Sensibilité en masse d'un levier et d'une plateforme en fonction de la position de la masse. b) Image au SEM d'une matrice de capteurs avec un zoom sur une plateforme* [135].

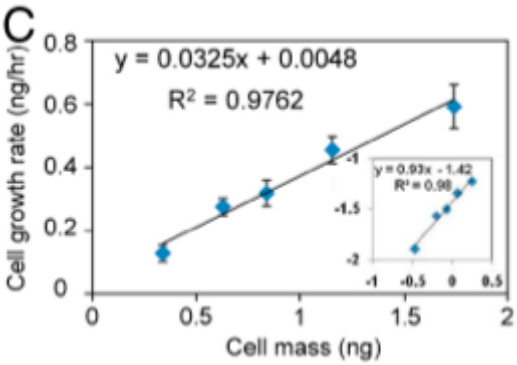

FIGURE I.52 – *Évolution de l'augmentation de la masse en fonction de la masse des cellules* [135].

Il est également possible de détecter certains types de cellule en utilisant des MEMS. Pour cela, Etayash *et al.* ont utilisé une série de leviers fonctionnalisés avec des peptides afin de ne capturer que des cellules cancéreuses et permettre ainsi de les détecter parmi des cellules saines [143]. La détection des cellules se fait par la déflexion des leviers lorsque les cellules adhèrent dessus. D'après les mesures de la figure I.53, on observe que les leviers captent aussi des cellules saines (MCF10A) mais à un taux moins important que pour les cellules cancéreuses (MCF7). De plus, cette étude semble montrer qu'il est possible de détecter des cellules cancéreuses pour une faible concentration de 25 cellules par millilitre.

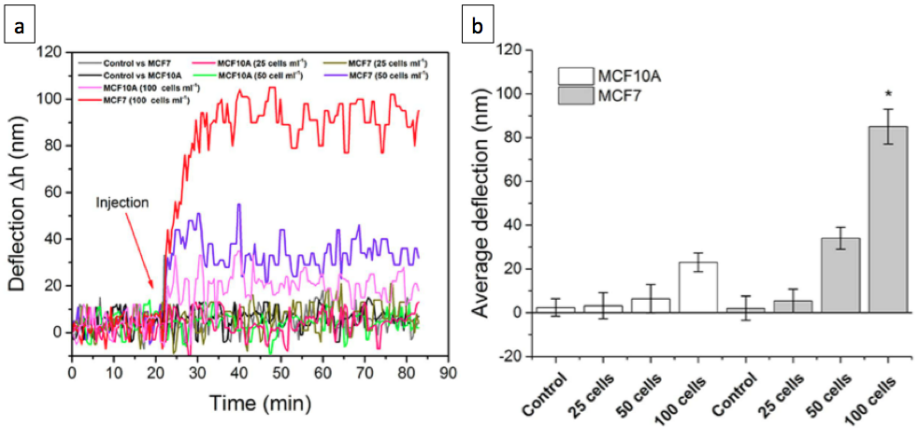

FIGURE I.53 – *a) Mesure de la déflexion des leviers pour des cellules épithéliales mammaires saines MCF10A et pour des cellules tumorales mammaires MCF7. b) Valeurs moyennes de déflexion des leviers pour les MCF10A et les MCF7 pour différentes concentrations de cellules* [143].

Levier microfluidique hybride

En 2013, Byun *et al.* ont développé un microlevier qui intègre un canal microfluidique dans le but d'étudier des cellules cancéreuses (figure I.54a) [144]. Leur démarche est d'utiliser le canal microfluidique pour contraindre la cellule à se déformer et la mesure de la fréquence de résonance du levier est utilisée pour suivre le parcours de la cellule dans le canal (figure I.54b). En effet, lorsque la cellule arrive en bout de levier, l'effet de masse est plus important, ce qui se traduit par une forte diminution de la fréquence de résonance (position 2 par rapport au schéma). Ensuite, la cellule poursuit sont parcours pour retourner vers l'encastrement du levier, ce qui se traduit par une augmentation de la fréquence (position 3). Lorsqu'elle arrive au niveau de l'étranglement, sa vitesse diminue et elle met un certain temps avant d'entrer entièrement dedans, faisant augmenter la fréquence très doucement. Enfin, une fois entrée dans l'étranglement, sa vitesse augmente et la cellule ressort de l'étranglement (position 4) puis retourne vers l'encastrement (position 5). Grâce à cette mesure, il est alors possible de déterminer la masse apparente de la cellule dans le liquide ainsi que sa durée d'entrée dans l'étranglement et sa durée de transition dans ce dernier. La durée d'entrée dans l'étranglement renseigne donc sur la déformabilité de la cellule et sa durée de transition sur les frictions de surface de la cellule (comme pour la technique d'aspiration par micropipette).

En utilisant ce système, les auteurs ont ainsi pu étudier un grand nombre de cellules (quelques milliers par heure) afin de comparer des lignés de cellules cancéreuses dont le potentiel métastatique est connu. Il est ainsi observé que les cellules ayant un plus fort potentiel métastatique possède également les plus grandes vitesses d'entrée dans l'étranglement ainsi que les plus grandes vitesses de transition (figure I.55). On remarque qu'une plus grande vitesse d'entrée est accompagnée par une plus grande vitesse de transition, ce qui signifie qu'une cellule à fort potentiel métastatique se déforme plus facilement et crée moins de frictions lors de son passage dans un canal. Cela pourrait expliquer la facilité qu'a une cellule métastatique pour se faufiler dans des canaux étroits et ainsi pouvoir répandre son infection.

I.3.3 Vers les MEMS organiques

Bien que des MEMS en silicium soient utilisés pour étudier des entités biologiques, les MEMS à base de matériaux organiques se développent de plus en plus de nos jours. En effet, les polymères présentent l'avantage de posséder des propriétés mécaniques plus proches de celles de l'environnement des cellules *in vivo*. De plus, leurs propriétés mécaniques ainsi que les propriétés chimiques de leur

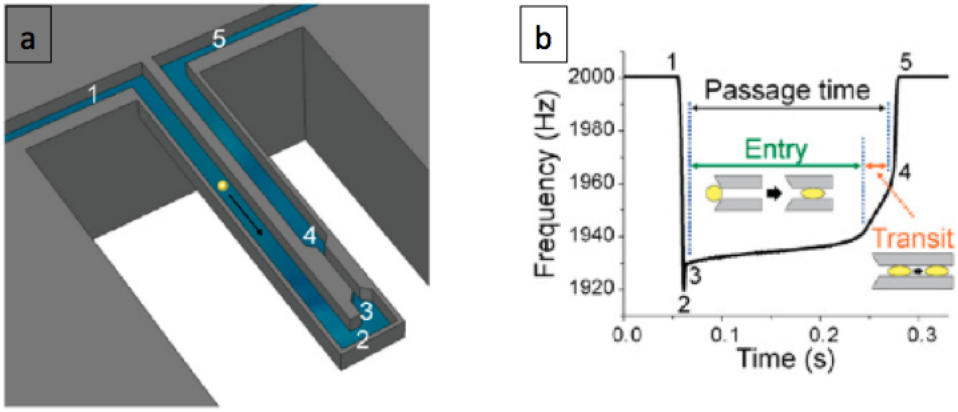

FIGURE I.54 – *a) Représentation du levier intégrant un canal microfluidique avec un étranglement afin de contraindre la cellule à se déformer. b) Mesure de la fréquence de résonance du levier en fonction de la durée de passage de la cellule. Les positions de la cellule allant de 1 à 5 permettent de suivre la cellule et de comprendre l'effet de son passage sur la fréquence de résonance* [144].

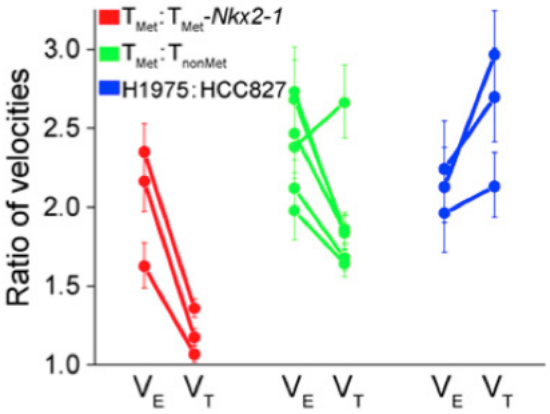

FIGURE I.55 – *Comparaison entre trois paires de cellules cancéreuse ayant des potentiels métastatiques différents. V_E représente la vitesse d'entrée et V_T la vitesse de transition. Ces résultats présentent le ratio des vitesses V_E pour les trois paires de cellules (T_{Met} vs T_{Met}-Nkx2-1, T_{Met} vs T_{nonMet} et H1975 vs HCC827) ainsi que le ratio des vitesses V_T* [144].

surface peuvent être facilement modifiées afin de mimer l'environnement *in vivo*. La plupart du temps, ils présentent également l'avantage d'être transparents, ce qui permet de simultanément imager des cellules par immunofluorescence et de faire des mesures de force afin de corréler les deux informations. Bien qu'il soit difficile d'appliquer des forces avec des systèmes en polymères [145], leur biocompatibilté, leur facilité de fabrication ainsi que leurs faibles coûts en font des candidats intéressants pour l'étude de la biomécanique cellulaire [146].

Les microleviers

Des techniques utilisant des leviers en polymère sont utilisées pour étudier les forces de traction des cellules. Ferrell *et al.* ont par exemple développé un système de quatre pads en polystyrène chacun relié à un levier (figure I.56) [147]. Ces quatre pads mobiles se regroupent autour d'un pad fixe qui permet à la cellule de s'accrocher. Les auteurs ont étudié la force appliquée par un fibroblaste au cours du temps. Pour cela, ils ont mesuré le déplacement des pads et, connaissant la rigidité des leviers, ils

ont déterminé la force. La force appliquée par les fibroblastes augmente avec le temps pour atteindre un palier au bout de 45 min aux alentours de 600 nN. Ce système a également permis d'étudier l'influence de la cytochalasine D qui est une substance qui perturbe le cytosquelette et diminue ainsi la capacité d'une cellule à exercer des forces. La force appliquée par la cellule a été mesurée au cours du temps avant et après l'injection de la cytochalasine D (figure I.57). On voit clairement la diminution de la force qu'appliquent les cellules après l'injection de la cytochalasine D, confirmant les effets de cette substance sur le cytosquelette.

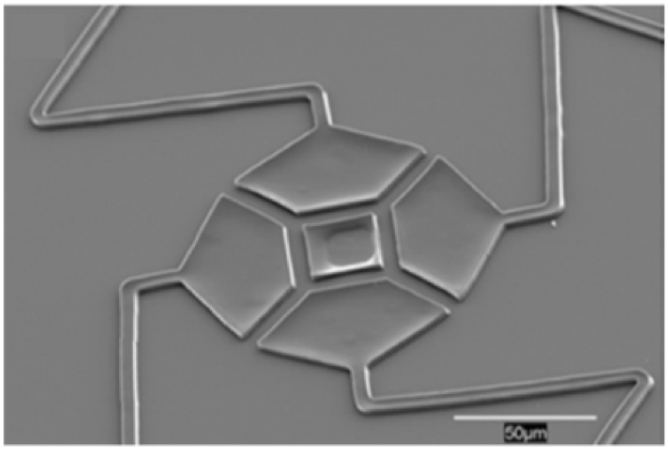

FIGURE I.56 – *Système de mesure en polystyrène constitué de quatre pads mobiles reliés à des leviers autour d'un pad fixe qui permet à la cellule de s'accrocher* [147].

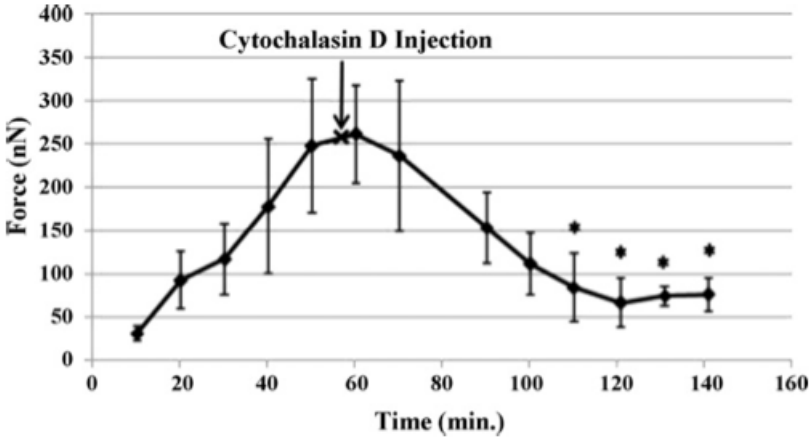

FIGURE I.57 – *Mesure de la force appliquée par les fibroblastes en fonction du temps avant et après l'injection de la cytochalasine D* [147].

Afin de mesurer les forces de contraction de cellules cardiaques, Park *et al.* ont développé un système de leviers hybrides à base de PDMS (figure I.58)[148]. Cette méthode consiste à mesurer la déflexion des leviers créée par les forces de contraction de myocytes cardiaques qui se trouvent sur les leviers. Les déformations des leviers hors plan et dans le plan ont été mesurées optiquement. Le système a été modélisé par une couche de myocytes cardiaques attachés sur de fins leviers. Les forces de contraction sont calculées en utilisant les équations de Stoney et une analyse par éléments finis. Les auteurs ont ainsi déterminé que les myocytes cardiaques appliquaient une contrainte de 5 nN/µm^2, confirmant des études antérieures. Ce système de mesure a ensuite été perfectionné en faisant des

rainures sur la longueur des leviers [149]. En effet, il a été montré que les myocytes qui évoluent sur des leviers ayant des rainures possèdent des filaments d'actine plus organisés et un noyau allongé. L'utilisation des leviers avec rainures a permis de calculer une contrainte exercée par les myocytes de $7\,\mathrm{nN/\mu m^2}$, ce qui est plus important que précédemment et montre ainsi un lien entre l'organisation du cytosquelette et la production de forces.

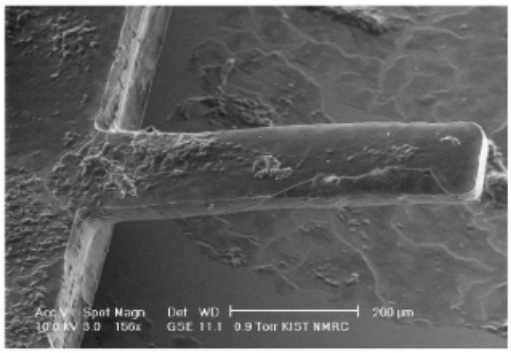

FIGURE I.58 – *Image ESEM d'un levier hybride à base de PDMS après ensemencement des cellules* [148].

Dans la même idée, Oyunbaatar *et al.* ont développé des leviers en polymère avec des rainures et des électrodes qui servent à la stimulation électrique de cellules cardiaques (figure I.59) [150]. La force appliquée par les cellules est déterminée à partir de la mesure optique de la déflexion des leviers. De même que dans l'étude précédente, les rainures permettent une meilleure organisation du cytosquelette et donc les forces de contractions sont plus importantes, allant de 0,5 µN sans rainures à 1,6 µN avec rainures. De plus, différentes concentrations de verapamil, qui est une substance qui diminue les forces de contraction des cellules, ont été testées et leurs effets ont été déterminés par la mesure de la déflexion des leviers. Il en résulte que la stimulation électrique des cellules permet d'observer plus clairement l'effet de cette substance car, à concentration égale de verapamil, la déflexion des leviers est plus importante avec la stimulation électrique. Enfin, la stimulation électrique permet également d'améliorer la maturation des cellules cardiaques.

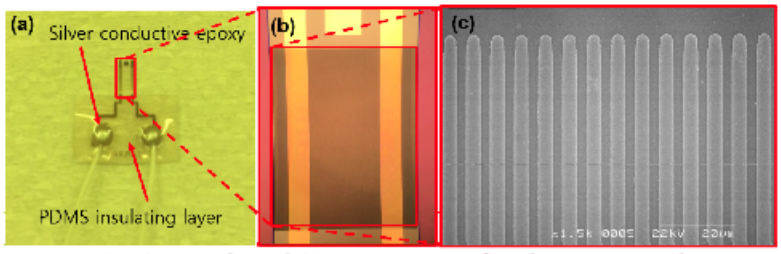

FIGURE I.59 – *a) Image de la structure complète avec le levier et les contacts électriques. b) Image de la zone structurée du levier avec la structure des électrodes qui servent à la stimulation électrique. c) Image au SEM de la structuration du levier avec des rainures espacées de 3 µm* [150].

Les micropiliers

Afin de mesurer les forces de traction exercées par une cellule, une technique consiste à utiliser des micropiliers en PDMS qui jouent le rôle de microleviers. La surface des piliers est fonctionnalisée avec des molécules qui favorisent l'adhésion des cellules. Aussi, lorsque les cellules évoluent sur cette

surface, elles vont préférentiellement s'attacher sur le haut des piliers et, se faisant, elles vont tirer dessus et les déformer (figure I.60) [151]. La déflexion est mesurée optiquement et, pour de faibles déflexions, la relation entre la force et la déflexion est linéaire, ce qui facilite les calculs. Dans la publication citée, le diamètre des micropiliers va de 2 µm à 10 µm et la hauteur de 3 µm à 50 µm, ce qui permet d'obtenir une large gamme de rigidités allant de 2,7 nN/µm à 1 600 nN /µm. De plus, seule la surface supérieure des piliers est recouverte de fibronectine afin de favoriser l'adhésion des cellules sur les piliers. Il est alors possible de restreindre la migration d'une cellule à une certaine zone en ne recouvrant que certains piliers. La méthode des micropiliers a été utilisée pour étudier différents types de cellules comme les fibroblastes [151], les cellules épithéliales [152] ou encore des myocytes cardiaques [153]. Il est également possible de choisir les molécules d'adhésion afin de mimer les interactions entre une cellule et la matrice extracellulaire, ou encore les interactions entre cellules [154]. Fu *et al.* ont aussi montré que la rigidité des micropiliers a une influence sur la morphologie des cellules, sur la contractilité du cytosquelette ainsi que sur la différentiation de cellules souches [155]. Plus récemment, des observations similaires ont été faites au niveau subcellulaire [156].

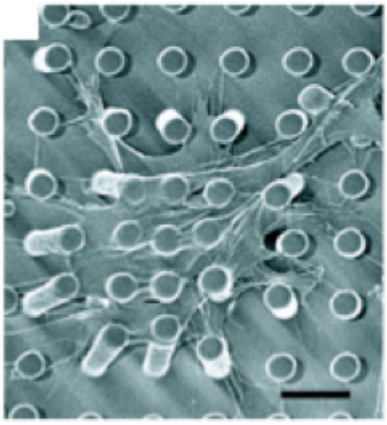

FIGURE I.60 – *Déformation de micropiliers en PDMS par les forces de traction qu'exerce la cellule* [151].

Les forces de contraction de myocytes cardiaques ont aussi été mesurées en utilisant des micropiliers [153]. Dans cette étude, les myocytes sont ensemencés sur des micropiliers compartimentés en rangées (figure I.61). Les myocytes se développent donc suivant une direction privilégiée et les forces de contractions sont mesurées grâce à la déformation des micropiliers, confirmant la direction privilégiée et démontrant ainsi l'alignement des myofibrilles à l'intérieur des myocytes.

Plus récemment, une autre technique utilise des micropiliers associés à des particules magnétiques afin de pouvoir actionner les micropiliers grâce à un champ magnétique (figure I.62) [157]. L'actionnement des piliers magnétiques permet d'appliquer des contraintes mécaniques sur les cellules et d'étudier leur impact sur la morphologie et la migration des cellules. L'application des contraintes fait que les cellules HUVEC utilisées sont plus étalées que sans contraintes. De plus, cette étude démontre que l'application des contraintes réduit la vitesse de migration des cellules.

D'une manière générale, l'utilisation de micropiliers dans l'étude de la distribution des forces générées pas une cellule est actuellement la méthode la plus adaptée, ce qui explique le fait qu'elle est très utilisée. En effet, c'est une méthode simple qui permet d'étudier les cellules en fonction de la rigidité du substrat car il est très facile de changer la rigidité des piliers en modifiant leur diamètre ainsi que leur hauteur. C'est donc une méthode qui se démocratise de plus en plus et dont la commercialisation est imminente avec notamment la société Elveflow qui cherche à développer un système pour l'étude de la migration et de la différentiation de cellules souches.

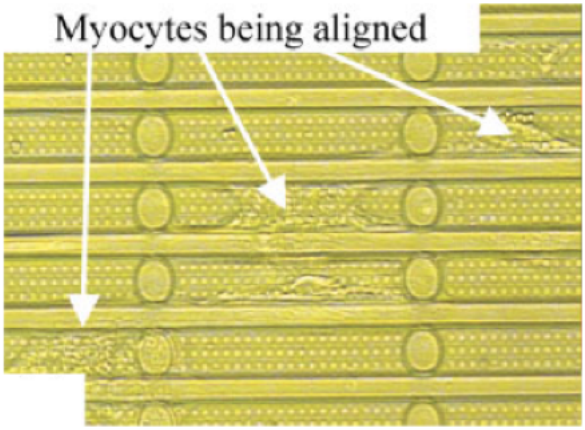

FIGURE I.61 – *Structure du système de mesure avec des rangées de micropiliers compartimentés afin de favoriser une direction de développement des myocytes* [153].

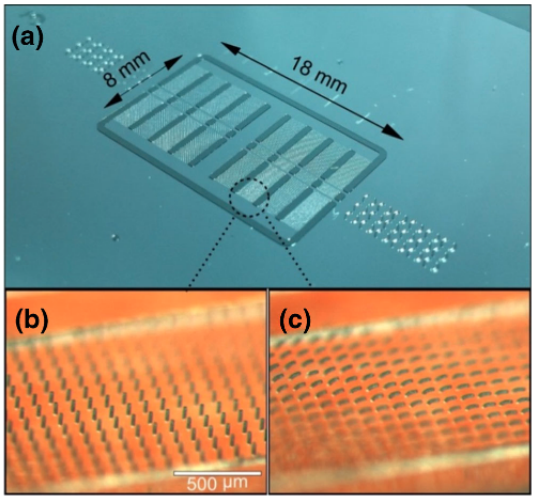

FIGURE I.62 – *a) Vue d'ensemble du système de micropiliers magnétiques avec des zones comprenant différentes densités de piliers ainsi que deux sortes de piliers : des magnétiques et des non magnétiques. Image d'une zone avec des piliers magnétiques b) sans actionnement et c) avec actionnement* [157].

I.4 Conclusions

L'étude de la biomécanique des cellules est un domaine en plein essor. Les propriétés mécaniques des cellules nous renseignent sur leurs fonctions, leurs dysfonctionnements, et mieux les comprendre signifie pouvoir diagnostiquer certaines maladies comme le cancer et éventuellement pouvoir les soigner. L'étude d'entités aussi petites et complexes que les cellules n'est pas chose aisée mais de nombreuses techniques ont vu le jour ou ont été adaptées dans ce but. Les techniques que l'on pourrait dire "classiques" comme l'AFM ou l'aspiration par micropipette sont très utilisées et permettent des études simples et faciles à mettre en place pour l'aspiration par micropipette, ou très polyvalentes et précises dans le cas de l'AFM. Cependant, d'autres techniques sont utilisées afin d'étudier des aspects oubliés des techniques "classiques" comme par exemple les pinces magnétiques qui permettent d'appliquer un couple sur les cellules ou les pièges optiques qui permettent d'étirer des cellules. Parmi les techniques alternatives, les MEMS sont très prometteurs pour l'étude des cellules car leurs faibles dimensions les rendent très sensibles à de faibles forces et ils permettent d'appliquer de grandes gammes de forces allant de 10 nN à 1 mN [158]. Les MEMS organiques à base de polymères sont particulièrement

intéressants et ne cessent de se développer car ils offrent la possibilité de se rapprocher des conditions *in vivo* en terme de rigidité et de chimie de surface. Leur rigidité peut être facilement personnalisée ainsi que les fonctions chimiques de leur surface. Il est également possible de créer des structures 3D complexes grâce à des techniques de fabrication inapplicables pour des matériaux inorganiques, comme par exemple la polymérisation d'un polymère par la technique dite des deux photons [159]. Les MEMS organiques offrent donc de multiples possibilités pour l'étude des cellules et présentent donc un intérêt tout particulier dans le développement de ce domaine.

Références

[1] S. Seyock, V. Maybeck, and A. Offenhäusser. How to image cell adhesion on soft polymers ? *Micron*, 92(39-42), 2017.

[2] S. E. Cross Y.-S. Jin, J. Rao, and J. K. Gimzewki. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*, 2(780-783), 2007.

[3] M.-C. Osterheld, C. Liette, and M. Anca. Image cytometry : An aid for cytological diagnosis of pleural effusions. *Diagnostic Cytopathology*, 32(173-176), 2005.

[4] C. W. M. Bedrossian. *Diagnostic Cytopathology, Malignant Effusions : A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis.* New York : Wiley-Liss, 1994.

[5] R. J J. Pelham and Y. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13661-13665), 1997.

[6] D. H. Smith, J. A. Wolf, and D. F. Meaney. A new strategy to produce sustained growth of central nervous system axons : continuous mechanical tension. *Tissue Engineering*, 7(131-139), 2001.

[7] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(677-689), 2006.

[8] C. R. Ethier and C. A. Simmons. *Introductory Biomechanics : From Cells to Organisms.* Cambridge University Press, 2007.

[9] P. F. Davies. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews*, 75(519-560), 1995.

[10] N. Marceau, A. Loranger, S. Gilbert, N. Daigle, and S. Champetier. Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. *Biochimie et Biologie Cellulaire*, 79(543-555), 2001.

[11] A. R. Bausch, F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75(2038-2049), 1998.

[12] N. Wang, J. P. Butler, and D. E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260, 1993.

[13] K. Y. Volokh, O. Vilnay, and M. Belsky. Tensegrity architecture explains linear stiffening and predicts softening of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33(1543-1549), 2000.

[14] B. P. Helmke, A. B. Rosen, and P. F. Davies. Mapping mechanical strain of an endogenous cytoskeletal network in living endothelial cells. *Biophysical Journal*, 84(2691-2699), 2003.

[15] L. J. Gibson and M. F. Ashby. *Cellular Solids : Structure and Properties.* Cambridge University Press, 1997.

[16] G. Binnig and C. F. Quate. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 1986.

[17] C. Gerber and H. P. Lang. How the doors to the nanoworld were opened. *Nature Nanotechnology*, 1(3-5), 2006.

[18] D. Rugar, H. J. Mamin, P. Guethner, S. E. Lambert, J. E. Stern, I. McFadyen, and T. Yogi. Magnetic force microscopy : General principles and application to longitudinal recording media. *Journal of Applied Physics*, 68(3), 1990.

[19] F. Saurenbach and B. D. Terris. Imaging of ferroelectric domain walls by force microscopy. *Applied Physics Letters*, 56(17), 1990.

[20] S. Sundararajan and B. Bhushan. Development of AFM-based techniques to measure mechanical properties of nanoscale structures. *Sensors and Actuators A*, 101(338-351), 2002.

[21] H. P. Lang, M. Hegner, E. Meyer, and C. Gerber. Nanomechanics from atomic resolution to molecular recognition based on atomic force microscopy technology. *Nanotechnology*, 13(R29-R36), 2002.

[22] J. H. Hoh and C.-A. Schoenenberger. Surface morphology and mechanical properties of mdck monolayers by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science*, 107(1105-1114), 1994.

[23] H. X. You, J. M. Lau, S. Zhang, and L. Yu. Atomic force microscopy imaging of living cells : a preliminary study of the disruptive effect of the cantilever tip on cell morphology. *Ultramicroscopy*, 82(297-305), 2000.

[24] A. Engel and D. J. Müller. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural Biology*, 7(715-718), 2000.

[25] T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, and D. Rugar. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. *Journal of Applied Physics*, 69(2), 1991.

[26] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Pratera, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Elings. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters*, 64(13), 1994.

[27] S. Ido, K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige, and H. Yamada. Beyond the helix pitch : Direct visualization of native dna in aqueous solution. *ACS Nano*, 7(1817-1822), 2013.

[28] Y. F. Dufrêne, T. Ando, R. Garcia, D. Alsteens, D. Martinez-Martin, A. Engel, C. Gerber, and D. J. Müller. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12, 2017.

[29] Y. F. Dufrêne, D. Martínez-Martín, I. Medalsy, D. Alsteens, and D. J. Müller. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve–based AFM. *Nature Methods*, 10(9), 2013.

[30] K. L. Johnson. One hundred years of Hertz contact. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 196(363-378), 1982.

[31] E. K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R. S. Chadwick. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 82(2798-2810), 2002.

[32] R. Long, M. S. Hall, M. Wu, and C.-Y. Hui. Effects of gel thickness on microscopic indentation measurements of gel modulus. *Biophysical Journal*, 101(643-650), 2011.

[33] D. Alsteens, H. Trabelsi, P. Soumillion, and Y. F. Dufrêne. Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria. *Nature Communications*, 4(2926), 2013.

[34] I. Medalsy, U. Hensen, and D. J. Muller. Imaging and quantifying chemical and physical properties of native proteins at molecular resolution by force–volume AFM. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(12103-12108), 2011.

[35] W. H. Roos1, R. Bruinsma, and G. J. L. Wuite. Physical virology. *Nature Physics*, 6(733-743), 2010.

[36] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93(3477-3481), 1996.

[37] R. Garcia and E. T. Herruzo. The emergence of multifrequency force microscopy. *Nature Nanotechnology*, 7(217-226), 2012.

[38] D. Martinez-Martin, E. T. Herruzo, C. Dietz, J. Gomez-Herrero, and R. Garcia. Noninvasive protein structural flexibility mapping by bimodal dynamic force microscopy. *Physical Review Letters*, 106(19), 2011.

[39] G. S. Shekhawat and V. P. Dravid. Nanoscale imaging of buried structures via scanning near-field ultrasound holography. *Science*, 310(89-92), 2005.

[40] T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera. High-Speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annual Review of Biophysics*, 42(393-414), 2013.

[41] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, 468(72-76), 2010.

[42] G. E. Fantner, R. J. Barbero, D. S. Gray, and A. M. Belcher. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*, 5(280-285), 2010.

[43] M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando, and R. Yasuda. Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells. *Scientific Reports*, 5(8724), 2015.

[44] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters*, 24(156), 1970.

[45] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical levitation by radiation pressure. *Applied Physics Letters*, 19(283), 1971.

[46] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(288-290), 1986.

[47] S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin, and A. Cable. Experimental observation of optically trapped atoms. *Physical Review Letters*, 57(334), 1986.

[48] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(1517), 1987.

[49] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, and R. M. Simmons. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science*, 283(1689-1695), 1999.

[50] C. Bustamante, Z. Bryant, and S. B. Smith. Ten years of tension : single-molecule DNA mechanics. *Nature*, 421(423-427), 2003.

[51] D. G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(810-816), 2003.

[52] P. C. Ke and M. Gu. Characterization of trapping force on metallic mie particles. *Applied Optics*, 38(160-167), 1999.

[53] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer. Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Applied Optics*, 41(2494-2507), 2002.

[54] A. Pralle, M. Prummer, E.-L. Florin, E. H. K. Stelzer, and J. K. H. Hörber. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscopy Research and Technique*, 44(378-386), 1999.

[55] W. J. Greenleaf, M. T. Woodside, and S. M. Block. High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36(171-190), 2007.

[56] L. Nugent-Glandorf and T. T. Perkins. Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection. *Optics Letters*, 29(2611-2613), 2004.

[57] J. W. Shaevitz, E. A. Abbondanzieri, R. Landick, and S. M. Block. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, 426(684-687), 2003.

[58] R. T. Dame, M. C. Noom, and G. J. L. Wuite. Bacterial chromatin organization by h-ns protein unravelled using dual dna manipulation. *Nature*, 444(387-390), 2006.

[59] K. C. Neuman, E. A. Abbondanzieri, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell*, 115(437-447), 2003.

[60] K. E. J. Michel, Y. Pavel, M. Eugene, M. A. Kouacou, and J. T. Zoueu. Dynamics study of the deformation of red blood cell by optical tweezers. *Open Journal of Biophysics*, 7(59-69), 2017.

[61] M. S. Yousafzai, F. Ndoye, G. Coceano, J. Niemela, S. Bonin, G. Scoles, and D. Cojoc. Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. *Optics and Lasers in Engineering*, 76(27-33), 2016.

[62] M. Guo, A. J. Ehrlicher, M. H. Jensen, M. Renz, J. R. Moore, R. D. Goldman, J. Lippincott-Schwartz, F. C. Mackintosh, and D. A. Weitz. Probing the stochastic, motor-driven properties of the cytoplasm using force spectrum microscopy. *Cell*, 158(822-832), 2014.

[63] T. T. Perkins. Ångström-precision optical traps and applications. *Annual Review of Biophysics*, 43(279-302), 2014.

[64] F. H. C. Crick and A. F. W. Hughes. The physical properties of cytoplasm : a study by means of the magnetic particle method. Part I. Experimental. *Experimental Cell Research*, 1(37-80), 1950.

[65] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(1122-1126), 1992.

[66] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271(1835-1837), 1996.

[67] D.Kilinc and G. U. Lee. Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integrative Biology*, 6(27-34), 2014.

[68] P. Kollmannsberger and B. Fabry. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *Review of Scientific Instruments*, 78(114301), 2007.

[69] J. Lipfert, J. W. J. Kerssemakers, T. Jager, and N. H. Dekker. Magnetic torque tweezers : measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments. *Nature Methods*, 7(977-980), 2010.

[70] J. Gelles, B. J. Schnapp, and M. P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331(450-453), 1988.

[71] L. G. Brown. A survey of image registration techniques. *ACM Computing Surveys*, 24(325-376), 1992.

[72] M. K. Cheezum, W. F. Walker, and W. H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical Journal*, 81(2378-2388), 2001.

[73] I. D. Vilfan, J. Lipfert, D. A. Koster, S. G. Lemay, and N. H. Dekker. Magnetic tweezers for single-molecule experiments. *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, (371-395), 2009.

[74] I. De Vlaminck, T. Henighan, M. T. J. van Loenhout, I. Pfeiffer, J. Huijts, J. W. J. Kerssemakers, A. J. Katan, A. van Langen-Suurling, E. van der Drift, C. Wyman, and C. Dekker. Highly parallel magnetic tweezers by targeted dna tethering. *Nano Letters*, 11(5489-5493), 2011.

[75] N. Ribeck and O. A. Saleh. Multiplexed single-molecule measurements with magnetic tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 79(094301), 2008.

[76] I. De Vlaminck and C. Dekker. Recent advances in magnetic tweezers. *Annual Review of Biophysics*, 41(453-472), 2012.

[77] K. Kim and O. A. Saleh. A high-resolution magnetic tweezer for single-molecule measurements. *Nucleic Acids Research*, 37(e136), 2009.

[78] T. Lionnet, A. Dawid, S. Bigot, F.-X. Barre, O. A. Saleh, F. Heslot, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Dna mechanics as a tool to probe helicase and translocase activity. *Nucleic Acids Research*, 34(4232-4244), 2006.

[79] M. Manosas, X. G. Xi, D. Bensimon, and V. Croquette. Active and passive mechanisms of helicases. *Nucleic Acids Research*, 38(5518-5526), 2010.

[80] F. J. Alenghat, B. Fabry, K. Y. Tsai, W. H. Goldmann, and D. E. Ingber. Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(93-99), 2000.

[81] J. M. Mitchison and M. M. Swann. The mechanical properties of the cell surface I. The cell elastimeter. *Journal of Experimental Biology*, 31(443-460), 1954.

[82] J. M. Mitchison and M. M. Swann. The mechanical properties of the cell surface III. The sea-urchin egg from fertilization to cleavage. *Journal of Experimental Biology*, 49(734-750), 1955.

[83] R. P. Rand and A. C. Burton. Mechanical properties of the red cell membrane I. Membrane stiffnessand intracellularpressure. *Biophysical Journal*, 4(115-135), 1964.

[84] J.-L. Maître, R. Niwayama, H. Turlier, F. Nédélec, and T. Hiiragi. Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nature Cell Biology*, 17(849-855), 2015.

[85] A. Yeung and E. Evans. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical Journal*, 56(139-149), 1989.

[86] K. Guevorkian and J.-L. Maître. Micropipette aspiration : a unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. *Methods in Cell Biology*, 139(187-201), 2017.

[87] D. P. Theret, M. J. Levesque, M. Sato, R. M. Nerem, and L. T. Wheeler. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *Journal of Biomechanical Engineering*, 110(190-199), 1988.

[88] W. R. Jones, H. P. Ting-Beall, G. M. Lee, S. S. Kelley, R. M. Hochmuth, and F. Guilak. Alterations in the young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of Biomechanics*, 32(119-127), 1999.

[89] M. Sato, M. J. Levesque, and R. M. Nerem. An application of the micropipette technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 109(27-34), 1987.

[90] R. M. Hochmuth, H. C. Wiles, E. A. Evans, and J. T. McCown. Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. II. Experiment. *Biophysical Journal*, 39(83-89), 1982.

[91] B. Liu, C. J. Goergen, and J.-Y. Shao. Effect of temperature on tether extraction, surface protrusion, and cortical tension of human neutrophils. *Biophysical Journal*, 93(2923-2933), 2007.

[92] T. Aoki, T. Ohashi, T. Matsumoto, and M. Sato. The pipette aspiration applied to the local stiffness measurement of soft tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 25(581-587), 1997.

[93] L. G. Alexopoulos, M. A. Haider, T. P. Vail, and F. Guilak. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis. *Journal of Biomechanical Engineering*, 125(323-333), 2003.

[94] T. Boudou, J. Ohayon, Y. Arntz, G. Finet, C. Picart, and P. Tracqui. An extended modeling of the micropipette aspiration experiment for the characterization of the young's modulus and poisson's ratio of adherent thin biological samples : Numerical and experimental studies. *Journal of Biomechanics*, 39(1677-1685), 2006.

[95] L. M. Lee and A. P. Liu. The application of micropipette aspiration in molecular mechanics of single cells. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 5(040902), 2015.

[96] C. M. Buffinton, K. J. Tong, R. A. Blaho, E. M. Buffinton, and D. M. Ebenstein. Comparison of mechanical testing methods for biomaterials : Pipette aspiration, nanoindentation, and macroscale testing. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 51(367-379), 2015.

[97] G. Esteban-Manzanares, B. Gonzáles-Bermúdez, J. Cruces, M. De la Fuente, Q. LI, G. V. Guinea, J. Pérez-Rigueiro, M. Elices, and G. R. Plaza. Improved measurement of elastic properties of cells by micropipette aspiration and its application to lymphocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1375-1385), 2017.

[98] E. Shojaei-Baghini and Y. Sun. Robotic micropipette aspiration of biological cells. *Experimental Robotics*, 88(591-602), 2013.

[99] R. N. Johnston, A. Atalar, J. Heiserman, V. Jipson, and C. F. Quate. Acousticmicroscopy : Resolution of subcellular detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3325-3329), 1979.

[100] E. M. Strohm, G. J. Czarnota, and M. C. Kolios. Quantitative measurements of apoptotic cell properties using acoustic microscopy. *IEEE Transactions on UltrasonIcs, FerroelectrIcs, and Frequency Control*, 57(3325-3329), 2010.

[101] M. M. Pasternak, E. M. Strohm, E. S. L. Berndl, and M. C. Kolios. Properties of cells through life and death – an acoustic microscopy investigation. *Cell Cycle*, 14(2891-2898), 2015.

[102] O. Thoumine and A. Ott. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science*, 110(2109-2116), 1997.

[103] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios. Creep function of a single living cell. *Biophysical Journal*, 88(2224-2233), 2005.

[104] D. Mitrossilis, J. Fouchard, A. Guiroy, N. Desprat, N. Rodriguez, B. Fabry, and A. Asnacios. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18243-18248), 2009.

[105] N. Caille, O. Thoumine, Y. Tardy, and J.-J. Meister. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 35(177-187), 2002.

[106] H. W. Hou, Q. S. Li, G. Y. H. Lee, A. P. Kumar, ? ? ? ?C. N. Ong, and C. T. Lim. Deformability study of breast cancer cells using microfluidics. *Biomedical Microdevices*, 11(557-564), 2009.

[107] Q. Guo, S. J. Reiling, P. Rohrbach, and H. Ma. Microfluidic biomechanical assay for red blood cells parasitized by plasmodium falciparum. *Lab on Chip*, 6, 2012.

[108] X. Ren, P. Ghassemi, H. Babahosseini, J. S. Strobl, and M. Agah. Single-cell mechanical characteristics analyzed by multiconstriction microfluidic channels. *ACS Sensors*, 2(290-299), 2017.

[109] J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H. M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, J. Käs, S. Ulvick, and C. Bilby. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical Journal*, 88(3689-3698), 2005.

[110] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and J. Käs. The optical stretcher : A novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, 81(767-784), 2001.

[111] A. E. Ekpenyong, G. Whyte, K. Chalut, S. Pagliara, F. Lautenschläger, C. Fiddler, S. Paschke, U. F. Keyser, E. R. Chilvers, and J. Guck. Viscoelastic properties of differentiating blood cells are fate- and function-dependent. *PLoS ONE*, 7(e45237), 2012.

[112] T. Dehoux, M. Abi Ghanemand O. F. Zouani, J.-M. Rampnoux, Y. Guillet, S. Dilhaire, M.-C. Durrieu, and B. Audoin. All-optical broadband ultrasonography of single cells. *Scientific Reports*, 5(8650), 2015.

[113] G. Sauerbrey. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, 155(206-222), 1959.

[114] J. Wegener, A. Janshoff, and H.-J. Galla. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance : comparative analysis of different mammalian cell lines. *European Biophysics Journal*, 28(26-37), 1998.

[115] M. S. Lord, C. Modin, M. Foss, M. Duch, A. Simmons, F. S. Pedersen, F. Besenbacher, and B. K. Milthorpe. Extracellular matrix remodelling during cell adhesion monitored by the quartz crystal microbalance. *Biomaterials*, 29(2581-2587), 2008.

[116] D. Le Guillou-Buffello, G. Hélary, M. Gindre, G. Pavon-Djavid, P. Laugier, and V. Migonney. Monitoring cell adhesion processes on bioactive polymers with the quartz crystal resonator technique. *Biomaterials*, 26(4197-4205), 2005.

[117] J. Xi, J. Y. Chen, M. P. Garcia, and L. S. Penn. Quartz crystal microbalance in cell biology studies. *Journal of Biochip and Tissue Chip*, S5, 2013.

[118] J. M. Atienza, J. Zhu, X. Wang, X. Xu, and Y. Abassi. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(795-805), 2005.

[119] S. B. Prakash and P. Abshire. On-chip capacitance sensing for cell monitoring applications. *IEEE Sensors Journal*, 7(440-447), 2007.

[120] S. Usami, H.-H. Chen, Y. Zhao, S. Chien, and R. Skalak. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Annals of Biomedical Engineering*, 21(77-83), 1993.

[121] C. Liu. *Foundations of MEMS*. Pearson Prentice Hall, 2006.

[122] V. Kaajakari. *Practical MEMS*. Small Gear Publishing, 2009.

[123] O. Brand, I. Dufour, S. M. Heinrich, and F. Josse. *Resonant MEMS : fundamentals, implementation and application*. Wiley-VCH, 2015.

[124] T. M. Adams and R. A. Layton. *Introductory MEMS : fabrication and applications.* Springer, 2010.

[125] Z. Deng, H. Wei, S. Fan, and J. Gan. Design and analysis a novel RF MEMS switched capacitor for low pull ?in voltage application. *Microsystem Technologies*, 22(2141-2149), 2016.

[126] K. Demirel, E. Yazgan, S. Demir, and T. Akın. A new temperature-tolerant RF MEMS switch structure design and fabrication for Ka-band applications. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 25(60-68), 2016.

[127] Q. Wang, W. Hong, and L. Dong. Graphene "microdrums" on a freestanding perforated thin membrane for high sensitivity MEMS pressure sensors. *Nanoscale*, 8(7663-7671), 2016.

[128] S. Kohyama, H. Takahashi, S. Yoshida, H. Onoe, K. H. Shoji, T. Tsukagoshi, T. Takahata, and I. Shimoyama. MEMS force and displacement sensor for measuring spring constant of hydrogel microparticles. *In IEEE MEMS 2017, Las Vegas, USA*, January 22-26 2017.

[129] A. Bouchaala, A. H. Nayfeh, and M. I. Younis. Frequency shifts of micro and nano cantilever beam resonators due to added masses. *Journal of Dynamic Systems, Measurement, and Control*, 138(091002), 2016.

[130] M.-T. Boudjiet, J. Bertrand, F. Mathieu, L. Nicu, L. Mazenq, T. Leïchlé, S. Heinrich, C. Pellet, and I. Dufour. Geometry optimization of uncoated silicon microcantilever-based gas density sensors. *Sensors and Actuators B*, 208(600-607), 2015.

[131] M.-T. Boudjiet. *Microsystèmes durables de mesures de concentration d'hydrogène utilisant des micropoutres sans couche sensible.* PhD thesis, Université de Bordeaux, 2015.

[132] D. B. Beasley, M. Bender, J. Crosby, S. McCall, T. Messer, and D. A. Saylor. Advancements in the micromirror array projector technology II. *Proceedings SPIE 5785, Technologies for Synthetic Environments : Hardware-in-the-Loop Testing X*, 68, 2005.

[133] M. Benmessaoud and M. M. Nasreddine. Optimization of mems capacitive accelerometer. *Microsystem Technologies*, 19(713-720), 2013.

[134] Eric Nuxoll. Biomems in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1611-1625), 2013.

[135] K. Park, L. J. Millet, N. Kim, H. Li, X. Jin, G. Popescu, N. R. Aluru, K. J. Hsia, and R. Bashir. Measurement of adherent cell mass and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20691-20696), 2010.

[136] C. G. Galbraith and M. P. Sheetz. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction ?forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9114-9118), 1997.

[137] G. Lin, K. S. J. Pister, and K. P. Roos. Surface micromachined polysilicon heart cell force transducer. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 9(9-17), 2000.

[138] T. D. Nguyen, N. Deshmukh, J. M. Nagarah, T. Kramer, P. K. Purohit, M. J. Berry, and M. C. McAlpine. Piezoelectric nanoribbons for monitoring cellular deformations. *Nature Nanotechnology*, 7(587-593), 2012.

[139] Y. Sun, K.-T. Wan, K. P. Roberts, J. C. Bischof, and B. J. Nelson. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2(279-286), 2003.

[140] S. Yang and T. Saif. Micromachined force sensors for the study of cell mechanics. *Review of Scientific Instruments*, 76(1-8), 2005.

[141] D. B. Serrell, J. Law, A. J. Slifka, R. L. Mahajan, and D. S. Finch. A uniaxial bioMEMS device for imaging single cell response during quantitative force-displacement measurements. *Biomedical Microdevices*, 10(883-889), 2008.

[142] V. Mukundan and B. L. Pruitt. MEMS electrostatic actuation in conducting biological media. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 18(405-413), 2009.

[143] H. Etayash, K. Jiang, S. Azmi, T. Thundat, and K. Kaur. Real-time detection of breast cancer cells using peptide- functionalized microcantilever arrays. *Scientific Reports*, 5(13967), 2015.

[144] S. Byun, S. Son, D. Amodei, N. Cermak, J. Shaw, J. H. Kang, V. C. Hecht, M. M. Winslow, T. Jacks, P. Mallick, and S. R. Manalis. Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7580-7585), 2013.

[145] N. J. Sniadecki, A. Anguelouch, M. T. Yang, C. M. Lamb, Z. Liu, S. B. Kirschner, Y. Liu, D. H. Reich, and C. S. Chen. Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14553-14558), 2007.

[146] D. B. Weibel and W. R. DiLuzio andG. M. Whitesides. Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(209-218), 2007.

[147] N. Ferrell, J. Woodard, and D. J. Hansford. Measurement of cell forces using a microfabricated polymer cantilever sensor. *Sensors and Actuators A*, 170(84–89), 2011.

[148] J. Park, J. Ryu, S. K. Choi, E. Seo, J. M. Cha, S. Ryu, J. Kim, B. Kim, and S. H. Lee. Real-time measurement of the contractile forces of self-organized cardiomyocytes on hybrid biopolymer microcantilevers. *Analytical Chemistry*, 77(6571–6580), 2005.

[149] J.Park, J. Kim, D. Roh, S. Park, B. Kim, and K. Chun. Fabrication of complex 3d polymer structures for cell-polymer hybrid systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(1614–1619), 2006.

[150] N. E. Oyunbaatar, D. S. Kim, E. S. Kim, B. K. Lee, and D. W. Lee. Cardiac toxicity screening using polymeric cantilever integrated with cell stimulators. *In IEEE MEMS 2017*, Las Vegas, USA, January 22-26, 2017.

[151] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen. Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1484-1489), 2002.

[152] O. Du Roure, A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Siberzan, and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2390-2395), 2005.

[153] Y. Zhao and X. Zhang. Cellular mechanics study in cardiac myocytes using PDMS pillars array. *Sensors and Actuators A*, 125(398-404), 2006.

[154] A. Ganz, M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R. M. Mège, and B. Ladouxt. Traction forces exerted through n-cadherin contacts. *Biology of the Cell*, 98(721-730), 2006.

[155] J. Fu, Y. Wang, M. T. Yang, R. A. Desai, X. Yu, Z. Liu, and C. S. Chen. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nature Methods*, 7(733-736), 2010.

[156] X. Liu, R. Liu, B. Cao, K. Ye, S. Li, Y. Gu, Z. Pan, and J. Ding. Subcellular cell geometry on micropillars regulates stem cell differentiation. *Biomaterials*, 111(27-39), 2016.

[157] F. Khademolhosseini, C.-C. Liu, C. J. Lim, and M. Chiao. Magnetically actuated microstructured surfaces can actively modify cell migration behaviour. *Biomedical Microdevices*, 18(13), 2016.

[158] S.-J. Park, M. B. Goodman, and B. L. Pruitt. Analysis of nematode mechanics by piezoresistive displacement clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17376–17381), 2007.

[159] M. R. Gullo, S. Takeuchi, and O. Paul. Muscle-actuated bio-hybrid MEMS by cell culture and differentiation on metamaterial micro-scaffolds. *In IEEE MEMS 2016*, Shanghai, China, January 24-28 2016.

CHAPITRE II

PROCÉDÉ DE FABRICATION ET SON OPTIMISATION

Le chapitre précédent met en évidence l'intérêt que peuvent avoir les MEMS organiques pour l'étude de la biomécanique cellulaire. Dans l'optique de réaliser cette étude, des structures résonantes à base de leviers piézoélectriques ont été réalisées. Ce chapitre détaille le choix de la piézoélectricité comme mode d'actionnement, ainsi que le choix des matériaux qui composent les résonateurs. Une technique simple et rapide qui permet de structurer les différentes couches qui composent les résonateurs y est décrite. Plusieurs étapes clés, comme la polarisation, sont étudiées afin d'optimiser les propriétés du matériau piézoélectrique vis à vis de l'efficacité de l'actionnement des résonateurs.

II.1 Structure des résonateurs MEMS

II.1.1 Type d'actionnement

Comme nous l'avons vu au chapitre I, les MEMS ont la capacité de transformer une grandeur physique en une autre grandeur physiquement mesurable : c'est la transduction. Il existe de nombreux types de transduction, que ce soit du domaine électrique, thermique, optique, magnétique, etc. vers le domaine mécanique, ou alors, par exemple, du domaine optique vers le domaine électrique (effet photovoltaïque). Le type de transduction choisi est important car c'est ce qui détermine la technologie et les procédés de fabrication qui seront utilisés.

Afin d'actionner les MEMS, quatre types d'actionnement sont couramment utilisés : électrostatique, électromagnétique, électrothermique et piézoélectrique. Dans le but d'avoir une comparaison rapide de ces types d'actionnement, leurs avantages et inconvénients sont résumés dans le tableau II.1. L'utilisation de l'effet piézoélectrique présente plusieurs avantages. L'avantage principal est qu'avec une seule couche de matériau, il est possible d'assurer à la fois l'actionnement et la détection des MEMS, permettant ainsi une bonne intégration à petite échelle, avec une structure simple. De plus, la puissance consommée est relativement faible. Également, afin d'effectuer des mesures en milieu liquide, l'actionnement électrostatique, par exemple, semble difficile à utiliser. Pour ces raisons, l'actionnement (et aussi la détection) par effet piézoélectrique a été choisie pour cette étude.

Actionnement	Avantages	Inconvénients
Électrostatique	• Intégration • Réponse rapide	• Compromis entre force et déplacement • Forte tension d'actionnement
Électrothermique	• Possibilité de larges déplacements • Réponse assez rapide	• Puissance consommée importante • Sensible à la température
Électromagnétique	• Possibilité de larges déplacements	• Intégration non triviale • Puissance consommée importante
Piézoélectrique	• Intégration (actionnement et détection en même temps) • Réponse rapide	• Dégradation des performances à basses fréquences

TABLE II.1 – *Comparaison des différents types d'actionnement des MEMS couramment utilisés* [1, 2].

II.1.2 Piézoélectricité

Généralités

Le phénomène piézoélectrique qui apparait dans certains matériaux cristallins et céramiques a été découvert en 1880 par les frères Pierre et Jacques Curie. Mais ce n'est qu'à partir de la Première Guerre Mondiale (1914-1918) que ce phénomène a été utilisé dans des applications pratiques, notamment dans les radars à ultrasons utilisant des lames de quartz. En 1918, le premier oscillateur électronique stabilisé par un cristal de quartz a été créé. Comme de nombreuses avancées techniques, c'est grâce à l'industrie militaire (durant la Seconde Guerre Mondiale 1939-1945) que l'industrie moderne de la piézoélectricité naît réellement et connait alors un essor spectaculaire. De nos jours, les travaux sur la piézoélectricité se concentrent sur des aspects pratiques, avec un nombre d'applications en constante augmentation, mais aussi sur des aspects théoriques, avec l'étude de nouveaux matériaux : polymères, matériaux composites et céramiques sans présence de plomb.

Le phénomène piézoélectrique est très intéressant car il permet de faire la transduction entre les domaines électrique et mécanique. Lorsque l'on applique une force sur un matériau, on déforme ce dernier. Ce faisant, le réseau cristallin du matériau se déforme et ainsi les barycentres des charges positives et négatives se dissocient. Dans la plupart des matériaux, les barycentres des charges positives et négatives ne changent pas malgré la déformation du réseau cristallin. Cependant, dans les matériaux piézoélectriques, cette déformation du réseau cristallin entraine un déplacement des barycentres des charges électriques, ce qui conduit à l'apparition de dipôles électriques. Tous ces dipôles électriques sont orientés de la même manière puisqu'ils sont ordonnés suivant le réseau cristallin. De ce fait, l'arrangement atomique de ces dipôles est la source, au niveau macroscopique, d'une polarisation des faces du matériau piézoélectrique. La figure II.1 illustre ces propos en prenant l'exemple de deux matériaux : le quartz (piézoélectrique) et le chlorure de sodium (non piézoélectrique). En résumé, les matériaux dont la maille cristalline possède un centre de symétrie ne présentent pas de propriétés piézoélectriques.

Les matériaux cristallins ne sont pas les seuls à pouvoir présenter des propriétés piézoélectriques. En effet, il existe des céramiques et des polymères piézoélectriques [3]. Certaines céramiques (titanate de baryum $BaTiO_3$) sont des corps polycristallins dont chaque microcristal est piézoélectrique. Ce-

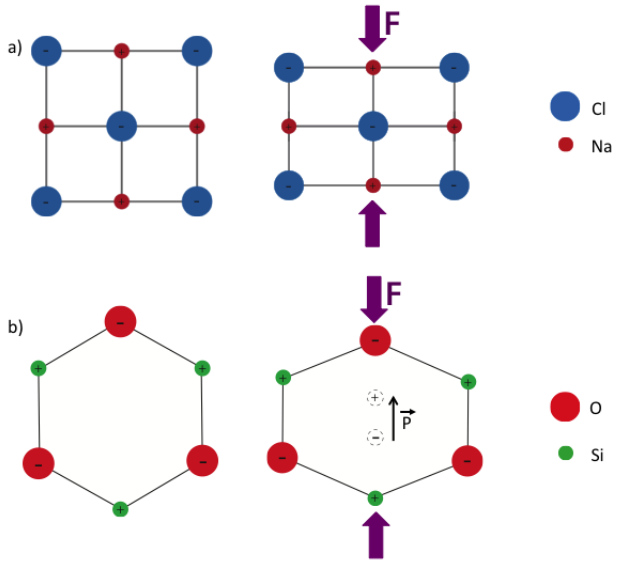

FIGURE II.1 – a) Si on déforme le chlorure de sodium en appliquant une force, les barycentres des charges positives et négatives ne se dissocient pas et donc la maille cristalline reste électriquement neutre ; b) Si on fait de même avec le quartz, les barycentres des charges électriques se dissocient, donnant lieu à l'apparition d'un dipôle électrique $\vec{P}$.

pendant, du fait de leurs orientations aléatoires, le matériau n'est pas de prime abord piézoélectrique. Il faut pour cela le polariser, c'est à dire qu'il faut appliquer un fort champ électrique au matériau afin que tous les microcristaux s'orientent dans le même sens (le sens du champ électrique). Ce faisant, leurs réponses électriques à une déformation mécanique sont identiques et donnent ses propriétés piézoélectriques au matériau céramique.

L'effet piézoélectrique peut aussi exister dans les polymères semi-cristallins. Un polymère est un matériau formé de longues chaînes carbonées. L'agencement de ces chaînes carbonées n'est *a priori* pas ordonné. Cependant, lorsqu'on chauffe un polymère, ces chaînes deviennent très mobiles et il se peut qu'elles s'immobilisent dans des empilements réguliers de chaînes lorsque la température diminue. Cela forme alors des domaines appelés cristallites ayant la même structure qu'un monocristal. Ces cristallites sont dispersés dans une matrice amorphe, ne rendant le polymère que partiellement cristallin. C'est pour cela que l'on parle de polymère semi-cristallin. De la même manière que pour les céramiques, les cristallites sont orientées de façon aléatoire. Afin d'avoir un effet piézoélectrique, il faut aussi polariser le polymère en appliquant un fort champ électrique dans le but d'obtenir la même orientation pour toutes les cristallites.

Les matériaux piézoélectriques sont très utilisés dans les applications MEMS car ils permettent à la fois l'actionnement et la détection des mouvements des structures utilisées. En effet, il existe en réalité deux effets piézoélectriques. Le premier a été expliqué précédemment. Lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée au matériau piézoélectrique, ce dernier génère des charges électriques à sa surface : c'est l'effet direct. Mais il existe aussi l'effet inverse, à savoir que lorsqu'un champ électrique est appliqué au matériau, ce dernier se déforme mécaniquement : c'est l'effet indirect. Cet effet indirect est utilisé dans les applications "actionneur", où l'on applique un champ électrique afin de déformer une structure. L'effet direct est utilisé dans les applications "capteur", où la déformation mécanique d'une structure due à un élément externe génère des charges électriques qui peuvent être collectées et analysées. Il est donc possible d'utiliser un effet ou l'autre, ou même les deux à la fois, ce qui rend les matériaux piézoélectriques très attractifs pour les applications MEMS.

Formalisme

Le formalisme piézoélectrique met en relation quatre grandeurs qui sont liées les unes aux autres. Ces quatre grandeurs sont : le champ électrique $\vec{\mathbf{E}}$, le déplacement électrique $\vec{D}$, la contrainte mécanique $\vec{\sigma}$ et la déformation mécanique $\vec{S}$. Chacune de ces grandeurs peut être fonction de deux autres grandeurs (soit $\vec{D}$ est fonction de $\vec{\mathbf{E}}$ et $\vec{\sigma}$, soit $\vec{D}$ est fonction de $\vec{\mathbf{E}}$ et $\vec{S}$, par exemple). Il existe ainsi huit équations afin de décrire entièrement un système. Dans le cadre de l'étude, le matériau piézoélectrique sera essentiellement actionné par l'application d'un champ électrique. Ainsi, l'équation qui nous intéresse est la suivante :

$$\vec{S} = s\vec{\sigma} + d\vec{\mathbf{E}} \tag{II.1}$$

Cette équation relie la déformation mécanique à la contrainte mécanique et au champ électrique. En réalité, les grandeurs s et d sont des tenseurs. Dans notre cas, on ne s'intéresse qu'à l'allongement longitudinal du matériau dans le plan pour un champ électrique appliqué vertical. Etant donné qu'on n'applique pas de contrainte, on obtient alors :

$$S_1 = d_{31}\mathbf{E_3} \tag{II.2}$$

La notation "31" indique dans quel sens a lieu l'allongement par rapport au champ électrique appliqué. Si on prend un repère de l'espace représenté par trois axes $\vec{x}$, $\vec{y}$ et $\vec{z}$, le "3" signifie que le champ électrique est appliqué selon l'axe $\vec{z}$ et le "1" veut dire que la déformation a lieu selon l'axe $\vec{x}$. On verra par la suite que dans notre cas, l'allongement dans le plan se traduit par une déflexion hors plan par l'effet bilame, et on pourra remonter au coefficient d_{31} qui nous intéresse en adaptant la formule (II.2).

II.1.3 Choix des matériaux

Matériau piézoélectrique

Parmi les matériaux piézoélectriques, le Titano-Zirconate de Plomb (PZT) sous forme de céramique est l'un des plus répandus. Cela est dû à ses forts coefficients piézoélectriques ($d_{31} \sim 210\,\mathrm{pm/V}$ [4]). Cependant, ce matériau contient du plomb, ce qui le rend dangereux pour la santé. C'est pourquoi d'autres matériaux, comme l'oxyde de zinc (ZnO), sont étudiés afin de pallier ce problème [5]. En ce qui concerne les matériaux organiques, le copolymère poly(fluorure de vinylidène - trifluoroéthylène) (PVDF-TrFE) est le plus utilisé. En effet, les matériaux à base de PVDF présentent les meilleures propriétés piézoélectriques parmi les polymères [4].

Le PVDF est composé d'une chaîne de monomères $F_2C = CH_2$. Ce monomère présente un moment dipolaire car le fluor est plus électronégatif que l'hydrogène. Cependant, dans sa phase α (phase la plus courante obtenue par cristallisation à partir de l'état fondu), le PVDF est apolaire car les moments dipolaires se compensent de part leurs orientations (figure II.2). Dans sa phase β, en revanche, le PVDF possède un moment dipolaire non nul. Pour qu'il se conforme dans sa forme β, il faut l'étirer et lui appliquer une tension afin qu'il se polarise. Il est aussi possible de lui ajouter un copolymère qui permet de s'abstenir d'étirer le PVDF : il suffit alors de le polariser en appliquant une tension.

Le trifluoroéthylène (TrFE) est un copolymère qui favorise la phase β du PVDF : il coupe les grosses molécules de PVDF en de plus petits segments, ce qui améliore la mobilité des chaînes lors de la polarisation. De plus, le copolymère a pour avantage d'augmenter le taux de cristallisation ainsi que la polarisation rémanente et la température d'utilisation [6]. C'est pourquoi le copolymère PVDF-TrFE a été préféré au PVDF. Cependant, le TrFE possède un moment dipolaire moins important que celui du PVDF : il ne faut donc pas trop concentrer le mélange en TrFE. Le PVDF-TrFE est fourni par Piezotech sous forme de poudre. Pour cette étude, une composition en mole du PVDF-TrFE 75 %/25 % a été utilisée car elle est caractérisée par le meilleur coefficient d_{31}. Cette poudre est solubilisée dans un solvant, le butan-2-one, avec un ratio en masse de 20 %.

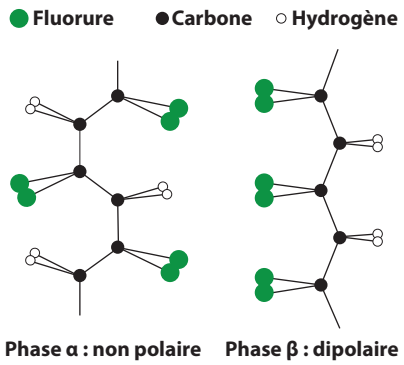

FIGURE II.2 – *Les deux phases communes du PVDF : la phase α qui est non polaire et la phase β qui est dipolaire.*

Substrat

Afin de déposer les différents matériaux qui composent les résonateurs, il faut un substrat sur lequel commencer. Les substrats utilisés pour fabriquer les résonateurs sont en polynaphtalate d'éthylène (PEN). Le choix de ce matériau est dû au fait qu'il résiste bien chimiquement aux solvants et qu'il peut tenir des températures allant jusqu'à 190 °C. Le PEN utilisé dans ces travaux provient de la société Goodfellow et est reçu sous forme de feuillet. Plusieurs épaisseurs sont disponibles, allant de 1,3 µm à 250 µm. Dans un premier temps, afin de concevoir la structure des résonateurs et le procédé de fabrication, une épaisseur de 50 µm a été choisie. En effet, cela permet d'avoir un substrat relativement souple, ce qui est l'intérêt d'utiliser des matériaux organiques, tout en étant facile à manipuler (sans trop de risques de le froisser).

Électrodes

Dans le but d'utiliser l'effet piézoélectrique indirect pour actionner les résonateurs, il faut pouvoir leur appliquer un champ électrique. Pour cela, il est nécessaire que la structure des résonateurs comporte deux électrodes de part et d'autre du matériau piézoélectrique. Dans l'idée d'avoir des électrodes structurées, il est pratique d'utiliser des électrodes métalliques déposées par évaporation à travers un masque mécanique (principe du shadow-masking). La structuration des électrodes a plusieurs avantages. Tout d'abord, cela permet d'appliquer le champ électrique dans la partie utile du système, à savoir au niveau du levier. Ensuite, cela limite la surface des deux électrodes en regard, ce qui diminue la capacité statique qui est gênante pour les mesures électriques (chapitre 3). Enfin, cela rend la polarisation plus aisée car les fuites de courant sont réduites (car les zones qui sont polarisées sont réduites). L'aluminium a été choisi. En effet, il est simple de le déposer par évaporation (thermique ou par faisceau d'électrons) et il possède de bonnes propriétés conductrices pour un moindre coût.

Passivation

L'utilisation des résonateurs en milieu liquide peut poser quelques difficultés. Hormis le fait qu'il est plus compliqué de détecter la résonance à cause du milieu qui amortit le mouvement, il faut aussi prendre en compte ses propriétés. En effet, si ce dernier est conducteur ou si c'est un solvant qui est corrosif pour les matériaux qui composent les résonateurs, il faut impérativement protéger les résonateurs. Dans l'idée d'utiliser les résonateurs pour l'étude de cellules vivantes, dans leur milieu physiologique conducteur, les électrodes ne doivent pas être en contact avec ce milieu. Cela créerait des fuites de courant et en plus les électrodes seraient endommagées par la corrosion. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) a été choisi pour la passivation des électrodes. En effet, ce matériau est bio-compatible, isolant et très simple d'utilisation. De plus, son module d'Young est faible ($\in$ [100 kPa ; 5 MPa] [7]), ce qui a pour conséquence de réduire le module d'Young équivalent des résonateurs, les rendant ainsi plus sensibles aux variations de rigidité.

II.1.4 Structure des résonateurs

Il existe principalement trois types de résonateur MEMS (voir chapitre I) : les leviers, les ponts et les membranes. Les leviers sont les plus simples, du point de vue théorique mais aussi du point de vue de la fabrication (surtout avec la technique qui est décrite section II.2). C'est pourquoi ce type de résonateur a été retenu.

D'après les choix des matériaux qui ont été mentionnés précédemment, la structure des leviers est la suivante (figure II.3) : un substrat en PEN sur lequel se trouve le PVDF-TrFE pris entre deux électrodes en aluminium, le tout recouvert de PDMS. Lorsqu'un champ électrique est appliqué dans un sens entre les deux électrodes, le PVDF-TrFE va s'étirer. Si on applique un champ électrique dans le sens inverse, le PVDF-TrFE va se contracter. Donc, si un champ électrique alternatif est appliqué, le PVDF-TrFE va s'étirer, puis se contracter de façon successive. Ainsi, si la couche piézoélectrique était seulement prise en sandwich entre les électrodes, elle vibrerait dans le plan. Cependant, le PVDF-TrFE repose sur un substrat et ces deux matériaux sont solidaires au niveau de l'interface. Lorsque le PVDF-TrFE s'étire, la surface du substrat qui est solidaire s'étire aussi mais pas la surface opposée. Cela se traduit par une déflexion de l'ensemble vers le bas (figure II.4). Dans le cas où le PVDF-TrFE se contracte, la déflexion s'effectue vers le haut. Ce type d'actionnement hors plan est appelé l'effet bilame. Cela traduit le fait que la configuration d'au moins deux matériaux dont les propriétés d'allongement sont différentes vis à vis d'une excitation conduit à la déflexion de la structure. Dans notre cas, seul le PVDF-TrFE veut s'allonger mais pas le substrat. Cela peut aussi être le cas de deux matériaux ayant des coefficients d'expansion thermique différents, soumis à une excitation thermique [8].

FIGURE II.3 – *Vue schématique de profil et en coupe de la structures des leviers.*

II.2 Procédé de fabrication

II.2.1 Enjeux de la fabrication des MEMS organiques

Les technologies liées au silicium se sont largement développées avec l'avènement de la microélectronique. Les MEMS à base de silicium ont su profiter de cette technologie déjà présente et ont donc connu un développement rapide. Par la suite, le domaine des MEMS a conduit à de nouvelles techniques de fabrication ainsi qu'à de nouveaux matériaux qui ne sont pas traditionnellement utilisés pour la microélectronique. La photolithographie est sûrement la technique la plus importante car elle permet de fabriquer des MEMS, de façon reproductible, avec des dimensions micrométriques et en quantité importante [9]. Associées à la photolithographie, on trouve habituellement des techniques de dépôt (procédé additif) qui se servent du matériau structuré par photlithographie comme d'un masque,

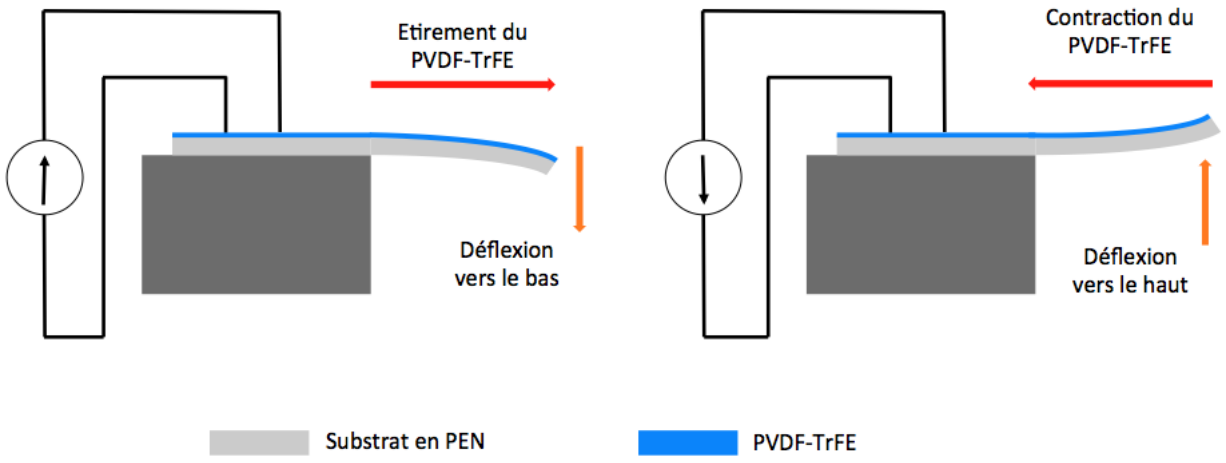

FIGURE II.4 – *Principe de l'effet bilame où un étirement du PVDF-TrFE conduit à une déflexion du levier vers le bas et une contraction conduit à la déflexion vers le haut.*

ou alors des techniques de gravure (procédé soustractif). Les techniques de dépôt peuvent être la pulvérisation cathodique ou le dépôt chimique ou physique en phase vapeur. Quant aux techniques de gravure, on trouve la gravure chimique ou la gravure physique. D'autres techniques, qui s'appuient sur celles déjà existantes, sont aussi utilisées afin d'améliorer la résolution (lithographie électronique ou ultra-violet) ou pour, par exemple, obtenir des profils de gravure plus anisotropes (gravure ionique réactive profonde).

Cependant, il en est différemment pour les systèmes à base de matériaux organiques qui sont en plein développement. En effet, ces matériaux sont souples et ne se manipulent pas comme du silicium. De plus, il faut trouver des moyens pour les structurer. Effectivement, les techniques énoncées précédemment ne sont pas forcément adaptables lorsqu'on travaille avec des matériaux organiques. Également, ils ne sont généralement pas photosensibles : il faut donc réussir à ne les déposer que là où l'on veut ou à enlever les parties inutiles. Des nouvelles techniques de fabrication voient donc le jour pour mettre en forme ces matériaux [10]. Aussi, l'élaboration de MEMS organiques ne se déroule pas forcément en salle blanche, ce qui est un avantage de coût, comparé aux technologies silicium.

II.2.2 Xurographie : une technique alternative

Un procédé de fabrication simple, peu coûteux et rapide a été mis en place au laboratoire IMS. De nombreuses structures de type levier ont été créées grâce à ce procédé qui repose sur la xurographie [11]. Ce terme provient du grec *xuron* qui veut dire "lame" et *graphe* qui veut dire "écrire". Le principe de fonctionnement est le même que celui d'une imprimante à jet d'encre, excepté qu'il y a une lame coupante au niveau de la tête d'impression. Il suffit alors de dessiner la forme que l'on souhaite sur un logiciel : chaque trait de dessin correspond à un passage de la lame. Cette technique provient de l'industrie du design afin de créer des graphismes sur support papier ou plastique. Elle est donc très bien adaptée pour l'utilisation de matériaux organiques car il est très facile d'obtenir des formes complexes avec ce procédé, ce qui est un avantage car les polymères ne sont pas simples à structurer. On peut ainsi utiliser les techniques classiques de fabrication comme le spin-coating pour déposer les matériaux sous forme de solution et ensuite venir y découper la forme voulue.

L'imprimante à découpe permet de faire essentiellement deux tâches : des MEMS mono-couches et des masques flexibles. Mais en combinant les masques flexibles avec les techniques de dépôt classiques (évaporation thermique ou par faisceau d'électrons), il est possible de créer des MEMS multicouches. La figure II.5 montre une photo de l'imprimante à découpe numérique ainsi que le principe : le maté-

riau que l'on veut découper est placé sur une feuille adhésive. Cette feuille adhésive peut se déplacer selon l'axe $\vec{y}$ et la lame suivant l'axe $\vec{x}$. On peut ainsi réaliser toutes les formes que l'on souhaite. Il existe cependant certaines limites à cette approche : l'épaisseur du matériau à découper ne doit pas excéder 250 µm et la résolution spatiale est de l'ordre de 200 µm (mais cela dépend du motif).

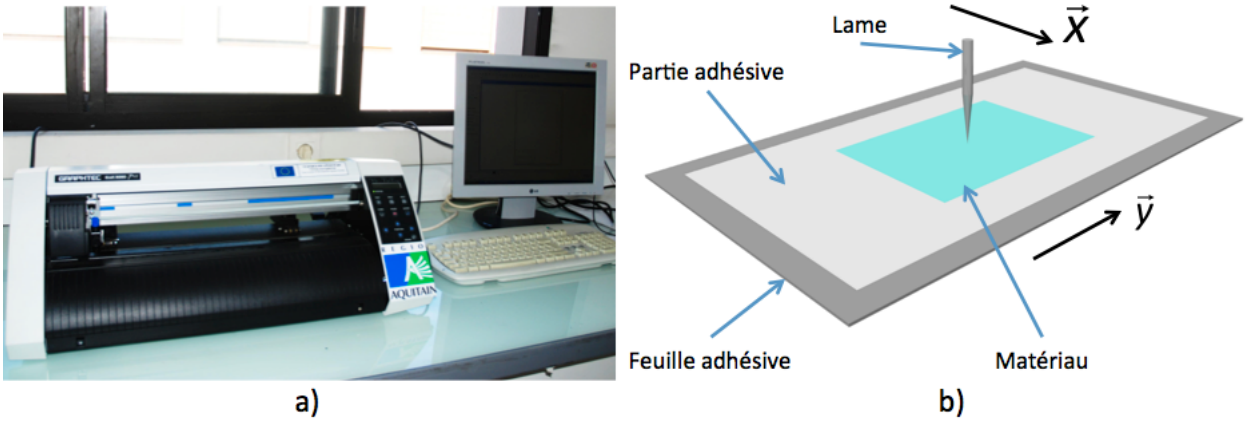

FIGURE II.5 – *a) Photo de l'imprimante à découpe Craft RoboPro CE6000 (Graphtec), b) Principe de la feuille adhésive sur laquelle on fixe le matériau à découper et axes de déplacement de la feuille et de la lame.*

Pour illustrer la résolution spatiale, des fentes de différentes largeurs ont été découpées dans un film de PEN de 50 µm d'épaisseur. La figure II.6 montre dans un premier temps la découpe d'une fente de 100 µm de largeur. On peut remarquer qu'il y a une différence de dimension de la fente suivant si l'on regarde au niveau de la surface supérieure ou inférieure. Cela traduit le fait que la lame a une forme de pointe conique. Donc la trace de la lame est plus petite en bout de pointe, ce qui explique cette différence de dimension entre les deux surfaces. Dans un second temps, la figure II.7 montre la découpe de trois fentes de largeur 100 µm, 200 µm et 300 µm, avec une focalisation sur la surface inférieure. Pour la fente de 100 µm de largeur, les contours ne sont pas très nets et la largeur de 100 µm n'est pas respectée. En revanche, à partir d'une largeur de 200 µm, la découpe est plus nette et la dimension est bien respectée. Enfin, la résolution dépend également du motif à découper. En effet, dans le cas de la découpe de carrés (figure II.8), il est clair que pour des dimensions de 100 µm et 200 µm, la forme du carré n'est pas respectée. La forme est respectée à partir de 300 µm. Cependant, les dimensions ne sont elles pas respectées car ce carré fait environ 200 µm. Il faut donc adapter les dimensions que l'on veut découper en fonction du motif choisi.

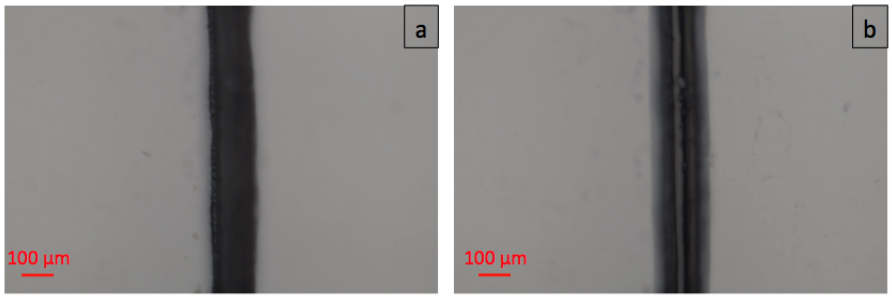

FIGURE II.6 – *Photos de la découpe d'une fente de 100 µm de largeur dans un film de PEN de 50 µm d'épaisseur. a) Image de la fente au niveau de la surface supérieure qui fait bien 100 µm, b) Image de la fente au niveau de la surface inférieure qui fait environ 40 µm.*

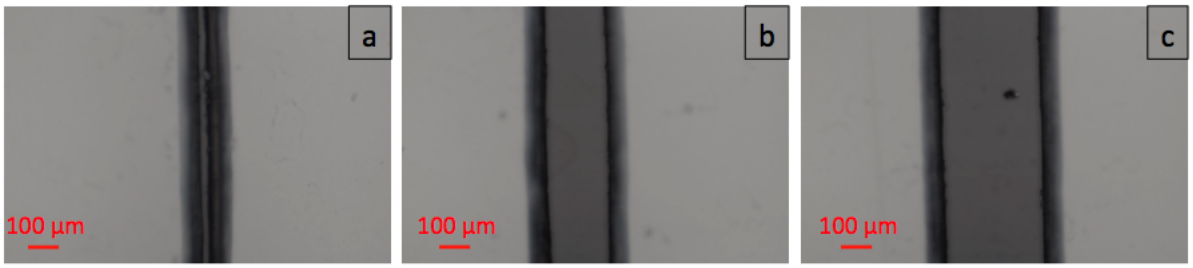

FIGURE II.7 – *Comparaison de la découpe de fentes pour trois largeurs différentes : a) 100 µm, b) 200 µm et c) 300 µm.*

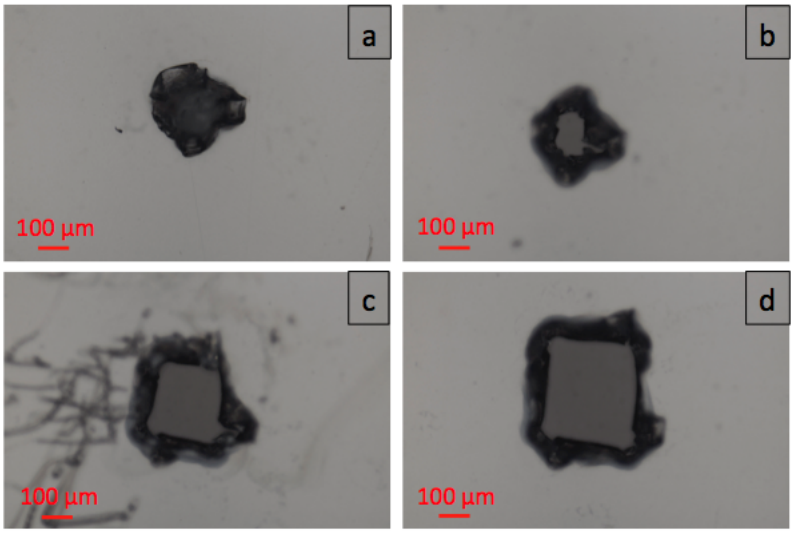

FIGURE II.8 – *Comparaison de la découpe de carrés pour quatre dimensions différentes : a) 100 µm, b) 200 µm, c) 300 µm et d) 400 µm.*

Lors de la découpe d'un matériau, plusieurs paramètres sont ajustables en xurographie : la force, la vitesse de déplacement ainsi qu'un offset de la lame. Il est alors possible, lors de la découpe d'un échantillon fait de plusieurs couches de matériaux, de choisir de découper tous les matériaux en même temps ou de ne découper que partiellement la couche, ce qui permet de ne structurer qu'une partie de l'échantillon (figure II.9). Cela permet, par exemple, de structurer des pistes conductrices à la surface d'un échantillon [12]. Il suffit de faire un dépôt d'un matériau conducteur sur toute une surface et de venir ensuite définir les pistes par xurographie, en ne découpant que le matériau en surface.

II.2.3 Étapes de fabrication

Le procédé de fabrication mis en œuvre dans ce travail pour créer des résonateurs piézoélectriques organiques est simple et rapide, utilisant des procédés classiques comme le spin-coating et le dépôt par évaporation. À ces techniques s'ajoute la xurographie afin d'obtenir la forme finale. De plus, comme indiqué précédemment, contrairement aux technologies silicium, il n'y a pas besoin d'être en salle blanche et les coûts de fabrication sont grandement réduits.

Découpe du substrat

La fabrication des résonateurs commence avec la découpe du substrat en PEN par xurographie. La forme du substrat est un rond de 20 mm de diamètre, avec des protubérances qui servent à l'alignement

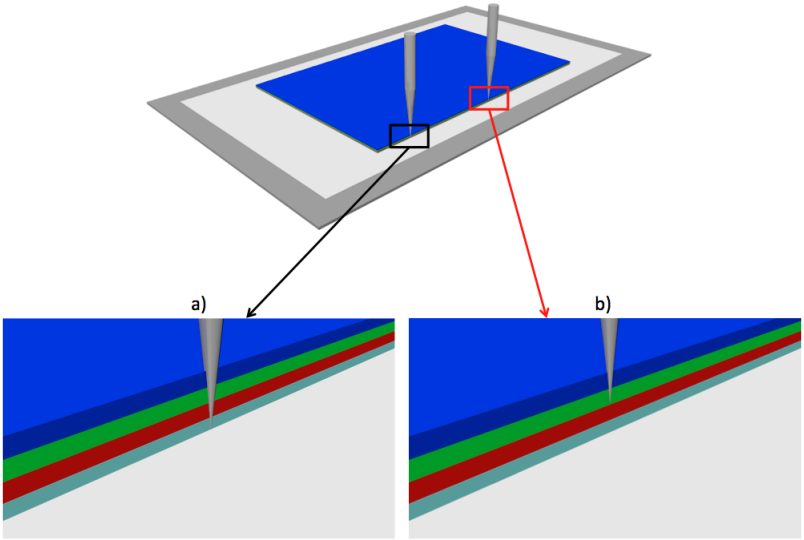

FIGURE II.9 – *a) Découpe de toutes les couches structurelles d'un échantillon, b) Découpe partielle des couches structurelles d'un échantillon.*

des masques lors du dépôt des électrodes.

Dépôt de l'électrode inférieure

Une fois le substrat découpé, une première électrode en aluminium est déposée par évaporation par faisceau d'électrons (voir annexe A). Le dépôt s'effectue à une pression inférieure à 1.10^{-6} mBar et pour une vitesse de dépôt comprise entre 0,1 nm/s et 0,2 nm/s. Afin de structurer cette électrode, l'évaporation se fait à travers un masque en PEN ou en polytéréphtalate d'éthylène (PET), réalisé aussi par xurographie et posé sur le substrat.

Spin-coating du PVDF-TrFE

Après cela, le matériau piézoélectrique est déposé par spin-coating, à 3500 tr/min, avec une durée d'accélération de 1 s, pendant 45 s. La couche ainsi déposée fait environ 4 µm d'épaisseur. L'influence de cette épaisseur est étudiée section II.4.1.

Recuit

Après le dépôt du PVDF-TrFE, l'échantillon subit deux recuits : un premier à 50 °C afin d'évaporer les restes de solvant, et un second à 140 °C afin d'augmenter le taux de cristallinité du PVDF-TrFE (voir section II.3.4).

Dépôt de l'électrode supérieure

Après ce recuit, une seconde électrode en aluminium est déposée dans les mêmes conditions que la première.

Découpe du levier

La forme du levier est ensuite découpée par xurographie.

Passivation

L'échantillon est recouvert de PDMS par dip-coating avant d'être fixé sur une lame de verre. Cela permet la passivation des électrodes (et même du levier dans sa globalité) et donc de pouvoir travailler

en milieu liquide conducteur. La fixation sur la lame de verre permet de laisser le levier suspendu afin qu'il puisse bouger.

Tout ce procédé est résumé figure II.10. Ce procédé est vraiment simple, rapide, avec une réalisation des résonateurs en une journée. Le prix des matériaux pour réaliser un résonateur a été estimé à 2,6 €. Pour l'étude menée dans ce chapitre, les substrats font 50 µm d'épaisseur. Les dimensions des leviers sont 3,4 mm pour la longueur et 2 mm pour la largeur. En réalité, les dimensions ne sont pas réellement importantes puisqu'il est question ici de l'étude des propriétés intrinsèques du PVDF-TrFE, qui ne dépendent pas de la géométrie choisie. Dans la version aboutie des résonateurs, il sera questions d'autres dimensions qui seront expliquées.

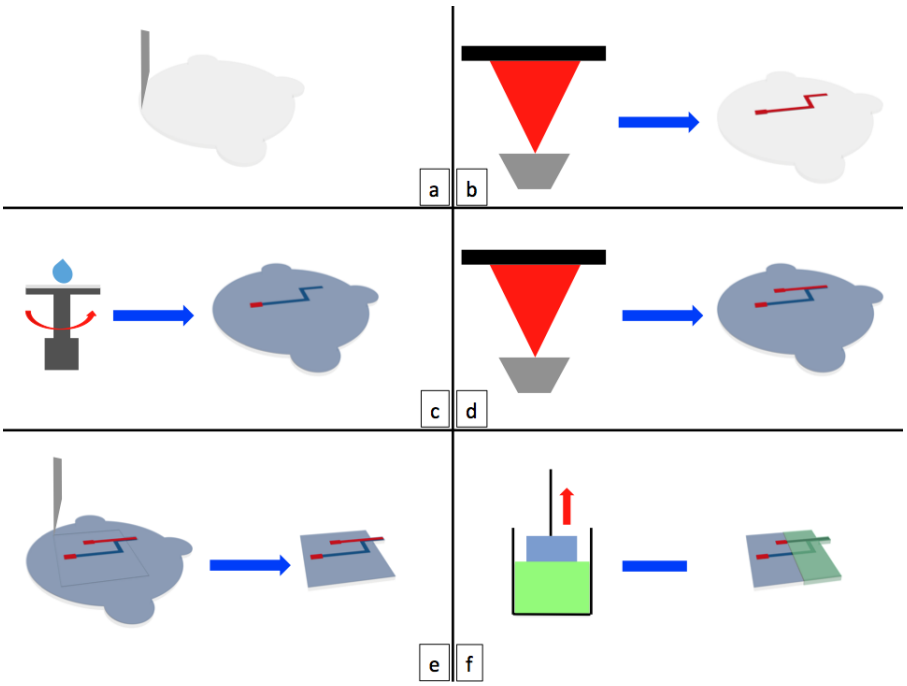

FIGURE II.10 – *Récapitulatif du procédé de fabrication. a) Découpe du substrat en PEN, b) Dépôt de l'électrode inférieure en aluminium, c) Spin-coating du PVDF-TrFE, d) Dépôt de l'électrode supérieure en aluminium, e) Découpe de la forme du levier, f) Dip-coating de PDMS pour la passivation des électrodes.*

II.2.4 Polarisation

La polarisation est une étape clé car elle permet d'aligner tous les domaines cristallins piézoélectriques du polymère dans le même sens, maximisant ainsi l'effet piézoélectrique macroscopique du matériau. En effet, avant polarisation, le polymère est constitué d'un ensemble de domaines cristallins qui se sont formés essentiellement après l'étape de recuit. Cependant, ces domaines sont répartis de façon aléatoire. D'un point de vue macroscopique, ils se compensent, ne rendant le matériau que peu, ou même pas du tout, piézoélectrique. Pour que tous ces domaines travaillent de concert, il faut alors appliquer un fort champ électrique : sous l'effet de la force électrique générée par le champ électrique, les domaines vont s'aligner avec ce champ électrique (figure II.11). Étant tous alignés, leurs réponses à une sollicitation mécanique ou électrique seront identiques, optimisant ainsi l'effet piézoélectrique.

Il existe deux techniques courantes pour polariser des matériaux : soit en appliquant une différence de potentiel entre deux électrodes qui entourent le matériau, soit par l'effet corona (figure II.12). La première technique est simple à mettre en place. Il suffit de prendre des contacts électriques avec les électrodes et d'appliquer une tension. Cette tension peut être continue ou alternative. L'inconvénient

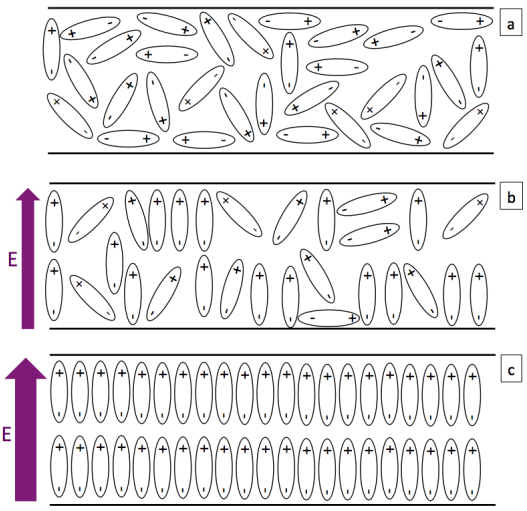

FIGURE II.11 – *Influence du champ électrique de polarisation sur l'alignement des domaines piézoélectriques. a) Avant polarisation, ces domaines sont orientés de façon aléatoire, b) En appliquant un champ électrique, certains domaines s'alignent mais pas tous car le champ n'est pas suffisamment important, c) Lorsque le champ électrique appliqué est suffisamment fort, tous les domaines sont alignés, optimisant ainsi les propriétés piézoélectriques du matériau.*

de cette technique est qu'il faut que l'échantillon à polariser possède des électrodes et c'est une polarisation individuelle non applicable à grande échelle. En revanche, la polarisation par effet corona permet de polariser de grandes surfaces de façon homogène et peut s'appliquer à grande échelle. Le principe est le suivant : une haute tension est appliquée sur une pointe, créant un champ électrique très intense. Ce champ électrique va ioniser l'air et les charges ainsi créées vont alors être attirées par une électrode reliée à la masse sur laquelle se trouve la surface à polariser. C'est ce dépôt de charges électriques à la surface du matériau qui va créer le champ de polarisation. Cette technique est très utile pour polariser des matériaux sous forme de film mais elle nécessite cependant une haute tension (typiquement 20 kV). Dans ces travaux, la polarisation par application direct d'un champ électrique continu a été choisie car elle est plus simple à mettre en œuvre, mais aussi parce que les surfaces à polariser sont faibles et que la structure même des résonateurs permet de l'appliquer facilement.

Afin d'avoir une vue d'ensemble sur les différentes étapes d'élaboration des résonateurs, une vue schématique est représentée figure II.13. Cela permet de bien comprendre à quel moment de la fabrication interviennent le recuit à 140 °C et la polarisation, ce qui est important puisque ces deux paramètres sont étudiés dans la section suivante.

II.3 Optimisation du procédé de fabrication

Lors de la réalisation des résonateurs piézoélectriques, deux étapes sont déterminantes : la polarisation et le recuit. En effet, le recuit permet d'obtenir un taux de cristallinité important, améliorant ainsi l'effet piézoélectrique, et la polarisation permet d'orienter tous les domaines cristallins dans le même sens, ce qui augmente aussi l'effet piézoélectrique. Bien que ces deux étapes soient très importantes, elles ne sont pas, ou seulement partiellement, étudiées dans la littérature. Ainsi, l'effet de la température de recuit a été étudié mais pas la durée nécessaire. Quant à la polarisation, toutes sortes de recettes sont trouvables : certains polarisent à 70 V/µm tout en chauffant à 90 °C [13] alors que d'autres polarisent à 100 V/µm sans chauffer [14]. Mais il est très rare que ces façons de procéder soient justifiées. Ainsi, dans cette partie, la valeur du champ électrique de polarisation, la durée de polarisation ainsi que la durée de recuit sont étudiées au travers de leurs influences sur l'actionnement dynamique des résonateurs. En effet, évaluer l'efficacité d'actionnement piézoélectrique en mesurant

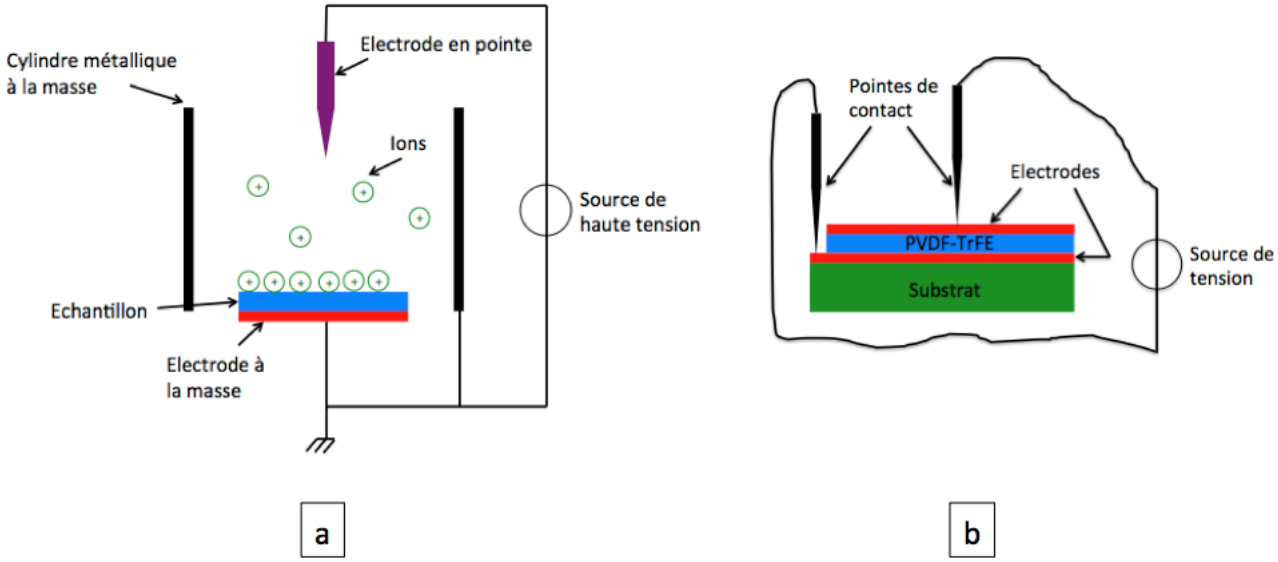

FIGURE II.12 – *Les deux principales techniques de polarisation. a) Polarisation par effet corona, b) Polarisation par application direct d'un champ électrique.*

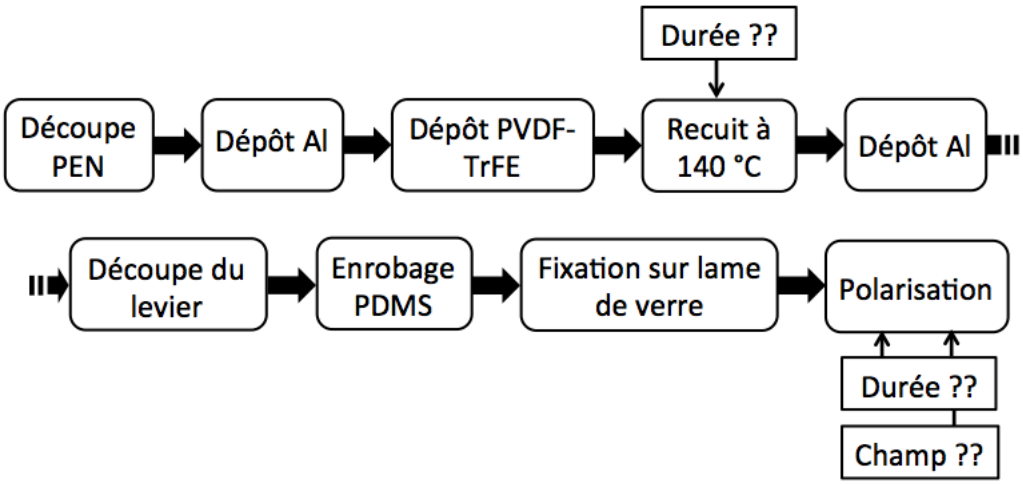

FIGURE II.13 – *Récapitulatif des différentes étapes qui permettent l'obtention de résonateurs fonctionnels, avant l'optimisation du recuit et de la polarisation.*

la valeur de la déflexion des leviers est un moyen simple et facile à appliquer.

Dans tout ce qui suit dans ce chapitre, les mesures de valeur de déflexion sont effectuées à l'aide d'un vibromètre laser à effet Doppler, un MSA-500 de la compagnie Polytec. Le principe de son fonctionnement est expliqué en annexe B. Ce sont donc des mesures optiques. Sauf indications contraires, les mesures de déflexion correspondent à la déflexion dynamique en bout de levier du premier mode de résonance pour une tension d'excitation d'environ 21 mV. Également, les résonateurs utilisés ne comportent pas de couche de passivation en PDMS car aucune mesure en milieu liquide n'est réalisée. Un exemple de spectre de résonance obtenu à l'aide du vibromètre est donné sur la figure II.14. Si l'on mesure la déflexion en bout de levier, elle est beaucoup plus importantes pour le premier mode que pour les autres. Il est donc très difficile de voir les autres modes par cette méthode (ou alors il faut faire la mesure ailleurs qu'en bout de levier ou avec des tensions d'actionnement plus élevées). Cependant,

si l'on ne mesure plus la déflexion mais la vitesse de déplacement du levier, on s'aperçoit que les autres modes sont bien là, notamment un mode qui sera intéressant pour la suite de ces travaux. Néanmoins, pour l'étude réalisée dans ce chapitre, seule la déflexion du premier mode de résonance sera exploitée. La valeur mesurée dans chacun des cas est la déflexion maximale qui correspond à la fréquence de résonance des structures.

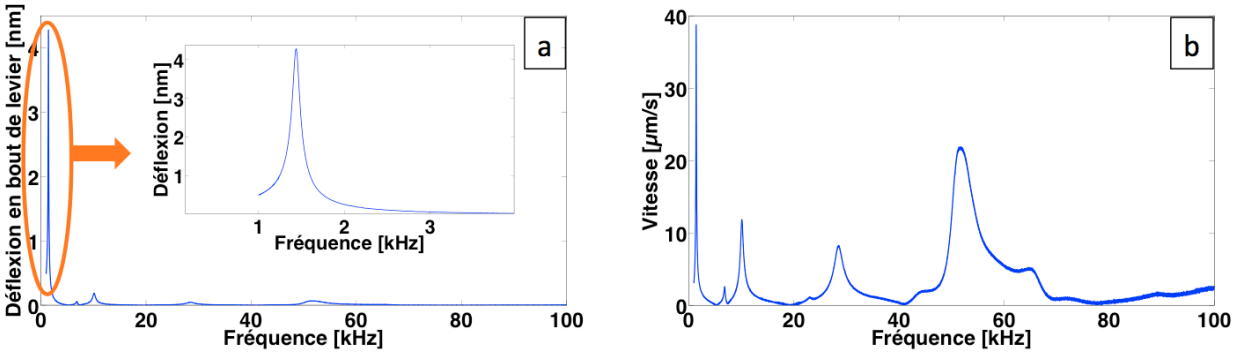

FIGURE II.14 – *Exemple de mesure effectuée au vibromètre : a) Mesure de la déflexion dynamique en bout de levier, b) Mesure de la vitesse de déplacement en bout de levier.*

II.3.1 Détermination du coefficient d_{31}

Le coefficient d_{31} correspond à l'allongement que subit le matériau perpendiculairement au champ électrique qui lui est appliqué. Dans notre cas, dû à l'effet bilame, cet allongement se traduit par une déflexion du levier. Afin de déterminer ce coefficient, il est donc nécessaire de pouvoir lui relier la déflexion qui correspond. Pour cela, un modèle mathématique qui prend en compte les propriétés mécaniques des deux couches de matériaux constituant le bilame est utilisé (équation (II.3)) [15] :

$$w = \frac{bE_p h_p E_s h_s (h_p + h_s) L^2}{h_p \left[4(E_p I_p + E_s I_s)(E_p h_p + E_s h_s) + bE_p h_p E_s h_s (h_p + h_s)^2\right]} V d_{31} \tag{II.3}$$

avec w la déflexion, b la largeur du levier, L la longueur du levier, V la tension appliquée, E_p et E_s les modules d'Young, h_p et h_s les épaisseurs et I_p et I_s les moments quadratiques du matériau piézoélectrique et du substrat respectivement. Cependant, les leviers des résonateurs sont composés de quatre couches de matériaux si les électrodes sont prises en compte. Il faut alors modifier l'équation (II.3) pour revenir à un système avec deux couches de matériaux. La méthode utilisée est la suivante : le substrat et l'électrode inférieure sont réunis en gardant les propriétés mécaniques du substrat mais en calculant un moment quadratique équivalent à l'association de ces deux couches. Il en va de même pour l'association de la couche de PVDF-TrFE et de l'électrode supérieure. On se ramène donc à un système équivalent avec deux couches de matériaux et l'équation (II.3) peut être utilisée avec les expressions des moments quadratiques équivalents suivantes :

$$I_{eq1} = \frac{b}{12E_p} \times \frac{h_p^4 E_p^2 + h_{Al}^4 E_{Al}^2 + 2h_p h_{Al} E_p E_{Al}(2h_p^2 + 3h_p h_{Al} + 2h_{Al}^2)}{h_p E_p + h_{Al} E_{Al}} = I_p \tag{II.4}$$

$$I_{eq2} = \frac{b}{12E_s} \times \frac{h_s^4 E_s^2 + h_{Al}^4 E_{Al}^2 + 2h_s h_{Al} E_s E_{Al}(2h_s^2 + 3h_s h_{Al} + 2h_{Al}^2)}{h_s E_s + h_{Al} E_{Al}} = I_s \tag{II.5}$$

L'équation (II.5) correspond au moment quadratique équivalent pour l'association du substrat et de l'électrode inférieure, avec les indices "Al" se référant aux propriétés de l'électrode en aluminium. On retrouve la même expression pour le moment quadratique équivalent du PVDF-TrFE avec l'électrode supérieure en remplaçant les propriétés du substrat par celles du PVDF-TrFE (équation (II.4)). Le tableau II.2 présente les valeurs utilisées concernant les propriétés des matériaux.

	PEN	PVDF-TrFE	Al
Module d'Young E	3 GPa	1 GPa	62 GPa
Épaisseur h	50 µm	4 µm	150 nm

TABLE II.2 – *Récapitulatif des propriétés des matériaux pour la détermination du coefficient d_{31}.*

Il faut également prendre en compte le fait que le modèle mathématique n'est valable qu'en mode quasi-statique. Cela veut dire qu'il faut mesurer la déflexion pour une excitation à faible fréquence, loin des fréquences de résonance des leviers. Sachant que, pour les résonateurs utilisés, la fréquence de résonance du premier mode se trouve aux alentours de 1,8 kHz, des tensions d'excitation à 200 Hz et 500 Hz ont été testées. La figure II.15 montre la valeur de la déflexion en fonction de la tension appliquée. Il est clairement visible que, pour une excitation à 500 Hz, la déflexion est plus importante que pour une excitation à 200 Hz, ce qui montre que le premier mode de résonance a déjà une influence et qu'il faut bien s'en éloigner pour avoir une estimation juste du d_{31}. Cependant, il a été vérifié qu'à partir de 200 Hz et en dessous, les valeurs de déflexion sont les mêmes, indiquant qu'on se trouve bien en mode quasi-statique et que les mesures à 200 Hz sont valables pour calculer le d_{31}. Il est à noter qu'on a bien une évolution linéaire de la déflexion avec la tension appliquée, en accord avec le modèle utilisé. Le coefficient d_{31} des structures a donc été déterminé en mesurant la déflexion en mode quasi-statique en bout de levier, donnant une valeur moyenne de 11 pm/V pour le procédé optimisé, ce qui correspond à l'état de l'art [4].

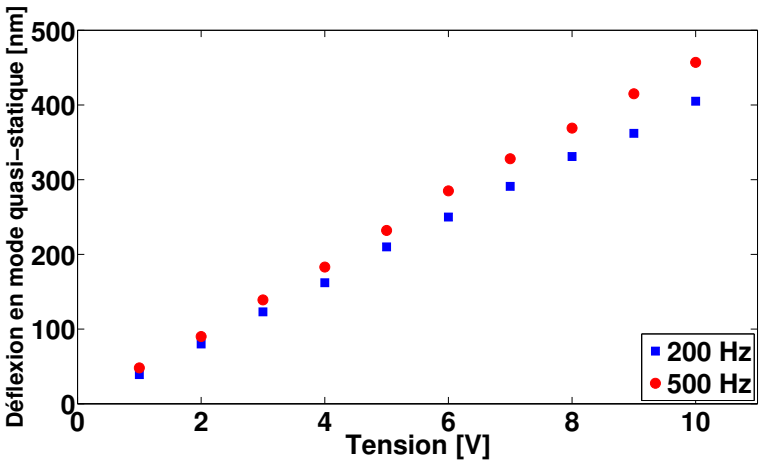

FIGURE II.15 – *Relation entre la déflexion en mode quasi-statique et la tension appliquée, pour des excitations à 200 Hz et 500 Hz.*

L'optimisation de la polarisation dans cette étude se fait au travers de deux paramètres : la valeur du champ électrique et la durée de la polarisation. Afin d'évaluer l'influence de ces deux paramètres, ainsi que la durée du recuit, sur les propriétés piézoélectriques des résonateurs, la valeur de la déflexion en bout de levier du premier mode de résonance a été choisie comme critère d'évaluation. Dans le but de justifier ce critère d'évaluation et d'être sûr qu'une plus grande déflexion du premier mode de résonance

soit bien liée à un meilleur coefficient d_{31}, ce coefficient a été déterminé et tracé en fonction de la valeur de la déflexion du premier mode pour plusieurs résonateurs (figure II.16). Il existe une relation linéaire du coefficient d_{31} et de la déflexion en bout de levier, signifiant qu'une déflexion plus importante est bien l'image d'un d_{31} plus important, et donc de meilleures propriétés piézoélectriques. Ceci est bien en accord avec la théorie. En effet, si l'on applique une tension continue, le levier subit une déflexion statique qui est l'image du coefficient d_{31}. Pour une tension donnée, plus la déflexion est importante, plus ce coefficient l'est aussi. Or, la déflexion dynamique du premier mode de résonance est Q fois plus importante que la déflexion statique, avec Q le facteur de qualité des résonateurs. En supposant que Q est indépendant du d_{31}, une déflexion du premier mode de résonance plus importante implique bien un coefficient d_{31} plus important. Il a ainsi été montré qu'une plus grande amplitude de mouvement lors du premier mode de résonance correspond bien à de meilleures propriétés piézoélectriques, validant ainsi ce critère d'évaluation pour la suite de l'étude.

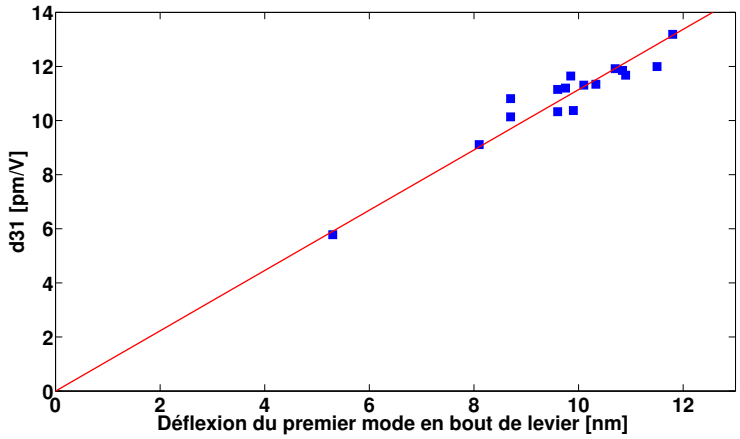

FIGURE II.16 – *Relation entre le coefficient d_{31}, déterminé par la mesure de la déflexion quasi-statique, et la déflexion du premier mode de résonance.*

II.3.2 Influence du champ de polarisation

Le premier paramètre étudié est l'intensité du champ de polarisation. Pour cela, la durée de recuit à 140 °C a été fixée à 1 h. L'influence de la durée de recuit est étudiée en section II.3.4 et celle de la durée de polarisation en section II.3.3. La polarisation se fait donc par l'application directe d'un champ électrique entre les deux électrodes entourant le PVDF-TrFE. Afin de prendre les contacts électriques pour appliquer ce champ, des pointes reliées à des micro-robots de la société Imina Technologies ont été utilisées (http ://www.imina.ch/technology, 2017). Ce système est très pratique car il permet de prendre facilement les contacts mais aussi d'une manière contrôlée : le déplacement des robots et des pointes peut se faire avec une grande précision, ce qui permet de prendre des contacts assez doux, sans trop forcer sur l'échantillon.

Dans un premier temps, il est intéressant de visualiser l'effet du champ électrique sur un échantillon. Pour cela, différentes tensions ont été appliquées successivement par ordre croissant et pour une durée de 5 min. Pour chacune de ces polarisations, la déflexion en bout de levier du premier mode de résonance a été mesurée avec actionnement piézoélectrique. Comme on peut le voir sur la figure II.17, pour les faibles champs électriques, l'efficacité de la polarisation augmente lentement avec la durée jusqu'à atteindre un palier. Cela montre dans un premier temps l'importance de la valeur du champ électrique : s'il est trop faible, l'effet piézoélectrique ne sera pas maximal, peu importe la durée de polarisation. On remarque également que, plus le champ électrique est important, plus le plateau est atteint rapidement. De plus, pour les plus hauts champs électriques, le palier est directement atteint après cinq minutes de polarisation. Enfin, l'efficacité de la polarisation augmente avec la valeur du

champ électrique jusqu'à un palier : pour les forts champs électriques, tous les dipôles sont alignés. L'effet piézoélectrique est alors maximal et il est inutile d'augmenter encore le champ électrique (avec le risque d'atteindre le seuil de claquage).

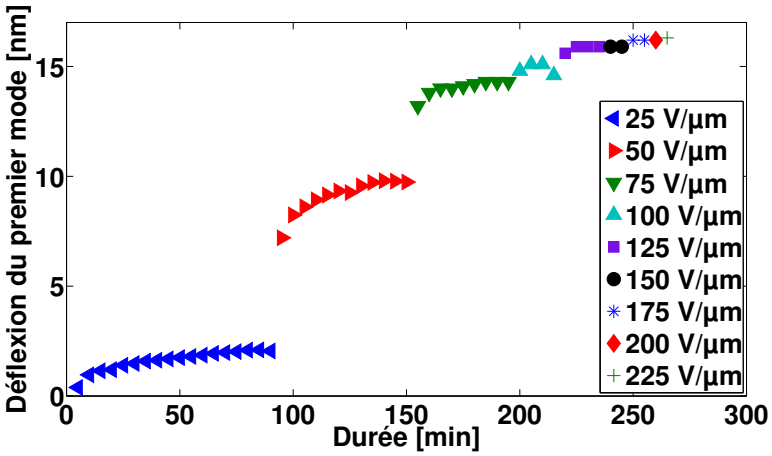

FIGURE II.17 – *Évolution de l'actionnement piézoélectrique en fonction de la durée et du champ de polarisation.*

Afin de confirmer ce résultat, six échantillons ont été polarisés par polarisation successive à différentes tensions. Pour chacune des tensions, la durée de polarisation est suffisamment longue pour assurer d'avoir atteint l'effet maximal de cette polarisation, en accord avec les résultats de la figure II.17. Les résultats sont présentés figure II.18. On retrouve bien les résultats précédents, c'est à dire une augmentation de l'actionnement piézoélectrique avec l'augmentation du champ électrique de polarisation. De plus, un palier est atteint pour une polarisation à 180 V/µm, donnant un effet piézoélectrique maximal. Cependant, si l'on considère 95 % de la valeur finale comme critère pour avoir un actionnement satisfaisant, un champ électrique de seulement 100 V/µm est suffisant. Cela permet d'avoir de bonnes propriétés piézoélectriques tout en dépensant moins d'énergie (le champ électrique nécessaire est pratiquement divisé par deux). Cela permet également de limiter les fuites de courant et le claquage du PVDF-TrFE lorsqu'on polarise à haute tension. C'est donc cette valeur de champ de polarisation qui a été retenue pour la suite de cette étude. Il est à noter que les barres d'erreur correspondent à l'écart type des mesures pour les six échantillons.

II.3.3 Influence de la durée de polarisation

De même que le champ électrique de polarisation, la durée de polarisation est importante en fonction du champ choisi, comme il a été montré précédemment. Étant donné que la valeur de 100 V/µm a été retenue, il faut déterminer la durée optimale de polarisation liée à ce champ électrique. Afin de mener cette étude, six échantillons ont été polarisés à 100 V/µm pour des durées croissantes successives. Il est supposé ici que les durées de polarisations sont cumulatives. Cela veut dire qu'un échantillon qui subit une polarisation pendant cinq minutes, puis une autre pendant quinze minutes, sera supposé avoir été polarisé en tout pendant vingt minutes. Les résultats montrent que la polarisation à 100 V/µm est maximale à partir d'une heure de polarisation (figure II.19). Cependant, elle reste très efficace dès les premières minutes et si on choisit le critère des 95 % de la valeur finale, finalement 5 min de polarisation sont suffisantes pour avoir de bonnes propriétés piézoélectriques. Encore une fois, cela permet de dépenser moins d'énergie et de temps tout en ayant de bons résonateurs. Ces résultats démontrent aussi que, ce qui importe le plus lors de la polarisation, c'est la valeur du champ électrique : plus ce champ est important, plus la polarisation se fait rapidement. En effet, l'orientation des domaines électriques se fait sous l'action du champ électrique. Afin de tous les orienter dans le même sens, il faut apporter une énergie suffisante aux chaînes du polymère. Donc si cette énergie est

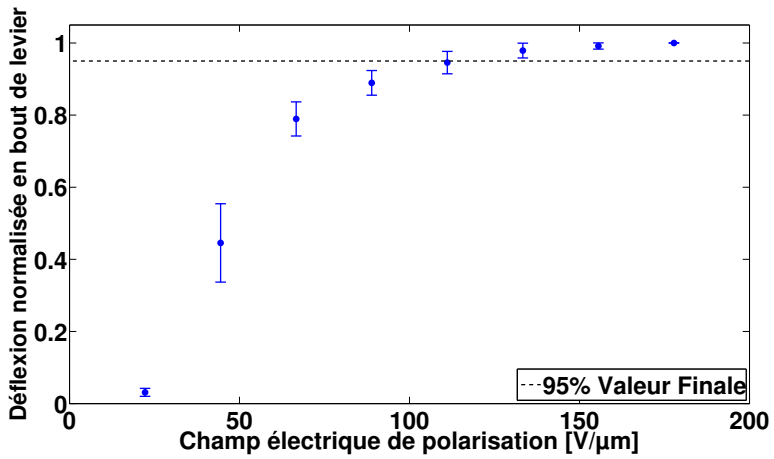

FIGURE II.18 – *Influence du champ électrique de polarisation sur l'actionnement piézoélectrique des résonateurs (la normalisation effectuée est telle que l'on a 1 pour le champ électrique maximal de polarisation*

trop faible, attendre longtemps ne changera rien.

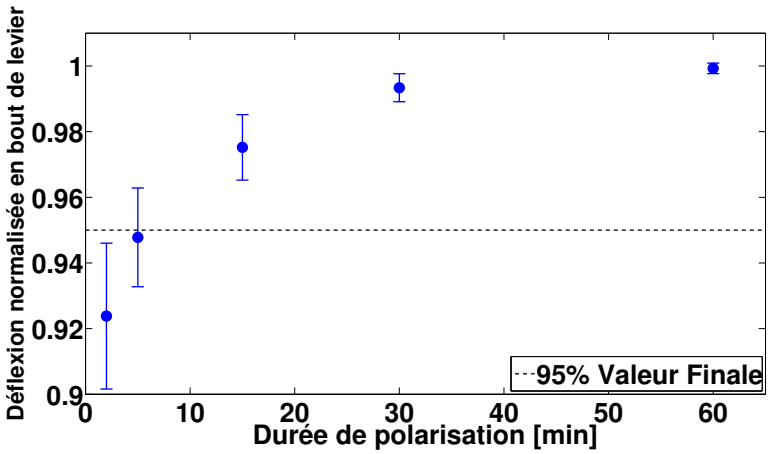

FIGURE II.19 – *Influence de la durée de polarisation pour un champ électrique de 100 V/µm.*

De longues durées de polarisation n'ayant *a priori* que très peu d'influence sur les propriétés piézoélectriques, des mesures de vieillissement ont été faites en fonction de la durée de polarisation afin de voir si les échantillons polarisés plus longtemps maintiennent mieux la polarisation. Quatre échantillons ont été polarisés pendant 2, 5, 15 et 30 min. La déflexion du premier mode de résonance a été mesurée tout de suite après la polarisation. Cette mesure sert de référence, de point de départ à partir duquel le vieillissement commence. Par la suite, la déflexion de ces mêmes échantillons a été mesurée pour différents temps après la polarisation. Les résultats sont visibles figure II.20. Une perte rapide de la polarisation a lieu dès les premières minutes après la polarisation, puis cela ralentit au fil des jours. Les résultats ne présentent pas d'influence notable de la durée de polarisation sur le vieillissement. On remarque également qu'après vingt jours, plus de 75 % de l'efficacité piézoélectrique est toujours présente, un critère important de fiabilité des résonateurs fabriqués.

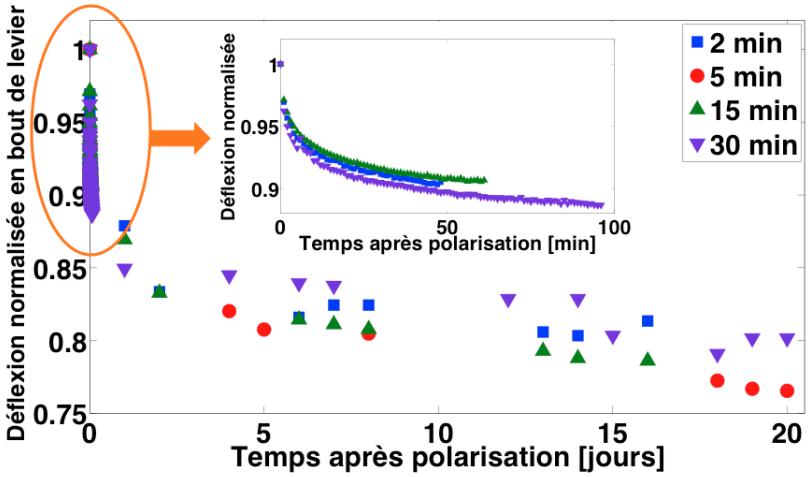

FIGURE II.20 – *Influence de la durée de polarisation sur le vieillissement des résonateurs.*

II.3.4 Influence de la durée de recuit

Le dernier paramètre étudié est la durée du recuit du PVDF-TrFE à 140 °C. La température de 140 °C a été retenue comme celle donnant le plus fort taux de cristallinité du PVDF-TrFE (figure II.21), ce qui améliore donc les propriétés piézoélectriques [16]. En effet, à 140 °C, le PVDF-TrFE se trouve dans le domaine paraélectrique, ce qui permet une meilleure mobilité des chaînes du polymère en comparaison avec le domaine ferroélectrique. En refroidissant, ces chaînes ont de plus grandes chances de s'immobiliser dans des empilements réguliers, augmentant ainsi le taux de cristallinité (jusqu'à 91%). L'effet piézoélectrique provenant de l'alignement de ces domaines cristallins, le recuit permet ainsi d'augmenter les propriétés piézoélectriques du PVDF-TrFE. Il reste cependant à déterminer la durée nécessaire du recuit pour avoir une bonne cristallisation.

Pour cela, des échantillons ont été recuits pour des durées différentes. Six échantillons ont été utilisés pour chaque durée. L'influence de la durée du recuit a ensuite été évaluée par la mesure de la déflexion du premier mode de résonance (figure II.22). Il est à noter que pour ces mesures, la tension d'actionnement est dix fois plus importante (210 mV au lieu de 21 mV) afin de pouvoir mesurer les faibles déflexions avant la polarisation des résonateurs. Cela explique les valeurs de déflexion mesurées très grandes en comparaison avec les mesures précédentes. Dans un premier temps, la déflexion a été mesurée avant la polarisation. Il est clairement visible que, sans l'étape de polarisation, les propriétés piézoélectriques sont faibles et de longues durées de recuit n'y changent rien. En revanche, après polarisation, une augmentation des propriétés piézoélectriques s'opère avec la durée du recuit jusqu'à atteindre un palier. Ce palier est très vite atteint : 5 min de recuit suffisent pour avoir un effet piézoélectrique maximal. On remarque également que si l'échantillon ne subit pas de recuit, les propriétés piézoélectriques sont très faibles, ce qui indique bien que le taux de cristallinité est également faible. Ceci démontre bien la nécessité de l'étape de recuit du PVDF-TrFE. Il est à noter que la vitesse de refroidissement du PVDF-TrFE après le recuit peut aussi avoir une influence sur le taux de cristallinité, et donc sur les propriétés piézoélectriques. Cependant, ce paramètre n'a pas été étudié. Tous les échantillons ont été refroidis sans contrôle, à l'air libre et à température ambiante. Mais les salles du laboratoire étant climatisées, la vitesse de refroidissement a dû être semblable pour tous les échantillons.

De même que pour la durée de polarisation, il est intéressant de savoir si la durée du recuit a une influence sur le vieillissement des résonateurs. Pour y répondre, quatre échantillons ont été recuit à 140 °C pendant 3, 10, 20 et 30 min, puis polarisés dans les conditions déterminées précédemment : à 100 V/µm pendant 5 min. La référence est également la mesure de la déflexion juste après la polarisation. Ensuite, la déflexion a été mesurée pour différents temps après la polarisation. La figure II.23 présente les résultats de cette étude. On retrouve encore la même allure de courbe, avec une

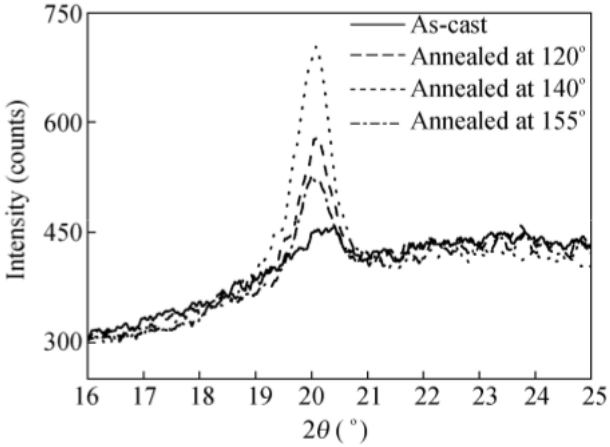

FIGURE II.21 – *Résultats du motif de la diffraction par rayons X pour le film de PVDF-TrFE non recuit et pour ceux recuits à 120 °C, 140 °C et 155 °C. Une plus forte intensité indique un plus fort taux de cristallinité. On arrive ainsi à un taux de 91 % pour celui recuit à 140 °C [16].*

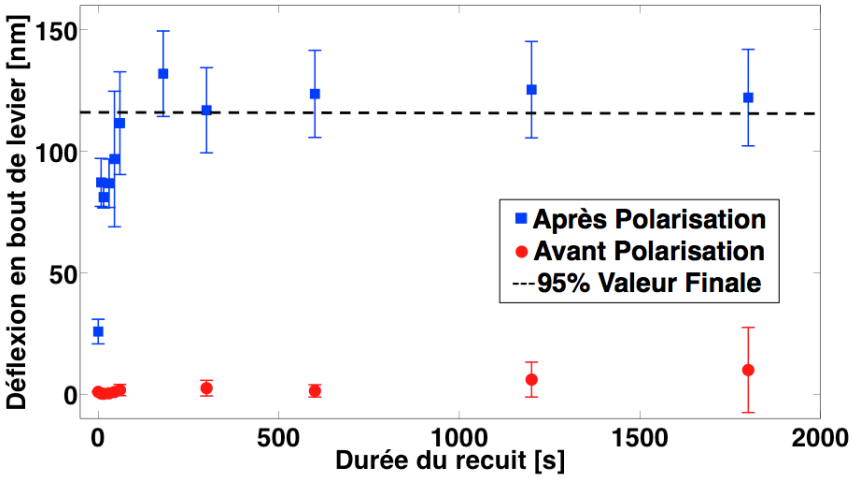

FIGURE II.22 – *Influence de la durée du recuit à 140 °C pour une polarisation à 100 V/µm.*

décroissance rapide dans les premières heures, puis un ralentissement de cette décroissance. Encore une fois, de longues durées de recuit ne semblent pas améliorer la tenue de la polarisation des résonateurs. On voit également que la perte de polarisation semble se stabiliser après un mois, avec une perte inférieure à 25 %. Cela démontre que ces résonateurs sont encore utilisables au moins un mois après leur fabrication, et donc qu'il peuvent fonctionner potentiellement sur de longues durées.

Finalement, la figure II.24 récapitule tout le procédé de fabrication ainsi que l'optimisation du recuit et de la polarisation qui a été retenue et qui sera utilisée pour la fabrication des résonateurs qui seront utilisés dans la suite de ces travaux.

Des mesures de cycles ferroélectriques ont également été faites pour les résonateurs optimisés et pour un résonateur qui n'a pas été polarisé. Les résultats sont présentés sur la figure II.25. Une tension triangulaire de fréquence 0,1 Hz a été appliquée aux résonateurs en faisant un balayage en amplitude de 0 V à -400 V, puis de -400 V à 400 V, et enfin de 400 V à 0 V, afin d'effectuer un cycle complet. Pendant ce cycle, la polarisation de la couche piézoélectrique est mesurée en fonction de la tension appliquée. On observe tout d'abord que la valeur de la polarisation pour le résonateur non polarisé est très faible, ce qui paraît évident. À partir de ces mesures, il est possible de déterminer deux paramètres : le champ

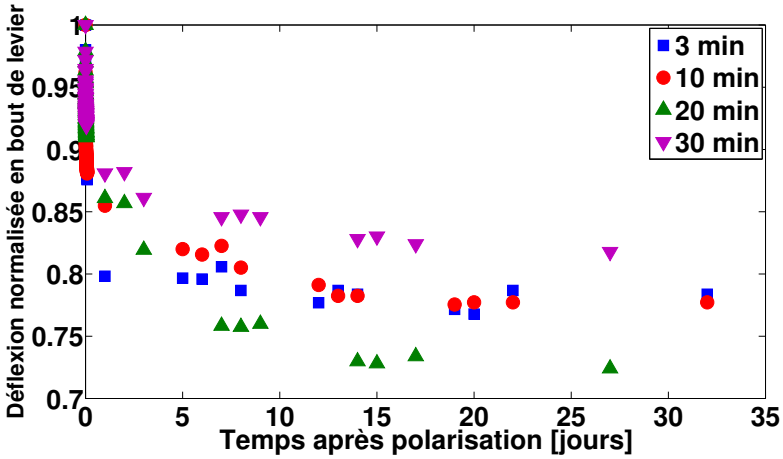

FIGURE II.23 – *Influence de la durée du recuit à 140 °C sur le vieillissement des résonateurs.*

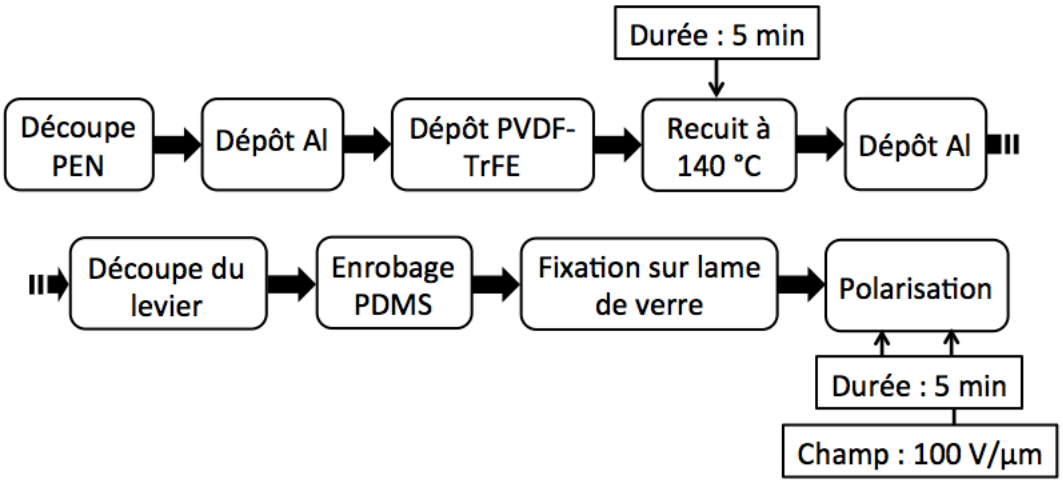

FIGURE II.24 – *Récapitulatif des différentes étapes qui permettent l'obtention de résonateurs fonctionnels, avec l'optimisation du recuit et de la polarisation.*

électrique coercitif et la polarisation rémanente. Le champ électrique coercitif correspond à la valeur du champ électrique pour laquelle la polarisation est nulle. Cela correspond à la valeur du champ électrique qui permet de retourner l'orientation des dipôles électriques dans le matériau, par analogie avec les matériaux ferromagnétiques. Une valeur élevée du champ coercitif signifie que le matériau ne se dépolarisera pas facilement car il faudrait pour cela lui appliquer un fort champ électrique. La polarisation rémanente correspond à la valeur de la polarisation du matériau lorsqu'il n'y a pas de champ électrique appliqué. Cela signifie que, lorsqu'on polarise le matériau, les dipôles électriques s'orientent avec le champ électrique appliqué. Une fois que la polarisation est terminée et qu'on coupe le champ électrique, les dipôles conservent leur orientation et génèrent donc une polarisation qui perdure. On remarque que la polarisation rémanente du résonateur non polarisé est très faible, ce qui explique la faible efficacité d'actionnement piézoélectrique. Les valeurs mesurées du champ électrique coercitif et de la polarisation rémanente sont respectivement de 45 V/µm et 71 mC/m^2. Ces valeurs correspondent avec celles données par le fournisseur (Piezotech) du PVDF-TrFE qui sont de 50 V/µm et 70 mC/m^2.

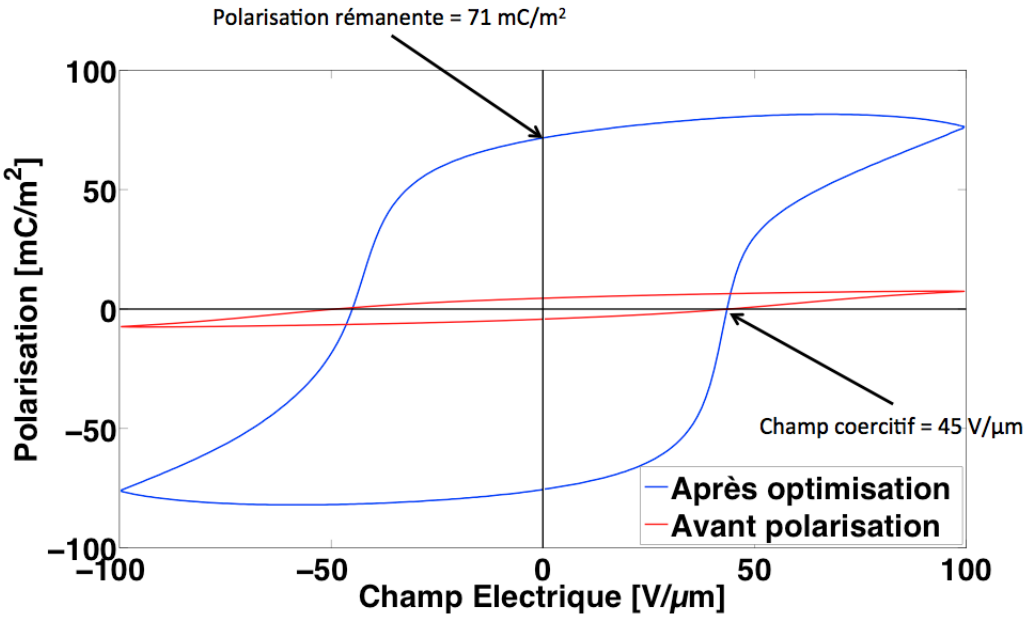

FIGURE II.25 – *Mesure de cycles ferroélectriques pour un résonateur optimisé (par rapport au procédé de fabrication) et pour un résonateur non polarisé.*

II.4 Autres paramètres d'influence

II.4.1 Épaisseur du PVDF-TrFE

On est en droit de se demander si l'épaisseur de PVDF-TrFE a une influence sur l'actionnement des résonateurs. Une étude rapide pour cinq épaisseurs a été menée. Les valeurs de la déflexion du premier mode ont été relevées pour cinq résonateurs différents (figure II.26). Il n'y a pas de réelle tendance qui se dégage et qui montrerait qu'une épaisseur plus importante ou plus faible donnerait un meilleur actionnement des résonateurs. C'est pourquoi cette étude n'a pas été approfondie.

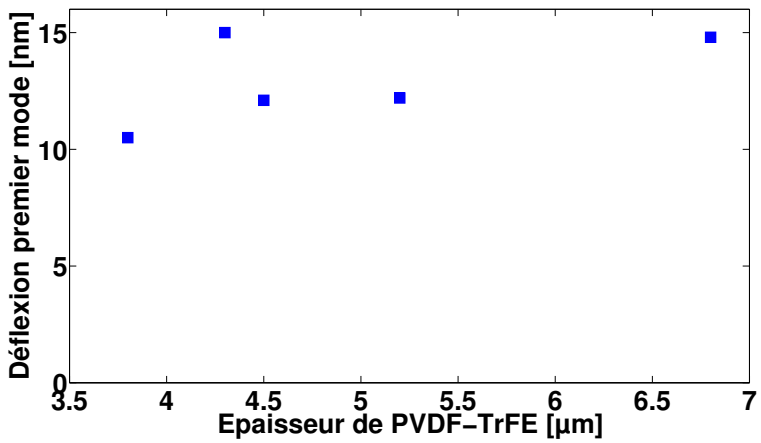

FIGURE II.26 – *Déflexion du premier mode de résonance en fonction de l'épaisseur de PVDF-TrFE.*

Cependant, il est important de remarquer l'influence de l'épaisseur de PVDF-TrFE sur d'autres facteurs. En effet, l'optimisation de la polarisation montre qu'un champ électrique d'au moins 100 V/µm est nécessaire. Donc, plus l'épaisseur est importante, plus la tension à appliquer pour polariser les

résonateurs devra être grande. Pour un film de PVDF-TrFE de 10 µm d'épaisseur, il faut donc une tension de 1 kV, ce qui est déjà important. À l'inverse, si l'épaisseur est faible, il peut y avoir des complications lors de la polarisation car le moindre défaut dans la couche du matériau crée des fuites de courant et le PVDF-TrFE peut éclater sous l'effet du champ électrique de claquage (figure II.27). Également, plus l'épaisseur est faible, plus la capacité statique est importante, ce qui est gênant pour les mesures électriques (cela est étudié au chapitre III). C'est pourquoi une épaisseur de 4 µm a été choisie. C'est un bon compromis entre la tension de polarisation qui devra être d'au moins 400 V, ce qui reste raisonnable, et une polarisation plus simple ainsi qu'une capacité statique pas trop importante (cette dernière étant proportionnelle à l'inverse de la distance entre les deux électrodes).

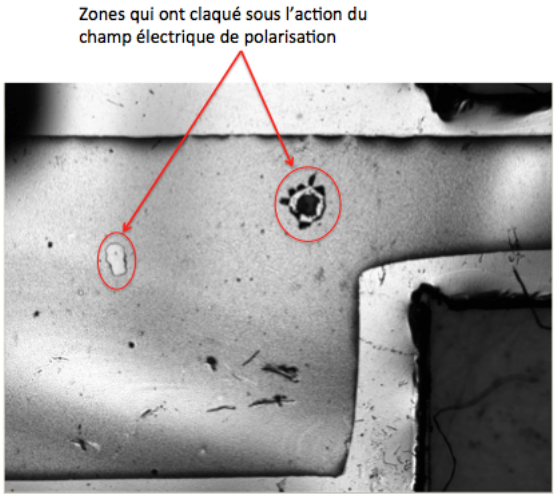

FIGURE II.27 – *Claquage du PVDF-TrFE au niveau des défauts de la couche sous l'effet du champ électrique de polarisation.*

II.4.2 PVDF-TrFE-CTFE

Il a été vu que l'ajout du TrFE au PVDF permet de faciliter la conformation dans la phase β qui est piézoélectrique, à condition de polariser le matériau. Il existe aussi des terpolymères qui consistent à ajouter du chlorotétrafluoroéthylène (CTFE) ou du chlorofluoroéthylène (CFE). Ces matériaux présentent des propriétés électrostrictives importantes (élongation >7 % sous un champ électrique de 150 V/µm, d'après la société Piezotech). De plus, grâce à l'encombrement stérique des atomes de chlore, la polarisation est en théorie facilitée : un champ électrique moins important est nécessaire pour polariser le matériau. Dans cette idée, le terpolymère PVDF-TrFE-CTFE d'une composition molaire 61,8 %/30,4 %/7,8 % fourni par Piezotech a été testé afin de voir si ce matériau alternatif peut être utilisé à la place du PVDF-TrFE dans le cas de notre étude.

Le procédé de fabrication est le même que pour les résonateurs avec le PVDF-TrFE. Dans un premier temps, l'influence de la durée de recuit a été étudiée. Pour cela, les échantillons ont été recuits à 115 °C pendant différentes durées, puis polarisés à 125 V/µm pendant 10 min afin d'être sûr que cette polarisation soit optimale. La température de 115 °C a été choisie afin d'amener le matériau dans le domaine paraélectrique sans dépasser la température de fusion, l'idée étant d'apporter la plus grande mobilité possible pour les chaînes du terpolymère. En effet, l'ajout du CTFE abaisse la température de fusion, qui tombe à 125 °C (au lieu de 150 °C pour le PVDF-TrFE). Les résultats de la durée du recuit sont présentés figure II.28. Il semblerait qu'une durée de recuit d'environ 10 min soit optimale. En effet, pour les faibles durées, l'actionnement piézoélectrique est faible. Il en est de même pour les plus longues durées, où l'actionnement semble décroitre avec l'augmentation de la durée. Il se peut que la température choisie soit trop proche de la température de fusion et que de longues

durées de recuit aient dégradé le matériau, ce qui expliquerait des propriétés piézoélectriques moindres.

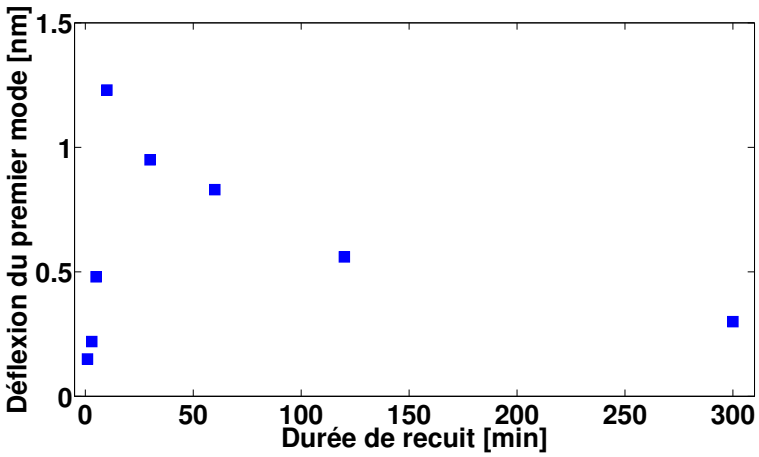

FIGURE II.28 – *Influence de la durée de recuit à 115 °C sur l'actionnement des résonateurs faits à partir du PVDF-TrFE-CTFE.*

Le second paramètre étudié est la polarisation. Pour vérifier que l'ajout de CTFE permet de polariser le terpolymère avec un champ électrique plus faible que pour le copolymère, un échantillon a été polarisé successivement à différents champs électriques, pendant des durées cumulatives (figure II.29). Il en résulte que, dans le cas du terpolymère, le champ électrique nécessaire pour avoir un actionnement optimal est effectivement plus faible que pour le copolymère : 50 V/µm au lieu de 100 V/µm. Cependant, on remarque également que la déflexion est beaucoup plus faible que dans le cas du copolymère (≈1,5 nm contre ≈15 nm, donc environ dix fois plus faible pour la même tension d'actionnement). Les propriétés du terpolymère sont donc moins performantes en ce qui concerne l'actionnement des résonateurs. Il faut également noter que l'étude sur le terpolymère n'est que partielle, faute de temps. Il faudrait confirmer ces résultats en refaisant les mêmes expériences sur un plus grand nombre d'échantillons afin d'avoir des barres d'erreurs et valider, ou non, ces premiers résultats.

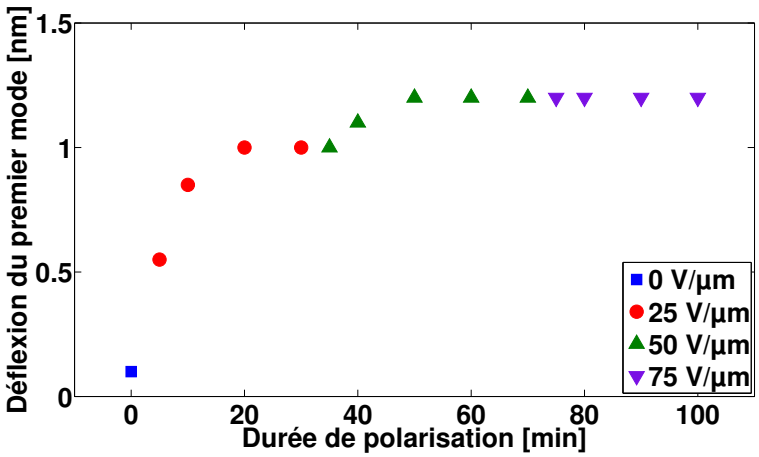

FIGURE II.29 – *Performance de l'actionnement en fonction du champ de polarisation et de la durée.*

II.5 Conclusions

Un procédé de fabrication rapide, simple et peu coûteux a été présenté, reposant principalement sur la xurographie, une technique assez récente développée au laboratoire IMS et adaptée pour la mise en forme de matériaux organiques. Hormis la xurographie, les techniques utilisées sont classiques et simples. Une optimisation de ce procédé de fabrication a été réalisée, portant sur trois paramètres : le champ électrique et la durée de polarisation ainsi que la durée du recuit à 140 °C. Il en résulte que pour une polarisation à température ambiante, pour des films de PVDF-TrFE de 4 µm, 100 V/µm pendant 5 min est suffisant pour avoir de bonnes propriétés piézoélectriques. Il est toujours possible d'aller au-delà (champ électrique et durée) pour avoir de meilleures performances mais cela a un coût énergétique et temporel non négligeable. Quant au recuit, 5 min suffisent également. Après optimisation, la perte de la polarisation est inférieure à 25 % un mois après avoir polarisé les résonateurs et semble se stabiliser, ce qui est prometteur pour la durée de vie des résonateurs. Enfin, l'optimisation du procédé a permis d'obtenir un coefficient d_{31} de 11 pm/V, corroborant les données de la littérature.

Références

[1] C. Liu. *Foundations of MEMS*. Pearson Prentice Hall, 2006.

[2] V. Kaajakari. *Practical MEMS*. Small Gear Publishing, 2009.

[3] P. Papet. Matériaux piézoélectriques : les céramiques oxydes à base de métaux de transition. *Techniques de l'Ingénieur*, K740 V2, 2012.

[4] Khaled S. Ramadan, D. Sameoto, and S. Evoy. A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers. *Smart Materials and Structures*, 23(033001), 2014.

[5] T. R. Shrout and S. J. Zhang. Lead-free ceramics : alternatives for PZT ? *Journal of Electroceramics*, 19(113-126), 2007.

[6] J. S. Harrison and Z. Ounaies. *Piezoelectric Polymers*. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 3, 2002.

[7] D. Fuard, T. Tzvetkova-Chevolleau, S. Decossas, P. Tracqui, and P. Schiavone. Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility. *Microelectronic Engineering*, 85(1289-1293), 2008.

[8] J. Teng and P. D. Prewett. Focused ion beam fabrication of thermally actuated bimorph cantilevers. *Sensors and Actuators A*, 123-124(608-613), 2005.

[9] J. W. Judy. Microelectromechanical systems (MEMS) : fabrication, design and applications. *Smart Materials and Structures*, 10(1115-1134), 2001.

[10] Z. Nie and E. Kumacheva. Patterning surfaces with functional polymers. *Nature Materials*, 7(277-290), 2008.

[11] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boutté, and J. D. Andrade. Xurograhy : Rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 14(6), 2005.

[12] E. Lemaire, D. Thuau, B. Caillard, and I. Dufour. Fast-fabrication process for low environmental impact microsystems. *Journal of Cleaner Production*, 108(207-216), 2015.

[13] C. Li, P.-M. Wu, S. Lee, A. Gorton, M. J. Schulz, and C. H. Ahn. Flexible dome and bump shape piezoelectric tactile sensors using PVDF-TrFE copolymer. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 17(334-341), 2008.

[14] T. Furukawa. Piezoelectricity and pyroelectricity in polymers. *6th International Symposium on Electrets*, Oxford, England(182-193), 1988.

[15] Q.-M. Wang, X.-H. Du, B. Xu, and L. E. Cross. Electromechanical coupling and output efficiency of piezoelectric bending actuators. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 46(638-646), 1999.

[16] K. Lau, Y. Liu, H. Chen, and R. L. Withers. Effect of annealing temperature on the morphology and piezoresponse characterisation of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) films via scanning probe microscopy. *Advances in Condensed Matter Physics*, 2013(435938), 2013.

CHAPITRE III

SYSTÈME DE MESURE

L'objectif d'un capteur est de pouvoir transmettre une information compréhensible par un utilisateur. Pour cela, il est important qu'il puisse transformer une information en un signal facilement interprétable : c'est ce qu'on appelle la transduction. Cela peut être, par exemple, la transformation d'une déformation mécanique en un signal électrique, ce qui est le cas pour l'effet piézoélectrique direct. De manière générale, dans les applications de type capteur, la transduction se fait d'un domaine (mécanique, optique, chimique, ...) vers le domaine électrique, puisqu'il est très facile d'exploiter les signaux électriques par une instrumentation dédiée. À l'inverse, pour les applications de type actionneur, la transduction se fait généralement du domaine électrique vers le domaine mécanique. De nombreux paramètres sont importants pour un capteur, comme la sensibilité, la sélectivité, la résolution, le domaine d'utilisation ou encore la justesse. Pour déterminer ces caractéristiques, il faut prendre en compte toute la chaîne de mesure (transduction, conditionnement des signaux et traitement). Il est donc important que le système de mesure lié au capteur soit performant afin d'assurer une bonne lecture et exploitation de l'information délivrée.

Ce chapitre présente un système complet qui permet d'effectuer des mesures électriques de fréquence de résonance des résonateurs présentés au chapitre II. En effet, les mesures effectuées pour l'optimisation du procédé de fabrication ont été faites à l'aide d'un vibromètre laser. Bien que cet appareil soit très utile pour faire des mesures de résonance, il est tout de même encombrant et il n'est pas possible de l'utiliser pour faire des mesures dans un incubateur, avec des cellules vivantes. Il faut donc que le mouvement des résonateurs ne soit plus interprété optiquement mais électriquement. C'est tout l'intérêt de l'utilisation des deux effets piézoélectriques : les résonateurs sont actionnés par l'effet piézoélectrique indirect (l'application d'un champ électrique entraîne la déformation mécanique du PVDF-TrFE) et la lecture de la résonance se fait grâce à l'effet direct (une déformation mécanique entraîne l'apparition de charges électriques) car lors du mouvement du levier, le PVDF-TrFE se déforme, créant ainsi des charges électriques.

III.1 Technique de mesure de la résonance

III.1.1 Type de détection

De la même manière qu'il existe différentes techniques couramment utilisées pour actionner les résonateurs MEMS, la détection du mouvement de ces derniers peut se faire de différentes façons. On retrouve un peu les mêmes principes dans la détection que dans l'actionnement, à savoir : électrostatique, piézorésistif et piézoélectrique, pour ne citer que ces trois là qui sont les plus utilisés. Afin de comparer ces trois types de détection, le tableau III.1 résume les avantages et les inconvénients des différentes techniques. Il est à noter que le choix d'un type de détection ne se base pas forcément sur la sensibilité. C'est un paramètre important mais il faut aussi considérer d'autres aspects, comme la technologie nécessaire, la puissance consommée ou encore la température d'utilisation. L'avantage de la détection piézoélectrique est que cela sert aussi pour l'actionnement des MEMS (voir chapitre II). Donc, si la piézoélectricité a été choisie pour l'actionnement, il est normal que ce soit aussi le cas pour la détection. C'est pour cela que ce type de détection a été choisi pour mener à bien ces travaux. De plus, comme le matériau piézoélectrique est déjà excité par un champ électrique pour actionner les résonateurs (effet piézoélectrique indirect), il n'y a pas besoin d'une autre source d'énergie pour la détection du mouvement grâce à l'effet piézoélectrique direct. Cette technique de détection est donc très pratique en terme de fabrication et en terme de puissance consommée. Également, étant donné que les résonateurs doivent fonctionner en milieu liquide conducteur, une détection intégrée est très utile, ce que ne présente pas une détection électrostatique, par exemple.

Détection	Avantages	Inconvénients
Électrostatique	• Simplicité des matériaux • Réponse rapide • Faibles tension et courant	• Grande surface nécessaire pour un effet capacitif suffisant • Électronique de détection non triviale
Piézorésistive	• Bonne sensibilité	• Sensible aux changements de température (et à l'environnement en général)
Piézoélectrique	• Pas de puissance consommée pour la détection	• Ne convient pas pour des opérations à hautes températures • Intégration dans des composants non triviale

TABLE III.1 – *Comparaison des différents types de détection des MEMS couramment utilisés* [1, 2].

III.1.2 Mesure de la résonance piézoélectrique

L'effet piézoélectrique direct a donc été choisi pour détecter le mouvement des leviers et, notamment, pour pouvoir déterminer la fréquence de résonance de ces derniers. Il faut cependant déterminer la technique de mesure et l'instrumentation qui servira à collecter les charges électriques créées. Pour ce qui est de la technique de mesure, deux techniques existent principalement : soit par un montage oscillateur, où l'on génère un signal directement à la fréquence de résonance, soit en faisant un balayage en fréquence de l'excitation et en mesurant le spectre d'impédance ou d'admittance, par exemple, pour déterminer la fréquence correspondant à un point particulier (comme le maximum de la conductance). Dans le premier cas, on a une mesure directe de la fréquence de résonance alors que pour la mesure du spectre de résonance, il faut extraire des mesures cette fréquence.

Montage oscillateur

Les oscillateurs sont présents dans la majorité des systèmes électroniques. Ils sont utilisés pour traquer le temps qui passe, comme dans les montres, ou, par exemple, pour servir de signal d'horloge dans les circuits logiques [3]. On les trouve aussi dans des microsystèmes pour des applications capteur [4]. Une manière de mesurer et de suivre la fréquence propre de ces résonateurs est d'utiliser un montage oscillateur. Le principe est illustré figure III.1. Pour avoir des oscillations, il faut respecter les deux critères de Barkhausen : le déphasage total de la boucle doit être nul (modulo 2π) et le gain total de la boucle doit être supérieur à un. Le résonateur permet de sélectionner la fréquence des oscillations et l'amplificateur permet de compenser le manque de gain afin de respecter le critère de Barkhausen à la fréquence sélectionnée. Afin de traquer la fréquence du signal en sortie du montage oscillateur, une boucle à verrouillage de phase (PLL : Phase-Locked Loop) est très souvent utilisée, mais un fréquencemètre peut également être utilisé. L'avantage du montage de type oscillateur est qu'il ne nécessite pas l'utilisation de générateur de signaux sinusoïdaux mais seulement l'alimentation continue de l'amplificateur. En effet, le bruit électronique des différents composants suffit en général à faire démarrer les oscillations qui sont, par la suite, amplifiées par le système.

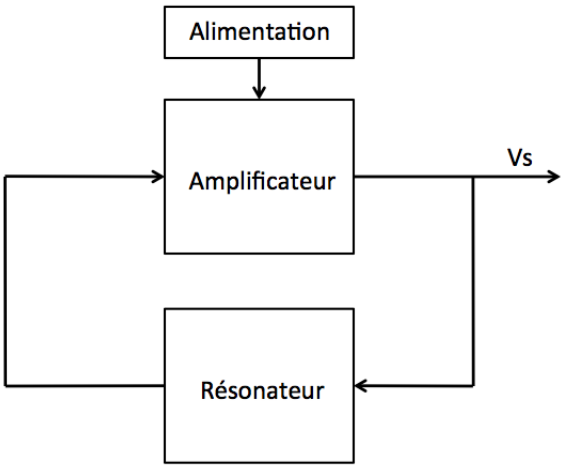

FIGURE III.1 – *Principe d'un montage oscillateur comprenant un amplificateur et une boucle de retour intégrant l'élément résonant.*

Ce type de montage est un bon moyen pour suivre des fréquences de résonance en temps réel. De plus, si l'on fait une compensation automatique de gain, il est possible d'en déduire le facteur de qualité des résonateurs. Effectivement, le facteur de qualité est une image des pertes énergétiques du résonateur dues aux frottements dans l'environnement d'utilisation et des autres pertes intrinsèques dans le matériau. Ainsi, en connaissant la compensation de gain nécessaire au maintien des oscillations, le facteur de qualité peut être déduit.

Bien que ce type de montage soit utilisé dans de nombreuses applications, il en est différemment lorsqu'il s'agit de l'utiliser pour des applications MEMS en milieu liquide [5]. En effet, à cause de l'amortissement dû au milieu liquide qui est plus dense et plus visqueux que l'air, la réponse du système est très fortement dégradée. Elle est alors masquée par la réponse parasite due au couplage électrique entre les ports d'actionnement et de détection [6]. Il faut alors user d'une stratégie pour s'affranchir de ce signal parasite [7]. La solution peut être l'ajout d'un circuit électrique qui reproduit le signal parasite ou l'ajout d'une structure mécaniquement bloquée qui sert à compenser le signal parasite.

Mesure de l'admittance

Une autre façon de déterminer la fréquence de résonance consiste à faire un balayage en fréquence de l'excitation et de mesurer le spectre d'admittance (ou d'impédance) en module et en phase, ou en partie réelle et partie imaginaire. D'un point de vue électrique, un résonateur piézoélectrique peut se représenter sous la forme du schéma présenté figure III.2. La résonance mécanique se représente par un circuit RLC série où R_m est l'image des pertes énergétiques dans le matériau, L_m est l'image de la masse inertielle et C_m celle de la rigidité des éléments mécaniques. En parallèle se trouve une capacité statique C_0 qui est due à l'architecture des résonateurs : deux électrodes séparées par un matériau diélectrique. On trouve également une résistance R_0 en parallèle. Cette résistance représente les pertes diélectriques. Si cette résistance est très grande, elle n'est pas prise en compte dans le modèle. Cependant, dans notre cas, comme nous le verrons par la suite, cette résistance a une influence et il faut donc la considérer.

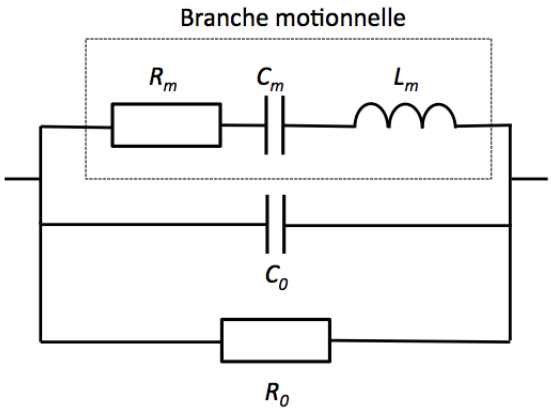

FIGURE III.2 – *Modèle équivalent d'un résonateur piézoélectrique d'un point de vue électrique.*

Dans un premier temps, l'étude de la branche motionnelle seule est réalisée. À partir du modèle électrique équivalent, on peut ainsi déterminer l'admittance Y_m de la partie motionnelle, qui peut s'exprimer sous la forme suivante :

$$Y_m = \frac{jC_m\omega}{1 + j\frac{\omega}{Q\omega_0} - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}} = \frac{jC_m\omega\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2} - j\frac{\omega}{Q\omega_0}\right)}{\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{Q^2\omega_0^2}} = G_m + jB_m \tag{III.1}$$

avec ω la pulsation, Q le facteur de qualité et ω_0 la pulsation propre. Les expressions de Q et de ω_0 sont les suivantes :

$$\omega_0 = \frac{1}{\sqrt{L_m C_m}} \qquad Q = \frac{L_m\omega_0}{R_m} = \frac{1}{R_m C_m \omega_0} \tag{III.2}$$

D'après l'équation III.1, l'admittance peut se mettre sous la forme d'une partie réelle (la conductance notée ici G_m) et d'une partie imaginaire (la susceptance notée ici B_m), qui sont exprimées dans l'équation III.3 :

$$G_m = \frac{\frac{C_m\omega^2}{Q\omega_0}}{\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{Q^2\omega_0^2}} \qquad B_m = \frac{C_m\omega\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)}{\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{Q^2\omega_0^2}} \tag{III.3}$$

À partir des mesures de spectre de la partie réelle et de la partie imaginaire de l'admittance, les valeurs de R_m, C_m et L_m peuvent être déterminées. En effet, la conductance G_m est maximale lorsque $\omega = \omega_0$ et vaut alors $\frac{1}{R_m}$. Cela nous donne alors la fréquence propre ainsi que R_m. De plus, en déterminant le facteur de qualité $Q = \frac{f_0}{\Delta f_{G>G_{max}/2}}$, et connaissant R_m et ω_0, C_m et L_m peuvent être calculés.

Néanmoins, cette étude ne concerne que la branche motionnelle. Or, si l'on mesure la conductance et la susceptance des résonateurs, on obtient les spectres de la figure III.3 qui correspondent au schéma électrique équivalent complet de la figure III.2. On remarque qu'il existe un couplage qui donne naissance à une pente importante pour les deux mesures. Ce couplage provient de la capacité C_0 et de la résistance R_0 du modèle équivalent qui n'ont pas encore été prises en compte dans les équations présentées. En effet, d'après ce modèle, l'admittance Y du résonateur complet peut se mettre sous la forme suivante :

$$Y = \frac{1}{R_0} + jC_0\omega + G_m + jB_m \tag{III.4}$$

Les expressions de la conductance G et de la susceptance B sont ainsi obtenues :

$$G = \frac{1}{R_0} + \frac{\frac{C_m\omega^2}{Q\omega_0}}{\left(1-\frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{Q^2\omega_0^2}} \qquad B = C_0\omega + \frac{C_m\omega\left(1-\frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)}{\left(1-\frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{Q^2\omega_0^2}} \tag{III.5}$$

Pour la susceptance, la capacité statique C_0 a pour effet d'ajouter un terme en $C_0\omega$, ce qui donne lieu à la pente importante que l'on observe. Pour ce qui est de la conductance, la résistance R_0 ajoute un terme en $\frac{1}{R_0}$, ce qui devrait juste ajouter un offset à la courbe. Cependant, la pente qui est présente laisse penser que la résistance R_0 n'est pas constante et varie avec la fréquence. En effet, comme mentionné précédemment, cette résistance représente les pertes diélectriques et est due au fait que la permittivité du matériau piézoélectrique est complexe. En fait, dans le cas d'un diélectrique parfait, sa permittivité est réelle et est liée à sa capacité de stockage d'énergie. Cependant, aucun diélectrique n'est parfait. Il existe donc des pertes dues au mouvement des charges libres (effet résistif), ce qui se traduit par une composante imaginaire de la permittivité. On peut donc exprimer la capacité statique sous la forme :

$$C_0 = \frac{\epsilon_0\epsilon_r S}{h_p} \qquad \text{avec} \qquad \epsilon_r = \epsilon_r' - j\epsilon_r'' \quad , \quad \epsilon_r' > 0 \qquad \text{et} \qquad \epsilon_r'' > 0 \tag{III.6}$$

avec ϵ_0 la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité relative du matériau, S la surface des électrodes en regard et h_p l'épaisseur du matériau piézoélectrique. En exprimant l'admittance de la capacité statique en notation complexe $jC_0\omega = j\frac{\epsilon_0\epsilon_r' S}{h_p}\omega + \frac{\epsilon_0\epsilon_r'' S}{h_p}\omega$, il vient donc un terme réel qui représente la résistance R_0 et qui s'exprime :

$$R_0 = \frac{h_p}{\epsilon_0\epsilon_r'' S\omega} \tag{III.7}$$

Puisque l'admittance Y dépend du terme $1/R_0$ et que R_0 est elle-même inversement proportionnelle à la fréquence, il est normal d'obtenir une pente positive dans les mesures de Y.

Si l'on veut déterminer les différents éléments de la branche motionnelle, il faut donc se ramener à des spectres d'admittance sans le couplage de C_0 et R_0. Dans le cas où il existe un fort couplage qui dépend de la fréquence, une méthode numérique permet de déterminer ce couplage et de l'enlever [8]. Cette méthode consiste à séparer les composantes du spectre qui appartiennent à un système

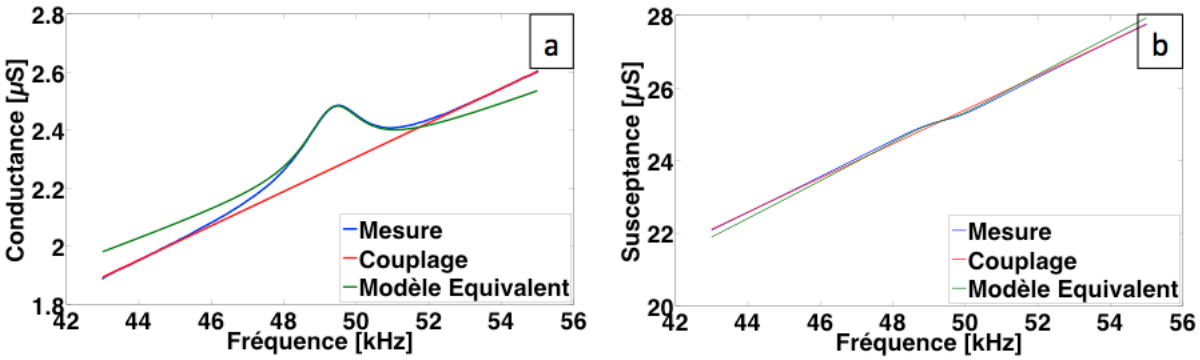

FIGURE III.3 – *Mesure des spectres d'admittance en partie réelle (conductance) et en partie imaginaire (susceptance) dans l'air. La courbe bleue correspond aux mesures, la courbe rouge au couplage dû à R_0 pour la conductance et à C_0 pour la susceptance et la courbe verte au modèle (équation III.5) établi à partir des valeurs des paramètres déterminées par les mesures.*

passe-bande du second ordre et le spectre de "fond" qui est dû au couplage. L'application de cette méthode aux mesures de la partie réelle et de la partie imaginaire du spectre d'admittance est illustrée figure III.3 (réalisée grâce au logiciel Matlab). Ainsi, le couplage est calculé et si on le soustrait aux mesures, on obtient les courbes "redressées" de la figure III.4. Cette méthode est donc très utile dans le cas de forts couplages et permet de déterminer la fréquence de résonance des résonateurs à partir des mesures brutes du spectre d'admittance.

A partir des mesures présentées sur les figures III.3 et III.4, tous les paramètres du modèle équivalent ont été déterminés. En prenant le maximum de la conductance découplée, on trouve la fréquence propre $f_0 = 49,38\,\text{kHz}$ ainsi que la résistance $R_m = 4,76\,\text{M}\Omega$. Un facteur de qualité $Q = 26$ a été calculé, permettant d'établir une valeur de la capacité $C_m = 26,4\,\text{fF}$ et de l'inductance $L_m = 393\,\text{H}$. Il est à noter que ces valeurs ne correspondent pas réellement à des composants électroniques : ce ne sont que des équivalences électriques de la partie mécanique. Quant à la détermination de R_0 à la fréquence f_0, il suffit de prendre la valeur du couplage à f_0 pour la conductance, ce qui nous donne $\frac{1}{R_0}$. On trouve alors $R_0 = 440\,\text{k}\Omega$. Si on prend la valeur du couplage à ω_0 (ou f_0) pour la susceptance, cela nous donne $C_0\omega_0$. On trouve alors $C_0 = 80,9\,\text{pF}$ autour de la fréquence f_0. Après avoir déterminé ces paramètres, le modèle équivalent correspondant a été tracé sur les figures III.3 et III.4 afin de vérifier la concordance entre les mesures et le modèle. On observe que le modèle correspond bien aux mesures près de la résonance, avec cependant un écart lorsque l'on s'éloigne de la résonance. Cet écart vient du fait que R_0 et C_0 sont calculés pour $f = f_0$ et que leur valeur dépend également de la fréquence. Néanmoins, connaissant R_0, C_0 et les dimensions géométriques des leviers, il est alors possible de déterminer la permittivité relative du PVDF-TrFE. On obtient alors $\epsilon_r' = 7,6$ pour la partie réelle et $\epsilon_r'' = 0,69$ pour la partie imaginaire. Ces valeurs sont proches des valeurs présentes dans la littérature ($\epsilon_r' = 8$ et $\epsilon_r'' = 0,4$ [9]), tout en prenant en compte que la permittivité dépend également des conditions de fabrication du PVDF-TrFE, et notamment de sa température de recuit [10].

Les mesures de spectre d'admittance permettent donc de déterminer les éléments du modèle électrique équivalent, mais cela permet surtout d'identifier la fréquence de résonance des résonateurs qui correspond au maximum de la conductance. Cependant, dû à un fort couplage de la capacité C_0 et de la résistance R_0, le spectre de la conductance et celui de la susceptance ne permettent pas, de prime abord, de déterminer la fréquence de résonance. Il faut alors faire un traitement des données afin d'enlever ce couplage. Afin de s'affranchir de ce traitement post-mesure, une stratégie de mesure différentielle a été choisie et est détaillée dans la section suivante.

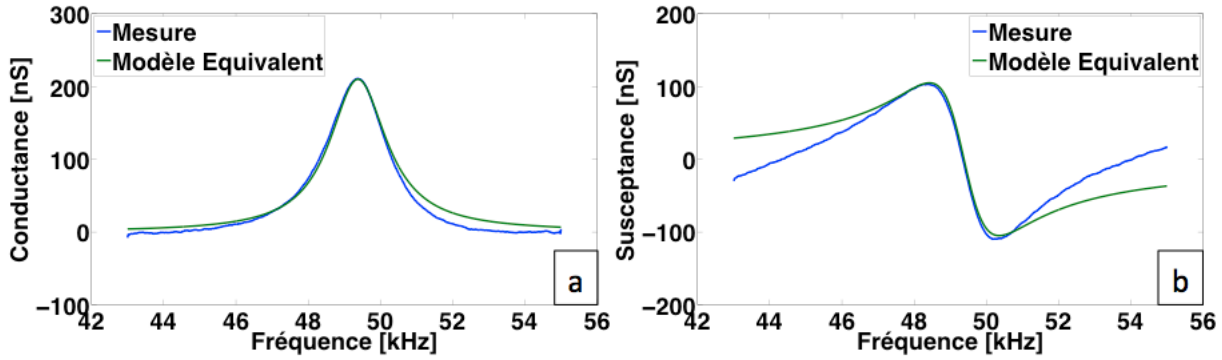

FIGURE III.4 – *Mesure des spectres d'admittance en partie réelle (conductance) et en partie imaginaire (susceptance) après avoir enlevé, de façon numérique, le couplage de C_0 et R_0 à partir des mesures de la figure III.3. La courbe bleue correspond aux mesures et la courbe verte au modèle (équation III.3) établi à partir des valeurs des paramètres déterminées par les mesures.*

III.2 Système de mesure

III.2.1 Principe de la carte électronique

Structure finale des résonateurs

Le choix de la mesure s'est porté sur une mesure du spectre de résonance car cela permet de visualiser la forme du signal électrique reçu et notamment de déterminer le facteur de qualité en mesurant la largeur du pic de résonance. Cependant, il a été montré que dans le cas de la mesure du spectre d'admittance, la résonance n'est pas très visible à cause de l'influence de la capacité statique C_0 et de la résistance R_0. Afin de s'affranchir de l'effet de ces éléments, il a été décidé de faire une mesure différentielle entre le levier suspendu et un autre levier qui lui n'est pas libéré. Ainsi, ces deux structures ont presque le même comportement hors résonance, ce qui permet d'annuler l'effet de C_0 et R_0. En revanche, aux fréquences de résonance, le comportement du levier libéré est différent de l'autre, et c'est cette différence qui permet de détecter la résonance.

Dans le but d'avoir les structures les plus semblables possible pour les deux leviers (même épaisseur de PVDF-TrFE et même surface des électrodes en regard), ces derniers sont fabriqués en même temps sur le même substrat et ils sont également polarisés en même temps avec la même tension. La figure III.5 présente le schéma et une photo de la version finale des résonateurs. L'électrode inférieure est commune aux deux leviers. De plus, un plan de masse a été ajouté tout autour des électrodes dans le but de limiter le bruit de mesure. Les dimensions finales des leviers diffèrent de celles utilisées pour l'optimisation du procédé de fabrication. En effet, afin de diminuer la masse des leviers, le substrat ne fait plus 50 µm mais 25 µm d'épaisseur, la longueur fait 2 mm, au lieu de 3,4 mm, et la largeur 1 mm, au lieu de 2 mm. L'épaisseur de 25 µm a été choisie car cela permet de manipuler assez facilement les substrats sans les abîmer. En effet, une épaisseur de 12 µm a été testée mais les substrats se froissaient très souvent et n'étaient alors plus utilisables. De même, la largeur des leviers fait 1 mm car il est difficile de descendre en dessous en utilisant la xurographie. En effet, l'alignement des échantillons lors de la découpe se faisant à l'œil, en dessous d'une largeur de 1 mm, il devient alors difficile d'assurer un bon alignement. La diminution de la masse et des paramètres géométriques permet aux résonateurs d'être plus sensibles aux variations de masse et de rigidité. Effectivement, la variation de la fréquence de résonance en fonction d'un changement de masse et de rigidité s'écrit :

$$\Delta f_r = \frac{1}{2}\left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m}\right) f_r \tag{III.8}$$

avec k la constante de rigidité du levier et m sa masse. Une diminution de la taille des leviers entraîne une augmentation de la fréquence de résonance. De plus, la diminution de la masse ainsi que l'augmentation de la fréquence a pour conséquence une augmentation de la sensibilité en masse. De même, les changements de dimensions choisis permettent de diminuer la rigidité des leviers et donc, avec l'augmentation de la fréquence de résonance, d'augmenter la sensibilité en rigidité.

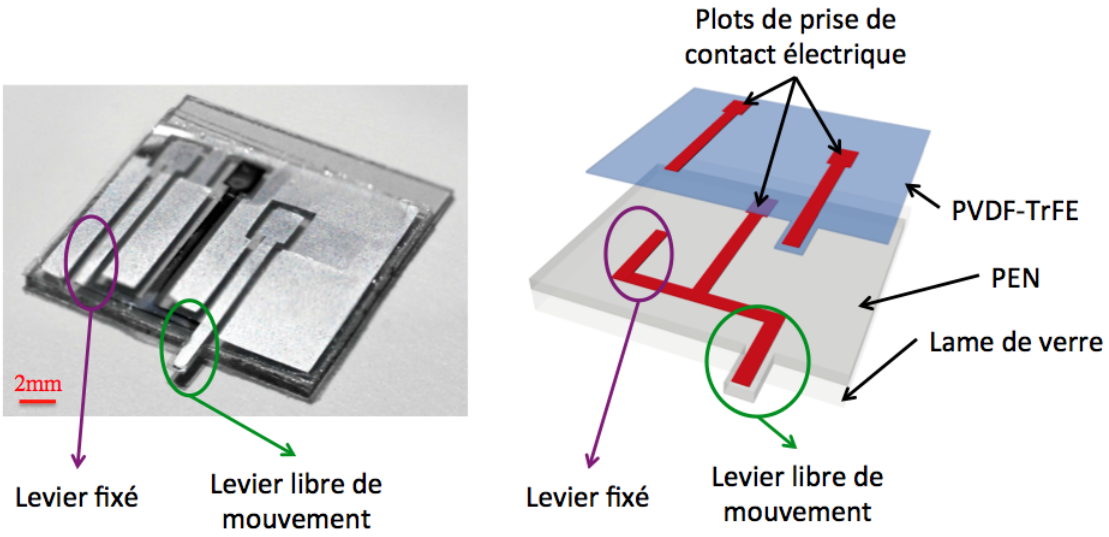

FIGURE III.5 – *Photo d'un résonateur utilisé pour les mesures électriques avec identification du levier et de son homologue qui n'est pas libéré ainsi qu'un schéma en vue éclatée, sans le plan de masse ni la passivation de PDMS, afin de bien comprendre la structure des résonateurs.*

Principe de la mesure

Le principe de la mesure qui est utilisé afin d'acquérir le spectre de résonance des résonateurs est présenté figure III.6. Les deux leviers (celui qui est libre de vibrer et celui qui est bloqué mécaniquement) sont alimentés par deux tensions sinusoïdales synchronisées à la même fréquence, mais pouvant avoir des amplitudes différentes. Le levier qui est libre est représenté, électriquement, par sa branche motionnelle $R_m L_m C_m$, sa capacité statique C_0 et sa résistance R_0, alors que le levier fixe est lui représenté uniquement par sa capacité statique C_0' et sa résistance R_0'. Le signal commun aux deux leviers, qui correspond à l'électrode inférieure, est récupéré et envoyé vers un amplificateur de charge. Afin de déterminer le module et la phase du signal de sortie de l'amplificateur, le principe d'un démodulateur IQ ("In-phase", "Quadrature") est utilisé : le signal est multiplié d'un côté par un signal en phase avec le signal de départ (en "cosinus"), et d'un autre côté par un signal en quadrature de phase avec le signal de départ (en "sinus"). Après cette multiplication des signaux, on obtient deux signaux, ayant le même module, avec une composante à deux fois la fréquence de départ et une composante continue. Dans le but de ne récupérer que des signaux continus contenant le module et la phase, ces deux signaux passent par un filtre passe bas. À partir de ces deux signaux continus, il est alors possible de remonter au module A et à la phase ϕ du signal issu de l'amplificateur de charge.

La carte VNA

Afin de réaliser le principe de mesure énoncé précédemment, une carte électronique a été développée au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) à Toulouse par Fabrice Mathieu. Cette carte peut s'apparenter à un analyseur de réseau vectoriel (VNA). Elle permet, à la fois, d'actionner les résonateurs et d'acquérir leurs spectres de résonance. Un premier avantage de cette carte est qu'elle est très compacte et peut donc être transportée facilement (figure III.8). Il faut cependant une alimentation externe stabilisée de ± 6 V afin d'alimenter l'amplificateur de charge qui

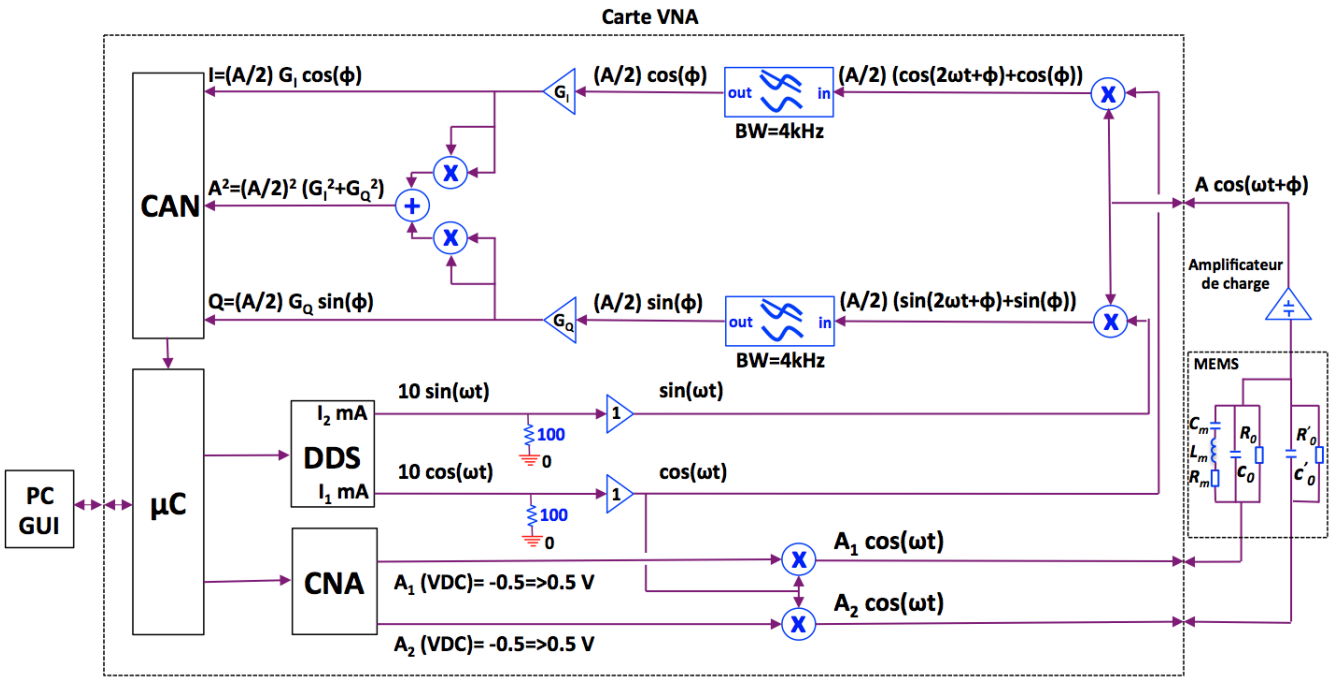

FIGURE III.6 – *Synoptique du principe de mesure choisi (mesure différentielle et démodulateur IQ).*

ne fait pas partie de la carte. Les amplitudes des deux tensions d'actionnement peuvent être réglées de manière indépendante, ce qui est très important. En effet, le but de cette mesure est de faire la différence entre le signal provenant du levier libre et celui provenant du levier fixe, afin d'éliminer l'influence de la capacité statique C_0 et de la résistance R_0. Etant donné que la capacité statique et la résistance viennent de la structure même des résonateurs (deux conducteurs, les électrodes, séparés par un diélectrique, le PVDF-TrFE), comme cela a été précisé précédemment, les deux leviers sont fabriqués sur le même substrat. Ainsi, si deux tensions en opposition de phase sont appliquées sur les deux leviers, le signal récupéré au point commun ne voit l'influence ni de C_0 ni de R_0. En effet, le principe de mesure correspond à la figure III.7. Dans ce cas, Z est l'impédance du levier libre et Z' celle du levier fixe. Une tension U est appliquée d'un côté et une tension $-U$ de l'autre, car une masse virtuelle est imposée par l'amplificateur de charge au niveau de l'électrode commune (potentiel nul). En applicant la loi des nœud, on a :

$$i_0 = i + i' = \frac{U}{Z} + \frac{-U}{Z'} = U(Y - Y') \tag{III.9}$$

L'admittance du levier libre peut s'exprimer comme étant la somme de l'admittance de la branche motionnelle et celle de la branche statique $Y = Y_m + Y_s$. Dans le cas où les deux leviers sont strictement identiques, ils ont la même admittance statique, donc $Y' = Y_s$. On obtient alors :

$$i_0 = U(Y_m + Y_s - Y_s) = UY_m \tag{III.10}$$

Il est alors possible de déterminer la charge électrique $Q_{élec}$ par la relation $i_0 = \frac{dQ_{élec}}{dt}$. On obtient ainsi en notation complexe :

$$Q_{élec} = \frac{I}{j\omega} = U\frac{Y_m}{j\omega} \tag{III.11}$$

La tension en sortie de l'amplificateur de charge est donc proportionnelle à $\frac{Y_m}{j\omega}$. Étant donné que l'expression de Y_m est celle d'un système passe-bande, on obtient donc un système passe-bas du second ordre en sortie de l'amplificateur de charge.

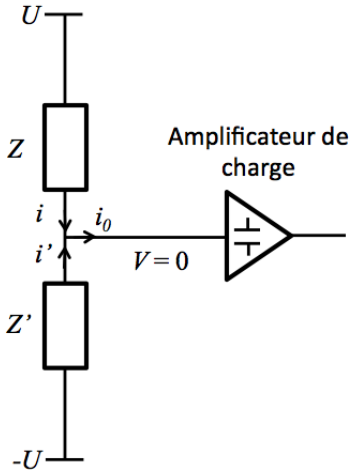

FIGURE III.7 – *Schéma électrique expliquant le signal qui est récupéré en sortie de l'amplificateur de charge.*

En réalité, les deux structures ne sont pas rigoureusement les mêmes, si bien que si l'on veut totalement éliminer l'effet de la capacité statique et de la résistance, il est possible de jouer sur les amplitudes des tensions d'actionnement : ce qui n'est pas compensé physiquement, à cause des différences entres les deux capacités et entre les deux résistances, peut l'être électriquement. Ceci est illustré sur la figure III.9.

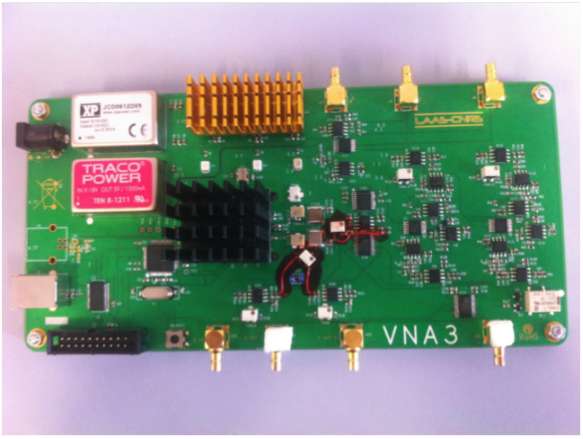

FIGURE III.8 – *Photo de la carte électronique permettant l'actionnement et la détection du mouvement des résonateurs.*

Dans le cas des spectres de résonance en module et en phase sans compensation (le levier fixe n'est pas alimenté), un phénomène est visible entre 110 kHz et 120 kHz, mais il est très difficile de déterminer la fréquence de résonance à partir de cette mesure. Si on s'intéresse au cas où il y a une compensation en alimentant les deux leviers avec la même amplitude de tension (mais de signe opposé), le phénomène de résonance est beaucoup plus visible mais il n'est encore une fois pas évident de déterminer la

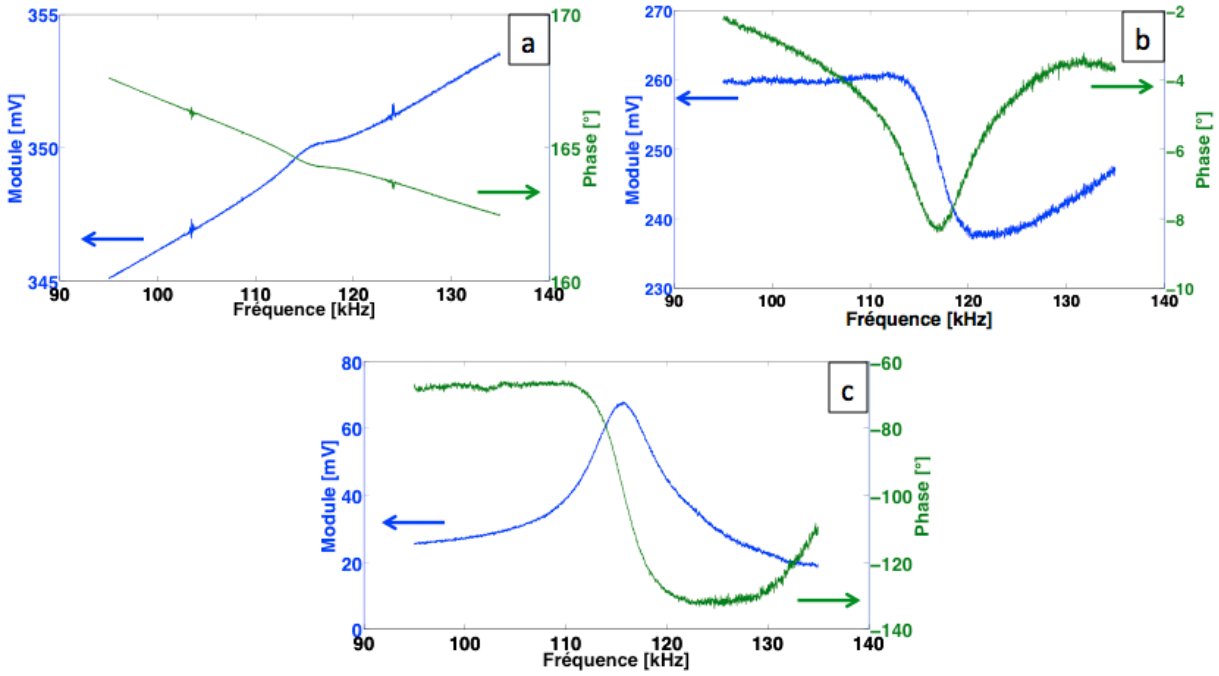

FIGURE III.9 – *Importance d'avoir une bonne compensation. a) Spectre de résonance sans compensation avec la structure fixe, b) Spectre de résonance avec compensation, pour la même amplitude des tensions d'actionnement des deux structures, c) Spectre de résonance avec compensation, avec un réglage différent pour les amplitudes des deux tensions d'actionnement.*

fréquence de résonance car cela ne correspond pas à un spectre de résonance classique, avec un pic pour le module et un saut pour la phase. En revanche, si les amplitudes des deux tensions sont réglées convenablement, c'est à dire que l'on obtient un pic pour le module et un saut de phase, il est alors possible d'obtenir un spectre de résonance propre et la fréquence de résonance correspond alors simplement au maximum du module. Cela permet donc une compensation optimale de la capacité statique et de la résistance afin d'avoir des spectres de résonance facilement exploitables. Il est à noter que le mode de résonance qui présente la meilleure réponse électrique est un mélange de flexions longitudinale et latérale (figure III.10). Le mélange de flexion longitudinale et latérale est exploité dans la référence [11]. Les auteurs ont structuré les électrodes en deux parties distinctes sur la largeur de leur structure (figure III.11a) afin de pouvoir appliquer des tensions différentes et ainsi forcer la flexion latérale de la structure. Afin de nommer les différents modes qui en résultent, ils utilisent la notation suivante : mode-xy, avec x qui correspond au mode en flexion longitudinale et y au mode en flexion latérale (figure III.11b). En référence à ces travaux, le mode qui a la meilleure réponse électrique dans notre étude sera appelé mode-22, qui est donc un mélange du deuxième mode en flexion longitudinale et du deuxième mode en flexion latérale.

Interface de mesure

Afin d'acquérir les données recueillies par la carte électronique, cette dernière est reliée à un ordinateur, et un logiciel a été développé, toujours au LAAS, codé en LabWindows. Il est alors possible de régler un certain nombre de paramètres qui sont récapitulés dans le tableau III.2. Le logiciel permet également de visualiser les spectres d'acquisition (figure III.12). On peut choisir de regarder les spectres en module et en phase, mais on peut également visualiser les signaux I, Q et A^2 (voir figure III.6). De plus, une fois que le spectre de résonance est acquis, le logiciel permet de déterminer la fréquence de résonance ainsi que le facteur de qualité. Aussi, il est possible de se centrer sur la fréquence de résonance et de suivre cette fréquence, ainsi que le facteur de qualité, au cours du temps. On visualise alors, non plus le spectre de résonance, mais l'évolution de la valeur de ces deux grandeurs.

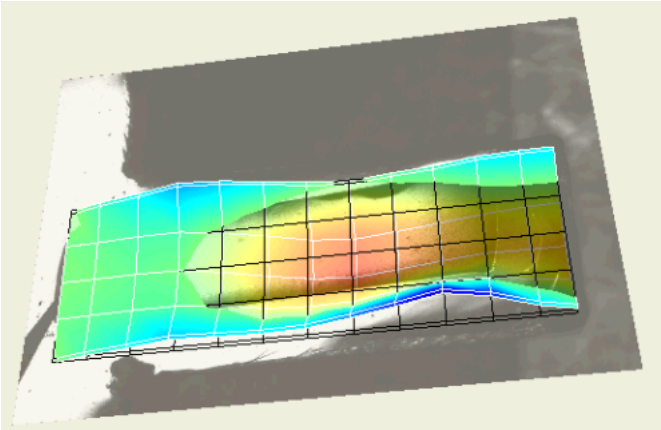

FIGURE III.10 – *Image de la forme du mode-22 mesurée à l'aide du vibromètre.*

Paramètre	**Gamme d'utilisation**
Amplitudes des tensions	-500 mV - 500 mV
Fréquence des tensions	1 kHz - 100 MHz
Pas de mesure	0,2 Hz - 20 MHz
Nombre de points d'acquisition	2 - 1.10^6
Nombre de mesures par point d'acquisition	1 - 255 (8 bits)
Délai entre deux points de mesure	300 µs - 65 ms
Index de la moyenne glissante	0 - 20
Gain des signaux I et Q	0,2 - 50

TABLE III.2 – *Gamme des différents paramètres ajustables.*

Afin de bien comprendre comment la mesure est effectuée avec les résonateurs, la figure III.13 résume les différentes tensions appliquées ainsi que le cheminement des signaux électriques.

III.2.2 Enceinte de mesure étanche

Pour faire des mesures électriques de la résonance, il faut dans un premier temps pouvoir prendre des contacts électriques avec les électrodes. Dans le cadre des mesures faites pour l'optimisation du procédé de fabrication, ces contacts ont été pris à l'aide de micro-robots. Il n'est cependant pas envisageable d'utiliser le même système si l'on veut aller vers un système plus pratique et autonome. De plus, les micro-robots sont à écarter dans le cas de mesures en milieu liquide conducteur. Il a donc fallu concevoir un système qui permette à la fois de prendre les contacts électriques et de faire des mesures en milieu liquide conducteur.

Dans un premier temps, l'idée est d'avoir une enceinte étanche qui sépare le levier, qui doit baigner dans le liquide, des contacts électriques, qui doivent rester au sec. Pour cela, deux pièces de Plexiglas séparées par un joint en PDMS ont été conçues. Il est possible d'avoir une vue éclatée de l'ensemble figure III.14. Le Plexiglas a été choisi car il est non toxique pour les cellules et sa transpa-

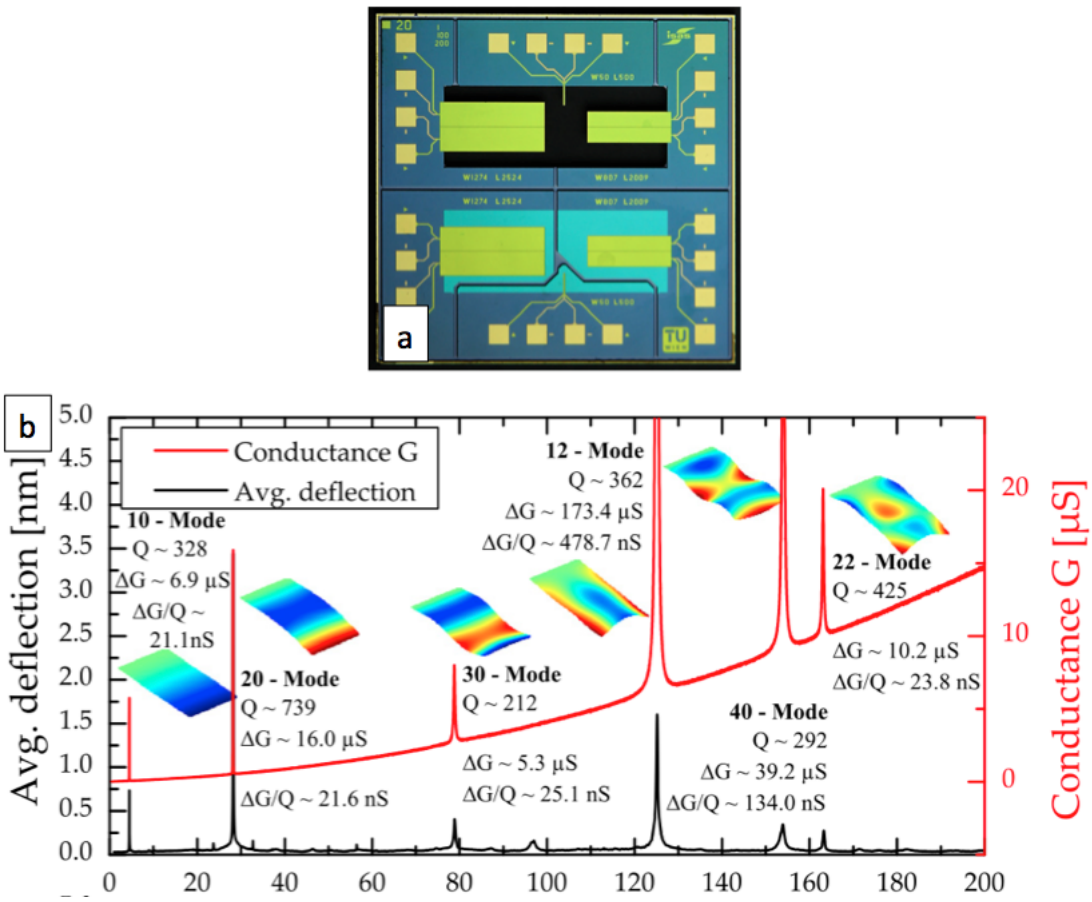

FIGURE III.11 – *a) Vue de dessus des structures utilisées avec la séparation de l'électrode en deux parties pour forcer les modes en flexion latérale. b) Mesures des différentes fréquences de résonance des structures avec une image du mode correspondant* [11].

rence permet de vérifier que l'ensemble du système de mesure est bien monté. Un autre système en poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE ou plus communément appelé Téflon) a aussi été créé dans l'éventualité d'utiliser les résonateurs dans des milieux corrosifs pour le Plexiglas, comme par exemple le toluène ou le chlorobenzène. La base en Plexiglas est usinée afin d'avoir une encoche dans laquelle le résonateur s'insère. Cette encoche fait la taille de la lame de verre sur laquelle sont fixés les résonateurs, 15 mm×15 mm avec une épaisseur de 600 µm. De plus, la base est creusée afin de pouvoir contenir du liquide. Le trou fait 1 mm de profondeur pour une surface de 6 mm×15 mm.

Par dessus cette base en Plexiglas vient s'ajouter un joint en PDMS. Le choix du PDMS vient du fait que c'est un matériau biocompatible, simple à utiliser et à mettre en forme. Le but de ce joint est, tout d'abord, de rendre l'ensemble de la structure étanche, mais aussi de séparer la partie levier de la partie contacts électriques. Pour cela, le PDMS est coulé dans un moule en acide polylactique (PLA) fabriqué grâce à une imprimante 3D, ayant les dimensions adaptées au système utilisé. De plus, la proportion en masse de réticulant utilisée pour faire le PDMS est de 5 % au lieu des 10 % recommandés, dans le but de le rendre plus mou et d'avoir une meilleure étanchéité. Ensuite, le tout est fermé par un capot en Plexiglas. Ce capot est usiné afin d'avoir un trou qui permette de verser le milieu liquide dans la cavité.

Une fois que l'étanchéité est faite, il reste à prendre les contacts électriques. Pour cela, des pointes à ressort à tête concave (référence RS 261-5121) ont été sélectionnées. L'avantage des pointes à ressort est que le contact avec la surface est plus doux et qu'elles s'adaptent à différentes distances. Également, la tête concave permet de ne pas abîmer l'électrode, contrairement à l'utilisation d'une tête à aiguille

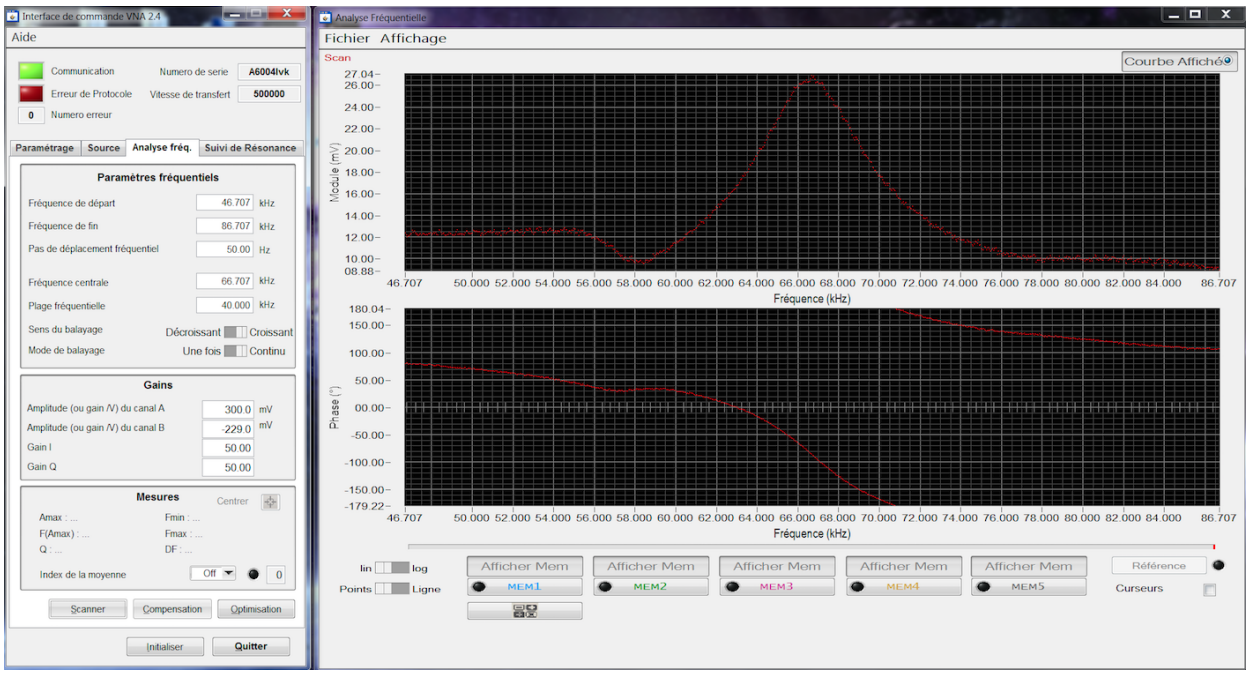

FIGURE III.12 – *Interface de mesure du logiciel associé à la carte électronique.*

ou avec des dents. Pour prendre contact avec les résonateurs, ces pointes passent par des petits trous faits dans le capot. Ces pointes sont soudées à un PCB qui les relie à trois connecteurs SMB. Les connecteurs SMB sont de type coaxial et ils se clipsent, contrairement au SMA qui eux se vissent. Trois des pointes sont reliées aux connecteurs SMB et la quatrième pointe est reliée à la masse électrique. Cette quatrième pointe prend contact avec une couche d'aluminium qui se trouve tout autour des électrodes dans le but de diminuer le bruit de mesure (plan de masse évoqué dans la section III.2.1).

III.2.3 Détermination de la fréquence de résonance

Après l'acquisition du spectre de résonance, il faut déterminer la valeur de la fréquence de résonance. Pour cela, il faut prendre la valeur de la fréquence qui correspond au maximum du pic de résonance en module. Afin de déterminer la fréquence de résonance avec précisions, quatre techniques différentes ont été testées. La première méthode consiste simplement à relever la valeur maximale du module et à prendre la fréquence qui correspond. La deuxième méthode est de faire un fit du pic de résonance avec une parabole afin d'avoir la valeur maximale et d'en déduire ainsi la fréquence de résonance (figure III.15) [12]. Étant donné que la parabole diverge rapidement de la courbe du module, le fit n'est réalisé que sur une étroite bande de fréquence proche de la résonance. La troisième méthode consiste à linéariser la phase autour de la résonance et de prendre la valeur de la fréquence qui correspond à une phase de -90 ° [12]. Finalement, la dernière méthode est celle expliquée dans la section III.1.2 et qui consiste à se ramener à un système passe-bande du second ordre, ce qui se traduit par un cercle dans le plan de Nyquist. Comme la tension en sortie de l'amplificateur de charge est analogue à un système passe-bas du second ordre, il faut donc multiplier la tension par $j\omega$ afin de se ramener à un système passe-bande.

Afin de comparer ces différentes méthodes, l'écart type de la valeur de la fréquence de résonance déterminée pour environ cinquante mesures dans l'air a été calculé. Les résultats sont récapitulés dans le tableau III.3. Il en résulte que déterminer la fréquence de résonance en prenant la valeur maximale des données brutes est un moyen simple, mais qui donne les plus grandes variations, ce qui est compréhensible puisqu'aucun traitement des données n'est effectué. En revanche, faire une approximation du pic du module par une parabole permet de déterminer la fréquence de résonance avec un faible écart type (260 ppm), ce qui est bien en considérant le faible facteur de qualité (≈ 23) et

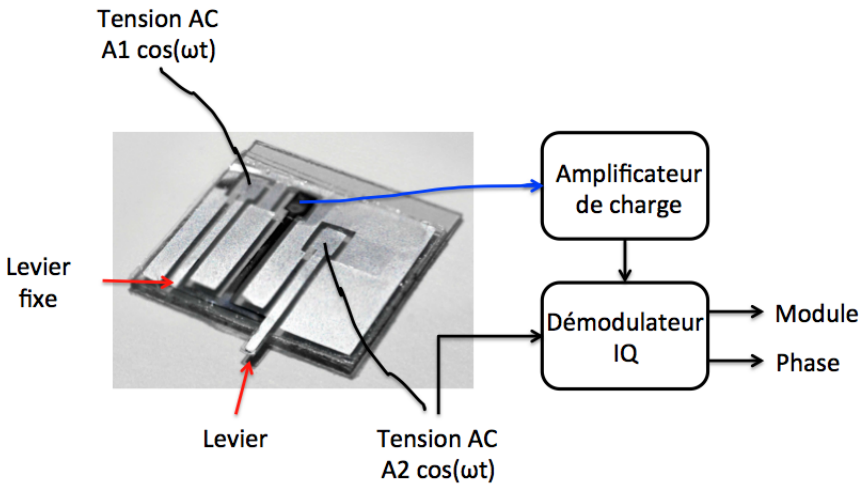

FIGURE III.13 – *Résumé du principe de la mesure électrique appliquée aux résonateurs.*

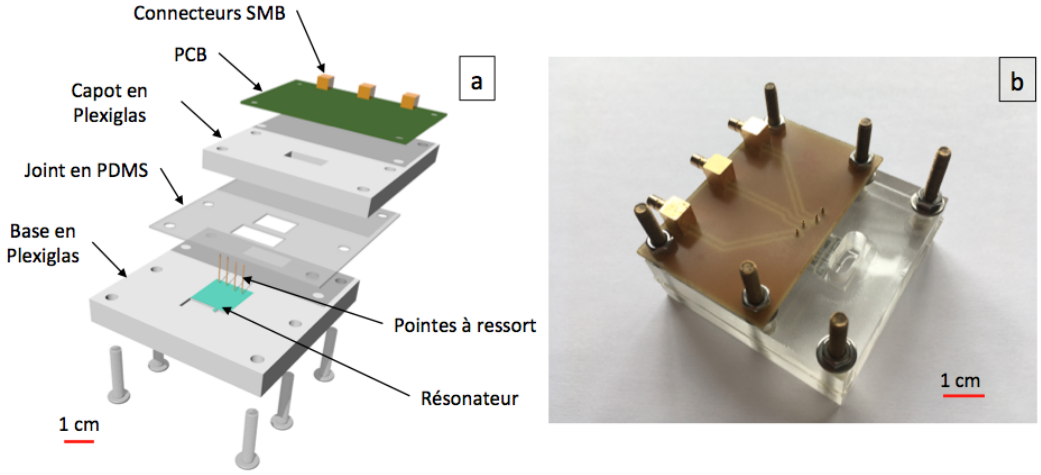

FIGURE III.14 – *a) Vue éclatée de l'enceinte de mesure étanche, b) Photo de l'ensemble réalisé.*

la simplicité de la méthode. Ainsi, afin de déterminer la fréquence de résonance à partir des mesures de spectre, la méthode de l'approximation du module par une parabole a été retenue.

III.3 Paramètres d'influence

La fréquence de résonance des résonateurs dépend essentiellement de la géométrie du levier et des propriétés mécaniques des matériaux. Cependant, elle dépend également des propriétés du milieu dans lequel les résonateurs évoluent, comme la température, la densité et la viscosité. Ainsi, dans le but d'obtenir des informations sur ce que l'on veut mesurer et non sur des paramètres extérieurs, il est intéressant de visualiser et de quantifier l'influence de ces paramètres sur la fréquence de résonance des résonateurs. Dans ce qui suit, l'influence de la température ainsi que celle de la viscosité et de la densité du fluide environnant sont étudiées afin d'être en mesure de les prendre en compte, si besoin est, dans les différentes mesures effectuées avec les résonateurs.

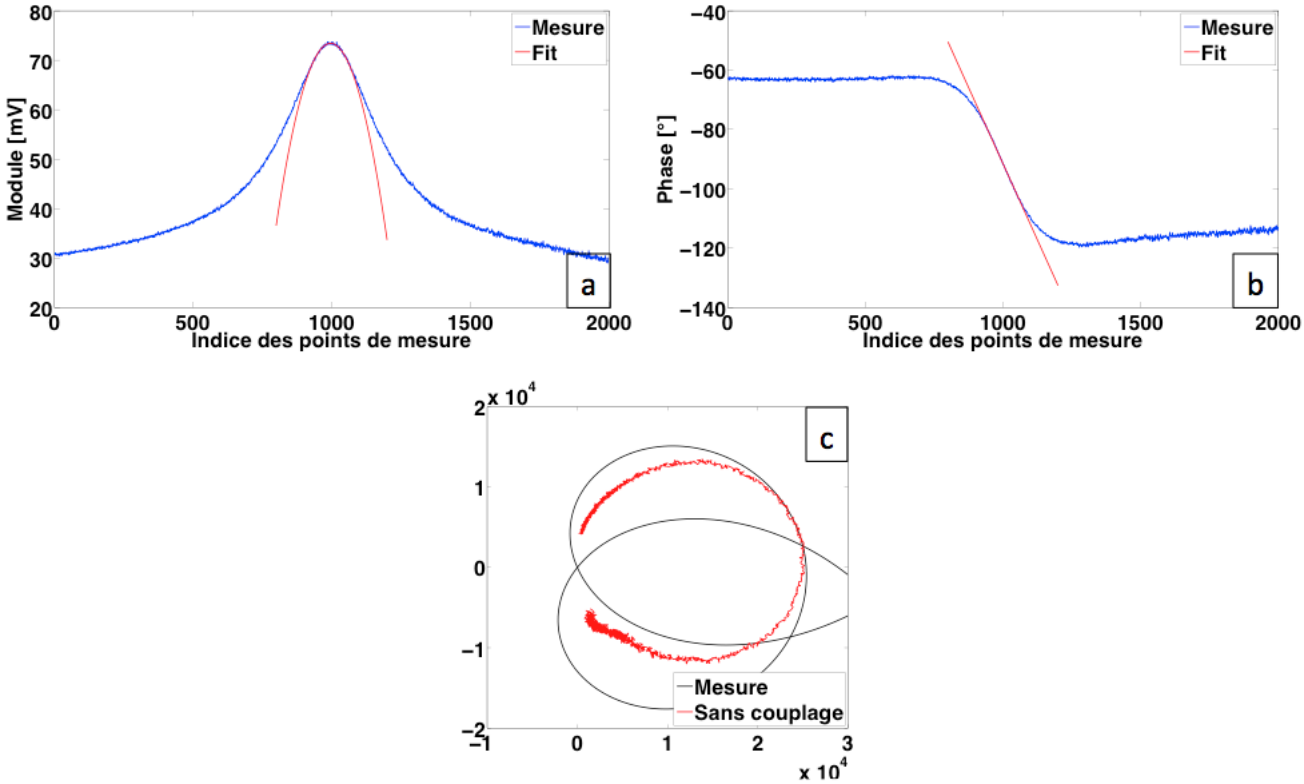

FIGURE III.15 – *Illustration des différentes méthodes utilisées pour déterminer la fréquence de résonance à partir de la mesure des spectres en module et en phase. a) Approximation du module proche de la résonance par une parabole, b) Linéarisation de la phase proche de la résonance, c) Vue du système ramené à un passe-bande du second ordre dans le plan de Nyquist.*

III.3.1 Viscosité et densité du milieu environnant

La densité et la viscosité du milieu dans lequel vibrent les résonateurs sont deux paramètres importants qui ont une forte influence sur la fréquence de résonance et la facteur de qualité. En effet, ces deux caractéristiques du milieu participent à l'amortissement du mouvement des leviers et à un effet de masse. Elles sont donc très influentes dans les milieux liquides donnant lieu à un fort amortissement (diminution du facteur de qualité) et à un effet de masse (diminution de la fréquence de résonance). Afin d'évaluer l'impact de la viscosité et de la densité sur la fréquence de résonance des résonateurs, cette dernière a été mesurée dans différents milieux liquides qui sont des mélanges d'eau et de glycérol (figure III.16). Dix mélanges ont été faits, allant de l'eau pure jusqu'à 90 % de glycérol, dans le but d'augmenter la viscosité et la densité. La viscosité a été déterminée grâce à un viscosimètre et les valeurs de la densité ont été prises à partir des données présentes dans [13]. Le tableau III.4 présente les valeurs de ces deux paramètres. La fréquence de résonance a été mesurée pour le premier mode en flexion et pour le mode-22. Pour le premier mode, les mesures ont été faites à l'aide du vibromètre, puisque la fréquence en liquide est trop basse pour pouvoir être mesurée avec la carte électronique. On remarque que l'augmentation de la viscosité et de la densité ont plus d'impact sur le premier mode en flexion que sur le mode-22. En effet, le premier mode présente les plus grands déplacements hors plan, et de fait, toute la surface du levier doit déplacer un grand volume de liquide pour se mouvoir, en comparaison avec le mode-22 qui est un mélange de flexions longitudinale et latérale.

Connaissant la densité et la viscosité du milieu, ainsi que les paramètres géométriques des leviers, le facteur de qualité et la fréquence de résonance dans le vide, il est possible d'établir un modèle qui prévoit les variations de fréquences de résonance en fonction de la viscosité et de la densité. Un modèle théorique, dit modèle de Sader, a été comparé avec les mesures effectuées (figure III.17) [14, 15]. Ce

Méthode	Fréquence de résonance [kHz]	Écart type [Hz]
Fit parabolique du module	114,7	30
Fit linéaire de la phase	114,3	34
Système passe-bande	114,3	34
Valeur maximale du module	114,6	110

TABLE III.3 – *Comparaison des différentes méthodes utilisées pour déterminer la fréquence de résonance. L'écart type des mesures est une image du bruit de mesure.*

% Glycérol	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Densité [kg/m^3]	998	1023	1049	1073	1101	1122	1147	1172	1199	2023
Viscosité [cP]	0,68	1,2	1,7	2,3	3,7	7,2	13	29	81	224

TABLE III.4 – *Valeurs de la viscosité et de la densité des mélanges eau/glycérol.*

modèle utilise les expressions de la fréquence de résonance ainsi que du facteur de qualité associé aux pertes visqueuses dans le milieu liquide suivantes :

$$f_r = f_{0,vac}\frac{1}{\sqrt{1+Lg_2/m}}\sqrt{1-\frac{1}{2Q^2}} \tag{III.12}$$

$$Q_{vis} = \frac{2\pi\sqrt{1+Lg_2/m}}{Lg_1/m}f_{0,vac} \tag{III.13}$$

$$Q = \frac{Q_{vis}Q_{int}}{Q_{vis}+Q_{int}} \tag{III.14}$$

avec $f_{0,vac}$ la fréquence propre dans le vide, Q le facteur de qualité total (qui prend en compte les pertes internes Q_{int} et celles dues au fluide Q_{vis}), L la longueur du levier, m sa masse totale et g_1 et g_2 deux fonctions qui dépendent des propriétés du fluide ainsi que de la géométrie du levier. Les deux paramètres g_1 et g_2 s'expriment en fonction de la fonction hydrodynamique $\Gamma = \Gamma_r - j\Gamma_i$, avec $\Gamma_r > 0$ et $\Gamma_i > 0$:

$$\Gamma_r = \frac{4}{\pi\rho_f b^2}g_2 \tag{III.15}$$

$$\Gamma_i = \frac{4}{\pi\rho_f b^2}\frac{g_1}{\omega} \tag{III.16}$$

En réalité, la fonction hydrodynamique représente la force hydrodynamique totale par unité de longueur normalisée par la force par unité de longueur nécessaire pour exciter un volume cylindrique circulaire de diamètre b et de densité ρ_f. Le modèle est en accord avec les mesures expérimentales et donne une très bonne estimation de la fréquence de résonance du premier mode en fonction des caractéristiques du milieu. Afin de voir l'influence de la densité et de la viscosité séparément, le modèle a été utilisé en ne faisant varier qu'un paramètre à la fois (en gardant les valeurs correspondantes à l'eau, figure III.18). On observe que les deux paramètres sont importants et que si l'un des deux est

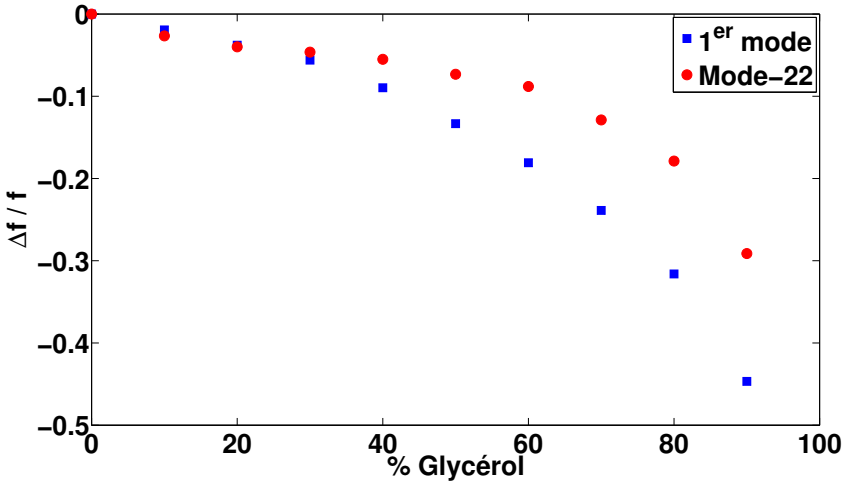

FIGURE III.16 – *Influence du ratio de glycérol dans l'eau sur la fréquence de résonance du premier mode et du mode-22.*

négligé, le modèle ne correspond plus aux mesures. Afin de comparer la sensibilité à la densité et à la viscosité, les variations relatives de fréquence de résonance ont été déterminées en fonction des variations relatives de la densité et de la viscosité (figure III.19). Dans les mesures effectuées avec les mélanges eau/glycérol, on observe que les variations de viscosité sont beaucoup plus importantes que les variations de densité, expliquant pourquoi la viscosité semble avoir plus d'influence sur la fréquence de résonance que la densité (figure III.18). Cependant, à variations relatives égales, l'influence de la densité sur la fréquence de résonance est bien plus importante. Pour une variation de viscosité de 70,6 %, la fréquence diminue de 1,3 % alors que pour une variation de densité de 22,5 %, donc environ trois fois moins, cette fréquence diminue de 9 %, soit sept fois plus. S'il est possible d'estimer la fréquence de résonance en fonction de la densité et de la viscosité du milieu, il est également possible de faire l'inverse, à savoir déterminer la viscosité et la densité du milieu à partir des mesures de la fréquence de résonance et du facteur de qualité (ceci sera exploité dans le chapitre IV).

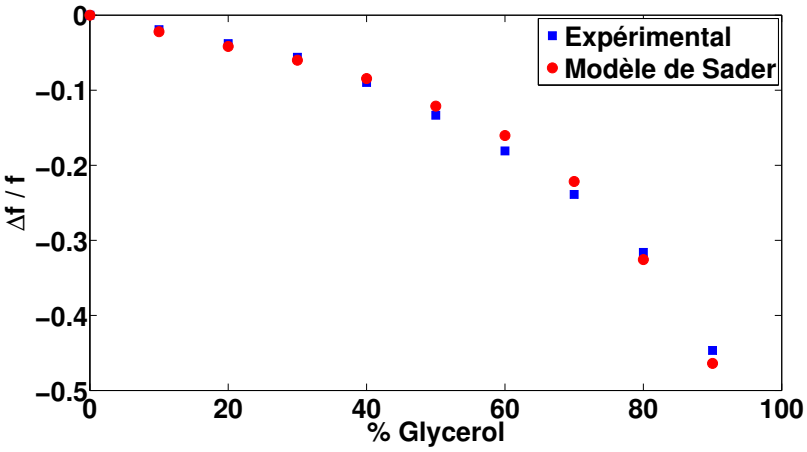

FIGURE III.17 – *Comparaison, pour le premier mode, entre les données expérimentales et un modèle théorique (modèle de Sader) permettant d'estimer la variation de la fréquence de résonance en fonction de la viscosité et de la densité du milieu.*

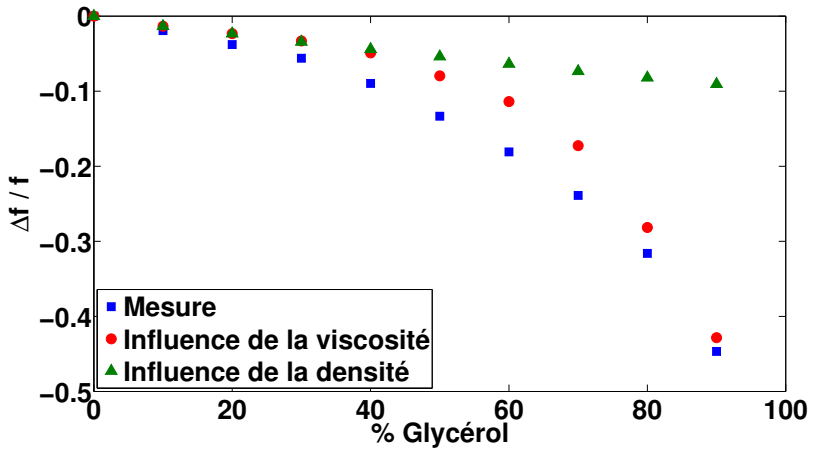

FIGURE III.18 – *Effets séparés de la viscosité et de la densité sur la fréquence de résonance du premier mode déterminés par calcul.*

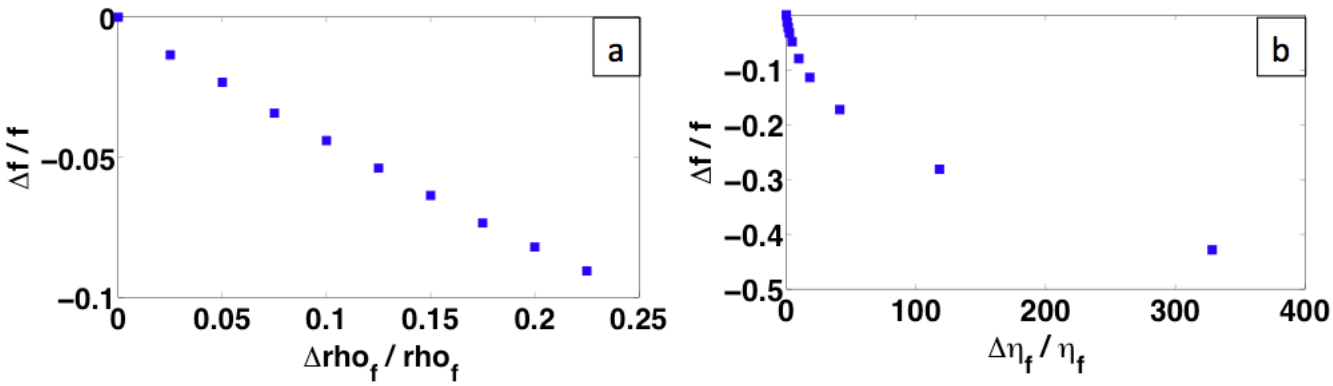

FIGURE III.19 – *Comparaison entre les données expérimentales et le modèle théorique (modèle de Sader) permettant d'estimer la variation de la fréquence de résonance en fonction de la viscosité et de la densité du milieu.*

III.3.2 Température

Un paramètre extérieur important est la température. En effet, pratiquement tous les systèmes mécaniques ont un comportement qui varie avec la température. Concernant les résonateurs, la température a deux effets : les propriétés mécaniques des matériaux sont modifiées avec la température ainsi que les dimensions et, généralement, la rigidité diminue avec l'augmentation de la température pour les polymères (conséquence de la variation des dimensions à masse constante) [16], et les changements de température modifient également la densité et la viscosité du milieu environnant. Afin de déterminer l'influence de la température sur la fréquence de résonance des résonateurs, des mesures ont été faites dans l'air et dans de l'eau. En effet, le but étant de faire des mesures avec des cellules en milieu aqueux, il est important de ne pas seulement caractériser les résonateurs dans l'air.

Des mesures de l'influence de la température ont été faites dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Recherche Paul Pascal (Dr. M. Urdampilleta, Dr D. Rosario-Amorin, Dr A. Mondal, M. Rouzières, Dr P. Dechambenoit et Dr. R. Clérac) et l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (Prof. C. Mathonière), pour une application qui consiste à utiliser les résonateurs afin de visualiser le changement d'aimantation d'un matériau magnétique. Ces mesures concernent une large gamme de températures (figure III.20) et ont été faites dans le vide. Deux conclusions sont à retenir de ces mesures. Tout d'abord, on remarque que les résonateurs fonctionnent même à très basse

température (130 K), ce qui permet d'envisager des applications qui nécessitent de travailler dans ces gammes de températures. En second lieu, on remarque que les variations de fréquence de résonance avec la température ne sont pas linéaires. En effet, dans le vide, les variations de fréquences de résonance sont dues à deux effets : la dilatation de la structure et la modification du module d'Young. En général, le phénomène prédominant est la modification du module d'Young. En effet, si l'on prend le cas du polyéthylène, le coefficient d'expansion thermique α vaut aux alentours de 0,2.10^{-3} K^{-1} [17] alors que le coefficient thermique du module d'Young est de l'ordre de -7.10^{-3} K^{-1} [18]. C'est pourquoi, seul cet effet sera pris en compte. Autour d'un point de fonctionnement, il est possible d'exprimer le module d'Young de la manière suivante :

$$E = E_0(1 + \alpha_E(T - T_0)) \tag{III.17}$$

avec E_0 le module d'Young à la température T_0, et α_E le coefficient de température du module d'Young. La fréquence de résonance dans le vide, en fonction de la température, s'exprime donc :

$$f_r(T - T_0) = \frac{\lambda^2 h}{2\pi L^2}\sqrt{\frac{E_0(1 + \alpha_E(T - T_0))}{12\rho}} \tag{III.18}$$

On voit donc que les variations de la fréquence de résonance ne sont pas linéaires mais évoluent avec la racine carrée de la température. À partir des mesures faites dans le vide, le coefficient de température du module d'Young a été déterminé. Les résultats sont présentés sur la figure III.21. On observe que ce coefficient dépend de la température et que sa valeur est comprise entre -0,6.10^{-3} K^{-1} et -3,1.10^{-3} K^{-1}, ce qui correspond à l'ordre de grandeur trouvé pour le polyéthylènene à 25 °C : -7.10^{-3} K^{-1}. Étant donné que les résonateurs sont composés de plusieurs matériaux, le α_E déterminé correspond à un coefficient de température du module d'Young équivalent à l'ensemble des différents matériaux.

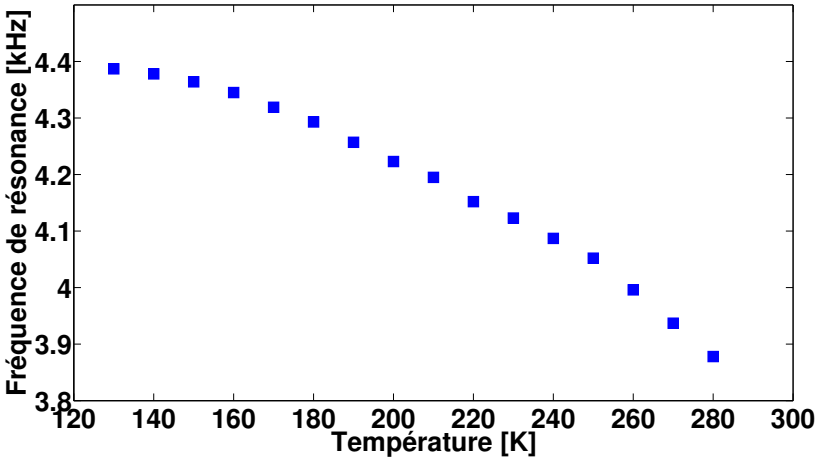

FIGURE III.20 – *Influence de la température sur la fréquence de résonance du premier mode pour une large gamme de températures.*

Des mesures ont également été faites dans l'air pour une gamme de températures plus réduite. La fréquence du premier mode de résonance ainsi que la fréquence du mode P ont été mesurées pour une gamme de températures allant de 23 °C jusqu'à 57 °C (figure III.22). Pour ces mesures, plusieurs cycles de montée et de descente en température ont été effectués sur un même résonateur. Le temps entre deux mesures est suffisamment long pour permettre au résonateur d'être à la température indiquée par la sonde (qui est en fait la température de l'air proche du résonateur) et d'être stable au niveau de la fréquence de résonance. On observe une décroissance linéaire de la fréquence de résonance avec

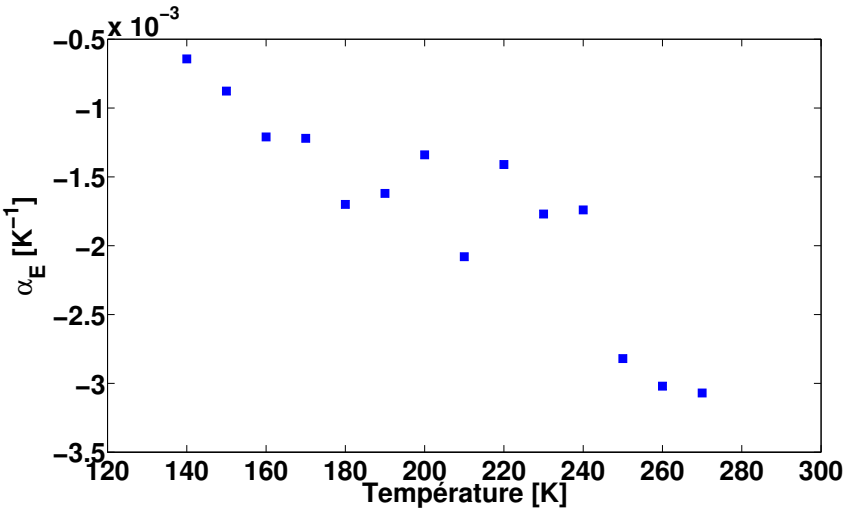

FIGURE III.21 – *Évolution du coefficient de température du module d'Young en fonction de la température.*

l'augmentation de la température, et ce pour les deux modes observés, sans phénomène d'hystérésis. La linéarité provient du fait que ces mesures concernent une faible gamme de températures ($\Delta T = 34\,°\mathrm{C}$) : il est alors possible d'exprimer la variation relative de fréquence par $\frac{\Delta f}{f} = \frac{1}{2}(\alpha + \alpha_E)\Delta T$, avec α le coefficient de dilatation thermique. Cette approximation est valable dans le vide, mais comme il est expliqué par la suite, les changements de densité et de viscosité de l'air pour cette gamme de température sont très faibles et n'ont que très peu d'impact sur la fréquence de résonance. On obtient ainsi un α_E de l'ordre de -9,4.10^{-3} K^{-1} (en négligeant le terme α) pour le premier mode. La valeur calculée est donc plus grande en valeur absolue que celles calculées à partir des mesures dans le vide. Cet écart est peut être dû aux approximations qui ont été faites pour calculer le α_E. Pour le premier mode, on a une diminution de la fréquence de résonance de -0,47 %/K, et de -0,21 %/K pour le mode-22. Il existe donc une différence entre les deux modes d'un facteur deux. Cette différence provient sûrement du fait que le module d'Young dépend de la température mais également de la fréquence. Ainsi, le coefficient de température du module d'Young n'est certainement pas le même pour le premier mode à 1,7 kHz et le mode-22 à 53 kHz. De plus, les variations de viscosité et de densité, ainsi que les variations des dimensions dues à la dilatation thermique, n'ont pas le même impact en fonction du mode de résonance. Il est cependant difficile d'évaluer l'influence de tous ces paramètres, étant donné que les résonateurs sont composés de plusieurs matériaux.

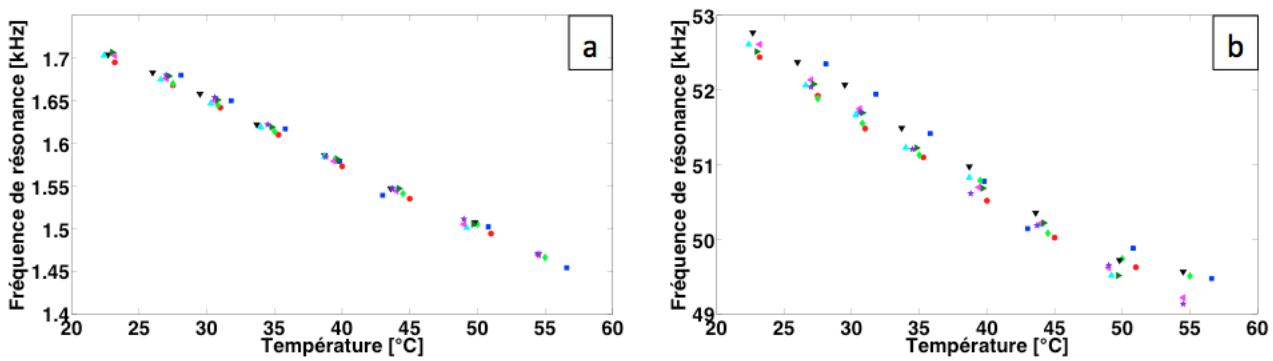

FIGURE III.22 – *Influence de la température sur la fréquence de résonance dans l'air : a) évolution de la fréquence de résonance du premier mode, b) évolution de la fréquence de résonance du mode-22.*

L'influence de la température a aussi été étudiée dans le cas où les résonateurs fonctionnent dans l'eau. Dans ce cas là, seule la fréquence de résonance du mode-22 a été mesurée. En effet, lorsque les résonateurs fonctionnent en milieu liquide, leurs mouvements sont plus amortis que dans l'air. Le facteur de qualité est alors plus faible et il est plus difficile d'obtenir une mesure exploitable pour le premier mode. S'ajoute à cela le fait que la fréquence de résonance du premier mode dans l'eau se trouve en dessous de 1 kHz à cause de l'effet de masse du liquide, qui est la limite de mesure de la carte électronique. Pour ces mesures (figure III.23), seulement trois séries de mesures ont été faites. Effectivement, la stabilisation de la température dans l'eau est plus lente que dans l'air, ce qui a demandé beaucoup de temps pour faire une série de mesures. De plus, ces résultats montrent également un comportement linéaire de la fréquence de résonance avec l'évolution de la température : il n'est donc pas nécessaire de faire un grand nombre de mesures. Les variations de fréquence de résonance sont de -0,14 %/K dans l'eau. Cette variation est plus faible que dans l'air. Afin d'expliquer cette variation plus faible, il faut étudier les variations de la densité et de la viscosité de l'air et de l'eau. Les variations de la viscosité dans l'air et dans l'eau peuvent s'exprimer de la façon suivante autour de la température ambiante [19] :

$$\frac{1}{\eta_{air}} = -123,2(T - 742,6) \tag{III.19}$$

$$\frac{1}{\eta_{eau}} = 29,83(T - 258,6) \tag{III.20}$$

Pour une variation de température de 10 °C (de 20 °C à 30 °C), on obtient une variation relative de viscosité de -22 % pour l'eau et de +2,2 % pour l'air. On a donc une diminution relativement importante pour l'eau et une faible augmentation pour l'air. Concernant les variations de densité, une loi permet d'exprimer la densité en fonction de la température, dans le cas de l'eau [20] :

$$\rho_{eau} = 999,975\left[1 - \frac{(T + 301,797)(T - 3,983)^2}{522\,528,9(T + 69,349)}\right] \tag{III.21}$$

avec la température en °C pour l'application de cette formule. Dans le cas de l'air, la formule est la suivante [21] :

$$\rho_{air} = \frac{P}{287,06\,T} \tag{III.22}$$

avec P la pression atmosphérique et T la température en Kelvin.

En utilisant ces deux formules, on obtient une variation relative de densité de -0,28 % pour l'eau et de -3,3 % pour l'air pour un changement de température de 20 °C à 30 °C. En ce qui concerne l'eau, la viscosité et la densité diminuent avec l'augmentation de la température, ce qui a pour conséquence de faciliter le mouvement des leviers. Donc, si la fréquence de résonance diminue, cela signifie que l'effet de la température sur la rigidité des leviers est prédominant. En revanche, l'augmentation de la température diminue la densité de l'air mais augmente sa viscosité. C'est pourquoi la diminution de la fréquence de résonance avec l'augmentation de la température est plus importante dans l'air que dans l'eau. En effet, l'influence des variations de densité et de viscosité dues aux changements de température ont été étudiées dans le cas de l'eau et de l'air (figure III.24). L'impact des variations de densité et de viscosité dans cette gamme de températures est faible (moins d'un pour-cent dans le cas de l'eau et de l'air). On observe cependant que ces variations sont plus importantes dans l'eau, ce qui se traduit par une plus forte influence sur la fréquence de résonance avec une augmentation de la fréquence plus importante (jusqu'à 0,56 % contre 0,034 %).

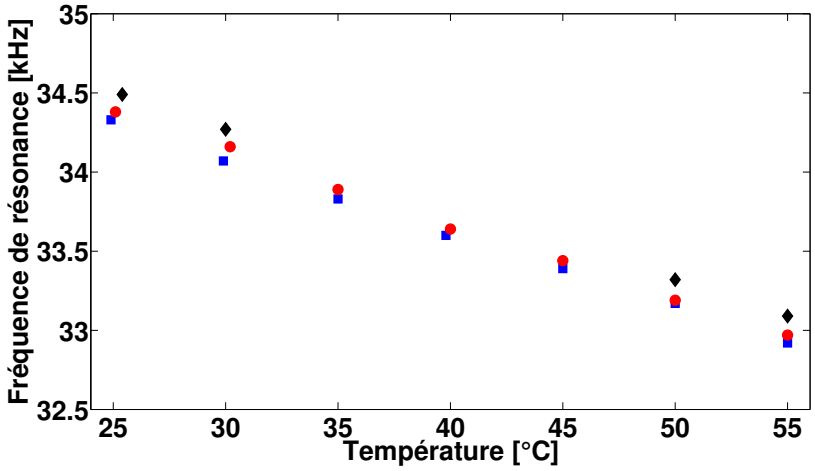

FIGURE III.23 – *Influence de la température sur la fréquence de résonance du mode-22 dans l'eau.*

III.3.3 Bruit de mesure

Dans les applications de type capteur, le bruit de mesure est une donnée importante. En effet, un capteur permet de mesurer une grandeur physique et, dans l'idéal, de quantifier cette dernière. Cependant, tout système de mesure subit des fluctuations qui ont un impact direct sur la mesure. Ces fluctuations peuvent être liées à des paramètres externes, comme la température, l'humidité ou encore la pression, qui ont une influence sur la grandeur à mesurer, mais elles peuvent également être liées à des paramètres internes aux matériaux et à l'équipement électronique. S'il est aisé de s'affranchir du bruit provenant de paramètres externes (appelés grandeurs d'influence), en faisant des mesures dans un environnement contrôlé, ce n'est pas le cas pour le bruit provenant de paramètres internes. Il est important de déterminer le bruit de mesure car cela permet d'évaluer la limite de détection (LDD) du capteur. En effet, la limite de détection est définie par un rapport signal sur bruit de 3. Cela veut dire que la plus petite quantité mesurable correspond à un signal égal à trois fois le bruit de mesure.

Afin de déterminer le bruit de mesure pour les résonateurs évoluant dans le milieu servant à la culture cellulaire, le spectre de résonance en module a été mesuré 20 fois. Les mesures ont été faites dans un incubateur à 37 °C afin de s'affranchir de l'influence de ce paramètre. Les résultats sont visibles figure III.25. Dans un premier temps, on remarque que le signal est plutôt stable. Pour déterminer la fréquence de résonance, l'approximation du pic par une parabole a donc été utilisée, comme précisé dans la section III.2.3. Les valeurs des fréquences de résonances sont reportées pour chaque mesure, ainsi que la valeur moyenne calculée. Le bruit de mesure a été défini comme étant l'écart type de ces mesures. Dans ce cas, un écart type de 18 Hz a été calculé. On peut donc estimer une limite de détection en variation de fréquence de résonance de 54 Hz. Si l'on traduit cette limite de détection en termes de masse, en utilisant la formule (III.8) et en assumant que la rigidité ne varie pas, on trouve une LDD de 794 ng dans l'hypothèse d'une masse uniformément répartie sur tout le levier (la masse des leviers a été estimée à 238 µg pour ce calcul).

Le but de ces travaux étant l'étude de la mécanique des cellules, il est important de savoir si cette limite de détection est suffisante pour espérer détecter l'adhésion de cellules sur les leviers. Dans le cas idéal où le levier est totalement recouvert de cellules et en considérant un diamètre moyen de 20 µm pour chaque cellule, cela donne une estimation de 5 000 cellules sur le levier. En supposant une masse comprise entre 0,5 ng et 2 ng pour les cellules (d'après l'étude [22] pour des cellules d'adénocarcinome du côlon humain), cela fait donc un ajout de masse compris entre 2,5 µg et 10 µg, ce qui bien au dessus de la limite de détection. Même si en pratique les leviers ne sont pas totalement recouverts de cellules et que seulement un dixième de cette estimation se produit (pour la masse la plus haute), cela reste

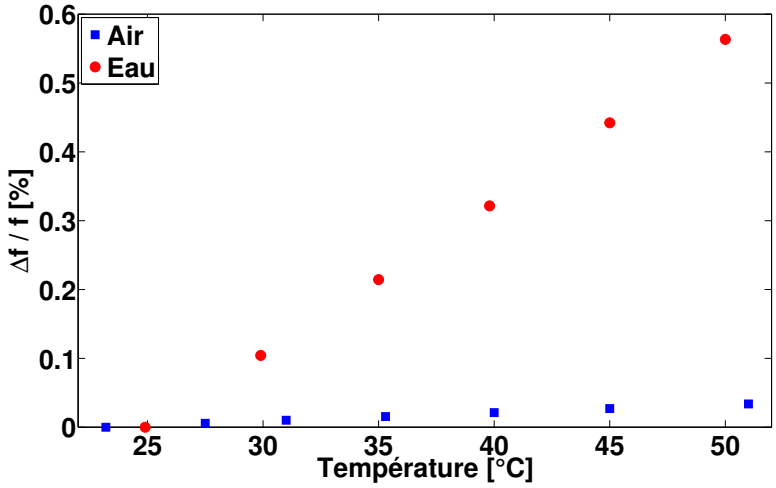

FIGURE III.24 – *Influence des variations de densité et de viscosité, dues aux changements de température, sur la fréquence de résonance du mode-22, dans l'air et dans l'eau, déterminée grâce au modèle de Sader.*

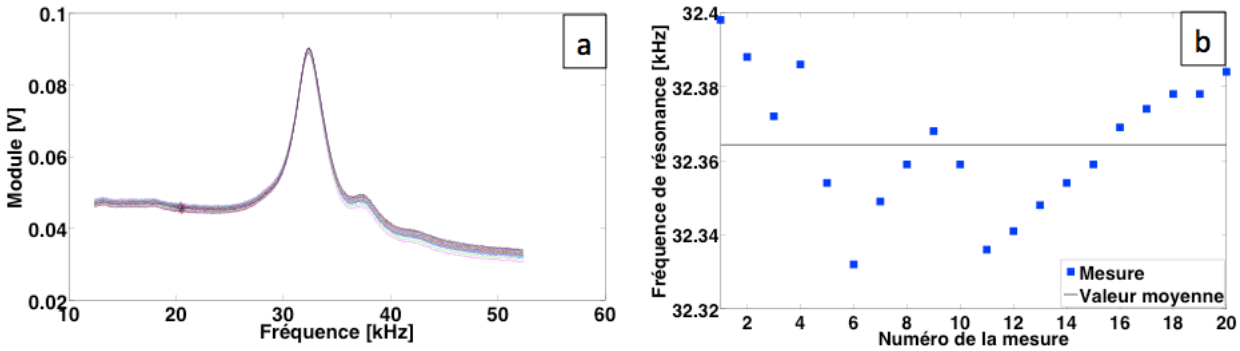

FIGURE III.25 – *a) Spectres en module pour 20 mesures réalisées, b) Fluctuations de la fréquence de résonance.*

détectable et donc prometteur pour la suite de cette étude.

III.4 Conclusions

Afin de pouvoir faire des mesures en milieu liquide, ce qui est indispensable pour étudier des cellules vivantes, une carte électronique associée à une enceinte de mesure étanche ont été réalisées. Cette carte électronique permet de mesurer le spectre de résonance des résonateurs en effectuant une mesure différentielle afin d'éliminer l'influence de l'impédance statique. Avec le réglage des deux tensions d'alimentation du levier et de son homologue fixe, une bonne compensation est réalisée et permet ainsi d'obtenir un spectre de résonance exploitable. L'enceinte de mesure étanche permet de séparer le levier des points de contacts électriques afin d'éviter toute fuite de courant et toute corrosion des electrodes. Cette enceinte permet une prise de contacts électriques simple à l'aide de pointes à ressort. Enfin, les influences de la température, de la viscosité et de la densité du fluide environnant sur la fréquence de résonance ont été évaluées. Il en résulte que pour de faibles variations de températures, le comportement dans l'air et dans l'eau de la fréquence de résonance est linéaire, avec une plus faible variation dans l'eau. Il a été observé que la densité du milieu environnant a plus d'impact sur la fréquence de résonance que la viscosité, ce qui a permis de déterminer la fréquence de résonance pour une gamme de viscosités de deux décades.

Références

[1] C. Liu. *Foundations of MEMS*. Pearson Prentice Hall, 2006.

[2] V. Kaajakari. *Practical MEMS*. Small Gear Publishing, 2009.

[3] J. T. M van Beek and R. Puers. A review of MEMS oscillators for frequency reference and timing applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 22(013001), 2012.

[4] J. Pettine, M. Patrascu, D. M. Barabacak, M. Vandecasteele, V. Petrescu, S. H. Brongersma, M. Crego-Calama, and C. Van Hoof. Volatile detection system using piezoelectric micromechanical resonators interfaced by an oscillator readout. *Sensors and Actuators A*, 189(496-503), 2013.

[5] J. H. Seo and O. Brand. High Q-factor in-plane-mode resonant microsensor platform for gaseous/liquid environment. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 17, 2008.

[6] C. J. van Mullem, H. A. C. Tilmans, A. J. Mouthaan, and J. H. J. Fluitman. Electrical crosstalk in two-port resonators - the resonant silicon beam force sensor. *Sensors and Actuators A*, 31(168-173), 1992.

[7] T. Manzaneque, V. Ruiz-Díez, J. Hernando-García, E. Wistrela, M. Kucera, U. Schmid, and J. L. Sánchez-Rojas. Piezoelectric MEMS resonator-based oscillator for density and viscosity sensing. *Sensors and Actuators A*, 220(305-315), 2014.

[8] A. O. Niedermayer, T. Voglhuber-Brunmaier, J. Sell, and B. Jakoby. Methods for the robust measurement of the resonance frequency and quality factor of significantly damped resonating devices. *Measurement Science and Technology*, 23(085107), 2012.

[9] R. Brito-Pereira, C. Ribeiro, S. Lanceros-Mendez, and P. Martins. Magnetoelectric response on Terfenol-D/ P(VDF-TrFE) two-phase composites. *Composites Part B*, doi : 10.1016/j.compositesb.2017.03.055, 2017.

[10] S. Kaur, A. Kumar, A. L. Sharma, and D. P. Singh. Influence of annealing on dielectric and polarization behavior of PVDF thick films. *Journal of Material Sciences : Materials in Electronics*, doi : 10.1007/s10854-017-6556-8, 2017.

[11] M. Kucera, E. Wistrela, G. Pfusterschmied, V. Ruiz-Díez, T. Manzaneque, J. L. Sánchez-Rojas, J. Schalko, A. Bittner, and U. Schmid. Characterization of a roof tile-shaped out-of-plane vibrational mode in aluminum-nitride-actuated self-sensing micro-resonators for liquid monitoring purposes. *Applied Physics Letters*, 104(233501), 2014.

[12] M. T. Boudjiet, J. Bertrand, C. Pellet, and I. Dufour. New characterization methods for monitoring small resonant frequency variation, experimental tests in the case of hydrogen detection with uncoated silicon microcantilever-based sensors. *Sensors and Actuators B*, 199(269-276), 2014.

[13] C. Ayela. *Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel*. PhD thesis, Université de Toulouse, 2007.

[14] J. E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics*, 84(64-76), 1998.

[15] I. Dufour, E. Lemaire, B. Caillard, H. Debéda, C. Lucat, S. M. Heinrich, F. Josse, and O. Brand. Effect of hydrodynamic force on micro cantilever vibrations : applications to liquid-phase chemical sensing. *Sensors and Actuators B*, 192(664-672), 2014.

[16] J. F. Mano, V. Sencadas, A. Mello Costa, and S. Lanceros-Méndez. Dynamic mechanical analysis and creep behaviour of β-PVDF films. *Materials Science and Engineering A*, 370(336-340), 2004.

[17] J. Fraden. *Handbook of modern sensors : physics, designs and applications*. Springer-Verlag, 2004.

[18] N. Lagakos, J. Jarzynski, J. H. Cole, and J. A. Bucaro. Frequency and temperature dependence of elastic moduli of polymers. *Journal of Applied Physics*, 59(12), 1986.

[19] E. M. A. Elbashbeshy and M. A. A. Bazid. The effect of temperature-dependent viscosity on heat transfer over a continuous moving surface. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 33(2716–2721), 2000.

[20] M. Tanaka, G. Girard, R. Davis, A. Peuto, and N. Bignell. Recommended table for the density of water between 0 °C and 40 °C based on recent experimental reports. *Metrologia*, 38(301-309), 2001.

[21] S. M. El Moustapha, M. L. Ndiaye, P. A. Ndiaye, A. K. O. Mahmoud, and I. Youm. Influence des paramètres météorologiques sur la production d'un aérogénérateur : Application sur le littoral Sahélien. *Revue des Energies Renouvelables*, 17(43-54), 2014.

[22] K. Park, L. J. Millet, N. Kim, H. Li, X. Jin, G. Popescu, N. R. Aluru, K. J. Hsia, and R. Bashir. Measurement of adherent cell mass and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20691-20696), 2010.

CHAPITRE IV

APPLICATIONS

Les résonateurs sont sensibles aux propriétés (masse et module d'Young) de ce qui est ajouté dessus. Le but de ces travaux est d'étudier des cellules vivantes et d'essayer de déterminer l'adhésion des cellules ainsi que l'évolution de leur croissance (masse) et de leur module d'Young à l'aide de résonateurs MEMS organiques. Cependant, nous avons vu au chapitre précédent que les résonateurs sont également sensibles aux propriétés du liquide dans lequel ils vibrent. Ainsi, dans un premier temps, les résonateurs ont été utilisés pour caractériser l'effet du module d'Young d'une couche déposée ainsi que l'effet d'une masse et de sa position sur les leviers. La viscosité de liquides a également été déterminée grâce aux résonateurs. Finalement, le suivi de l'adhésion de cellules hMSC a été effectué ainsi que la détermination de la masse moyenne d'une cellule.

IV.1 Mesure du module d'Young d'un matériau

Les résonateurs sont sensibles aux changements de masse et de rigidité (module d'Young). Lorsqu'une entité s'adsorbe sur la surface d'un résonateur, ces deux paramètres que sont la masse et la rigidité de l'entité ont une influence sur la fréquence de résonance. En effet, pour les modes de résonance en flexion, si l'on néglige l'influence du milieu environnant, la fréquence de résonance s'exprime :

$$f_n = \frac{\lambda_n^2}{2\pi}\sqrt{\frac{EI}{L^3 m_0}} \tag{IV.1}$$

avec $I = \frac{bh^3}{12}$ le moment quadratique, b la largeur du levier, h son épaisseur, L sa longueur, E son module d'Young, m_0 sa masse et λ_n un coefficient qui dépend du mode de résonance. Les valeurs de λ_n sont données dans le tableau IV.1 pour les cinq premiers modes. D'après l'équation (IV.1), on remarque que, dans le cas de l'ajout d'une couche uniformément répartie sur toute la surface du levier, la masse est modifiée, l'épaisseur est modifiée (ce qui se répercute sur une modification du moment quadratique) et le module d'Young est modifié. Pour prendre en compte la modification de l'épaisseur et du module d'Young, il est possible de calculer un moment quadratique équivalent. De la même manière que dans la section II.3.1 pour le calcul du coefficient d_{31}, le levier est considéré comme une composition de deux couches de matériaux : le levier et la couche déposée dessus. En considérant les

paramètres géométriques et mécaniques de ces deux couches, il est possible de se ramener à une unique couche en calculant un moment quadratique équivalent :

$$I_{eq} = \frac{b}{12E_0} \times \frac{h_0^4E_0^2 + h_c^4E_c^2 + 2h_0h_cE_0E_c(2h_0^2 + 3h_0h_c + 2h_c^2)}{h_0E_0 + h_cE_c} \tag{IV.2}$$

avec b la largeur du levier, h_0 son épaisseur, E_c le module d'Young de la couche et h_c l'épaisseur de la couche. Après le dépôt d'une couche de matériau, l'expression de la fréquence de résonance pour le premier mode en flexion devient ainsi :

$$f_1 = \frac{\lambda_1^2}{2\pi}\sqrt{\frac{E_0I_{eq}}{L^3(m_0 + m_c)}} \tag{IV.3}$$

avec m_c la masse de la couche déposée uniformément sur tout le levier. D'après l'équation (IV.3), il est clair que l'ajout d'une masse a pour effet de faire décroître la fréquence de résonance. En revanche, le terme E_0I_{eq}, qui dépend de la la rigidité des matériaux, augmente avec l'ajout d'une couche, quelles que soient les propriétés de la couche. Ceci a donc pour effet d'augmenter la fréquence de résonance.

n	1	2	3	4	5
λ_n	1,875104	4,694091	7,854757	10,99554	14,92257

TABLE IV.1 – *Valeurs du coefficient λ_n pour les cinq premiers modes en flexion*

Les matériaux organiques sont moins denses que les métaux mais ils sont également beaucoup moins rigides que ces derniers. Aussi, lors d'un dépôt de métal sur les résonateurs organiques, l'effet de masse et l'effet de rigidité sont en compétition. Afin d'illustrer ces propos, des dépôts successifs d'argent ont été effectués sur un résonateur et l'évolution de la fréquence de résonance pour le premier mode en flexion et pour le mode-22 a été relevée. Pour ce faire, différentes épaisseurs d'argent ont été déposées par évaporation par faisceau d'électrons et la fréquence de résonance des deux modes a été mesurée entre chaque dépôt. Les résultats sont présentés sur la figure IV.1. On observe que la fréquence de résonance augmente pour les deux modes, ce qui traduit le fait que l'effet de l'augmentation de la rigidité domine l'effet de masse associée au dépôt de la couche d'argent, même pour de très faibles épaisseurs (180 nm). Afin de déterminer la fréquence de résonance théorique en fonction de l'épaisseur de la couche d'argent, l'équation (IV.3) a été utilisée. Pour déterminer l'expression de la fréquence de résonance théorique pour le mode-22, le même type d'expression a été utilisé, excepté le coefficient λ_1 qui a été remplacé par un autre coefficient calculé à partir de la valeur de la fréquence de résonance avant le dépôt d'argent.

Dans un premier temps, la fréquence de résonance a été mesurée avant le premier dépôt d'argent. À partir de cette mesure, et connaissant la géométrie du levier ainsi que sa masse (évaluée à partir des épaisseurs des différents matériaux), le module d'Young équivalent du levier a été calculé $E_0 =$ 880 MPa. Cette fréquence de résonance sert également de référence pour le calcul de l'écart relatif en fréquence en fonction de l'épaisseur de la couche d'argent. Une fois que tous les paramètres sont connus, la fréquence de résonance théorique est déterminée en fonction de l'épaisseur de la couche d'argent. En utilisant l'équation (IV.3) et son homologue pour le mode-22, la valeur théorique de la fréquence de résonance en fonction de l'épaisseur d'argent est comparée aux résultats obtenus expérimentalement (figure IV.1). Les valeurs de la masse volumique et du module d'Young de l'argent utilisées pour les calculs sont respectivement de 10,5 g/cm^3 et 83 GPa. On observe une différence entre les valeurs théoriques et expérimentales. Cela provient probablement du fait que la masse du levier est estimée à partir de l'épaisseur des différentes couches de matériaux qui composent le levier. Ainsi, les erreurs

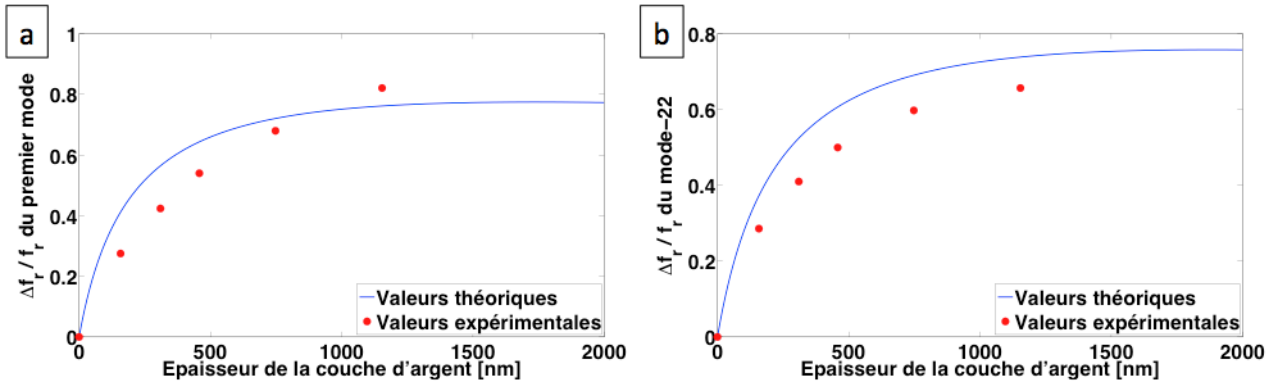

FIGURE IV.1 – *Influence du dépôt d'argent sur la fréquence de résonance a) du premier mode en flexion et b) du mode-22 en fonction de l'épaisseur de la couche d'argent.*

faites sur la détermination des épaisseurs ont un impact direct sur l'estimation de la fréquence de résonance. De plus, lors du dépôt de l'argent sur le levier par évaporation par faisceau d'électrons, il existe une contrainte mécanique, qui n'est pas prise en compte, exercée par la couche d'argent due au changement de température lors du dépôt et après refroidissement. Malgré les différences, on remarque que les valeurs expérimentales suivent la même tendance que les valeurs théoriques. En théorie, il ainsi possible de déterminer le module d'Young de l'argent grâce à ces mesures. Cependant, à cause des écarts entre les mesures et les valeurs théoriques, la détermination du module d'Young donne une large gamme de valeurs, allant de 10 GPa à 140 GPa en utilisant les mesures du premier mode et de 1 GPa à 44 GPa en utilisant les mesures du mode-22 (la valeur trouvée dans la littérature est de 83 GPa). Il faudrait donc refaire des mesures et déterminer plus précisément les épaisseurs des différents matériaux qui composent le levier. Néanmoins, ces résultats montrent que les résonateurs sont sensibles aux variations de rigidité et que l'effet de masse n'est pas tout le temps prédominant, même pour de très faibles épaisseurs déposées.

IV.2 Mesure d'une masse en fonction de sa position

Comme l'indique l'équation (IV.1), la fréquence de résonance d'un levier dépend de sa masse. L'effet de l'ajout d'une masse sur la fréquence de résonance dépend du type de masse : la masse peut être répartie sur la surface du levier ou elle peut être ponctuelle. Dans le cas d'une masse uniformément répartie sur toute la surface du levier, que l'on notera M_{uni}, le terme de masse m_0 dans l'équation (IV.1) devient simplement $m_0 + M_{uni}$. En revanche, dans le cas d'une masse ponctuelle, que l'on notera M_{ponc}, son effet sur la fréquence de résonance dépend de sa position sur le levier. La fréquence de résonance pour les modes en flexion (équation (IV.1)) peut s'exprimer de façon équivalente par :

$$f_n = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\frac{3}{\lambda_n^4} m_0}} \tag{IV.4}$$

avec $k = \frac{3EI}{L^3}$ la constante de raideur du levier considérée en bout de levier (rapport entre la force appliquée en bout de levier et la déflexion en bout de levier). Dans le cas où la masse ponctuelle se trouve en bout de levier, l'équation (IV.4) devient :

$$f_n = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\frac{3}{\lambda_n^4} m_0 + M_{ponc}}} \tag{IV.5}$$

Cependant, lorsque la masse ponctuelle se trouve à un autre endroit sur le levier, son influence sur la fréquence de résonance est différente. De plus, l'effet de la position dépend du mode de résonance. En effet, S. Dohn *et al.* ont étudié l'effet de la position d'une masse ponctuelle sur la fréquence de résonance des quatre premiers modes en flexion (figure IV.2) [1]. Dans cette étude, les auteurs ont mesuré la fréquence de résonance d'un levier en silicium de 153 µm de long sur 11 µm de large, pour une épaisseur de 1,05 µm. Afin d'ajouter une masse ponctuelle sur le levier, une microparticule d'or de 0,9 µm de rayon a été utilisée. La fréquence de résonance du levier chargé s'exprime de la façon suivante :

$$f_{n,\Delta m}^2 = \frac{f_n^2}{1 + \frac{M_{ponc}}{m_0} U_n^2(z_{\Delta m})} \tag{IV.6}$$

avec f_n la fréquence de résonance du mode n à vide, $U_n(z)$ la fonction de la forme du mode de résonance et $z_{\Delta m}$ la position longitudinale de la masse ponctuelle ($z_{\Delta m} = 0$ lorsque la masse se trouve au niveau de l'encastrement du levier). La fonction de la forme du mode de résonance $U_n(z)$ a pour expression :

$$U_n(z) = A_n[\cos(k_n z) - \cosh(k_n z)] + B_n[\sin(k_n z) - \sinh(k_n z)] \tag{IV.7}$$

avec A_n, B_n et k_n des coefficients qui dépendent du mode de résonance et dont les valeurs peuvent être trouvées dans l'article [1]. À partir de l'équation (IV.6), il est possible d'exprimer l'écart relatif en fréquence en fonction de la position de la masse ponctuelle :

$$\frac{\Delta f}{f_n} = -1 + \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{M_{ponc}}{m_0} U_n^2(z_{\Delta m})}} \tag{IV.8}$$

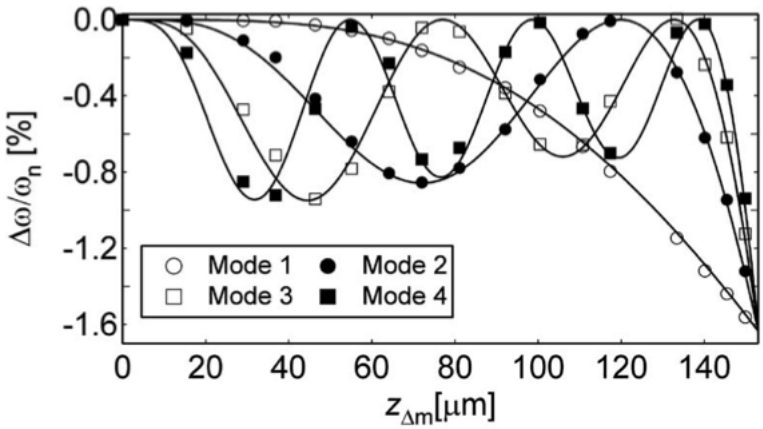

FIGURE IV.2 – *Valeurs théoriques (lignes) et expérimentales de l'écart relatif de la fréquence de résonance pour les quatre premiers modes en flexion en fonction de la position longitudinale d'une masse ponctuelle sur un levier* [1].

L'observation de la figure IV.2 montre que, pour le premier mode, plus la masse se trouve vers le bout du levier, plus l'écart en fréquence est important, avec une valeur maximale en bout de levier. En revanche, ce n'est pas le cas pour les autres modes. En effet, pour le deuxième mode, on remarque que, mis à part lorsque la masse se trouve au niveau de l'encastrement, il existe une autre position pour laquelle l'écart en fréquence est nul : cela correspond au nœud du deuxième mode (partie du levier qui ne bouge pas lors de la vibration). Ainsi, pour le troisième mode, il existe deux positions

où l'écart en fréquence est nul qui correspondent aux deux nœuds du mode, et donc il existe trois positions pour le quatrième mode, etc. Néanmoins, l'écart en fréquence maximal se trouve toujours lorsque la masse est en bout de levier.

Dans un premier temps, afin de suivre l'évolution de changements de masse et l'influence de la position d'une masse sur les leviers, le suivi du séchage de gouttes d'eau a été effectué grâce aux résonateurs. Le but était de suivre l'évolution de la fréquence de résonance des deux premiers modes en flexion tout en enregistrant le profil des gouttes sur le levier à l'aide d'une caméra associée à un système optique. Pour ce faire, une goutte a été placée sur un levier et la fréquence de résonance a été mesurée à l'aide du vibromètre. La figure IV.3 présente les résultats de l'écart relatif en fréquence pour les deux premiers modes et pour trois positions différentes de goutte. Au fur et à mesure que la goutte sèche, sa masse diminue et donc la fréquence de résonance du levier augmente pour atteindre une valeur finale lorsque la goutte s'est complètement évaporée. Il a été remarqué que l'écart en fréquence n'était pas le même pour les deux modes et que, en fonction de la position de la goutte d'eau sur le levier, il peut être plus important pour le premier mode, ou pour le deuxième mode, ou encore à peu près équivalent pour les deux modes. Lorsque le centre de la goutte d'eau se trouve vers l'encastrement du levier (figure IV.3a), l'écart en fréquence est plus important pour le deuxième mode. Les résultats sont inversés lorsque la goutte se trouve en bout de levier (figure IV.3c). Enfin, lorsque la goutte se trouve vers le centre du levier, cet écart est à peu près égal pour les deux modes (figure IV.3b). Ces résultats sont en accord avec l'étude de S. Dohn *et al.*

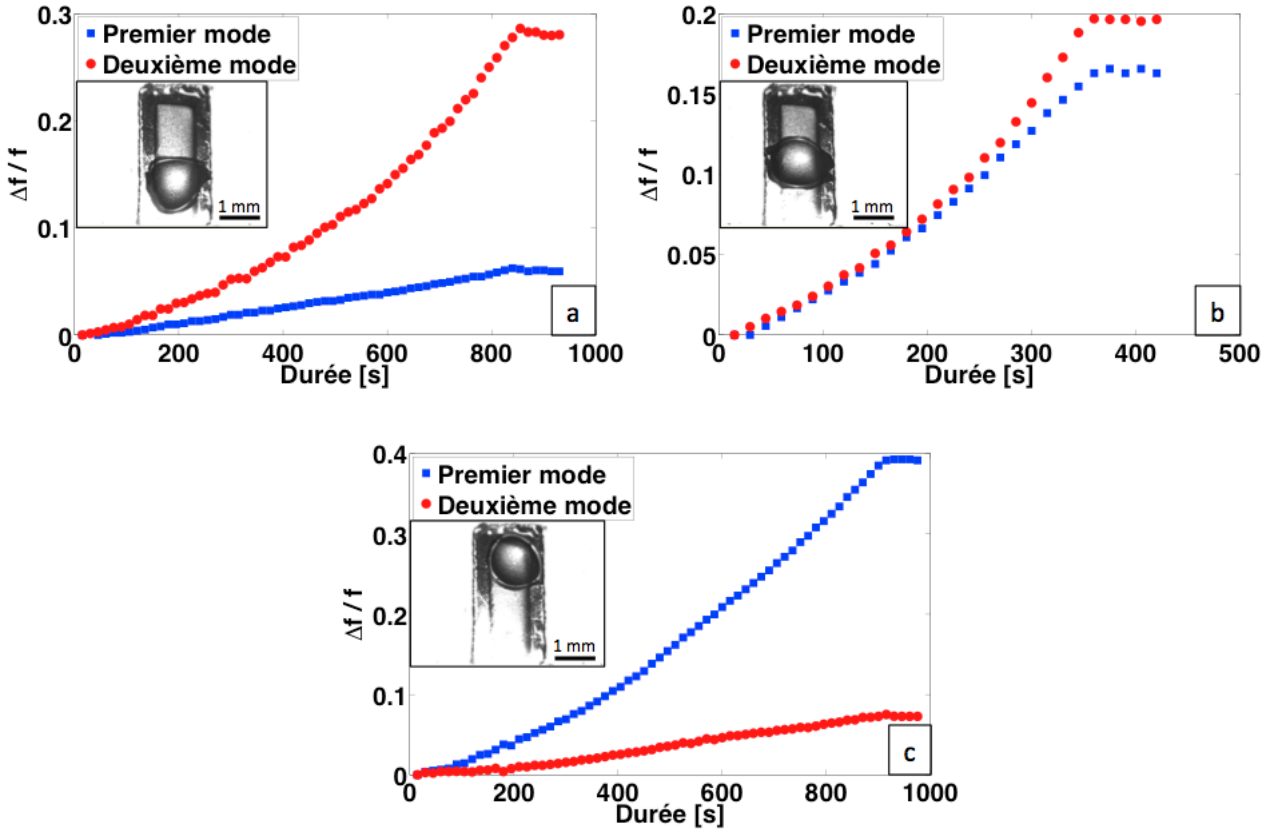

FIGURE IV.3 – *Écart relatif de la fréquence de résonance pour le premier et le deuxième mode en flexion en fonction de la durée de séchage d'une goutte d'eau lorsque a) la goutte se trouve plutôt au niveau de l'encastrement du levier, b) la goutte se trouve vers le centre et c) la goutte se trouve vers le bout du levier. Les images montrent la position et la taille des gouttes utilisées pour les mesures.*

Ce modèle a été utilisé pour essayer de déterminer la position du centre des gouttes d'eau en mesu-

rant la fréquence de résonance avant et après l'ajout des gouttes d'eau pour le premier et le deuxième mode, et connaissant la masse des gouttes. Les résultats présentés dans le tableau IV.2 comparent la position relative (qui vaut 0 au niveau de l'encastrement et 1 en bout de levier) du centre des gouttes déterminée optiquement et en utilisant le modèle de Dohn. On observe qu'en utilisant ce modèle on obtient une approximation de la position des gouttes mais qu'il y a des différences avec la position déterminée optiquement. En effet, la surface des leviers n'étant pas super-hydrophobes et la taille des gouttes d'eau étant importante par rapport à la taille des leviers, on ne peut pas considérer une goutte d'eau comme une masse réellement ponctuelle.

Position relative du centre de la goutte	0,41	0,51	0,54	0,80
Position calculée par le modèle de Dohn	0,37	0,61	0,60	0,76

TABLE IV.2 – *Comparaison entre la position du centre de la goutte déterminée optiquement et la position calculée grace au modèle de Dohn.*

Cette étude a donc motivé le développement d'une théorie qui prend en compte non seulement la position d'une masse sur un levier, mais également l'excentricité verticale du centre de gravité ainsi que le moment d'inertie que peut avoir la masse et la nature de l'attachement de la masse sur la surface du levier. En effet, dans le cas des travaux de S. Dohn *et al.*, il est supposé que la masse est ponctuelle. De plus, en prenant en compte d'autres paramètres comme la nature de l'attachement et la géométrie de l'élément adsorbé sur le levier, il est théoriquement possible d'utiliser les leviers pour définir ces paramètres en mesurant l'écart en fréquence de plusieurs modes de flexion.

Une première théorie a été développée par S. Heinrich de l'Université de Marquette à Milwaukee aux États-Unis et par I. Dufour du laboratoire IMS. Cette théorie s'applique dans le cas d'une masse rigide attachée de façon rigide sur la surface du levier par un contact ponctuel. Les différents paramètres pris en compte sont visibles sur la figure IV.4 [2]. Le levier est caractérisé par sa masse m, son module d'Young E, son moment quadratique I, sa longueur L ainsi que son épaisseur h. L'entité adsorbée est caractérisée par sa masse M, son moment d'inertie J, la position longitudinale du point de contact avec le levier x_0 ainsi que l'excentricité verticale e de son centre de gravité. Les équations ne seront pas développées ici mais elles peuvent être consultées dans la référence [2].

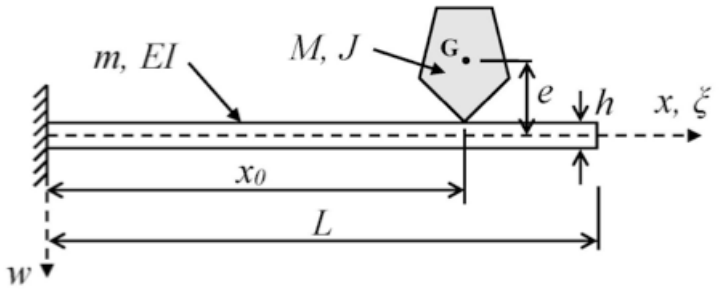

FIGURE IV.4 – *Représentation d'une masse quelconque attachée à la surface d'un levier avec la définition des différents paramètres utilisés* [2].

La figure IV.5 montre les résultats théoriques de l'influence de la masse de l'entité adsorbée ainsi que l'influence de l'excentricité pour les trois premiers modes en flexion. Il en ressort que, comme attendu, la masse à une forte influence sur l'écart relatif en fréquence, avec un écart plus grand pour une masse plus importante. De plus, excepté pour le premier mode, l'excentricité a une influence non négligeable. On remarque que plus la masse est importante et plus l'influence de l'excentricité est

importante. Ainsi, dans le cas où la masse est conséquente par rapport à la masse du levier, négliger l'excentricité revient à faire une erreur importante si l'on veut déterminer la masse de l'entité adsorbée.

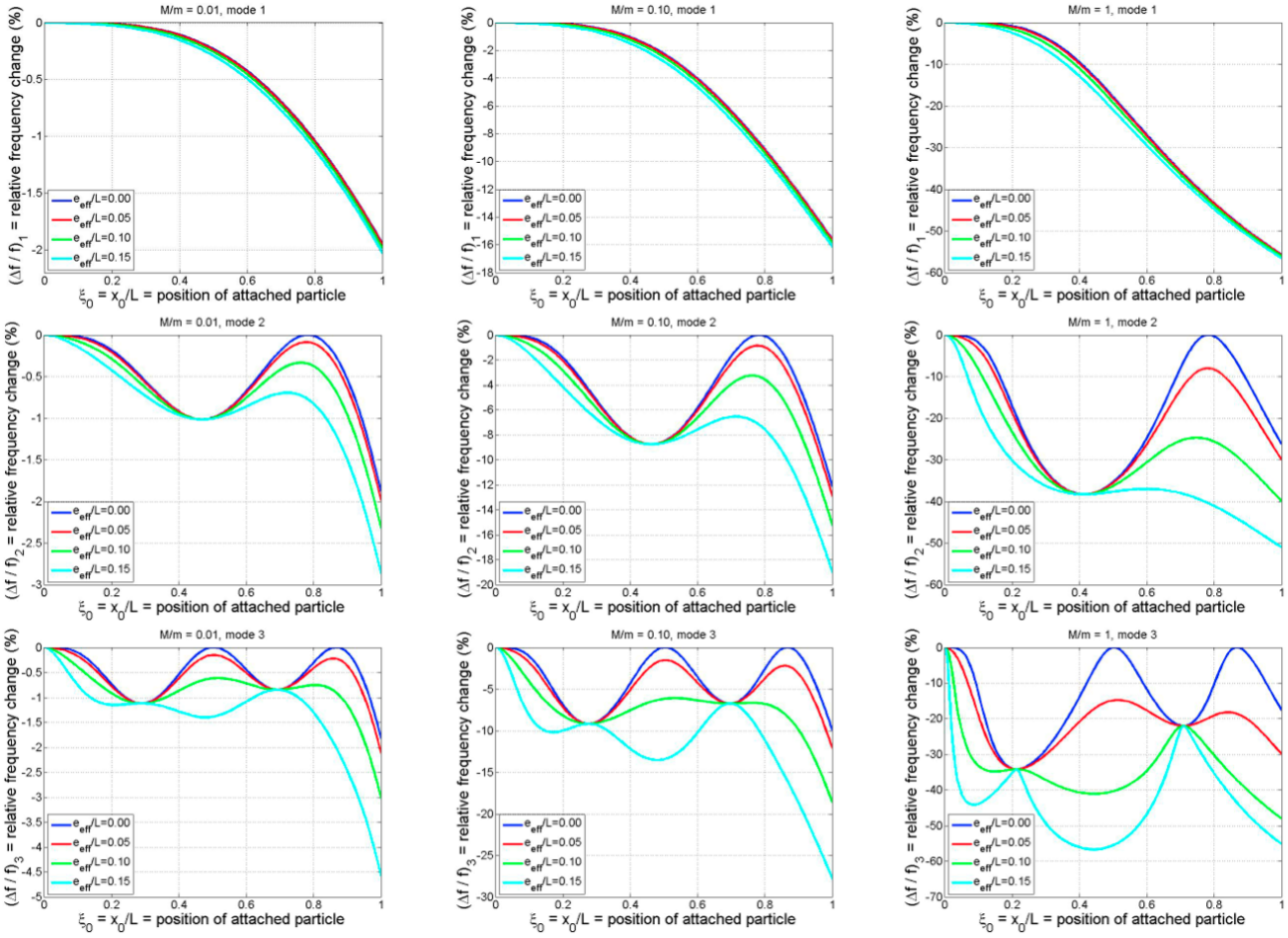

FIGURE IV.5 – *Calcul de l'écart relatif en fréquence pour les trois premiers modes en flexion et pour trois masses relatives différentes de l'entité adsorbée (M/m = 0,01 ; 0,1 et 1) ainsi que pour quatre valeurs de l'excentricité effective relative (e_{eff}/L = 0 ; 0,05 ; 0,1 et 0,15). L'expression de l'excentricité effective relative est* $\frac{e_{eff}}{L} = \sqrt{\frac{1}{L^2}(e^2 + \frac{J}{M})}$ [2].

Des mesures de fréquences de résonance pour les premier et deuxième modes ont été faites avec les résonateurs et en posant une petite bille de Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) à différentes positions sur le levier pour essayer de valider ces résultats théoriques (figure IV.6). Les valeurs de l'écart relatif en fréquence en fonction de la position de la bille sont données sur la figure IV.7. La bille de PMMA a été considérée comme sphérique avec un diamètre de 575 µm et une masse de 0,117 mg (masse de 0,555 mg pour le levier utilisé). Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la théorie développée puisque l'on observe que, par exemple, il existe une position de la bille (0,78) où l'écart en fréquence est quasiment nul pour le deuxième mode alors que la masse relative de la bille est de 0,2 et le paramètre $e_{eff}/L \approx 0{,}11$. Or, d'après les résultats de la figure IV.5, l'écart en fréquence ne peut pas être nul pour une si grande masse, à moins de considérer une excentricité nulle, ce qui n'est pas le cas. Cela provient très probablement du fait que la bille de PMMA est juste posée sur le levier et non attachée. Son influence est donc différente de la théorie développée. Il faudrait pouvoir attacher une bille ou un autre objet sur le levier, mais ce n'est pas évident car il faut aussi pouvoir déplacer la bille afin de voir l'influence de la position. Jusqu'à présent, cette théorie n'a donc pas encore été validée expérimentalement.

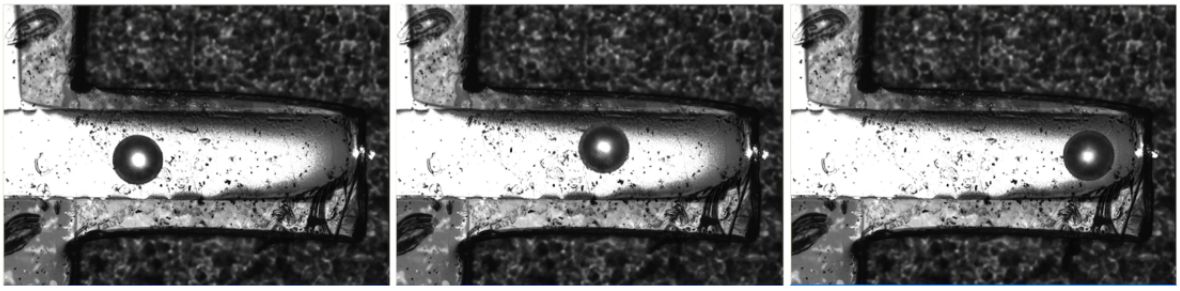

FIGURE IV.6 – *Images de la bille de PMMA pour différentes positions sur le levier.*

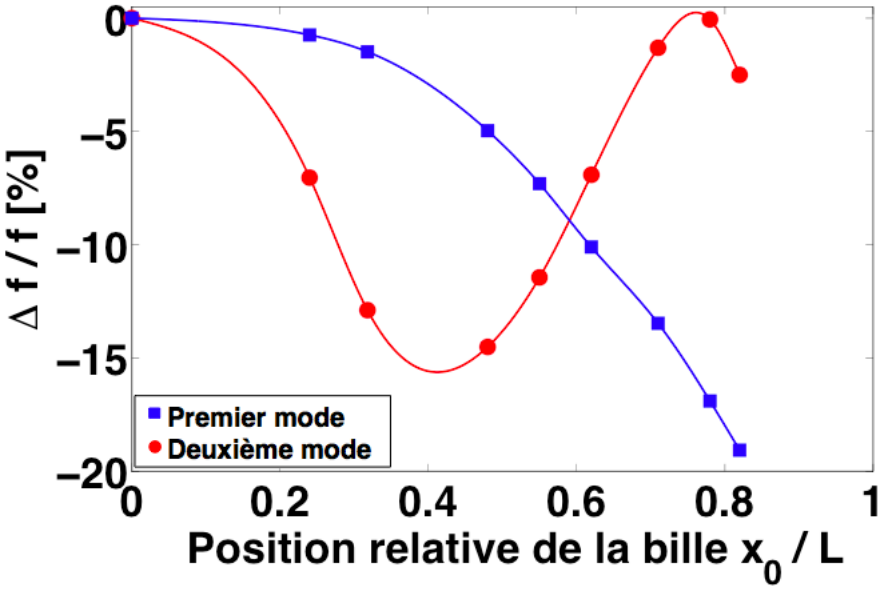

FIGURE IV.7 – *Écart relatif en fréquence pour les premier et deuxième modes en fonction de la position relative x_0/L de la bille de PMMA sur le levier.*

Cette théorie a été étendue dans le cas où l'attachement de l'entité adsorbée n'est plus rigide mais élastique [3], se représentant par une constante de raideur rotationnelle. Les valeurs théoriques sont présentées sur la figure IV.8. Dans un premier temps, on observe que les résultats calculés par cette théorie correspondent à ceux calculés par analyse par éléments finis. De plus, il existe des valeurs de la constante de rigidité rotationnelle et de la position de l'entité adsorbée pour lesquelles l'écart en fréquence est positif, ce qui n'est *a priori* jamais le cas lorsque l'on ajoute une masse ponctuelle sur un levier. De même que pour l'excentricité du centre de gravité, l'influence de la rigidité de l'attachement semble plus importante pour les modes d'ordre supérieur. Cependant, ces résultats n'ont pas encore été vérifiés expérimentalement pour les mêmes raisons que précédemment.

La détermination de la masse d'une entité adsorbée n'est donc pas une chose aisée dans le cas où cette entité possède une taille et une masse comparables à celles du levier. Il est évident que la position de cette masse a une grande influence sur l'écart en fréquence. Mais il a été mis en évidence que la forme de l'entité ainsi que la nature de son attachement ont également une influence non négligeable, pouvant même faire augmenter la fréquence. Bien que n'ayant pas encore été vérifiés expérimentalement, ces résultats correspondent à des simulations par éléments finis et permettent d'envisager d'utiliser la résonance de leviers afin de déterminer des caractéristiques de l'entité adsorbée comme la nature de son attachement.

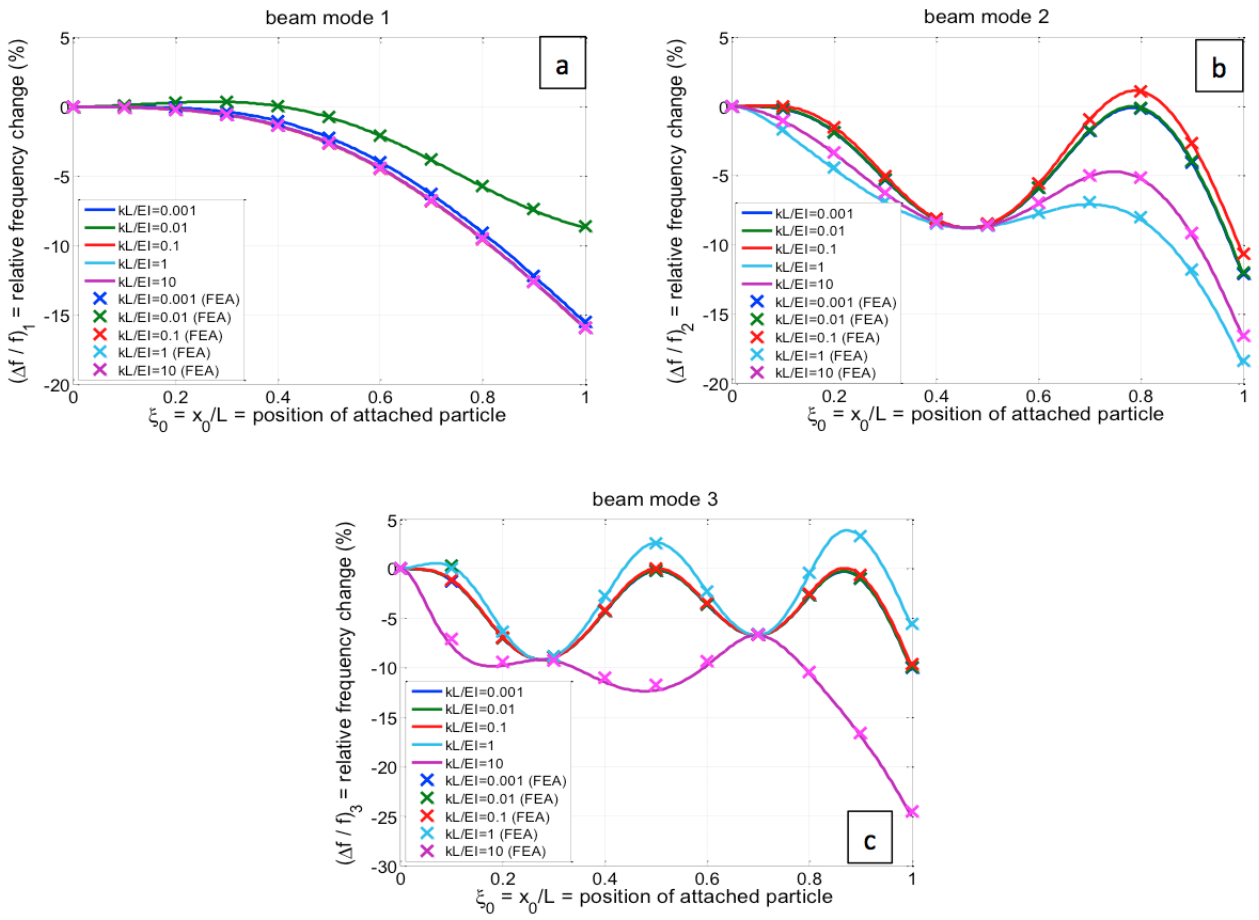

FIGURE IV.8 – *Écart relatif en fréquence pour les trois premiers modes en fonction de la position relative x_0/L de l'entité adsorbée et pour différentes valeurs de la constante de raideur rotationnelle normalisée kL/EI = 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10. Les lignes correspondent aux résultats trouvés par l'expression analytique et les croix correspondent à des analyses par éléments finis (FEA).*

IV.3 Mesure de la viscosité d'un liquide

Nous avons vu dans le chapitre III que les résonateurs sont sensibles à la densité et à la viscosité du milieu environnant. En effet, ces deux caractéristiques ont une influence sur la fréquence de résonance et sur le facteur de qualité des résonateurs. Aussi, il est possible de relier les variations de la fréquence de résonance et du facteur de qualité aux changements de densité et de viscosité. Dans la suite de cette section, les équations découlent de la référence [4].

Lorsqu'un résonateur mécanique vibre dans un milieu, ce dernier s'oppose au mouvement du résonateur, ce qui peut se modéliser par une force exercée sur le résonateur. Pour de faibles amplitudes de vibration, la force par unité de longueur peut s'exprimer :

$$F_f(\omega) = -(jg_1\omega - g_2\omega^2)w \tag{IV.9}$$

avec g_1 et g_2 les deux fonctions définies à la section III.3.1, et w la déflexion. Cette force possède donc un terme proportionnel à la vitesse $(-j\omega g_1 w)$ et un terme proportionnel à l'accélération $(\omega^2 g_2 w)$. Dans le cas d'un oscillateur mécanique linéaire, il est possible d'exprimer la pulsation propre ω_0 et le facteur de qualité Q de la façon suivante :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k_0}{m_{eff} + m_f(\omega_0)}} \tag{IV.10}$$

$$Q = \frac{1}{\omega_0} \times \frac{k_0}{c_0 + c_f(\omega_0)} \tag{IV.11}$$

avec k_0 la constante de raideur de l'oscillateur, m_{eff} sa masse effective ($= \frac{3}{\lambda_n^4} m_0$), c_0 son coefficient d'amortissement, $m_f(\omega)$ et $c_f(\omega)$ la masse et le coefficient d'amortissement respectivement ajoutés par le fluide. En fonction des grandeurs g_1 et g_2, ces deux coefficients s'expriment (en utilisant les équations (III.12) et (III.13)) :

$$m_f(\omega) = g_2 L \frac{m_{eff}}{m_0} \qquad \text{et} \qquad c_f(\omega) = g_1 L \frac{m_{eff}}{m_0} \tag{IV.12}$$

Ces deux derniers paramètres dépendent de la fréquence à laquelle vibre l'oscillateur et sont également fonctions de la masse volumique et de la viscosité du fluide :

$$m_f(\omega) = m_\rho \rho_f + m_{\eta\rho} \sqrt{\frac{\eta \rho_f}{\omega}} \qquad \text{et} \qquad c_f(\omega) = c_\eta \eta + c_{\eta\rho} \sqrt{\omega \eta \rho_f} \tag{IV.13}$$

avec m_ρ, $m_{\eta\rho}$, c_η et $c_{\eta\rho}$ des coefficients qui dépendent de la géométrie de l'oscillateur. En remplaçant l'expression de m_f dans l'équation (IV.10) et celle de c_f dans l'équation (IV.11), et en divisant par k_0, on obtient les expressions de ω_0 et de Q suivantes :

$$\omega_0 = \frac{1}{\sqrt{m_1 + m_2 \rho_f + m_3 \sqrt{\eta \rho_f}}} \qquad \text{et} \qquad Q = \frac{1}{\omega_0} \times \frac{1}{c_1 + c_2 \eta + c_3 \sqrt{\eta \rho_f}} \tag{IV.14}$$

avec m_1, m_2, m_3, c_1, c_2 et c_3 six coefficients à déterminer. Dans le cas présent, la dépendance de m_f et de c_f vis à vis de ω a été négligée car toutes les mesures seront faites à des fréquences proches de la fréquence de résonance . Ainsi, les expressions obtenues de ω_0 et de Q ne dépendent que de la densité et de la viscosité. Il est ainsi possible d'inverser le système afin d'obtenir les expressions de ρ_f et de η en fonction de la fréquence propre et du facteur de qualité. On obtient ainsi :

$$\rho_f = \frac{1}{2}(a_0 k_1 - b_0 + k_3) \frac{m_3}{m_2 k_2 \sqrt{2\pi f_0}} \tag{IV.15}$$

$$\eta = \frac{1}{2}(b_0 k_1 - a_0 + k_3) \frac{c_3 \sqrt{2\pi f_0}}{c_2 k_2} \tag{IV.16}$$

Les paramètres a_0, b_0, k_1, k_2 et k_3 ont été introduits afin d'alléger les expressions de ρ_f et η. Leurs expressions sont les suivantes :

$$a_0 = \frac{1}{m_3 (2\pi f_0)^{3/2}} - \frac{m_1}{m_3} \sqrt{2\pi f_0} \qquad b_0 = \frac{1}{c_3 Q (2\pi f_0)^{3/2}} - \frac{c_1}{c_3 \sqrt{2\pi f_0}} \tag{IV.17}$$

$$k_1 = 1 - 2\frac{m_2 c_2}{m_3 c_3} \qquad k_2 = 1 - \frac{m_2 c_2}{m_3 c_3} \qquad k_3 = \sqrt{(a_0 - b_0)^2 + 4 a_0 b_0 \frac{m_2 c_2}{m_3 c_3}} \tag{IV.18}$$

On observe que les équations (IV.15) et (IV.16) sont indépendantes l'une de l'autre. Il est donc possible, à partir de la mesure de la fréquence de résonance et du facteur de qualité, de déterminer la densité du fluide sans aucune connaissance de la viscosité, et inversement, ou encore les deux à la fois.

Au chapitre 3, l'influence de la viscosité et de la densité sur la fréquence de résonance a été observée en faisant des mesures dans des mélanges d'eau et de glycérol. Ces mêmes mesures ont également été utilisées afin de déterminer la viscosité des différents mélanges (la détermination de la densité a été essayée mais les résultats étaient trop éloignés de la réalité). Pour cela, la fréquence de résonance ainsi que le facteur de qualité ont été mesurés pour le premier mode en flexion et pour le mode-22. Pour les mesures du premier mode en flexion, les mesures ont été faites à l'aide du vibromètre car la fréquence est trop faible (en dessous d'un kHz) pour pouvoir être mesurée avec la carte électronique qui est limitée à 1 kHz.

Afin de déterminer la viscosité à partir de l'équation (IV.16), nous avons vu qu'il faut préalablement déterminer six coefficients (m_1, m_2, m_3, c_1, c_2 et c_3). Les mesures effectuées pour les mélanges avec 0 %, 40 % et 80 % de glycérol ont été utilisées afin de déterminer ces coefficients. En effet, pour chaque mesure, la fréquence de résonance et le facteur de qualité sont déterminés, ce qui donne deux équations pour chaque mélange pour déterminer les six coefficients. Il faut donc trois mesures afin de tous les déterminer. Une fois ces six coefficients connus, il est possible de calculer la viscosité pour n'importe quel fluide, à conditions bien évidemment que le résonateur ne soit pas trop amorti et que la mesure soit possible. Les résultats sont présentés sur la figure IV.9. La viscosité a été déterminée grâce au résonateur et également à l'aide d'un viscosimètre commercial afin de comparer les résultats. Il est à noter que pour déterminer la viscosité d'un liquide avec le viscosimètre, il faut connaître sa masse volumique, contrairement à l'utilisation des résonateurs. Comme mentionné précédemment, les mesures pour les mélanges à 0 %, 40 % et 80 % correspondent parfaitement car elles ont servi à l'étalonnage qui permet de déterminer les six coefficients. On observe que pour les mesures effectuées avec le premier mode en flexion, les résultats sont très cohérents avec les valeurs données par le viscosimètre, avec une erreur relative maximale de 22 %. Pour les mesures faites avec le mode-22, on remarque que les résultats sont plus discordants pour les plus faibles viscosités. Si l'on écarte les valeurs pour les faibles valeurs de viscosités, l'erreur relative maximale est alors de 32 %.

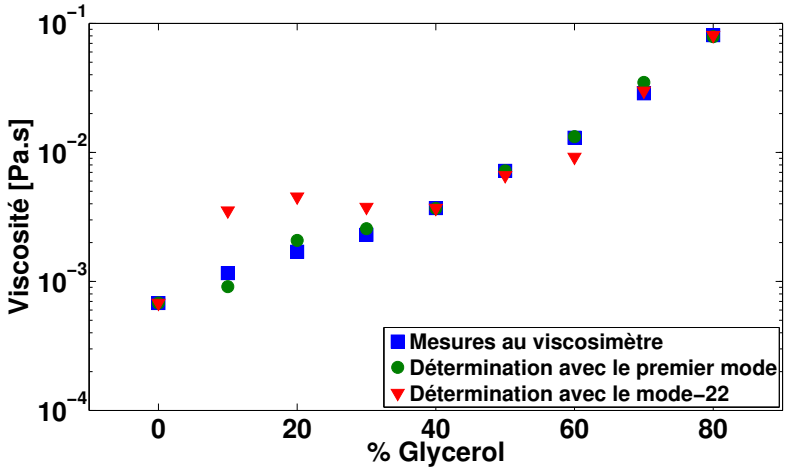

FIGURE IV.9 – *Détermination de la viscosité des mélanges eau/glycérol en fonction du ratio volumique du glycérol dans l'eau. Les résultats correspondent à des mesures faites avec le viscosimètre et avec les résonateurs pour le premier mode et le mode-22.*

Les équations utilisées sont issues des travaux de M. Heinisch *et al.* qui ont utilisé des diapasons en acier de section rectangulaire et circulaire pour déterminer la masse volumique et la viscosité de

liquides [5]. Les auteurs ont réussi à déterminer la viscosité avec une précision de 1 % pour une gamme de viscosités allant de 0,2 mPa.s à 2 mPa.s. En ce qui concerne la masse volumique, une précision de 0,01 % a été atteinte pour une gamme de masses volumiques allant de 0,78 g/cm^3 à 1 g/cm^3.

En comparaison avec d'autres travaux, on peut citer G. Pfusterschmied *et al.* [6] qui ont déterminé la densité et la viscosité de liquides en mesurant la fréquence de résonance et le facteur de qualité de leviers en silicium. Pour cela, les auteurs ont tout d'abord utilisé un mode transversal, nommé mode-17, pour déterminer la densité des liquides, puis ils ont déterminé la viscosité en connaissant la densité. Ils ont ainsi réussi à mesurer à la fois la densité et la viscosité avec des erreurs relatives maximales de 4 % et 3 % respectivement. D'autres travaux utilisent également la résonance de leviers afin de déterminer la densité et la viscosité de liquides [7]. Les auteurs de cet article n'utilisent pas la mesure du facteur de qualité mais seulement la fréquence de résonance de deux modes. Les mesures sont étalonnées en faisant préalablement des mesures dans l'air et dans l'eau. Une fois l'étalonnage fait, il est possible de déterminer la densité et la viscosité de différents fluides. Ils ont ainsi déterminé la viscosité de différents liquides avec une erreur relative de 8 %.

Les deux travaux des autres équipes affichent de meilleurs résultats, avec notamment la détermination de la densité en même temps que celle de la viscosité. Cependant, il est à noter que les mesures faites dans le cadre de cette thèse n'ont été réalisées qu'une seule fois. De plus, la viscosité de liquides a été déterminée pour une large gamme, allant de 0,68 mPa.s à 90 mPa.s, soit plus de deux ordres de grandeurs. Il est aussi à rappeler que les résonateurs utilisés sont organiques, contrairement aux autres travaux présentés où ils sont en silicium.

IV.4 Étude de l'adhésion cellulaire

L'objectif de ces travaux est d'étudier la biomécanique de cellules, et notamment de suivre en temps réel leur l'adhésion sur les résonateurs. Afin de remplir cet objectif, il faut s'assurer que les résonateurs fonctionnent en milieu liquide et que les cellules adhèrent sur la surface des résonateurs. Le fonctionnement des résonateurs en milieu liquide a été démontré, avec notamment les mesures de viscosité de mélanges eau/glycérol. Il reste donc à s'assurer que les cellules adhèrent sur les résonateurs. Dans toute cette section, les cellules utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses (hMSC) car elles sont robustes et plutôt grosses, ce qui permet d'avoir un effet de masse important lors de l'adhésion sur les leviers.

Traitement UV/Ozone des résonateurs

Comme précisé dans le chapitre précédent, pour que les résonateurs fonctionnent en milieu liquide conducteur, ils ont été recouverts de PDMS par dip-coating. Cependant, le PDMS est un matériau hydrophobe et les cellules sont réticentes à adhérer sur ce genre de surface [8]. Afin de rendre le PDMS plus hydrophile, une méthode simple et rapide consiste à faire un traitement de la surface par UV/ozone [9]. En effet, le dioxygène exposé aux UV se dissocie en atomes d'oxygène qui se combinent à nouveau par trois pour former de l'ozone. L'ozone va alors oxyder le PDMS pour former de l'oxyde de silicium, plus hydrophile que le PDMS [10]. Cette méthode est simple et rapide mais les effets ne sont pas permanents, et le PDMS retrouve ses propriétés hydrophobes avec le temps. Ce temps dépend de la durée d'exposition aux UV [11].

Afin de vérifier l'acquisition du caractère hydrophile du PDMS par traitement UV/ozone, des carrés de PDMS ont été exposés à de l'ozone en utilisant un nettoyeur UV/ozone modèle 42-220 de la société Jelight Company. Une durée d'exposition de 30 min a été choisie. En effet, si le temps d'exposition est trop faible, le PDMS retrouve vite ses propriétés hydrophobes, et si la durée d'exposition est longue, l'échantillon chauffe et il risque d'être endommagé [9]. Après exposition, des gouttes d'eau ont été posées sur les carrés de PDMS et une photo de leur profil a été enregistrée (figure IV.10). On observe clairement que l'angle de contact de la goutte est plus faible lorsque le PDMS a été traité

par UV/ozone, révélant ainsi ses propriétés hydrophiles. L'angle de contact θ_c a été déterminé par un traitement de l'image effectué à l'aide du logiciel Matlab dont le principe est illustré sur la figure IV.11. Pour le PDMS non traité, $\theta_c = 96,3\,°$, et pour le PDMS traité, $\theta_c = 66,6\,°$.

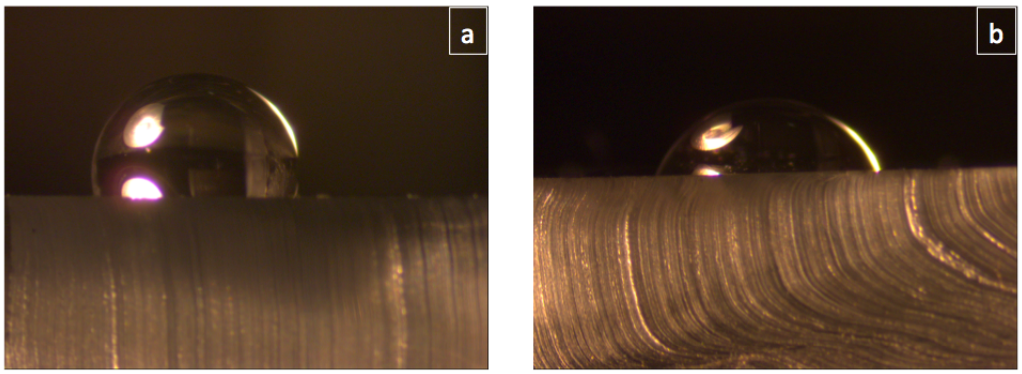

FIGURE IV.10 – *Image du profil des gouttes d'eau sur les carrés de PDMS a) avant le traitement UV/ozone et b) après le traitement.*

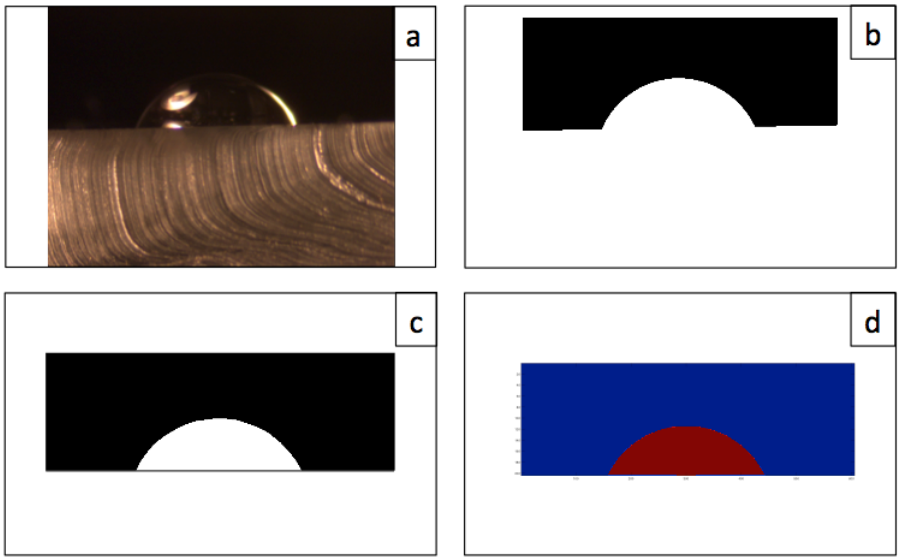

FIGURE IV.11 – *Principe du traitement d'image utilisé pour déterminer l'angle de contact de l'image en a). b) L'algorithme permet d'abord de transformer une image en couleur en noir et blanc afin de délimiter les contours de la goutte. c) Une ligne de base est ensuite définie afin de délimiter la surface sur laquelle se trouve la goutte. d) Finalement, une approximation de la goutte est faite par une portion de cercle et l'angle de contact est calculé à partir de cette approximation.*

Test de développement des cellules

Après le traitement UV/ozone, le PDMS est plus hydrophile, ce qui est préférable pour que les cellules y adhèrent. Cependant, dans le but de maximiser l'adhésion des cellules, des carrés de PDMS ont été recouverts par des protéines, après le traitement UV/ozone, et des tests d'adhésion de cellules hMSC ont été menés. Des carrés de PDMS ont été recouverts de collagène ou de poly-D-lysine et des cellules ont été incubées dessus pendant une nuit, ainsi que sur des carrés de PDMS neutres (mais

toujours après le traitement UV/ozone). Ces deux protéines sont connues pour promouvoir l'adhésion cellulaire [12, 13]. Les images sont présentées sur la figure IV.12. On remarque qu'il n'y a pas de réelle différence avec ou sans protéines, dans le sens où les cellules se développent bien dans les trois cas. Aussi, il a été choisi d'utiliser le PDMS après le traitement UV/ozone sans protéines afin d'avoir des expérimentations les plus simples et les plus rapides.

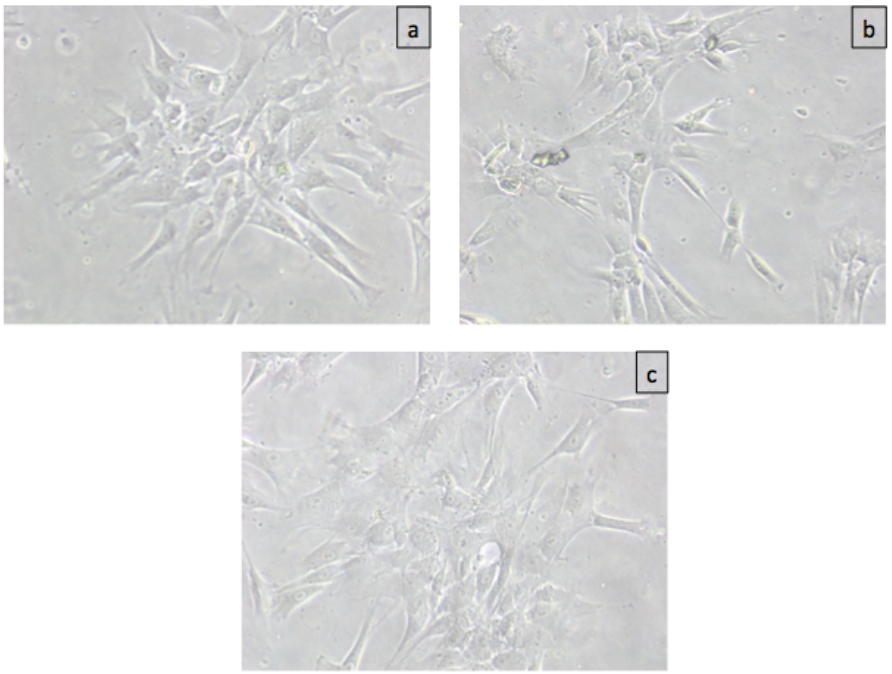

FIGURE IV.12 – *Image du développement de cellules hMSC sur des carrés de PDMS traités par UV/ozone et recouverts a) de collagène, b) de poly-D-lysine et c) sans protéines.*

Influence des vibrations

Une question importante est aussi de savoir si les vibrations des résonateurs ne sont pas un frein pour l'adhésion des cellules. Pour répondre à cette question, des cellules ont été incubées sur des résonateurs sans vibrations et d'autres avec vibrations. Les vibrations ont été appliquées en continu en faisant des balayages en fréquence autour de la fréquence de résonance. Deux durées d'incubation ont été respectées : 10 min et 2 h. Après incubation, les cellules adhérentes ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 min à température ambiante. La figure IV.13 montre des images des leviers faites au profilomètre optique. Cette méthode a été retenue car des images par microscopie à fluorescence ont été testées sans succès. En effet, les cellules ont été marquées après fixation sur les leviers mais on ne distingue aucune cellule à cause de l'absorption du fluorophore dans le PDMS (figure IV.14). Après 2 h d'incubation sans vibration (figure IV.13a), on observe que les cellules se sont bien étalées. En revanche, pour la même durée d'incubation mais avec des vibrations (figure IV.13b), même si l'image n'est pas aussi nette que la précédente, il semblerait que les cellules adhèrent mais qu'elles ne s'étalent pas. Enfin, pour seulement 10 min d'incubation avec des vibrations (figure IV.13c), on remarque que des cellules ont déjà adhéré, ce qui démontre que les vibrations ne posent pas de problème pour l'adhésion des cellules. De plus, pour les expériences de suivi de l'adhésion des cellules sur les leviers, les résonateurs ne sont actionnés que pendant la durée du balayage en fréquence effectué pour faire les mesures.

Suivi de l'adhésion de cellules

Nous venons de voir que les cellules adhèrent bien sur le PDMS traité par UV/ozone et que les vibrations ne les empêchent pas d'adhérer sur les résonateurs. Ainsi, des mesures de suivi d'adhésion

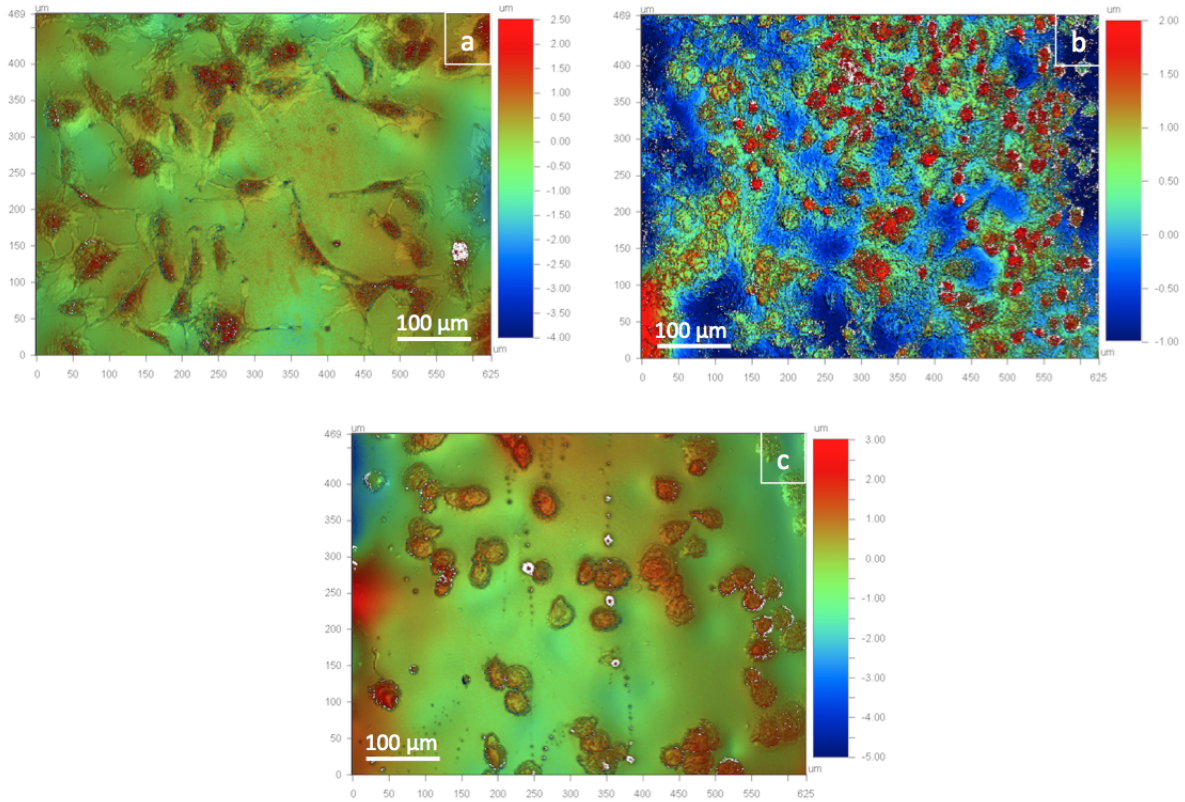

FIGURE IV.13 – *Images des leviers au profilomètre optique après fixation des cellules pour a) 2 h d'incubation sans vibration, b) 2 h d'incubation avec vibration et c) 10 min d'incubation avec vibration.*

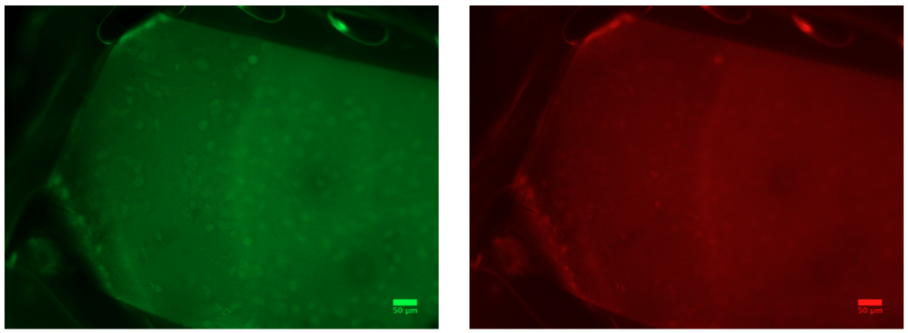

FIGURE IV.14 – *Images par microscopie à fluorescence d'un levier pour des fluorescences verte et rouge.*

de cellules en temps réel ont été réalisées à l'aide des résonateurs. Tout d'abord, pour effectuer ces mesures, les résonateurs ont été placés dans l'enceinte de mesure étanche et submergés dans 1 mL de milieu physiologique (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2, de la société Promo Cell) utilisé pour la culture des hMSC. L'ensemble a ensuite été placé dans un incubateur à 37 °C, avec 5 % de CO_2 et saturé en humidité. Avant de commencer les mesures, une durée d'une heure est attendue afin que le milieu physiologique et les résonateurs se stabilisent en température. Après cette heure de stabilisation, le spectre de résonance est mesuré toutes les minutes pendant une heure afin de déterminer la ligne de base de la fréquence de résonance et s'assurer que les résonateurs sont stables. Les cellules sont ensuite introduites dans un faible volume de milieu physiologique (quelques centaines de microlitres) puis injectées dans l'enceinte de mesure. Le spectre de résonance est alors mesuré toutes

les minutes pendant une heure. Cela implique que, toutes les minutes, les vibrations ne sont appliquées que pendant une faible durée (typiquement quelques secondes).

Dans un premier temps, des mesures sans cellules ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles avec cellules. Cela veut dire que la fréquence de résonance a été mesurée après une heure d'attente pour la stabilisation en température. Après cela, 100 µL de milieu physiologique sans cellules ont été injectés dans l'enceinte de mesure afin de vérifier que cela ne perturbe pas les mesures de la fréquence de résonance. La figure IV.15 présente les résultats de la mesure à blanc. On observe que l'injection du liquide perturbe la mesure car la fréquence de résonance après injection est légèrement plus grande. Cependant, en aucun cas l'injection du liquide ne produit de décroissance continue de la fréquence de résonance : elle reste stable après l'injection.

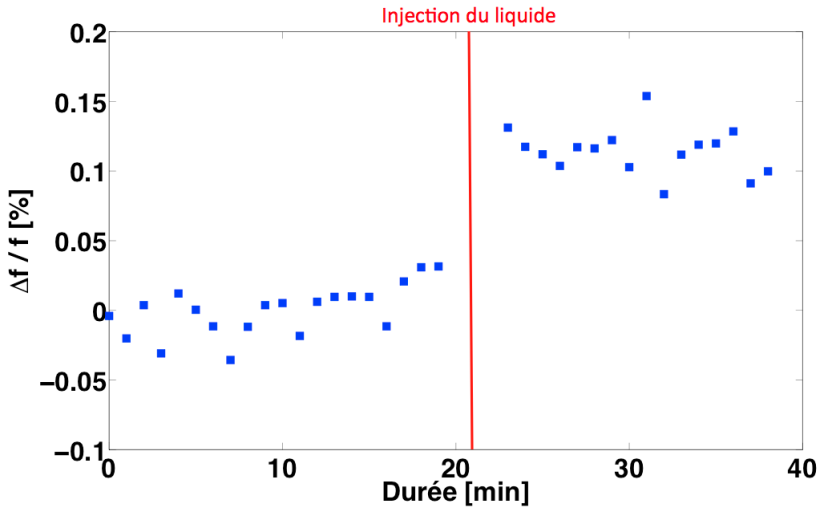

FIGURE IV.15 – *Mesure à blanc de la fréquence de résonance afin d'observer l'impact sur cette dernière de l'injection d'un liquide sans cellules.*

Afin d'effectuer les mesures dans les mêmes conditions, les cellules ont été comptées avant la mesure afin d'en injecter 100 000 à chaque fois. Pour compter les cellules, 100 µL de la solution contenant les cellules ont été prélevés et mélangés avec 10 µL de bleu de trypan. Ce dernier permet de colorer les cellules mortes afin de bien les visualiser et de ne pas les compter. Ensuite, une cellule de Malassez, dans laquelle on injecte une partie du mélange obtenu, est utilisée pour compter les cellules. La cellule de Malassez contient un quadrillage composé de 100 carrés. Il faut alors compter le nombre de cellules contenues dans les 100 carrés en les observant au microscope optique. Le résultat obtenu est ensuite multiplié par 1,1 pour avoir le nombre de cellules par microlitre (car on a mélangé 100 µL de solution contenant les cellules avec 10 µL de bleu de trypan).

Trois mesures du suivi de l'adhésion de cellules ont été effectuées dans les mêmes conditions afin de déterminer la reproductibilité. Les résultats sont présentés sur la figure IV.16. On observe qu'avant l'introduction des cellules, la fréquence de résonance est assez stable, avec une fluctuation inférieure à 0,1 %. On remarque également que la valeur de la variation relative en fréquence après une heure d'incubation des cellules est similaire pour les trois mesures et vaut aux alentours de -0,4 %. Cela démontre qu'à peu près le même nombre de cellules ont adhéré sur les résonateurs. Pour le vérifier, les cellules ont été fixées après les mesures et comptées sur les leviers à partir des images faites au profilomètre optique (figure IV.17). En connaissant la valeur de la variation relative en fréquence ains que le nombre de cellules, il est possible de déterminer la variation de masse due à l'adhésion des cellules (en utilisant la l'équation (III.8)) ainsi que la masse moyenne d'une cellule hMSC (en supposant que les cellules soient réparties de façon homogène sur les leviers). La détermination du nombre de cellules, de la variation de la masse ainsi que de la masse moyenne d'une cellule pour les trois mesures

est présentée dans le tableau IV.3. Grâce à ces mesures, une masse moyenne comprise entre 3,3 ng et 3,6 ng a été calculée pour les cellules hMSC. La masse des cellules dépend du type de cellule car elle ne font pas toutes le même volume. Cependant, à titre de comparaison, des travaux ont permis de déterminer la masse de cellules d'adénocarcinome du côlon humain HT29 [14]. La masse déterminée par les auteurs pour ces cellules se trouvent entre 0,5 ng et 2 ng. Les valeurs déterminées grâce aux résonateurs organiques sont donc du même ordre de grandeur, même si les cellules sont différentes (les hMSC sont des cellules assez grosses en comparaison avec d'autres types de cellules).

	Nombre de cellules	Δm [µg]	**Masse d'une cellule [ng]**
Mesure 1	540	1,8	3,4
Mesure 2	470	1,7	3,6
Mesure 3	570	1,9	3,3

TABLE IV.3 – *Détermination du nombre de cellules sur les leviers, de la variation de masse et de la masse moyenne d'une cellule hMSC.*

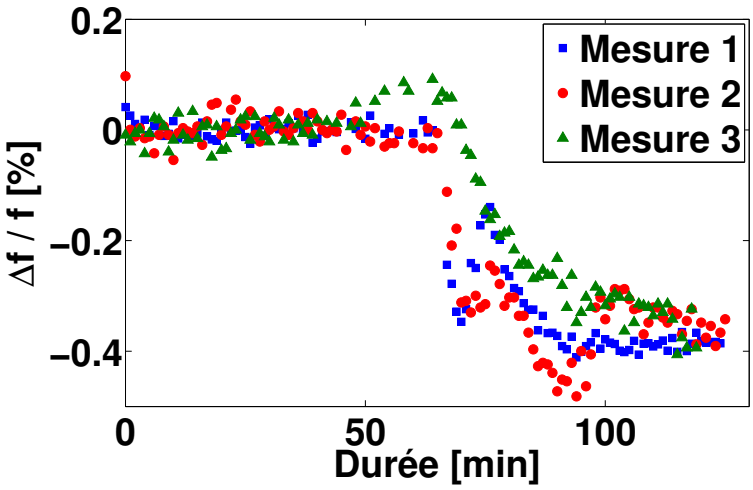

FIGURE IV.16 – *Mesure de la variation relative en fréquence en fonction de la durée. Pendant la première heure, la fréquence de résonance est mesurée sans les cellules, puis les cellules sont injectées et la mesure se poursuit pendant une heure.*

La figure IV.16 nous montre également que, pour les mesures 1 et 2, il y a des moments où la fréquence de résonance augmente puis diminue à nouveau. Ce phénomène s'est produit une fois pour la mesure 1 et deux fois pour la mesure 2. Cependant, il ne s'est pas produit pour la troisième mesure. Cela est peut-être dû à un artefact de mesure ou dû à un comportement des cellules. Afin de déterminer la cinétique de l'adhésion cellules, une valeur moyenne de l'écart relatif en fréquence a été prise pour les trois mesures. Le résultat est donné sur la figure IV.18. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type calculé avec seulement trois points de mesure. Afin de déterminer la cinétique de l'adhésion des cellules, une approximation des données a été faite en prenant une équation du type $A\left(1-e^{(-t/\tau)}\right)$, avec A la valeur finale et τ la constante de temps. Pour l'approximation réalisée, $A=$-0,36 % et $\tau=8{,}4$ min. On peut donc déterminer que 95 % des cellules ont adhéré au bout de 3τ, soit 25,2 min.

Le suivi de l'adhésion de cellules a donc été réalisé avec succès à l'aide des résonateurs organiques piézoélectriques. Ces mesures ont permis de déterminer une cinétique de l'adhésion de cellules ainsi que la masse moyenne d'une cellule hMSC.

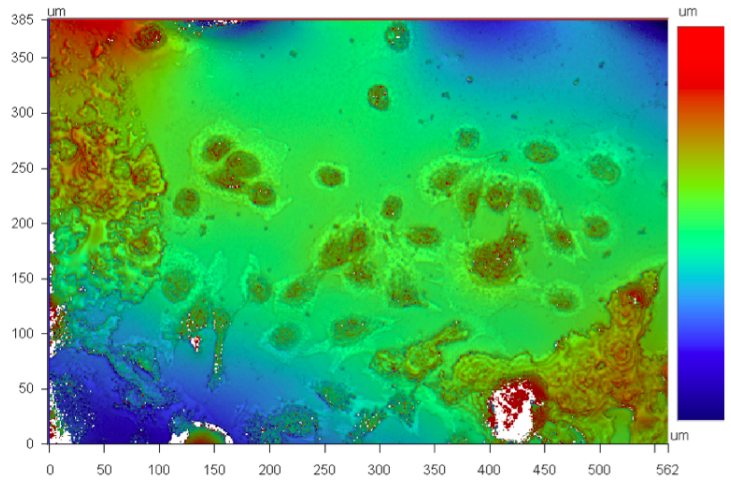

FIGURE IV.17 – *Image d'un levier faite à l'aide du profilomètre optique après une mesure du suivi de l'adhésion de cellules.*

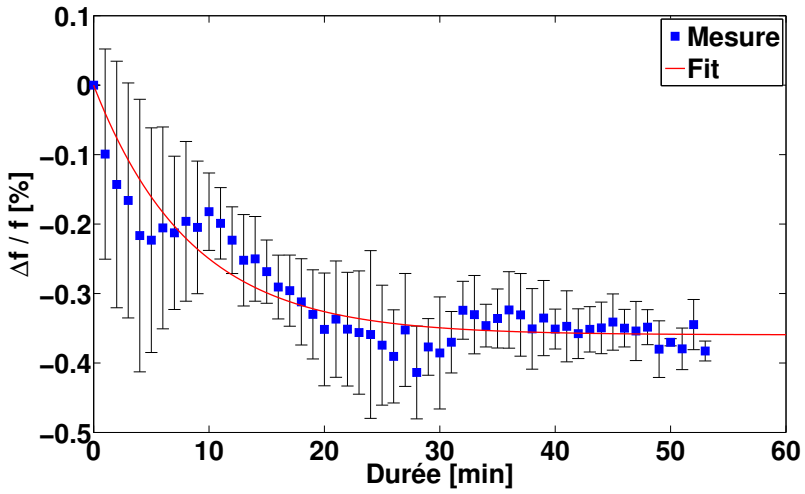

FIGURE IV.18 – *Mesure de la moyenne de la variation relative en fréquence seulement pour la partie avec les cellules. Une approximation des données est faite afin de déterminer la cinétique de l'adhésion des cellules.*

IV.5 Conclusions

Les résonateurs piézoélectriques organiques ont été utilisés pour différentes applications. Il a été démontré qu'ils peuvent être utilisés pour déterminer une masse en fonction de sa position sur les leviers, le module d'Young d'un matériau déposé ou encore la viscosité d'un liquide. De plus, dans le cadre d'applications biologiques, les résonateurs ont permis de suivre en temps réel l'adhésion de cellules hMSC. Les leviers ont été traités par UV/ozone afin de rendre le PDMS plus hydrophile et permettre l'adhésion des cellules. Il en résulte que 95 % des cellules adhérent en 25 min. De plus, les vibrations des leviers ne semblent pas empêcher les cellules d'adhérer mais semblent avoir un impact sur leur développement si les vibrations sont appliquées en continu. Finalement, ces mesures ont permis d'évaluer la masse moyenne d'une cellule hMSC qui vaut 3,4 ng. Des mesures supplémentaires sont nécessaires pour compléter cette étude. Il serait intéressant de déterminer le nombre minimal de cellules que l'on peut détecter en diminuant le nombre de cellules injectées. De plus, après que toutes les cellules ont adhéré, il serait intéressant d'injecter une substance qui permette de les rigidifier afin d'observer cette rigidification grâce aux résonateurs. Cette étude montre néanmoins la polyvalence des

MEMS organiques et leur potentiel pour des applications biologiques.

Références

[1] S. Dohn, W. Svendsen, and A. Boisen. Mass and position determination of attached particles on cantilever based mass sensors. *Review of Scientific Instruments*, 78(103303), 2007.

[2] S. Heinrich and I. Dufour. Toward higher-order mass detection : Influence of an adsorbate's rotational inertia and eccentricity on the resonant response of a Bernoulli-Euler cantilever beam. *Sensors*, 15(29209-29232), 2015.

[3] S. Heinrich, P.-H. Ducrot, C. Ayela, H. Zhang, and I. Dufour. On the role of adsorbate position, geometry, and binding characteristics on the multi-modal response of cantilever-based resonators for higher-order discrete-mass detection. *Proceedings of the 13th International Workshop on Nanomechanical Sensing*, Delft, Pays-Bas, June 22-24, 2016.

[4] M. Heinisch, T. Voglhuber-Brunnmaier, E. K. Reichel, I. Dufour, and B. Jakoby. Reduced order models for resonant viscosity and mass density sensors. *Sensors and Actuators A*, 220(76-84), 2014.

[5] M. Heinisch, T. Voglhuber-Brunnmaier, E. K. Reichel, I. Dufour, and B. Jakoby. Application of resonant steel tuning forks with circular and rectangular cross sections for precise mass density and viscosity measurements. *Sensors and Actuators A*, 226(163-174), 2015.

[6] G. Pfusterschmied, M. Kucera, C. Weinmann, M. Schneider, A. Bittner, J. L. Sánchez-Rojas, and U. Schmid. Two-step procedure for multi-mode mems resonator- based sensing of fluid properties. *IEEE MEMS 2017*, Las Vegas, USA, January 22-26, 2017.

[7] A. F. Payam, W. Trewby, and K. Voïtchovsky. Simultaneous viscosity and density measurement of small volumes of liquids using a vibrating microcantilever. *Analyst*, 142(1492), 2017.

[8] Y. Arima and H. Iwata. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 28(3074-3082), 2007.

[9] Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman, and Y.-H. Lo. Uv/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Sensors and Actuators B*, 97(402-408), 2004.

[10] R. J. Muisener, C. L. Mirley, and J. T. Koberstein. A room temperature method for the formation of ultrathin SiOx films. *American Physical Society, Annual March Meeting*, 1996.

[11] A. Oláh, H. Hillborg, and G. J. Vancso. Hydrophobic recovery of UV/ozone treated poly(dimethylsiloxane) : adhesion studies by contact mechanics and mechanism of surface modification. *Applied Surface Science*, 239(410-423), 2005.

[12] S. L. Schor. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *Journal of Cell Science*, 41(159-175), 1980.

[13] T. Renault, G. Flaujac, and R.-M. Le Deuff. Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, ostrea edulis. *Methods in Cell Science*, 17(199-205), 1995.

[14] K. Park, L. J. Millet, N. Kim, H. Li, X. Jin, G. Popescu, N. R. Aluru, K. J. Hsia, and R. Bashir. Measurement of adherent cell mass and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20691-20696), 2010.

Conclusions

Si l'étude de cellules biologiques, et plus précisément leur biomécanique, n'est pas une mince affaire, il existe de nombreuses techniques qui se sont adaptées ou développées dans ce but. Parmi ces techniques, les MEMS ont su trouver leur place grâce à leur polyvalence et à leurs performances qui ne sont plus à démontrer tant leur utilisation est répandue dans la plupart des systèmes électroniques actuels.

L'utilisation des matériaux organiques est en plein développement et leur intégration dans des MEMS n'est donc pas étonnante. Ces matériaux ont des propriétés différentes des matériaux inorganiques et sont donc très intéressants pour développer de nouveaux systèmes tels que les écrans souples. De plus, leur biocompatibilité permet d'envisager leur utilisation dans des applications biologiques.

Ces travaux ont tout d'abord permis de montrer une technique de fabrication de résonateurs organiques piézoélectriques simple, rapide et peu coûteuse. Cette technique est basée sur la xurographie qui permet de mettre facilement en forme les matériaux organiques qui ne sont pas structurables par les techniques classiques de la microélectronique. De plus, une optimisation du procédé de fabrication vis à vis du matériau piézoélectrique (PVDF-TrFE) a été développée et a permis d'obtenir un coefficient d_{31} de 11 pm/V correspondant à l'état de l'art.

Les résonateurs utilisés dans ces travaux sont caractérisés pas leur fréquence de résonance et leur facteur de qualité. Grâce à la mesure de ces deux caractéristiques, il est possible de déterminer des grandeurs physiques comme la masse ou la rigidité d'entités adhérées et/ou adsorbées dessus. Il est donc important d'avoir un système de mesure performant. De plus, des mesures en milieu liquide sont nécessaires pour étudier des cellules. C'est pourquoi une carte électronique a été développée associée à une enceinte de mesure étanche. La technique de mesure utilisée permet de faire une mesure différentielle entre un levier suspendu et un levier fixe afin de s'affranchir des signaux qui ne correspondent pas à la résonance du levier suspendu. Il a également été montré que la température, la masse volumique et la viscosité du milieu environnant ont une influence sur la fréquence de résonance et le facteur de qualité et qu'il est important de la caractériser afin de s'en affranchir le cas échéant.

Afin de montrer le potentiel des MEMS organiques, les résonateurs ont été utilisés dans différentes applications. Il est possible de les utiliser pour déterminer une masse et sa position sur les leviers, la rigidité d'un matériau déposé ainsi que la viscosité de liquides. Les MEMS organiques sont donc très polyvalents. En ce qui concerne l'étude de cellules biologiques, des mesures de suivi de l'adhésion de cellules hMSC ont été faites. Pour cela, la surface des leviers en PDMS a été traitée par UV/ozone afin de s'assurer que les cellules adhèrent dessus. Il a aussi été vérifié que les vibrations n'empêchent pas les cellules d'adhérer. Pour 100 000 cellules injectées, une variation relative en fréquence de -0,4 % a été atteint avec une adhésion de 95 % des cellules en 25 min. De plus, en comptant les cellules adhérées sur les leviers, une masse moyenne de 3,4 ng a été déterminée pour les cellules hMSC.

Ces travaux ont permis de développer une nouvelle thématique pluridisciplinaire au sein du groupe organique du laboratoire IMS, en collaboration avec le CBMN, combinant la physique et la biologie. Le domaine de la biologie est très complexe et n'est pas simple à aborder pour un non-biologiste. Cependant, ces travaux seront (je l'espère) le début du grande aventure dans le monde des cellules pour l'équipe PRIMS de l'IMS.

Perspectives

Dans l'optique de poursuivre les mesures, il serait intéressant de diminuer le nombre de cellules injectés afin de déterminer la plus faible concentration détectable. L'effet inverse serait également intéressant à étudier : augmenter le nombre de cellules injectées pour observer le nombre maximal de cellules qui peuvent adhérer sur les leviers. De plus, les mesures de suivi d'adhésion ont été faites pour une durée d'une heure. Nous avons vu qu'au bout de cette durée, les cellules commencent à peine à s'étaler. Il serait donc intéressant de faire des mesures plus longues afin d'étudier l'influence de leur étalement sur la fréquence de résonance des résonateurs. En effet, lors de leur étalement, les cellules appliquent des forces qui génèrent des contraintes mécaniques dans les leviers et qui modifient la fréquence de résonance.

Une autre étude intéressante serait de suivre l'adhésion de cellules puis d'utiliser une substance qui permet de les rigidifier afin d'observer si les résonateurs sont capables de détecter ces modifications. L'ideal serait d'utiliser une modification de la rigidité réversible afin de bien distinguer les deux phénomènes.

Les résonateurs peuvent aussi être utilisés dans l'étude de la différenciation de cellules souches. En effet, il a été montré que les cellules souches sont sensibles à la rigidité du substrat et peuvent se différencier en fonction. Ainsi, il est possible d'utiliser différents leviers avec des rigidités différentes et d'observer l'influence de la rigidité sur les cellules souches. Si une cellule se trouve sur un substrat qui a une rigidité importante, la rigidité de la cellule devrait évoluer et devenir plus importante.

Des études intéressantes restent donc à être mener avec l'utilisation des résonateurs organiques piézoélectriques. Les matériaux organiques ont un fort potentiel pour les applications biologiques et leur biocompatibilité permet d'envisager des systèmes qui rendent possible des mesures *in vivo*.

Liste des publications

Article dans des revues avec comité de lecture

P.-H. Ducrot, I. Dufour et C. Ayela. *Optimization of PVDF-TrFE processing conditions for the fabrication of organic MEMS resonators.* Scientific Reports, 6, 19426, 2016.

M. Urdampilleta, C. Ayela, **P.-H. Ducrot**, D. Rosario-Amorin, A. Mondal, M. Rouzieres, P. Dechambenoit, C. Mathoniere, F. Mathieu, I. Dufour et R. Clerac. *Molecule-Based Microelectromechanical Sensors.* Materials Horizons. Soumis.

Communications dans des conférences

P.-H. Ducrot, I. Dufour et C. Ayela. *Optimization of PVDF-TrFE film processing for organic MEMS resonators and application to water droplets drying study.* Le Studium Conference, Piezoelectric Micro and Nano Stuctures and their Applications, Blois, France, 25-26 septembre 2014. **Poster**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, M.-C. Durrieu, L. Plawinski et C. Ayela. *Cell biomechanics evaluation by Organic MicroElectroMechanical Systems (OMEMS).* Workshop du Pôle de Médecine Régénératrice de Bordeaux, Bordeaux, France, 17 novembre 2014. **Poster**

D. Thuau, **P.-H. Ducrot**, H. Nesser, E. Lemaire, H. Debéda, C. Ayela et I. Dufour. *Xurography : Simple, low-cost and versatile fabrication process for organic MEMS.* Journées Nationales sur les Technologies Emergentes en Micronanofabrication, Lyon, France, 18-20 novembre 2015. **Oral**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, L. Nicu, F. Mathieu et C. Ayela. *Electronic scheme for full control of organic piezoelectric MEMS resonators.* IEEE International Frequency Control Symposium, Nouvelle Orléans, Louisiane, États-Unis, 9-12 mai 2016. **Poster**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, M.-C. Durrieu, L. Plawinski et C. Ayela. *Study of mechanical properties of cells thanks to organic piezoelectric resonators.* Journée scientifique de la Fédération de Recherche "Technologie pour la Santé", Bordeaux, France, 14 juin 2016. **Poster**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, L. Nicu, F. Mathieu, M. Heinisch, B. Jakoby et C. Ayela. *Simple fabrication process of organic piezoelectric resonators : application to viscosity measurements.* 13th International Workshop on Nanomechanical Sensing (NMC), Delft, Pays-Bas, 22-24 juin 2016. **Oral**

S. M. Heinrich1, **P.-H. Ducrot**, C. Ayela, H. Zhang et I. Dufour. *On the role of adsorbate position, geometry, and binding characteristics on the multi-modal response of cantilever-based resonators for higher-order discrete-mass detection.* 13th International Workshop on Nanomechanical Sensing (NMC), Delft, Pays-Bas, 22-24 juin 2016. **Poster**

P.-H. Ducrot, D. Thuau, H. Nesser, H. Debéda, C. Ayela et I. Dufour. *MEMS resonators activities at the IMS.* Polytec Technical Seminar on the Latest Technologies in MEMS Characterization), Grenoble, France, 17 novembre 2016. **Oral**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, M.-C. Durrieu, L. Plawinski et C. Ayela. *Study of mechanical properties of cells thanks to organic piezoelectric resonators.* Journées Scientifiques des 10 ans du CBMN, Bordeaux, France, 6-7 avril 2017. **Poster**

P.-H. Ducrot, I. Dufour, L. Nicu, F. Mathieu et C. Ayela. *Full system for piezoelectric organic MEMS resonators operating in liquid media.* 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), Kaohsiung, Taïwan, 18-22 juin 2017. **Poster**

Glossaire

Liste des acronymes

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
AFM	Atomic Force Microscopy (Microscopie à Force Atomique)
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CTFE	ChloroTétraFluoroÉthylène
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MEMS	MicroElectroMechanical Systems (MicroSystèmes ÉlectroMécanique)
MFM	Magnetic Force Microscopy (Microscopie à Force Magnétique)
MSC	Mesenchymal Stem Cell (Cellule Souche Mésenchymateuse)
PCB	Printed Circuit Board (Circuit Imprimé)
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
PEN	PolyNaphtalate d'Éthylène
PET	PolyTéréphtalate d'Éthylène
PLA	Acide PolyLactique
PLL	Phase-Locked Loop (Boucle à Vérouillage de Phase)
PVDF	Poly(Fluorure de Vinylidène)
PZT	Lead Zirconate Titanate (Titano-Zirconate de Plomb)
QCM	Quartz Cristal Microbalance (Microbalance à Quartz)
TFM	Traction Force Microscopy (Microscopie à Force de Traction)
TrFE	TriFluoroÉthylène
VNA	Vectorial Network Analyser (Analyseur de Réseaux Vectoriel)

Liste des symboles

Symbole	Description	Unité
B	Susceptance	S
b	Largeur	m
C	Capacité	F
c	Coefficient d'amortissement	N.s/m
$\vec{D}$	Déplacement électrique	C/m^2
d_{xy}	Coefficient piézoélectrique	m/V
E	Module d'Young	Pa
$\vec{\mathbf{E}}$	Champ électrique	V/m
F	Force	N
f	Fréquence	Hz
G	Conductance	S
g	Fonction du fluide	
h	Épaisseur	m
I	Moment quadratique	m^4
i	Courant électrique	A
j	Nombre imaginaire	
k	Constante de raideur	N/m
L	Longueur	m
L	Inductance	H
m, M	Masse	kg
Q	Facteur de qualité	
R	Résistance	Ω
$\vec{S}$	Déformation mécanique	m
S	Surface	m^2
T	Température	K
t	Variable de temps	s
U	Tension électrique	V
V	Tension électrique	V
w	Déflexion	m
Y	Admittance	S
Z	Impédance	Ω
α	Coefficient de température	/K
ϵ	Permittivité	F/m
η	Viscosité	Pa.s
Γ	Fonction hydrodynamique	
λ	Valeur propre	
ρ	Masse volumique	kg/m^3
$\vec{\sigma}$	Contrainte mécanique	Pa
ω	Pulsation angulaire	rad/s

ANNEXE A

ÉVAPORATION PAR FAISCEAU D'ÉLECTRONS

L'évaporation par faisceau d'électrons est un procédé dans lequel une cible (le matériau que l'on veut déposer) est bombardée par des électrons. Ce bombardement arrache des atomes de la cible qui se transforment en phase gazeuse (figure A.1). Ce gaz d'atome précipite ensuite et se dépose sur le substrat. Dans ce processus, des électrons sont créés en chauffant à blanc un filament de tungstène dans un environnement à très basse pression (typiquement $< 1.10^{-6}$ mbar). Ces électrons sont ensuite accélérés par une tension de l'ordre de 10 kV et focalisés en un faisceau par un champ magnétique, puis ce faisceau est dirigé sur la cible, toujours pas champ magnétique, qui est portée à un potentiel positif. Le bombardement crée un gaz d'atomes de la cible qui vient au contact du substrat qui se trouve au dessus de la cible et le gaz précipite pour se fixer sur le substrat. Grâce à cette méthode de dépôt, il est possible de déposer un matériau avec une vitesse très faible (<1Å/s) jusqu'à des vitesses de l'ordre de 10 nm/s. Le contrôle de l'épaisseur déposée se fait généralement à l'aide d'une balance à quartz.

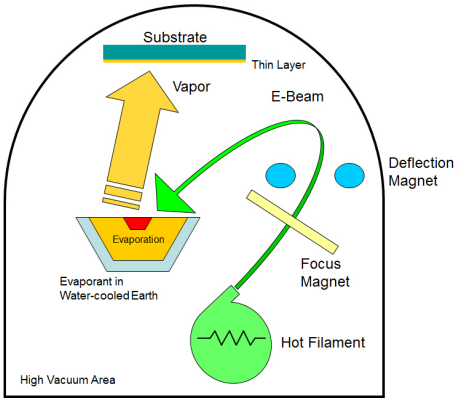

FIGURE A.1 – *Principe de l'évaporation d'un matériau par faisceau d'électrons.*

ANNEXE B

VIBROMÈTRE LASER

Le vibromètre laser utilisé dans cette étude fonctionne selon le principe de l"effet Doppler (figure (B.1)). Un faisceau laser est envoyé dans un premier temps à travers un séparateur. Une partie du faisceau est dévié, il servira de faisceau de référence et l'autre partie est envoyée sur l'échantillon. Après réflexion sur l'échantillon, le faisceau passe à nouveau par un séparateur qui l'envoie sur le détecteur où il rejoint le faisceau de référence. La fréquence du faisceau réfléchi par l'échantillon est modifiée car ce dernier est en mouvement : c'est l'effet Doppler. C'est grâce à cette différence qu'il est possible de remonter à la vitesse de déplacement de l'échantillon par interférométrie. Le signal est ensuite traité et il possible d'avoir l'amplitude et la phase de la vitesse de déplacement. Connaissant la vitesse, le vibromètre permet aussi de remonter au déplacement.

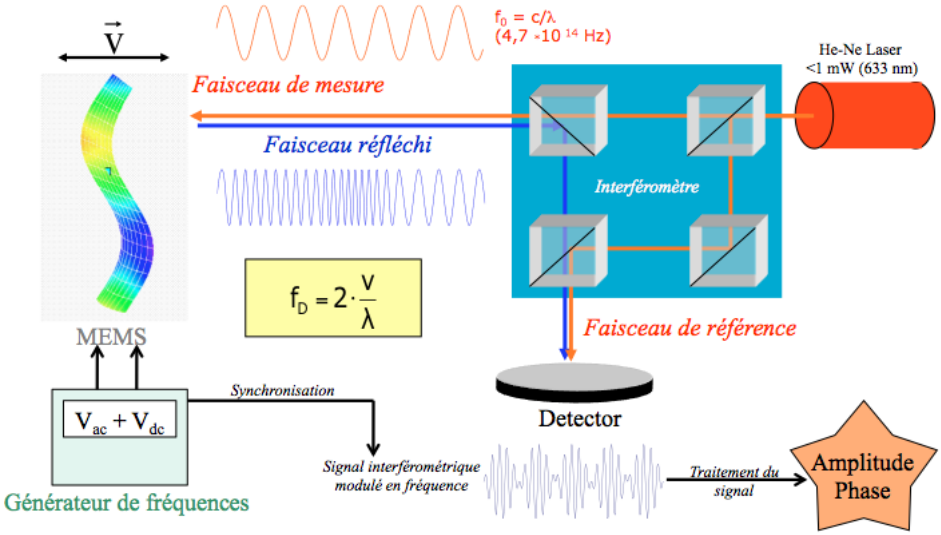

FIGURE B.1 – *Principe de fonctionnement du vibromètre laser à effet Doppler.*

Sur le vibromètre utilisé, il existe un deuxième laser : on place ce spot laser sur une partie fixe de l'échantillon. Ce signal est ensuite soustrait au premier et permet donc d'enlever les éventuels déplacements des parties sur lesquelles, par exemple, une poutre est fixée et qui ne font par partie de la

résonance de la poutre.

C'est aussi un outil très utile qui permet de visualiser les déformations des structures. La figure (III.10) montre des images obtenues à l'aide du vibromètre mais il est aussi possible de voir l'animation qui montre la poutre se déformer. Pour faire cela, on définit une grille de points de mesure sur la poutre et pour chaque point, le vibromètre mesure le déplacement de la poutre. Il reconstitue ensuite le déplacement de toute la poutre à partir des points de mesure. C'est un outil très pratique.