

Pince optique et microscopie à contraste de phase pour l'étude de la mécanique cellulaire : développement, modélisation et calibration en réflexion.

Flavie Gillant

▶ **To cite this version:**

Flavie Gillant. Pince optique et microscopie à contraste de phase pour l'étude de la mécanique cellulaire : développement, modélisation et calibration en réflexion.. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. ⟨NNT : 2016SACLO016⟩. ⟨tel-01629471⟩

HAL Id: tel-01629471

https://pastel.hal.science/tel-01629471v1

Submitted on 6 Nov 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.



HAL Authorization

NNT : 2016SACLO016

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

préparée à

L'INSTITUT D'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL

ÉCOLE DOCTORALE N°572
Ondes et Matière (EDOM)

Spécialité de doctorat : Physique

par

Flavie GILLANT

Pince optique et microscopie à contraste de phase pour l'étude de la mécanique cellulaire : développement, modélisation et calibration en réflexion

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 13 décembre 2016

Composition du jury :

Mme S. LEVEQUE-FORT	Présidente	Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay
M. F. GALLET	Rapporteur	Laboratoire Matière et Systèmes Complexes
M. S. MONNERET	Rapporteur	Institut Fresnel
Mme A. DUPONT	Examinatrice	Laboratoire Interdisciplinaire de Physique
M. A. BARAKAT	Examinateur	Laboratoire d'Hydrodynamique
Mme N. WESTBROOK	Directrice de thèse	Institut d'Optique Graduate School

Remerciements

Une thèse est le fruit d'un gros travail scientifique. Ceci est indéniable. Mais c'est aussi une aventure humaine au travers de laquelle, peu importe ce qu'il s'est passé scientifiquement, on en ressort grandi. On est sans cesse confronter à nos limites : scientifiquement bien sûr, mais aussi moralement, intellectuellement, émotionnellement, voire même physiquement. On apprend à accepter ses limites, à se remettre en question, à s'adapter, à trouver des solutions, à se dépasser pour pouvoir aller toujours plus loin. Même s'il est vrai que bien des fois j'aurais préféré que ce soit plus simple, que le temps soit plus long entre deux difficultés, je ne regrette pas les épreuves que j'ai rencontrées. De la même façon, je ne regrette pas la tournure qu'a pris ma thèse, même si celle-ci s'est bien éloignée de ce que j'avais envisagé initialement, car elle me ressemble et mon empreinte est partout dans ce travail. Donc je dirais qu'une thèse, renvoie nécessairement tôt ou tard à soi-même et aide à mieux se connaître.

Ainsi, mes premiers remerciements vont naturellement à Nathalie Westbrook, qui un jour m'a envoyé un message pour me proposer un sujet de thèse qui correspondait vraiment à ce que je recherchais à l'époque. Ces remerciements s'adressent également à Karen Perronet qui a initié la collaboration avec Abdul Barakat pour que ce sujet voit le jour et m'a accueillie au laboratoire. Ensemble vous m'avez donné l'opportunité de faire une thèse et finalement, toute la flexibilité pour faire la thèse qui me correspondait. Pour cela, je vous suis très reconnaissante.

A vos côtés, j'ai beaucoup appris d'un point de vue scientifique allant des choses basiques (comment je positionne mon doublet), à un peu moins basiques (comment j'aligne ma pince), voire carrément pas basiques (comment défendre ses idées et apporter tout le support pour convaincre). Finalement, c'est bien cet apprentissage qui m'a permis à la fin d'avoir une vraie discussion scientifique argumentée avec les membres du jury. Donc merci beaucoup d'avoir permis cette évolution.

Enfin, j'ai également beaucoup appris humainement. Travailler ensemble pendant plus de 3 ans n'est pas chose aisée, surtout quand le projet n'avance pas comme on l'aurait souhaité. Chaque partenaire a ses atouts et ses faiblesses, ses attentes et ses besoins, ses ressources et ses contraintes. La magie c'est d'arriver à concilier tout cela pour que chacun apporte ses forces et ses richesses et en contrepartie tire un bénéfice de celles des autres pour avancer constructivement. J'ai appris que cela ne peut se faire sans communication explicite et sans volonté de toutes les parties. J'aurais aimé pouvoir faire mieux dans ce domaine là, mais en tout cas cette expérience m'aura fait grandir.

Ce projet pluri-disciplinaire a également été l'occasion de diverses collaborations. Tout d'abord avec le LadHyx, où j'ai été très bien accueillie par toute l'équipe. Je voudrais remercier plus particulièrement Julie Lafaurie-Janvorre qui m'a formée à la culture cellulaire et qui a été

présente dans les premiers mois de thèse pour réaliser les premières expériences sur les cellules. Je voudrais également remercier Abdul Barakat pour avoir initié ce sujet, m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour réaliser les expériences sur cellules et pour sa supervision.

Je voudrais aussi remercier Max Richly et Antigoni Alexandrou du LOB pour notre collaboration sur la calibration de la pince. Merci pour nos échanges, pour toutes les explications que vous m'avez données sur l'inférence bayésienne et pour toutes nos discussions.

Enfin, merci à Antoine Federici et Arnaud Dubois pour les travaux effectués sur l'OCT en vue de la combiner à la pince. Merci pour vos idées, votre disponibilité et un grand merci à Antoine pour toutes les heures passées dans le noir à essayer d'observer les cellules en 3D. Merci également à Matthew Feldman d'avoir travailler sur l'adaptation de l'instrument.

Bien évidemment, je tiens à remercier chaque membre du jury d'avoir accepté de faire parti du jury et vous être intéressé à mes travaux. Merci également pour tous les échanges constructifs que nous avons eus lors de la soutenance. Je voudrais particulièrement remercier Serge Monneret et François Gallet, les deux rapporteurs, qui ont examiné en détail mon manuscrit et Sandrine Lévêque-Fort qui a accepté de présider ce jury.

Ces travaux n'auraient pas été les mêmes sans la présence de Julien Moreau. Cela a commencé par de banals échanges entre deux collègues qui prennent les mêmes transports en commun. Mais qui a pris le B, sait que ces trajets peuvent être longs. Et forcément, au fil du temps j'ai partagé des interrogations scientifiques, ou des doutes de thésarde, qui t'ont amené dans ma salle de manip, et à partir de là tu as pris une véritable part dans mon travail de recherche. Tu m'as permis d'oser remettre en question, m'expliquant que cétait mon rôle de thésarde, tu m'as soutenue face aux difficultés, tu m'as donné confiance quand j'en avais besoin, tu n'as pas hésité à te retrousser les manches pour comprendre les problèmes et les résoudre avec moi, et toi aussi tu m'as amenée à défendre mes idées. Et donc finalement, tu as pris une part importante dans mon travail malgré tes nombreuses autres activités. Merci pour ta disponibilité et tout ce que tu m'as apporté.

Au delà de ces apsects scientifiques, j'ai appris à connaître quelqu'un qui, bien qu'il demeure relativement secret, témoigne d'une grande générosité et d'une curiosité immense. Je suis ravie de t'avoir eu comme collègue et comme ami.

Comme je l'ai dit précédemment, la thèse est une véritable aventure humaine et j'ai eu la chance de rencontrer des gens formidables. Et comme le dit le poète brésilien Vinicius de Moraes dit "La vie est l'art de la rencontre". Parmi ces personnes, je tiens tout d'abord à remercier les trois personnes qui m'ont accompagné tout au long de cette aventure, dans les fous rires comme dans les moments de blues : Nathalie Barbier, Aurore Olivero et Olivier Bugaud.

Nathalie, ma co-bureau, ma collègue et mon amie. Qui aurait pu prédire que deux thésardes en physique se retrouvant dans un même bureau aient tant de points communs qui sortent totalement du cadre de la science, qu'elles partagent le goût de la littérature, des étapes de vie, une certaine philosophie et tant d'autres choses. Vraiment j'ai rencontré une véritable amie qui a été d'un soutien indéfectible pour traverser les difficultés, qui m'a aidée à relativiser et à trouver mes limites. Merci d'avoir été là, sans toi ça n'aurait pas du tout été pareil.

Aurore, ma sœur de thèse. Nous sommes arrivées en même temps dans le groupe Biophoto-

nique. Bien que nous n'ayons pas travaillé sur le même sujet, nous avons partagé l'encadrement de Julien, les différentes étapes de la thèse, avec ces doutes, ces enthousiasmes et ces lassitudes, voire ces coups de gueule. Ensemble, nous avons décidé de pratiquer le yoga pour notre dernière année de thèse, bien conscientes d'avoir besoin de calme et de sérénité pour aborder cette dernière ligne droite et oh combien cela nous a été utile pendant les longues journées de rédaction pour garder la tête froide (bon aussi grâce à la menthe poivrée...). Vraiment, j'ai eu beaucoup de chance de faire cette aventure avec toi, de vivre ces étapes ensemble et vraiment, bien souvent je me suis sentie moins seule dans mes galères. Merci pour ton amitié et ton soutien et pour tout ce que nous avons partagé.

Olivier, mon ami qui m'a baptisée "terreur" ou "sale gosse". On a bien failli travailler ensemble, mais après 2 semaines dans son labo, ma réputation était faite. En tout cas, moi je me suis bien amusée et ça m'a bien fait rire. Du coup, on est resté de très bons amis et c'est certainement mieux ainsi (qui sait qui qui aurait été le plus têtu ou le plus horrible ?). Merci beaucoup pour ton amitié, ton écoute, ta compréhension, tes opinions et tout ton soutien.

Je voudrais également remercier tout le groupe Biophotonique dans son ensemble. Je commencerai par Nicolas Fitzman, un sacré personnage, assez indescriptible. Ce que je pourrais aisément mentionner en revanche c'est son goût pour les débats. Il prenait sans cesse le contrepied de ce que je disais, quitte à soutenir des thèses assez extrêmes, juste pour voir jusqu'où pouvait aller notre argumentation. Bien des fois je renonçais tellement cela devenait absurde. En tout cas, merci de ton accueil dans cette équipe et au sein de votre bureau avec Karen. J'ai beaucoup apprécié ta présence, ton originalité et l'amitié que tu continues de me témoigner.

Figure emblématique du groupe biophotonique : Mitradeep Sarkar. Il était là quand je suis arrivée, il est toujours là alors que je pars et qui sait s'il ne finira pas là. J'ai eu la chance de rencontrer quelqu'un d'une extrême gentillesse, avec un grand cœur, d'un naturel très optimiste et joyeux, mais ayant aussi une caractéristique qui ne passe pas inaperçue : Mitradeep est un bavard extrême : il adore parler, et chose hallucinante, il le fait en français. Imaginez ce que cela aurait été si en plus c'était en anglais ? Mitradepp, je suis ravie de t'avoir rencontré, merci pour ta bonne humeur et ton aide.

Je voudrais également remercier Alexandra Sereda que j'ai connue un peu tardivement à la fin de sa thèse. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton soutien, qui continuent au-delà de nos échanges quotidiens au laboratoire.

Dernière personne de l'équipe OCT : Jonas Ogien. Très discret et gentil, j'ai apprécié chacun de nos échanges. Tu m'as aussi donné l'occasion de rentrer dans un magasin pour enfant et de m'émerveiller de tant de jouets, afin de choisir un joli cadeau de naissance. Je te souhaite un bon séjour aux Etats-Unis, une bonne continuation dans ta thèse et pour la suite.

Notre chef de groupe Michaël Canva. Je te remercie d'avoir toujours eu une oreille attentive quelque soit le sujet et d'avoir essayé selon tes moyens de résoudre les difficultés auxquelles je faisais face. Je regrette que tu sois parti au Canada car tu apportais une certaine stabilité dans ce groupe. Merci à Patrick Georges, pour avoir assuré cette place pendant tes absences, merci de votre écoute, de votre attention et de votre considération. Merci aussi d'avoir trouvé certaines solutions et de m'avoir facilité les choses quand j'en ai eu besoin.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidée pendant ma thèse d'une façon ou d'une autre, parmi elles : André Villing, merci pour ta patience pour m'expliquer le

fonctionnement de la rétro-action et pour tes blagues, André Guilbaud, merci pour ta bonne humeur quotidienne et pour ta disponibilité pour réaliser chaque pièce de mécanique dont j'ai eu besoin, Henri Benisti, Raymond Mercier ou encore Vincent Josse, merci de votre disponibilité, de l'intérêt que vous m'avez témoigné et de la pédagogie dont vous avez fait preuve pour répondre à chacune de mes questions, voire même me faire répéter.

Au cours de ce doctorat, j'ai eu la chance d'enseigner à l'Institut d'Optique où j'ai fait de très belles rencontres aussi. Je voudrais ainsi remercier les équipes de Langage C et des TP d'Optique Physique de m'avoir accueillie, aidée à préparer mes enseignements et permis d'évoluer au cours des années. En particulier, merci à Sylvie Lebrun, Julien Villemejane et Lucio Martinelli, et Thierry Avignon, Cédric Lejeune, Lionel Jacubowiez, Sébastien de Rossi, et Erwan Bimbard.

Je tiens à remercier chaleureusement Sylvie qui est devenue mon amie. Merci d'avoir partagé ces cours de C pendant les 3 années, merci pour nos discussions, pour ta gentillesse et ta bienveillance. Bon je t'en veux un peu de m'avoir lâchée au yoga, mais Aurore et Vincent ont pris le relai alors ça va.

Je voudrais terminer en disant merci à toutes les personnes qui ont fait que travailler au laboratoire était si plaisant, et parmi elles : Minh-Chau avec sa bonne humeur et son grain de folie, Marie-Christine, Nick, Émilie, Julien, Margaux, Mauro, Florence, Martin, Vincent et bien d'autres encore.

Merci à Mme Mortureux pour votre disponibilité, votre écoute, votre bienveillance et votre soutien. Cela m'a énormément aidé à prendre du recul sur les événements pour pouvoir mener à bien ce projet dans les meilleures conditions pour moi.

Enfin, je voudrais remercier tous mes amis, dont certains sont déjà cités et auxquels je voudrais ajouter Clémentine, Sita et Jonathan : merci d'être là, merci de votre amitié et merci d'avoir fait ce bout de chemin avec moi, parfois depuis plusieurs années déjà, mais en tout cas pour encore un moment je l'espère.

Merci à Federico d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue pour que j'aie confiance en moi et que j'ose faire cette thèse.

Et finalement, je voudrais remercier mes soeurs, mes parents et ma grand-mère qui ont fait le déplacement depuis chez nous, jusqu'ici spécialement pour être là, ce jour de la fin de mes études (pour le moment...). Merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté, que vous soyez d'accord ou pas avec mes choix, que vous compreniez ou pas ce que je faisais, je sais que vous êtes là malgré tout. Et pour finir, je voudrais avoir une pensée pour mon grand-père qui n'est malheureusement plus là pour partager tout ça avec nous, mais qui a joué un grand rôle dans ma vie et notamment dans mes études.

Table des matières

Introduction générale **1**

1 Une pince optique pour étudier la mécanotransduction dans les cellules endothéliales **3**

1.1 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales 4
1.1.1 Les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins 5
1.1.2 Dysfontionnement de l'endothélium et développement de l'athérosclérose 6
1.1.3 Athérosclérose et perturbations locales du flux sanguin 8
1.1.4 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales 11
1.1.4.1 Le cytosquelette impliqué dans la mécano-transmission longue distance 14
1.1.4.2 Le cytosquelette, une voie rapide et longue distance de la mécano-transmission 15
1.1.5 Résumé 19
1.2 Le projet de thèse 19
1.2.1 Modèle théorique 19
1.2.2 Validations expérimentales 21
1.2.2.1 Exercer une force locale 21
1.2.2.2 Mesurer les propriétés visco-élastiques des cellules 22
1.2.2.3 Suivre la propagation de la force 23
1.2.2.4 Induire une orientation préférentielle des filaments d'actine . . 27
1.2.2.5 Imager les cellules en trois dimensions 27
1.3 Le piégeage optique : principe et mise en œuvre 29
1.3.1 Principe du piégeage optique 29
1.3.1.1 Régime de l'optique géométrique : $a >> \lambda$ 31
1.3.1.2 Régime de Rayleigh : $a << \lambda$ 33
1.3.1.3 Théorie de Mie-Debye avec prise en compte de l'aberration sphérique : $a \approx \lambda$ 35
1.3.1.4 Résumé 35
1.3.2 Point de départ du montage 37
1.3.3 Les adaptations du montage pour le projet 37
1.3.3.1 Microscopie à contraste de phase 39
1.3.3.2 Détection du signal rétro-diffusé par la bille 40
1.3.4 Résumé sur le montage à réaliser 43
1.4 Méthodes de calibration d'un montage de pince optique 44
1.4.1 Equation du mouvement d'une bille piégée 45
1.4.2 Méthodes de calibration à partir du mouvement brownien 46
1.4.2.1 Analyse de la densité spectrale de puissance 46
1.4.2.2 Application du théorème de l'équipartition 48
1.4.2.3 Inférence bayésienne 49

1.4.3 Calibration à partir d'un échelon de position . . . 50
1.4.4 Résumé sur les méthodes de calibration . . . 53

2 Mise en œuvre du dispositif expérimental 55
2.1 Réalisation du piégeage optique . . . 56
2.1.1 Vue d'ensemble du montage permettant de piéger une bille . . . 58
2.1.2 Laser . . . 59
2.1.3 Objectif de microscope . . . 61
2.1.3.1 Aberration sphérique : choix de l'ouverture numérique et de l'huile d'immersion . . . 61
2.1.3.2 Aberration sphérique et indice de l'huile d'immersion . . . 64
2.1.3.3 Transmission de l'objectif . . . 65
2.1.4 Mise en forme du faisceau laser . . . 66
2.1.5 Choix des billes micrométriques . . . 67
2.2 Déplacement du piège par rapport à l'échantillon . . . 70
2.2.1 Déplacement par la platine de nano-positionnement . . . 71
2.2.2 Déplacement par les déflecteurs acousto-optiques . . . 71
2.2.2.1 Déflexion du faisceau par les déflecteurs acousto-optiques . . . 72
2.2.2.2 Translation du piège dans le plan de l'échantillon . . . 75
2.3 Détection . . . 77
2.3.1 Imagerie des cellules et de la bille . . . 77
2.3.2 Détection de la position de la bille à partir du faisceau réfléchi . . . 80
2.3.2.1 Adaptation du montage pour la détection du faisceau rétro-diffusé 80
2.3.2.2 Détection du signal . . . 84
2.4 Application aux cellules . . . 87
2.4.1 Exercer une force sur la cellule via la bille piégée . . . 87
2.4.2 Orientation préférentielle des filaments d'actine . . . 88
2.4.3 Imagerie à contraste de phase et piégeage optique . . . 88
2.4.4 Microscopie de fluorescence et piégeage optique . . . 88
2.4.5 Imagerie par tomographie par cohérence optique plein champ et piégeage optique . . . 90
2.4.6 Conclusion . . . 92

3 Compréhension et modélisation des signaux détectés 93
3.1 Observations expérimentales et modèle simple de la lame d'eau . . . 94
3.1.1 Système d'interférence . . . 95
3.1.2 Modèle de la lame d'eau . . . 96
3.1.2.1 Description "classique" . . . 96
3.1.2.2 Une approche générale : les "points sources" effectifs S_1 et S_2 . 98
3.1.2.3 Approche dans le cadre de l'approximation paraxiale . . . 99
3.1.3 Mesure de la hauteur de piégeage à partir de l'interférogramme . . . 100
3.1.3.1 Mesure à partir du centre de l'interférogramme . . . 100
3.1.3.2 Mesure de la hauteur à partir de la position des anneaux . . . 101
3.1.4 Détection de la position de la bille : anneaux d'interférence et anneau de phase, une combinaison problématique ? . . . 106

3.1.4.1 Observation de la figure d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège . . . 106
3.1.4.2 Influence de l'anneau de phase couplé à la figure d'interférence sur la sensibilité de la détection . . . 109
3.2 Modèles tenant compte de la courbure de la bille . . . 112
3.2.1 Modèle du tracé de rayons suivant l'optique géométrique . . . 112
3.2.2 Modèle tenant compte de la diffraction . . . 117
3.2.2.1 Un modèle décrivant la position des anneaux . . . 117
3.2.2.2 Ajustement des profils expérimentaux : détermination de la hauteur . . . 118
3.3 Modélisation de la sensibilité du détecteur . . . 121
3.3.1 Modélisation de l'effet du déplacement de la bille par rapport au piège sur la figure d'interférence . . . 123
3.3.1.1 Modélisation du déplacement du maximum d'intensité . . . 123
3.3.1.2 Modélisation du déplacement du centre des anneaux . . . 124
3.3.1.3 Modélisation de l'interférogramme lorsque la bille n'est pas centrée . . . 126
3.3.2 Effet de l'anneau de phase sur la sensibilité du détecteur . . . 127

4 Calibration du montage de pince optique en rétro-diffusion 133
4.1 Acquisition et traitement des signaux pour la calibration . . . 134
4.1.1 Acquisition et traitement de la réponse à un échelon de position . . . 134
4.1.1.1 Acquisition d'une réponse à un échelon de position . . . 134
4.1.1.2 Traitement d'une réponse à un échelon de position . . . 137
4.1.2 Acquisition et traitement du mouvement brownien . . . 140
4.1.2.1 Acquisition d'un mouvement brownien . . . 140
4.1.2.2 Traitement par analyse de la densité spectrale de puissance . . . 140
4.1.2.3 Traitement par application du théorème de l'équipartition . . . 143
4.1.2.4 Traitement par inférence bayésienne . . . 143
4.1.3 Paramètres expérimentaux . . . 146
4.1.3.1 Température . . . 147
4.1.3.2 Rayon de la bille . . . 147
4.1.3.3 Hauteur du centre de la bille . . . 148
4.2 Mesure de la sensibilité du détecteur . . . 149
4.2.1 Méthodologie : réponse de la bille à un déplacement rapide du piège . . . 149
4.2.2 Courbes de sensibilité du détecteur . . . 150
4.2.3 Calibration en fonction de la hauteur . . . 152
4.2.4 Conclusion sur le montage combinant pince optique et imagerie à contraste de phase . . . 154
4.3 Mesure de la raideur du piège et comparaison des méthodes de calibration . . . 155
4.3.1 Calibration de la raideur en fonction de la hauteur : détérioration de l'efficacité de piégeage par l'aberration sphérique ? . . . 156
4.3.2 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la hauteur . . . 158

4.3.3 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la puissance . . . 164
4.4 Comment calibrer le dispositif lors des expériences avec les cellules ? . . . 168

Conclusion générale **169**

A Protocole de fonctionnalisation des billes avec RGD **173**

B Protocole de microstructuration du substrat **175**

C Etude de la fonction d'ajustement dans la méthode de la réponse à un échelon de position **177**
C.1 Simulation des courbes de réponse à un échelon de position . . . 177
C.2 Programme permettant l'ajustement . . . 179
C.3 Comparaison de la fiabilité et de la robustesse des deux fonctions d'ajustement 180
C.4 Conclusion sur l'étude de l'ajustement . . . 183

D Comparaison des mesures de raideur dans les directions x et y **185**
D.1 Mesures en fonction de la hauteur . . . 185
D.2 Mesures en fonction de la puissance . . . 187

Bibliographie **191**

Introduction générale

Dans les pays industrialisés les maladies cardio-vasculaires telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'embolie ou la thrombose, représentent la première cause de mortalité. Toutes ces maladies sont la conséquence de l'athérosclérose, pathologie dont la progression se compte en dizaines d'années. Celle-ci se développe dans les artères de gros et moyen calibres dont la partie interne de la paroi est remaniée en des endroits bien précis. Ainsi se forment des poches où s'accumulent des lipides, des glucides complexes, des constituants du sang, etc, appelées plaques d'athérome, dont la rupture cause les maladies citées ci-dessus. Ceci est probablement dû à un dysfonctionnement des cellules endothéliales, i.e. les cellules qui tapissent l'intérieur de la paroi artérielle, directement en contact avec le sang.

Bien que les facteurs de risque, tels que la sédentarité, la surcharge pondérale, l'hypertension artérielle, un taux élevé de "mauvais" cholestérol, le diabète, ou encore le tabagisme, affectent l'ensemble du système sanguin, l'athérosclérose se développe préférentiellement dans des zones de contraintes mécaniques spécifiques telles que les bifurcations ou les endroits de fortes courbures des artères. Ainsi il existerait un lien entre le dysfonctionnement des cellules endothéliales et les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin. En effet, de façon générale les forces mécaniques jouent un rôle important dans la formation et la morphologie de la plupart des tissus et des organes du corps. Ainsi la structure et la fonction des cellules dépendent directement de leur environnement mécanique tant au niveau global que local, entraînant entre autres les processus d'adhésion, de migration et de différenciation. Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes par lesquels une cellule perçoit ces stimuli et les traduit en messages bio-chimiques lui permettant d'y répondre.

Pour comprendre le développement de l'athérosclérose, il est donc intéressant d'étudier comment un stimulus mécanique généré par l'écoulement sanguin, perçu à la surface de la cellule est traduit en message bio-chimique à l'intérieur de la cellule, modifiant l'expression des gènes à l'intérieur du noyau. Tout ce processus est englobé sous la terminologie de mécano-transduction. S'il existe des éléments de réponse, l'ensemble de ces mécanismes reste aujourd'hui mal compris.

Pour étudier la mécano-transduction dans les cellules endothéliales, il est nécessaire de créer une contrainte sur la membrane cellulaire et de suivre son évolution à l'intérieur de la cellule. Pour ce faire, l'application d'une force locale via une bille micrométrique liée à la membrane de la cellule, grâce à un piège optique est une technique de choix pour mimer la force tangentielle exercée sur la cellule par le flux sanguin. Il est par ailleurs possible de combiner le piégeage optique à d'autres techniques de microscopie, notamment de fluorescence, afin d'isoler et de suivre la voie de mécano-transduction dans la cellule stimulée. En effet, depuis une vingtaine d'années, la micro-manipulation par pince optique est devenue un outil prisé pour étudier les propriétés mécaniques des cellules comme par exemple les globules rouges, mais aussi des biomolécules, telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, né d'une collaboration entre Abdul Barakat, du Laboratoire d'Hydrodynamique de l'Ecole Polytechnique (LadHyX), et Karen Perronet et Nathalie Westbrook, du groupe Biophotonique du Laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique. L'équipe d'Abdul Barakat travaille essentiellement sur la bio-mécanique cardio-vasculaire, comprenant la conception de stents, l'interaction entre les cellules immunitaires et l'endothélium, la vectorisation de médicaments par l'internalisation de nanoparticules et la mécano-transduction dans les cellules endothéliales. De l'autre côté, l'équipe Biophysique en molécule unique, constituée de Nathalie Westbrook et Karen Perronet, développe des dispositifs optiques pour répondre à des problématiques biologiques à l'échelle de la molécule unique. L'étude de la cinétique de la traduction de l'ARN messager par le ribosome a constitué l'axe principal de recherche de l'équipe pendant près de dix ans. Pour cela, un montage de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM) permettant de suivre l'activité de chaque ribosome sur son brin d'ARN messager a été réalisé, ainsi qu'un montage de pince optique afin de caractériser les forces exercées par le ribosome sur certaines structures de l'ARN, et en vue de le coupler au montage de TIRFM.

Ainsi, le but de ma thèse a été d'adapter le montage de pince optique déjà existant à l'étude de la mécano-transduction dans les cellules endothéliales. Le développement de l'instrument ne s'est pas fait de façon linéaire et s'est entremêlé de différents tests avec les échantillons biologiques que j'ai réalisés, permettant une adaptation "sur-mesure" du montage pour l'application visée. Pour cela, le piégeage optique a été combiné à la microscopie à contraste de phase, permettant une imagerie des cellules et de la bille piégée. D'autre part, une détection en réflexion des signaux de mesure de force a été réalisée afin de permettre un accès facile aux échantillons biologiques. Cependant, l'association de ces deux méthodes a amené des problématiques inattendues que j'ai étudiées en détail. En effet, les signaux détectés sont constitués d'anneaux d'interférence auxquels se superpose l'image de l'anneau de phase, perturbant ainsi la détection de la position de la bille. Cette détection en réflexion revêt néanmoins un avantage considérable car elle permet une estimation précise de la hauteur de piégeage de la bille, bien souvent nécessaire pour calibrer un dispositif de pince optique.

Ce manuscrit décrit les travaux qui ont été réalisés durant mes trois ans de thèse allant du contexte général aux détails des résultats et de leur compréhension, en passant par le développement de l'instrument adapté aux expériences sur les propriétés mécaniques des cellules. Le premier chapitre présente d'abord les motivations biologiques liées à l'athérosclérose et à la mécano-transduction dans les cellules endothéliales, le projet global dans lequel s'inscrit mon travail, puis de façon plus spécifique une introduction sur le dispositif à réaliser. Le second chapitre est dédié au montage de pince optique proprement dit et à la réalisation des adaptations, comprenant la combinaison du piégeage optique et de la microscopie à contraste de phase, et la détection des signaux en réflexion. Ce chapitre se termine sur une application aux expériences biologiques. Cependant, les différentes composantes du signal détecté entraînent une perturbation de la détection de la position de la bille, qui sera expliquée et modélisée dans le chapitre 3. Enfin, le quatrième chapitre est consacré aux résultats de calibration du dispositif comprenant la mesure de la sensibilité du détecteur en lien avec les prédictions du modèle décrit au chapitre 3, et la mesure de la raideur selon quatre méthodes de calibration différentes.

Chapitre 1

Une pince optique pour étudier la mécanotransduction dans les cellules endothéliales

Sommaire

1.1 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales 4
1.1.1 Les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins 5
1.1.2 Dysfontionnement de l'endothélium et développement de l'athérosclérose 6
1.1.3 Athérosclérose et perturbations locales du flux sanguin 8
1.1.4 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales 12
1.1.4.1 Le cytosquelette impliqué dans la mécano-transmission longue distance 14
1.1.4.2 Le cytosquelette, une voie rapide et longue distance de la mécano-transmission 15
1.1.5 Résumé 18
1.2 Le projet de thèse 19
1.2.1 Modèle théorique 19
1.2.2 Validations expérimentales 21
1.2.2.1 Exercer une force locale 21
1.2.2.2 Mesurer les propriétés visco-élastiques des cellules 22
1.2.2.3 Suivre la propagation de la force 23
1.2.2.4 Induire une orientation préférentielle des filaments d'actine . . . 25
1.2.2.5 Imager les cellules en trois dimensions 28
1.3 Le piégeage optique : principe et mise en œuvre 28
1.3.1 Principe du piégeage optique 30
1.3.1.1 Régime de l'optique géométrique : $a >> \lambda$ 31
1.3.1.2 Régime de Rayleigh : $a << \lambda$ 33
1.3.1.3 Théorie de Mie-Debye avec prise en compte de l'aberration sphérique : $a \approx \lambda$ 35
1.3.1.4 Résumé 35
1.3.2 Point de départ du montage 37
1.3.3 Les adaptations du montage pour le projet 37
1.3.3.1 Microscopie à contraste de phase 39
1.3.3.2 Détection du signal rétro-diffusé par la bille 40
1.3.4 Résumé sur le montage à réaliser 44
1.4 Méthodes de calibration d'un montage de pince optique 44
1.4.1 Equation du mouvement d'une bille piégée 45

1.4.2 Méthodes de calibration à partir du mouvement brownien 46
1.4.2.1 Analyse de la densité spectrale de puissance 46
1.4.2.2 Application du théorème de l'équipartition 48
1.4.2.3 Inférence bayésienne 49
1.4.3 Calibration à partir d'un échelon de position 50
1.4.4 Résumé sur les méthodes de calibration 53

Mon sujet de thèse porte sur le développement d'une pince optique dédiée à l'étude de la mécano-transduction dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins, impliquées dans l'athérosclérose. Ce premier chapitre permet de situer le contexte, autant d'un point de vue biologique, que technique et de présenter le point de départ global de mon travail. Tout d'abord, je vais présenter les motivations biologiques en partant de l'athérosclérose pour aller vers quelques résultats sur la mécano-transduction. Je décrirai ensuite le projet global, les techniques employées pour le mener à bien, l'organisation au sein de la collaboration et ma participation. Les deux dernières parties du chapitre sont consacrées aux méthodes optiques. Après un bref rappel sur le piégeage optique, j'expliquerai les adaptations que j'ai dû faire par rapport au montage de pince optique existant dans l'équipe. Je présenterai en particulier le contraste de phase, méthode choisie pour imager les cellules, et la détection de la position de la bille piégée en réflexion. Enfin les méthodes de calibration du dispositif mises en œuvre seront résumées.

1.1 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales

La paroi artérielle est soumise à des forces de pression dues à l'écoulement sanguin, représentées sur la figure 1.1 :

- des forces radiales : l'action de pompage du cœur génère une pression hydraulique pulsatile, appelée pression artérielle, soumettant la paroi du vaisseau à des contractions périodiques, et donc à une pression normale à la paroi,
- des forces tangentielles : le sang est un fluide visqueux qui en s'écoulant génère une force de friction parallèle à la surface, proportionnelle à sa viscosité et à sa vitesse et inversement proportionnelle au rayon du vaisseau. On parle de contrainte de cisaillement pour désigner la pression exercée par cette force par unité de surface.

Les perturbations du flux sanguin seraient impliquées dans le développement de l'athérosclérose, une maladie qui à terme peut conduire à un arrêt cardiaque ou un accident vasculaire cérébral. En effet, bien que les facteurs de risque tels que le taux de cholestérol ou l'hypertension soient présents dans tout l'arbre artériel, la maladie se développe préférentiellement à la jonction des vaisseaux sanguins. L'origine de l'athérosclérose est aujourd'hui attribuée à un dysfonctionnement de l'endothélium, partie interne de la paroi sanguine constituée d'une monocouche de cellules directement en contact avec le sang qui s'écoule. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce dysfonctionnement est basée sur une réponse inadaptée des cellules aux forces appliquées par le flux sanguin. Dans ce cadre là, l'étude des processus de mécanotransduction dans les cellules endothéliales, i.e. comment les signaux mécaniques sont perçus, transmis ou convertis en message biochimique visant à modifier l'expression des gènes, pourrait apporter certaines réponses.

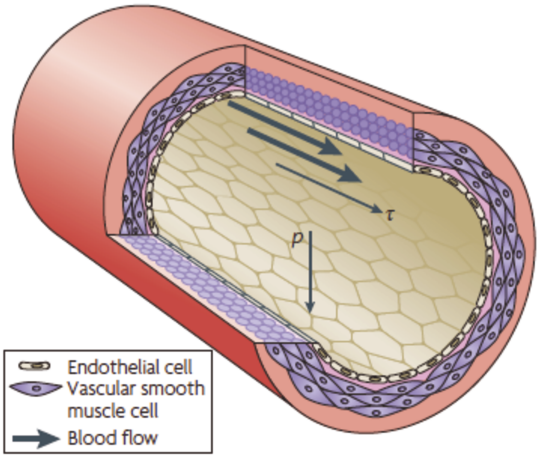


FIGURE 1.1 – Forces exercées sur la paroi des vaisseaux. Sur cette coupe d'un vaisseau sanguin, sont représentées les forces normales à la paroi dues à la pression artérielle pulsatile (p), et tangentielles dues à l'écoulement du flux sanguin (τ). Extraite de [Hahn 2009].

Dans cette partie, pour laquelle je me suis principalement inspirée de trois revues ([Barakat 2013], [Hahn 2009] et [Wang 2009]) je commencerai par décrire les cellules endothéliales et leur fonctionnement chez un individu sain, avant d'introduire les dysfonctionnements qui interviennent lors du développement de l'athérosclérose et le lien avec la perturbation du flux. Enfin, je présenterai des études prouvant que le cytosquelette est impliqué dans la mécano-transduction.

1.1.1 Les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches : l'intima, la media et l'adventice en allant de l'intérieur vers l'extérieur de la paroi (cf. figure 1.2). La partie la plus interne de l'intima est l'endothélium. Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales qui tapissent l'intérieur du vaisseau sanguin et se trouvent donc au contact direct du sang. Il repose sur une matrice extracellulaire contenant quelques cellules de muscles lisses. La média est formée de plusieurs couches de cellules de muscles lisses, entourées de fibres de collagène et d'élastine, principaux constituants de la couche périphérique, appelée adventice.

Le flux sanguin joue un rôle crucial dans le développement des vaisseaux sanguins depuis l'embryogénèse jusqu'à l'âge adulte où il régule leur diamètre. En effet, les diamètres des vaisseaux sont déterminés par la pression sanguine, résultant de l'action de pompage du cœur : la pression est maximale dans l'aorte et décroît progressivement en passant ensuite dans les artères de faible calibre, jusqu'aux capillaires. Cette adaptation du diamètre des vaisseaux au flux est permanente. Par exemple, les artères de gros calibre, telle que l'aorte, répondent aux fluctuations grâce à leur élasticité intrinsèque, permettant de maintenir constante la pression dans les artères de plus faibles dimensions. Néanmoins, si ces artères plus petites sont également soumises à une pression sanguine différente, ce sont les muscles lisses qui, en se contractant ou en se relaxant, palient ces variations de façon à maintenir la pression constante dans les capillaires.

Si les cellules endothéliales réagissent également aux contractions dues à la pression arté-

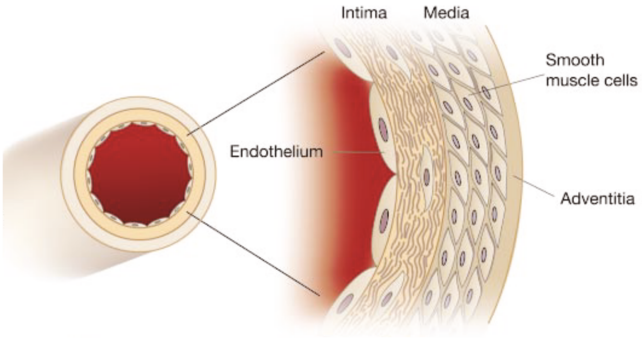


FIGURE 1.2 – Composition de la paroi artérielle. Elle possède trois couches : l'intima, la média et l'adventice ("adventitia" sur la légende). On distingue entre autres les cellules de muscles lisses ("smooth muscle cells") et les cellules endothéliales en contact avec le sang, dont la monocouche forme l'endothélium. Adaptée de [Libby 2002].

rielle, elles sont plus sollicitées dans la réponse aux forces tangentielles directement exercées sur l'endothélium par la circulation sanguine. Ainsi, les cellules endothéliales répondent à une augmentation du flux sanguin en envoyant des signaux biochimiques aux cellules de muscles lisses voisines, entraînant leur relaxation et donc l'élargissement du vaisseau pour rétablir la contrainte de cisaillement initiale [Hahn 2009].

D'autre part, chez un individu sain, l'endothélium représente une surface non thrombogénique, i.e. une surface qui empêche la coagulation du sang. Il régule aussi la perméabilité aux petits solutés et aux macromolécules, telles que les lipoprotéines transporteuses du cholestérol dans le sang, au travers des jonctions entre les cellules [Barakat 2013].

1.1.2 Dysfontionnement de l'endothélium et développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie progressive, caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères de gros calibre [Libby 2002]. A un stade avancé, après plusieurs dizaines d'années, elle peut être responsable d'un accident cardiaque tel que l'infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral, premières causes de mortalité dans les pays développés.

Les différentes étapes du développement de la maladie sont schématisées sur la figure 1.3. Nous allons les rappeler sommairement d'après [Hahn 2009] et [Libby 2002] :

- Les cellules saines expriment de faibles taux de récepteurs d'adhésion et de cytokines attirant les leucocytes (ou globules blancs) et forment une barrière pour empêcher la migration de grosses molécules telles que le cholestérol dans la paroi sanguine (figure 1.3-a).
- Dans certaines régions, a contrario, les récepteurs d'adhésion des leucocytes [1] et les cyto-

1. On peut citer par exemple : VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule 1) et ICAM-1(intercellular adhesion molecule 1)

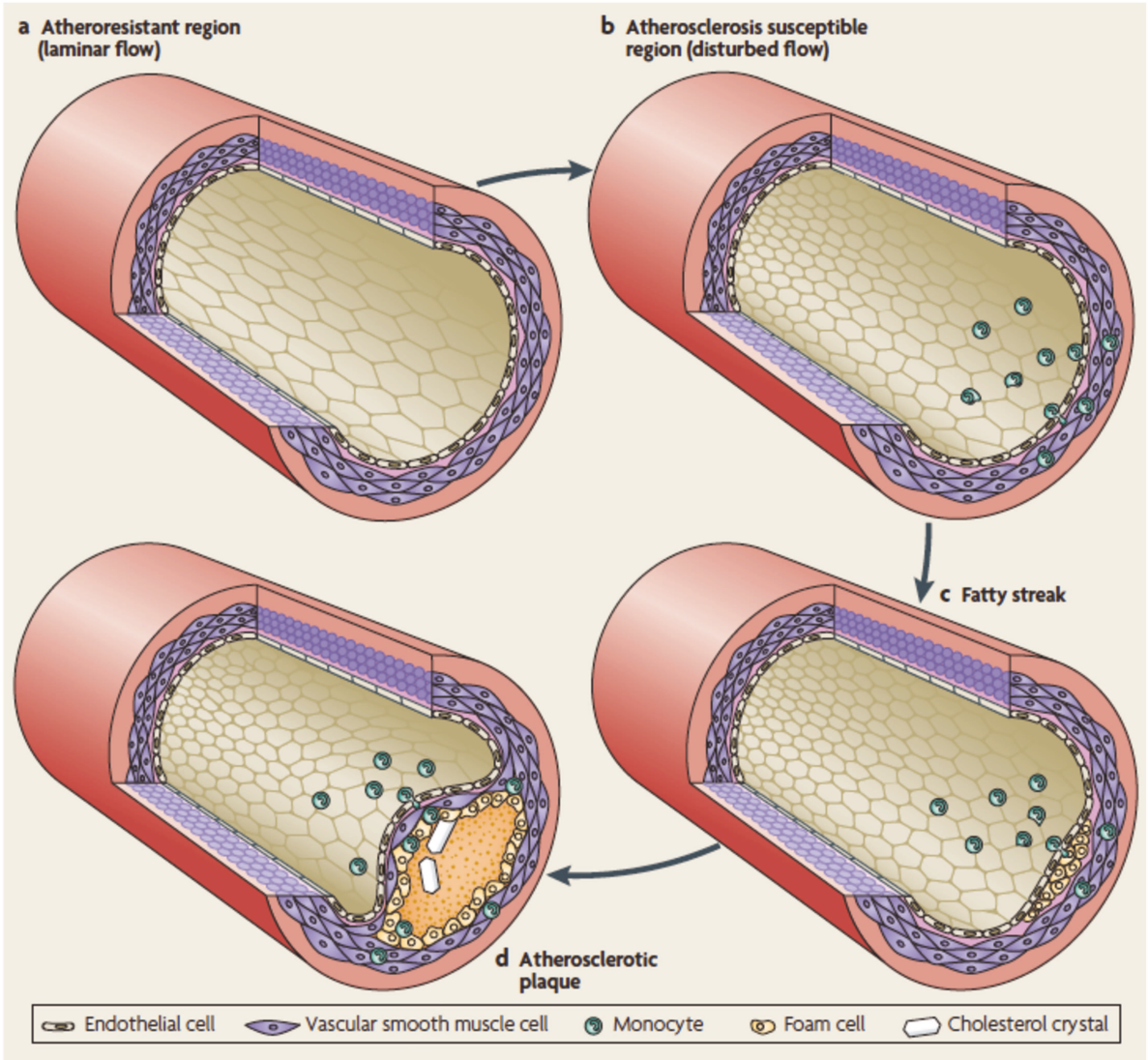


FIGURE 1.3 – Les différentes étapes du développement de l'athérosclérose. Extraite de [Hahn 2009].

kines[2] sont beaucoup plus exprimés. De fait, les leucocytes, et plus particulièrement les monocytes, sont beaucoup plus présents aux abords de l'endothélium, où ils s'attachent, avant de migrer dans la paroi artérielle (figure 1.3-b).

- Du fait de la perméabilité de l'endothélium, des poches graisseuses se forment. Les monocytes se différencient alors en macrophages, phagocytant les lipoprotéines (principalement de basse et très basse densités) transportant le cholestérol et les triglycérides dans les tissus. Les macrophages engorgés de lipoprotéines sont appelés cellules spumeuses ("foam cells" en anglais). Ces cellules sont plus actives et sécrètent des chimiokines et des enzymes qui altèrent la matrice extracellulaire. Elles ont aussi une incidence sur les cellules de muscles lisses, augmentant les facteurs de croissance et la migration et conduisant à l'épaississement des couches de muscles lisses (figure 1.3-c). Ces poches de graisses sont présentes chez tous les individus, incluant les enfants et les jeunes adultes sains.
- La présence de facteurs de risques tels que le taux de lipoprotéines plasmiques, d'agents oxidants dus au tabagisme, de glucose dans le sang, de médiateurs inflammatoires circulant et le manque d'exercice, détermine l'évolution de ces petites poches de graisse. Lorsqu'elles grossissent et sont plus inflammées, on parle de plaque d'athérome. Elles contiennent généralement un coeur de cellules nécrotiques, des débris graisseux avec des cristaux de cholestérol, en plus d'une accumulation encore plus importante de cellules spumeuses, d'autres cellules immunitaires et des cellules de muscles lisses (figure 1.3-d).

L'athérome prend ainsi de plus en plus d'espace dans le lumen artériel, pouvant aller jusqu'à couper la circulation sanguine, conduisant à des manifestations cliniques. On peut aussi assister à une rupture physique de la plaque pouvant entraîner une thrombose, i.e. l'obstruction d'un vaisseau [Libby 2002].

L'origine de la maladie n'est pas encore vraiment identifiée. Jusque dans les années 70, il était supposé que la lésion était due à une incapacité de la paroi sanguine à métaboliser les lipides transportés en son sein, depuis le sang, conduisant à une accumulation des lipides [St Clair 1985]. Ainsi, d'abondantes études ont montré le lien entre hypercholestérolémie et athérosclérose. Cependant, cela n'expliquait pas ce qui permettait aux lipoprotéines de traverser la paroi. Les scientifiques ont alors avancé l'hypothèse selon laquelle le premier stade de la maladie est une blessure de l'endothélium, conduisant à un dénuement des cellules endothéliales [Ross 1976]. Ceci a bien pour effet d'augmenter le transport des macromolécules et de permettre l'adhésion des plaquettes, relargant des facteurs de croissance aux cellules de muscles lisses. Cependant, cette hypothèse a dû être revue lorsqu'il a été constaté que dans les tous premiers stades de la maladie, l'endothélium reste intact. Finalement, aujourd'hui l'origine de la maladie est attribuée à un dysfonctionnement de l'endothélium [Libby 2002].

1.1.3 Athérosclérose et perturbations locales du flux sanguin

Bien que les facteurs de risques se répercutent sur la totalité du système sanguin, la maladie se développe préférentiellement à la jonction des vaisseaux sanguins ou aux endroits de forte courbure [Schwartz 1962]. Ces sites sont associés à un flux perturbé, dû en grande partie

2. On peut citer par exemple MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1)

à la géométrie des artères, mais aussi au caractère pulsatile du cycle cardiaque, au comportement non-newtonien du sang et à la souplesse de la paroi artérielle [Barakat 2013]. Ainsi, les zones protégées du développement de la maladie sont soumises à un flux unidirectionnel, laminaire avec une forte contrainte de cisaillement. Au contraire, dans les zones propices au développement de la maladie, le flux peut être faible, se séparer, se renverser et même devenir turbulent. De plus, les cellules y expriment un phénotype pro-inflammatoire comprenant un renouvellement des cellules plus rapide, de hauts niveaux de perméabilité, de stress oxydant et de gènes inflammatoires, contrairement aux cellules des zones protégées (cf. figure 1.4).

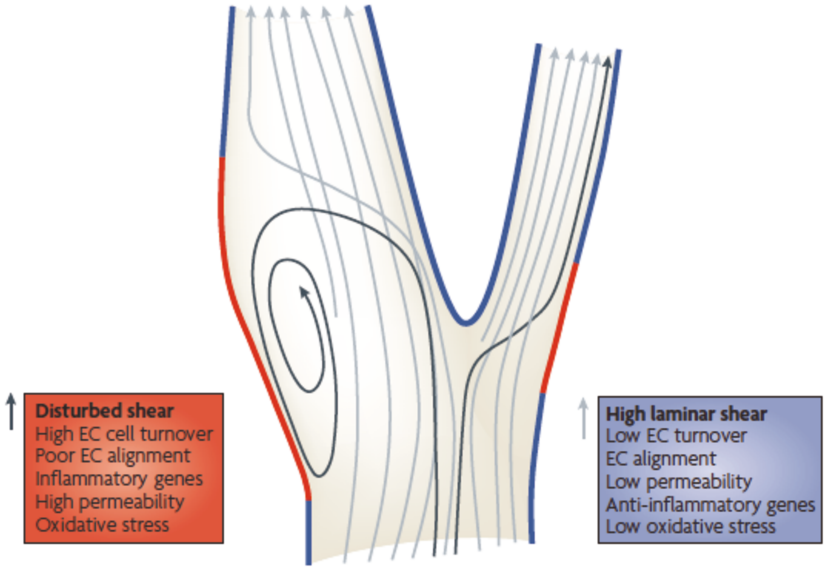


FIGURE 1.4 – Perturbation du flux à la bifurcation des vaisseaux. En amont et en aval de la bifurcation (zones en bleu), le flux est unidirectionnel et laminaire, tandis qu'à la bifurcation (zones en rouge), on observe la formation d'un tourbillon dû à un renversement du flux lors du cycle cardiaque. Selon la nature du flux, les cellules expriment des phénotypes différents. Extraite de [Hahn 2009].

Par ailleurs, la forme et l'orientation des cellules soumises à des flux différents ne sont pas les mêmes. En effet, sur la figure 1.5 qui présente l'endothélium in vivo proche d'une bifurcation, on peut observer un changement brutal de la forme des cellules qui se trouvent allongées et alignées dans la direction du flux en amont, et polygonales et sans direction préférentielle dans la seconde partie. Ce changement de conformation coïncide précisément avec la présence d'une bifurcation.

Des études sur la conséquence du flux sur les cellules ont également été menées in vitro. En culture, les cellules endothéliales sont également adhérentes au substrat et forment une monocouche, pavant toute la surface qu'elles recouvrent (voir figure 1.6a). Elles ont un diamètre compris entre 20 et 30 µm et une épaisseur de 2 à 4 µm. Comme in vivo, elles sont ancrées sur une surface rigide grâce à des sites d'adhésion focale de la membrane basale, complexes macromoléculaires comprenant entre autres des intégrines, protéines transmembranaires connectées au cytosquelette intracellulaire via des protéines de liaison [Vicente-Manzanares 2009].

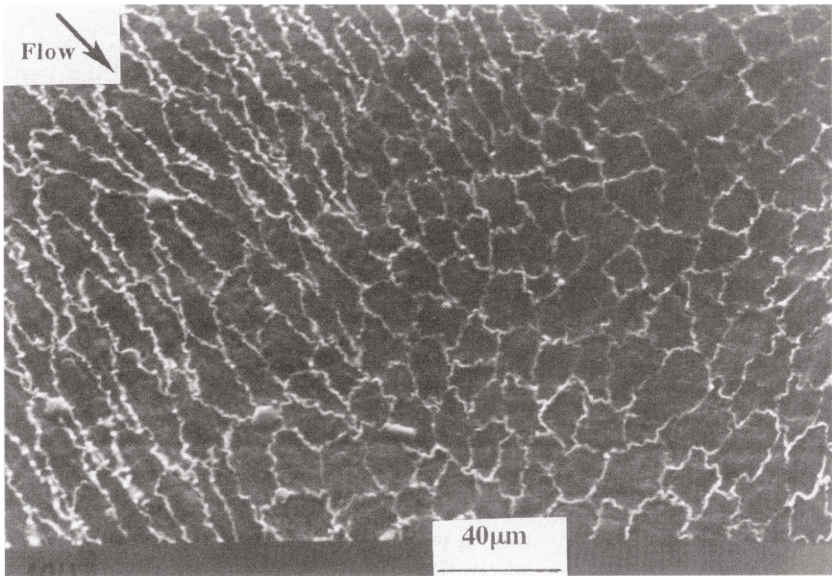


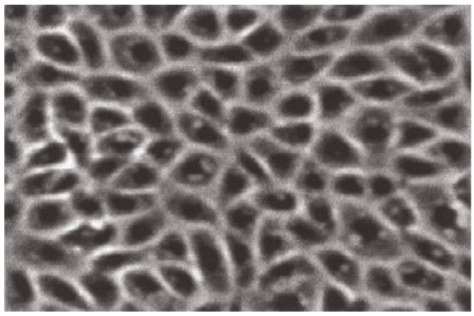
FIGURE 1.5 – Profil de l'endothélium de l'aorte du thorax d'un primate, se situant à proximité directe de la bifurcation des artères intercostales. Les cellules endothéliales changent de forme de façon abrupte passant d'une forme allongée dans la direction du flux à une forme polygonale sans orientation préférentielle. Extraite de [Davies 1995].

Le cytosquelette est composé de trois réseaux filamentaires : les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine. Ces derniers se regroupent pour former des structures rigides appelées fibres de stress, formant des faisceaux d'environ 200 nm de diamètre [Kumar 2006, Deguchi 2006] contre seulement 6 à 10 nm pour les filaments individuels [Mofrad 2006]. On peut les observer sur la figure 1.6b.

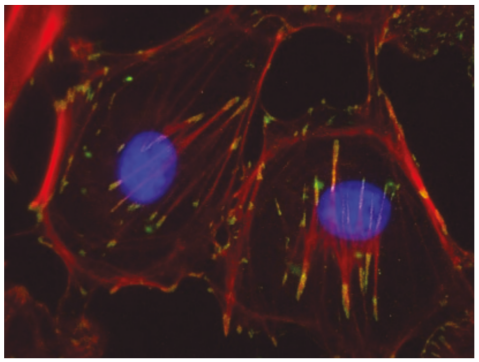
In vitro, on observe un changement de la forme des cellules sous l'application d'un flux laminaire comme le montre la figure 1.7, mais aussi une réorganisation du cytosquelette qui est orienté dans la direction du flux [Galbraith 1998, Davies 1994]. En revanche, ce réarrangement du cytosquelette n'est pas observé lorsque les cellules sont soumises à un flux perturbé (comme par exemple oscillant). Dans ce cas, les cellules présentent un phénotype similaire aux cellules qui sont cultivées en condition statique [Chien 2007]. De plus, les cellules soumises à un flux laminaire expriment des gènes protégeant du développement de la maladie comme c'est le cas in vivo [Hahn 2009, Chien 2007].

Enfin, un flux laminaire induit de nombreuses réponses des cellules endothéliales au niveau biologique telles que l'activation des intégrines, la stimulation des canaux ioniques sensibles au flux, le déclenchement de la tyrosine kinase Src et des protéines G, l'altération de la fluidité de la membrane cellulaire, le changement du pH intracellulaire ou encore la libération d'ATP [Barakat 2013].

Ainsi, de nombreuses preuves attestent du fait que les cellules endothéliales perçoivent les contraintes de cisaillement liées au flux et s'adaptent à celui-ci en déclenchant une multitude de réponses. Cependant, les voies par lesquelles un stimulus mécanique est transmis depuis la membrane externe de la cellule jusqu'à l'intérieur de la cellule où il est traduit en signal biochimique, restent aujourd'hui floues.



(a) Monocouche de cellules.



(b) Imagerie de fluorescence.

FIGURE 1.6 – Culture de cellules endothéliales d'aorte de bœuf en condition statique. La figure 1.6a représente une monocouche de cellules endothéliales confluentes. Extraite de [Lum 2000]. La figure 1.6b est une image de microscopie de fluorescence avec un marquage du noyau (en bleu), des adhésions focales (en vert) et des filaments d'actine (en rouge). Les traits épais en rouge correspondent à des fibres de stress. Image fournie par V. Panzetta and P. Netti, Interdisciplinary Research Center in Biomaterials (CRIB), Université de Naples Federico II, Italie.

1.1.4 La mécanotransduction dans les cellules endothéliales

Malgré un grand nombre de preuves montrant que les cellules endothéliales répondent biologiquement aux stimuli mécaniques, peu de choses sont connues à propos des mécanismes qui gouvernent ces réponses, allant de la perception du signal mécanique à la modification de l'expression des gènes et du comportement général de la cellule. Ces mécanismes peuvent être vus comme une succession de processus :

1. Mécano-sensibilité : perception du signal mécanique à la surface de la cellule.
2. Mécano-transmission : transmission du signal vers un ou plusieurs sites intracellulaires.
3. Mécano-transduction : transduction ou conversion du signal mécanique en signal biochimique capable d'induire des réactions biologiques ou biochimiques.

Ainsi, sous le nom de mécano-transduction se trouvent souvent ces trois niveaux et non pas seulement la conversion du signal mécanique en message biochimique. Un modèle de la mécano-transduction dans les cellules endothéliales induites par les contraintes de cisaillement a été proposé dans [Davies 2009] et est représenté sur la figure 1.8. Il propose quatre voies de signalisation induisant l'étape de la mécano-transduction :

- la surface de la membrane via les canaux ioniques sensibles au flux ou l'activation des protéines G induisant une conversion proche de la membrane,
- la jonction entre les cellules via les protéines transmembranaires de jonctions telles que les cadhérines, impliquant une conversion également in situ,
- la jonction entre la cellule et la matrice extracellulaire via les sites d'adhésion impliquant les intégrines, conduisant également à une mécano-transduction proche de la membrane,

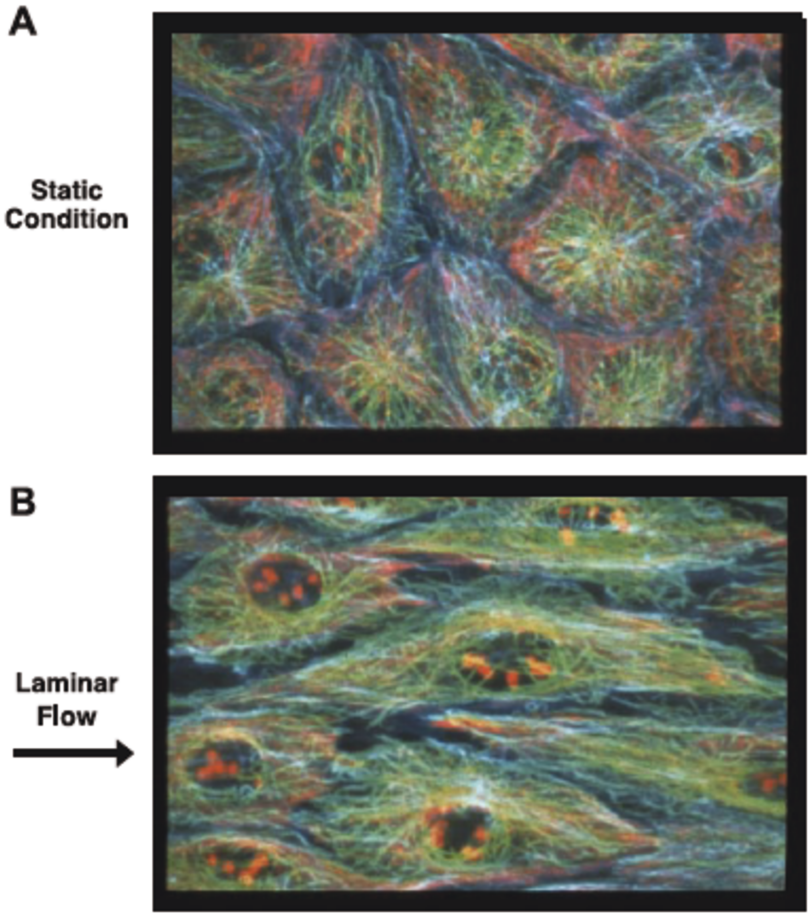


FIGURE 1.7 – Effet d'un flux laminaire sur l'organisation du cytosquelette et la forme des cellules. Les différents filaments du cytosquelette sont repérés par fluorescence avec en bleu les filaments d'actine, en vert les microtubules et en rouge les filaments intermédiaires. Les images ont été prises dans des conditions statiques (a), puis après 24h sous flux laminaire de 12 dyn/cm^2, soit 1.2 Pa (b). Extraite de [Chien 2007].

- l'étape de mécano-transduction peut également avoir lieu proche du noyau, qui peut être déformé suite à une contrainte mécanique, ce qui implique une mécano-transmission.

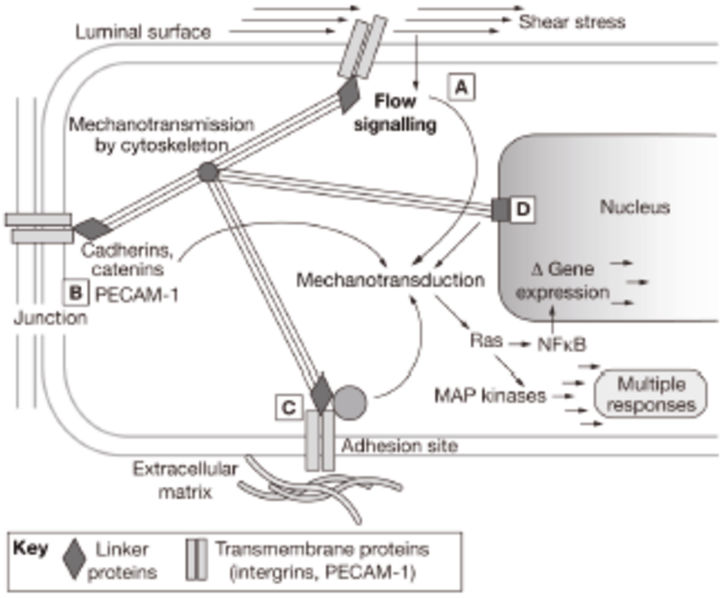


FIGURE 1.8 – Modèle de la mécano-transduction de la contrainte de cisaillement dans les cellules endothéliales. La conversion du signal mécanique en message bio-chimique peut avoir lieu à la surface de la cellule directement (A), à la jonction entre les cellules (B), ou encore à la jonction entre la cellule et le substrat via les sites d'adhésion (C). Elle peut également avoir lieu après une transmission du signal via le cytosquelette, dans un endroit proche du noyau (D). La mécano-transduction est suivie d'une cascade de réactions induisant des réponses multiples de la cellule et une modification de l'expression des gènes. (PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule 1, MAP : mitogen-activated protein, NFκB : nuclear factor κB, Ras : petite GTPase). Extraite de [Davies 2009].

Dans les trois derniers cas, une mécano-transmission par le cytosquelette est envisagée. Ceci est une voie de transmission nouvelle par rapport au schéma classique : la perception du stimulus mécanique à la surface de la membrane implique un changement conformationnel local de certaines protéines [Vogel 2006] induisant par la suite une transmission par cascade de réactions biochimiques impliquant des phénomènes de diffusion ou de transport par les moteurs moléculaires. Ainsi, pour l'étape de la mécano-transmission, trois mécanismes sont considérés :

- la diffusion,
- les moteurs moléculaires,
- le cytosquelette.

En effet, une étude expérimentale a montré qu'une transmission rapide (quelques centaines de ms) dans des zones éloignées (quelques dizaines de µm) du point d'application de la force est possible [Na 2008]. Ce résultat implique une voie alternative aux processus de diffusion

et de transport par les moteurs moléculaires qui sont relativement lents (cela prend plusieurs secondes pour parcourir quelques dizaines de µm). L'hypothèse selon laquelle le cytosquelette est responsable de cette transmission rapide et longue distance est étayée par plusieurs études montrant l'implication du cytosquelette dans la transmission d'un signal mécanique au sein de la cellule. Certains de ces travaux sont présentés dans les deux parties suivantes.

1.1.4.1 Le cytosquelette impliqué dans la mécano-transmission longue distance

Il est communément admis que lorsqu'une force est appliquée sur la surface d'une cellule, elle déforme la membrane puis est rapidement dissipée dans le cytoplasme [Vogel 2006]. La conversion entre signal mécanique et signal biochimique doit donc avoir lieu proche de la surface de la cellule. En effet, les intégrines et les cadhérines, protéines transmembranaires, sont impliquées dans la mécano-transduction [Orr 2006]. Toutefois, elles sont aussi directement connectées au cytosquelette, pouvant ainsi permettre une transmission de la contrainte mécanique par ces réseaux filamenteux. En effet, il existe un grand nombre d'études qui montrent que les forces mécaniques peuvent être transmises par le cytosquelette à différents endroits à l'intérieur de la cellule comme par exemple [Wang 1993, Davies 1995, Maniotis 1997, Hu 2003, Hu 2004, Hu 2005, Wang 2005, Silberberg 2008, Na 2008].

Il a été montré expérimentalement dans [Wang 1993] que les intégrines agissent comme des récepteurs mécaniques qui transfèrent les signaux mécaniques au cytosquelette. En effet, une rupture d'un ou plusieurs réseaux de filaments du cytosquelette conduit à une réduction significative, voire une annulation de la réponse de la cellule au stimulus. Ce stimulus est induit par un champ magnétique appliqué à une bille ferromagnétique attachée à la surface de la cellule. En effet, les billes sont fonctionnalisées avec la séquence RGD (Arg-Gly-Asp), connue pour être un ligand des récepteurs de la fibronectine, telles que les intégrines $\beta_1\alpha_5$ se trouvant à la surface des cellules [Schwartz 1991].

Ceci a été confirmé dans [Maniotis 1997], qui montre que les signaux perçus par les intégrines à la surface de la cellule sont transférés par le cytosquelette jusqu'au noyau. En effet, la déformation de la surface de la cellule par des micropipettes fonctionnalisées avec des ligands tels que la fibronectine ou RGD induit une déformation de l'enveloppe du noyau et un déplacement du nucléole. L'intégrité du cytosquelette est là aussi une condition nécessaire au transfert de la force. Cependant, la déformation imposée à la cellule dans cette étude n'est pas physiologique : elle est beaucoup trop importante dans le temps considéré. De plus, on pourrait soupçonner que la déformation est telle qu'elle induit de fait les déplacements du nucléole, sans qu'une voie de signalisation de la cellule n'ait été activée.

En 2003, la même équipe développe une méthode de détection synchrone des déplacements internes à une cellule adhérente soumise à une contrainte extérieure [Hu 2003]. Celle-ci permet de cartographier la transmission du signal mécanique à l'intérieur du cytoplasme d'une cellule. Les auteurs marquent alors les mitochondries, qui sont connectées aux microtubules par des moteurs moléculaires [Tanaka 1998] et se trouvent dans le cytoplasme [Wang 2001]. Ils observent alors des déplacements localisés des mitochondries à plus de 20 µm du point d'application de la force via la bille fonctionnalisée avec RGD dans des conditions proches des conditions physiologiques (cf. figure 1.9). D'autre part, ils observent également un transfert de la contrainte depuis la surface apicale jusqu'à la membrane basale avec une concentration au niveau des adhésions focales. Enfin, cette transmission de la force à longue distance n'est

observée que lorsque les cellules peuvent former des adhésions focales sur leur substrat et des fibres de stress.

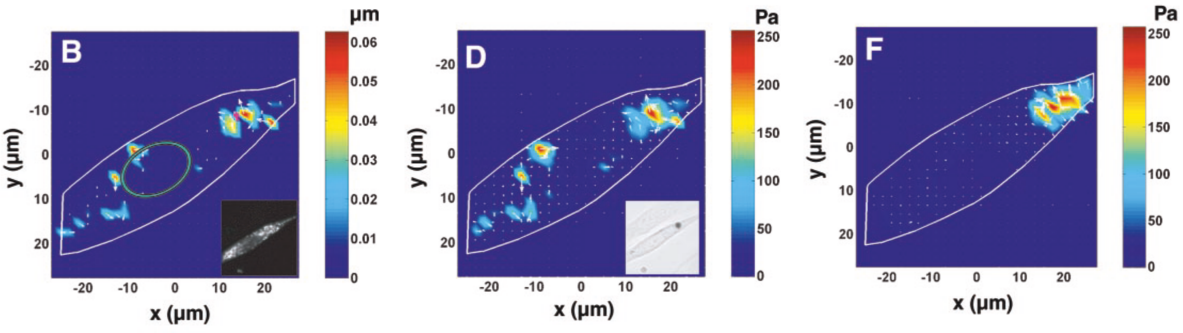


FIGURE 1.9 – Cartographie des déplacements du cytosquelette dans une cellule vivante. (B) Carte des déplacements des mitochondries suite à l'application d'une contrainte via une bille fonctionnalisée liée à la membrane de la cellule. (D) Carte de la contrainte calculée à partir de la carte des déplacements (B). (F) Carte de la contrainte calculée en cas de rupture des filaments d'actine. Encarts : (B) image de fluorescence de la cellule avec marquage des mitochondries ; (D) image à contraste de phase de la cellule avec en noir la bille. Adaptée de [Hu 2003].

En 2004, ils publient une technique de pince magnétique capable d'exercer des forces axiales dans les trois dimensions, mais aussi un couple [Hu 2004] (cf. figure 1.10). Grâce à cela ils mettent en évidence des déplacements du cytosquelette et du nucléole différents selon la direction de la force par rapport à l'axe allongé de la cellule. Ils relient cette observation au fait que dans ces cellules, les fibres de stress sont alignées et orientées dans la direction de l'axe allongé de la cellule.

Au fil des travaux émerge l'importance de l'existence d'une tension intrinsèque au cytosquelette (appelée dans la suite pré-stress). Ce pré-stress est nécessaire à une propagation efficace et longue distance de la contrainte appliquée en surface de la cellule jusqu'au nucléole [Hu 2005]. Une suppression des fibres de stress annule cette efficacité.

1.1.4.2 Le cytosquelette, une voie rapide et longue distance de la mécano-transmission

Concomitamment, une autre équipe a développé un rapporteur fluorescent de l'activité de la protéine Src [Wang 2005]. Src est une tyrosine kinase impliquée dans des voies de signalisation de la cellule à l'étape de la mécano-transduction i.e. à l'étape de la conversion du signal mécanique en signal biochimique. De plus, elle est connue pour réguler les interactions entre les intégrines et le cytosquelette [Felsenfeld 1999]. En appliquant une force sur une bille liée aux intégrines, les auteurs observent une activation "instantanée" de Src, et ce de façon directionnelle et en majorité dans des zones éloignées et opposées à la direction de la force (cf. figure 1.11). Une rupture des filaments d'actine ou des microtubules bloque la transmission longue distance, mais localement l'activation de Src est maintenue. Cette transmission, d'abord immédiate dans ces zones, est suivie d'une vague de propagation de l'activation de la protéine plus lente. Cependant l'instantanéité de cette activation n'est pas plus explicitée.

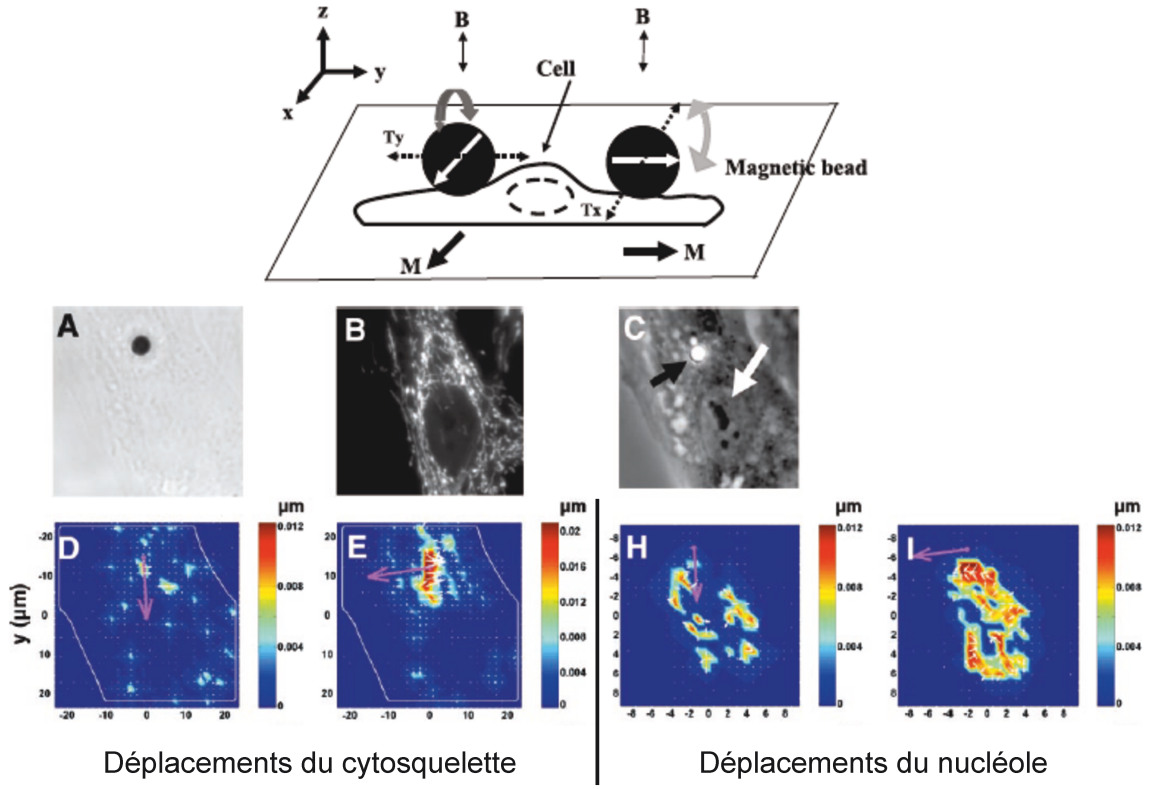


FIGURE 1.10 – Transmission d'une contrainte mécanique par le cytosquelette. La contrainte est appliquée grâce à une bille magnétique liée à la membrane de la cellule et soumise à un champ magnétique dont la direction est indiquée sur les images D, E, H, et I par une flèche rose. (A), (B) et (C) Images de la cellule allongée plutôt dans la direction x. Le point noir de l'image (A) correspond à la bille. (B) Image de microscopie de fluorescence avec marquage des mitochondries. (C) Image en contraste de phase. La bille est en clair et est indiquée par la flèche noire. Le nucléole est indiqué par la flèche blanche. (D) et (E) Cartes de déplacement du cytosquelette. (H) et (I) Cartes de déplacement du nucléole. Pour les cartes (D) et (H) le couple est appliqué dans la direction y : les déplacements sont beaucoup moins importants que dans le cas où le couple est appliqué dans la direction x (cartes (E) et (I)). Adaptée de [Hu 2004].

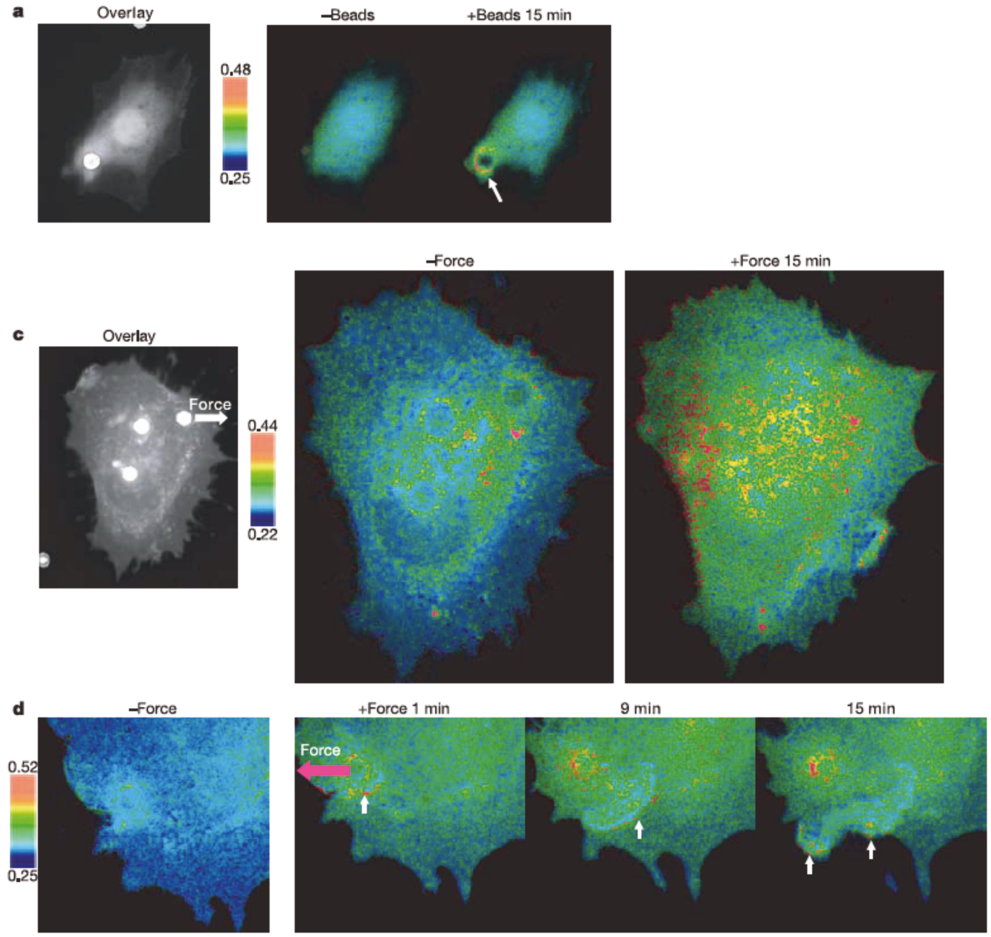


FIGURE 1.11 – Propagation longue distance et directionnelle de Src induite par une contrainte mécanique. Celle-ci est appliquée grâce à un piège optique via une bille liée aux intégrines de la membrane. (a) En absence de piège optique, la bille active Src localement, à sa proximité (une valeur élevée de l'intensité indique une forte activation de Src). (c) L'application d'une force, dans la direction indiquée par la flèche blanche sur la bille la plus proche, induit une activation de Src loin de cette bille et dans la direction opposée. (d) Vague de propagation directionnelle de la contrainte mesurée au cours du temps (en bleu clair). Les petites flèches blanches indiquent les points extrêmes de la propagation pour chaque temps. Adaptée de [Wang 2005].

Ce même rapporteur Src est ensuite utilisé dans [Na 2008] pour déterminer si l'hypothèse d'une mécano-transduction d'une force appliquée localement à la membrane de la cellule via une cascade de signalisation basée sur les phénomènes de diffusion ou de transport par les moteurs moléculaires dans le cytoplasme est valable. Une meilleure résolution temporelle est alors apportée, conduisant à une observation de l'activation de Src en moins de 300 ms dans des zones éloignées du point d'application de la force, à plus de 20 µm (cf. figure 1.12). Cette mesure élimine les hypothèses d'une transmission par une cascade de signalisation assurée par diffusion (qui prendrait 1.7 s pour parcourir 20 µm) et de tranport via les moteurs moléculaires sur les microtubules (qui prendrait entre 5 et 20 s pour la même distance). L'hypothèse d'une propagation de la force via le cytosquelette est donc pertinente. En effet, une propagation longitudinale purement élastique suivant une fibre de stress conduirait à un temps de parcours d'un peu moins d'une µs (la vitesse de propagation est estimée à 30 m/s). Cette hypothèse de propagation conduit à une valeur sous-estimée du temps de parcours car les fibres de stress ont un comportement visco-élastique, et non purement élastique. De plus, les 300 ms mesurées ne correspondent pas seulement au temps de propagation : il faut également y ajouter les différents temps aboutissant à un changement de fluorescence du rapporteur. Ainsi, une transmission via le cytosquelette est la plus plausible.

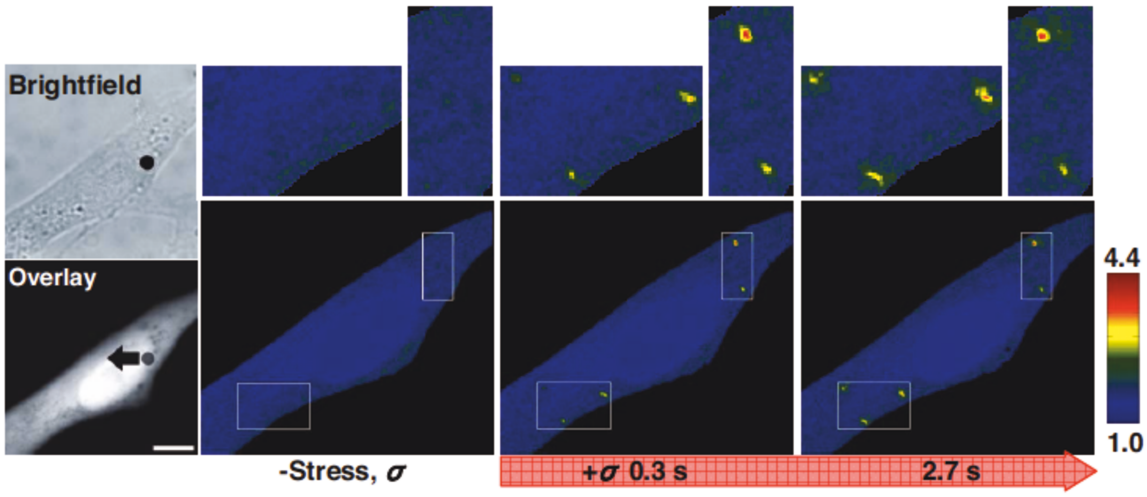


FIGURE 1.12 – Activation rapide et longue distance de Src. L'application de la contrainte mécanique est appliquée grâce à une pince magnétique via une bille liée à la membrane de la cellule. La direction de la force est indiquée par la flèche noire. En seulement 0.3 s, l'activation de Src est observée dans des zones éloignées du point d'application. Ces zones sont agrandies au dessus de chaque image prise à différents temps : avant l'application de la contrainte, puis 0.3 s après et enfin 2.7 s après. A 2.7 s une nouvelle zone d'activation ressort plus intensément. La barre d'échelle sur la figure "overlay" correspond à 10 µm. Adaptée de [Na 2008].

Na et al. montrent de plus que l'activation de Src dépend de l'activation des intégrines, de la rigidité du substrat, de l'existence du pré-stress et de l'intégrité du réseau d'actine. Enfin, l'activation de Src est colocalisée avec les déplacements des microtubules, suggérant que les microtubules sont déformés par la contrainte imposée au cytosquelette, induisant ensuite

l'activation de Src.

1.1.5 Résumé

Ainsi, dans cette première partie dédiée au contexte biologique, nous avons vu que les cellules endothéliales sont soumises aux forces de cisaillement générées par l'écoulement du flux sanguin. Les bifurcations et les endroits de fortes courbures des artères sont des zones privilégiées du développement de l'athérosclérose dont la naissance est attribuée au dysfonctionnement de l'endothélium. En effet, dans ces zones les cellules développent un comportement différent de celles soumises à un flux laminaire et unidirectionnel, tant au niveau de leur forme, de leur orientation, de l'organisation du cytosquelette que de l'expression des gènes pro-inflammatoires. L'étude des processus qui gouvernent les réponses des cellules aux stimuli mécaniques peut être une piste d'explication du dysfonctionnement de l'endothélium. Aujourd'hui, le cytosquelette a été identifié comme un vecteur de la mécano-transmission depuis la perception du signal par les intégrines à la surface de la cellule jusqu'à la déformation des éléments du noyau, en passant par l'activation de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Le cytosquelette permet une transmission rapide et longue distance du signal mécanique, notamment grâce à la tension qui existe en permanence en son sein (pré-stress).

1.2 Le projet de thèse

Notre projet de recherche s'inscrit dans ce contexte de l'étude de la mécano-transduction dans les cellules endothéliales impliquées dans le développement de l'athérosclérose. Pour cela, un modèle théorique a été développé sous la direction d'Abdul Barakat au LadHyX. Ce modèle considère une transmission par les fibres de stress depuis la surface de la cellule jusqu'au noyau. Abdul Barakat souhaite maintenant valider expérimentalement ce modèle, et c'est dans ce contexte que mon projet de thèse est né. Mais avant de détailler la partie expérimentale, je vais revenir sur le modèle théorique et ses résultats.

1.2.1 Modèle théorique

Il s'agit d'un modèle mathématique développé pour décrire la dynamique spatio-temporelle de la transmission de la force par le cytosquelette dont les résultats ont été publiés dans [Hwang 2012a], [Hwang 2012b] et [Gouget 2016]. Cette transmission est supposée être effectuée par les fibres de stress car de nombreuses observations expérimentales montrent qu'elles jouent un rôle important [Wang 2005, Wang 2009, Na 2008]. Ce modèle a d'abord considéré la transmission par une seule fibre de stress [Hwang 2012a, Hwang 2012b], puis a été étendu à deux fibres de stress plus ou moins alignées [Gouget 2016]. Dans les deux cas, la transmission de la force appliquée à la surface de la cellule jusqu'au noyau est évaluée par la déformation des fibres de stress, suivant la direction de la force, soit constante soit oscillante. Dans le modèle avec une seule fibre de stress, celle-ci relie une intégrine de la surface de la cellule au noyau (cf. figure 1.13). La fibre de stress est décrite comme un matériau visco-élastique mis sous tension (pré-stress). Ci-dessous sont présentés les différents résultats du modèle simple qu'il s'agit de vérifier par la suite expérimentalement.

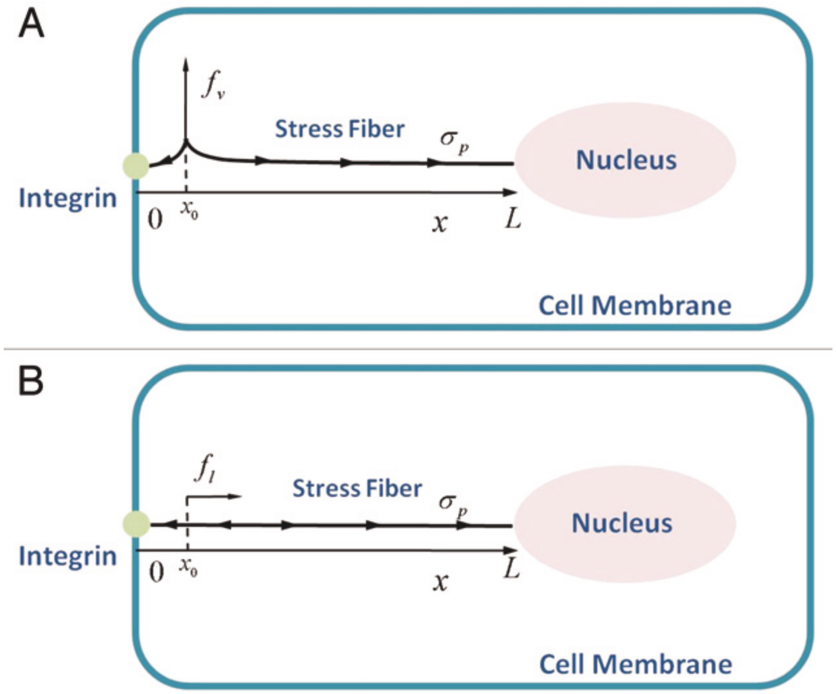


FIGURE 1.13 – Schéma du modèle mathématique de transmission d'une force via une fibre de stress. La contrainte mécanique est exercée en $x_0 = 1$ µm, proche de l'intégrine (située en $x = 0$) qui est reliée au noyau se trouvant en $x = L = 10$ µm, par une fibre de stress sousmise à un préstress de 3.10^5 Pa. La force est exercée dans la direction orthogonale à la fibre de stress (A) ou dans la direction longitudinale (B). Extraite de [Hwang 2012b].

Force constante Lorsqu'une force constante orthogonale à la fibre de stress est appliquée, Hwang et al. ont montré qu'elle se propage beaucoup plus rapidement que dans le cas où cette force est appliquée dans la direction longitudinale. Ainsi pour une longueur de propagation de 10 µm, une force appliquée orthogonalement sera transmise en typiquement 10 ms (soit une vitesse de 1 mm/s) contre 10 s dans le cas d'une force longitudinale (soit une vitesse de 1 µm/s). Il y a donc un facteur 1000 entre les deux ! D'après ce modèle, seules les forces exercées dans une direction orthogonale aux fibres de stress peuvent être transmises à des vitesses comparables à celles observées expérimentalement dans [Na 2008] (environ 300 ms pour parcourir 20 µm). Ceci impliquerait alors qu'une propagation rapide et longue distance d'une contrainte mécanique n'est possible que dans des cellules présentant des fibres de stress alignées et orientées orthogonalement à la force exercée. Ceci est à mettre en regard avec les observations expérimentales de déformation anisotrope selon l'organisation des filaments d'actine et la direction de la force par rapport à une orientation préférentielle des filaments [Hu 2004].

Le modèle montre également qu'une transmission rapide et longue distance dans les cellules dépend fortement du pré-stress des fibres, en accord avec les observations expérimentales publiées dans [Hu 2005]. Enfin, la vitesse de propagation est principalement limitée par la viscosité interne des fibres de stress.

Force oscillante La déformation au niveau du noyau induite par une force oscillante dépend fortement de la fréquence de la force. Ainsi, à basse fréquence (<0.1 Hz), la déformation est transmise sans atténuation quelle que soit la direction de la contrainte exercée. En revanche, à haute fréquence, la transmission est atténuée et de façon différente selon la direction de la force. Les fibres de stress présentent un comportement similaire à un filtre passe-bas ayant des fréquences de coupure différentes selon la direction de la force : environ 1 Hz en longitudinal et plutôt 1 kHz en transverse.

1.2.2 Validations expérimentales

Afin de vérifier expérimentalement les résultats obtenus par le modèle mathématique, il faut donc :

- exercer une force locale sur la surface de la cellule,
- suivre la propagation de la contrainte à l'intérieur de la cellule,
- induire une orientation préférentielle des filaments d'actine.

D'autre part, afin de comparer les résultats expérimentaux aux résultats théoriques, il est important de déterminer les propriétés visco-élastiques de nos cellules. Ces différents points, ainsi que l'imagerie trois dimensions de la cellule sont abordés dans la suite, qui présente les techniques employées et l'organisation du projet au sein de la collaboration.

1.2.2.1 Exercer une force locale

Il existe différentes options pour exercer une force locale sur la membrane de la cellule, parmi lesquelles on peut citer :

- l'AFM : la microscopie à force atomique. Dans cette technique, la force est exercée et mesurée par le biais d'une pointe qui peut être fonctionnalisée. Avec ce dispositif, la pointe est positionnée à l'aplomb de la cellule, accrochée à son substrat. Il est donc facile d'exercer une force normale à la cellule, mimant celles dues à la pulsation sanguine, mais il est plus délicat d'appliquer une force tangentielle, mimant la contrainte de cisaillement.
- la TFM : la microscopie de force de traction. Des billes sont logées dans un substrat sur lequel adhère la cellule. Le suivi du mouvement de ces billes indique les forces exercées par la cellule sur le substrat. A contrario, si ces billes sont magnétiques, l'application d'un champ permet d'induire des tensions dans le substrat qui sont ensuite relayées à la cellule.
- les pinces optique ou magnétique : des billes fonctionnalisées ou non sont accrochées à la surface de la cellule. La force est alors exercée sur la membrane de la cellule via ces billes lors de l'application d'une force due à un gradient d'intensité lumineuse dans le cas d'une pince optique, et d'un champ magnétique dans celui d'une pince magnétique. Les forces exercées peuvent être constantes ou oscillantes. Dans le cas d'une pince magnétique, un couple est facilement applicable.

Dans notre cas, il est important de pouvoir appliquer la force sur la surface apicale de la cellule, là où elle est en contact avec le flux sanguin, ce qui exclut la TFM. D'autre part, nous avons vu que les cellules endothéliales répondent principalement aux forces de cisaillement. Ainsi, les pinces magnétique et optique semblent le choix le plus adapté.

Ayant connaissance qu'un montage de pince optique avait été monté dans notre équipe, Abdul Barakat a alors contacté Karen Perronet et Nathalie Westbrook pour collaborer. La force locale est donc exercée grâce à une pince optique que j'ai développée au cours de ma thèse à partir du montage précédent réalisé au cours de la thèse d'Antoine Le Gall. Le schéma de principe de la force appliquée par le piège optique est représenté sur la figure 1.14. Cette même technique a été utilisée pour montrer l'activation de Src suite à l'application de la force sur les intégrines via une bille liée à la membrane cellulaire [Wang 2005].

1.2.2.2 Mesurer les propriétés visco-élastiques des cellules

Pour obtenir des résultats théoriques de la propagation de la force dans les cellules, le modèle mathématique prend en compte les propriétés visco-élastiques de la cellule. Cependant, ces données n'ont pas encore été publiées pour les cellules que nous étudions : les cellules endothéliales d'aorte de bœuf (BAECs pour l'acronyme anglais). Or on peut les mesurer grâce à un montage de pince optique en imposant une contrainte sinusoïdale, de fréquence variable [Wottawah 2005, Balland 2005, Balland 2006, Wei 2008].

Le module complexe visco-élastique, $G^* = G' + i\ G''$, est le rapport entre la contrainte imposée et la déformation du matériau. Sa partie réelle G' traduit le comportement élastique (module de conservation), tandis que la partie imaginaire G'' le comportement visqueux (module de dissipation). G' et G'' sont déterminés à partir de l'amplitude et du déphasage du déplacement de la bille liée à la cellule par rapport au mouvement imposé [Wei 2008]. La figure 1.15 représente le schéma de principe d'une expérience de micro-rhéologie de cellule adhérente grâce à une pince optique. On part d'une situation où la bille est centrée sur le piège, puis la cellule est déplacée grâce à une platine piézo-électrique, à laquelle est imposée un mouvement

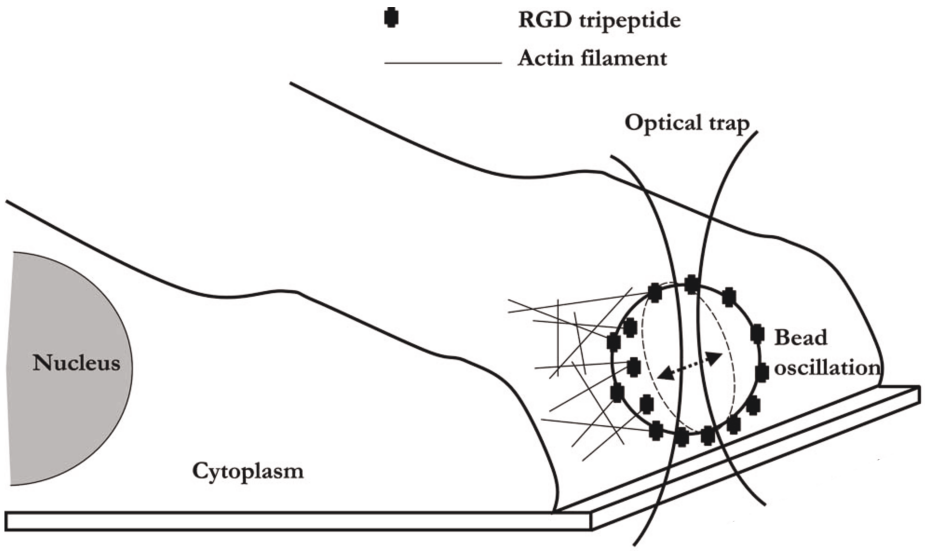


FIGURE 1.14 – Schéma de l'application d'une force avec un piège optique sur une bille fonctionnalisée avec RGD fixée aux intégrines connectées au réseau d'actine. Adaptée de [Balland 2006].

sinusoïdal. La bille est alors soumise à deux forces : la force de rappel exercée par le piège et la force exercée par la cellule. La bille se situe donc dans une position intermédiaire entre le centre du piège resté fixe et sa position initiale sur la cellule. Connaissant la constante de raideur du piège et la fréquence du mouvement sinisoïdal imposé, le module complexe G^* peut être déterminé.

Le défi de cette expérience consiste donc à calibrer d'abord la constante de raideur du piège à la hauteur de la bille sur la cellule, puis à imposer un mouvement sinusoïdal de la cellule par rapport au piège, soit en déplaçant la cellule en maintenant le piège fixe grâce à une platine piézo-électrique, soit en déplaçant le piège en maintenant la cellule fixe. La deuxième solution sera réalisée dans le cadre de ma thèse.

Ces deux premiers points, à savoir exercer une force locale sur la cellule via une bille fonctionnalisée liée à la membrane de la cellule grâce à une pince optique, et mesurer les propriétés visco-élastiques des cellules representent les deux objectifs principaux de mon projet de thèse. Pour ce faire, j'ai été formée à la culture cellulaire par Julie Lafaurie-Janvorre, post-doctorante dans l'équipe d'Abdul Barakat au LadHyX, me permettant d'être autonome sur la réalisation des échantillons biologiques.

1.2.2.3 Suivre la propagation de la force

Une fois la force exercée sur les intégrines de la cellule, il s'agit de suivre sa propagation à l'intérieur de la cellule. Pour cela, l'idée était de reprendre le rapporteur FRET de l'activité de Src publié dans [Wang 2005] en le transfectant dans nos cellules.

Le FRET (acronyme de Förster Resonance Energy Transfer) est un transfert d'énergie non radiatif de type interaction dipôle/dipôle entre deux espèces fluorescentes, l'une appelée

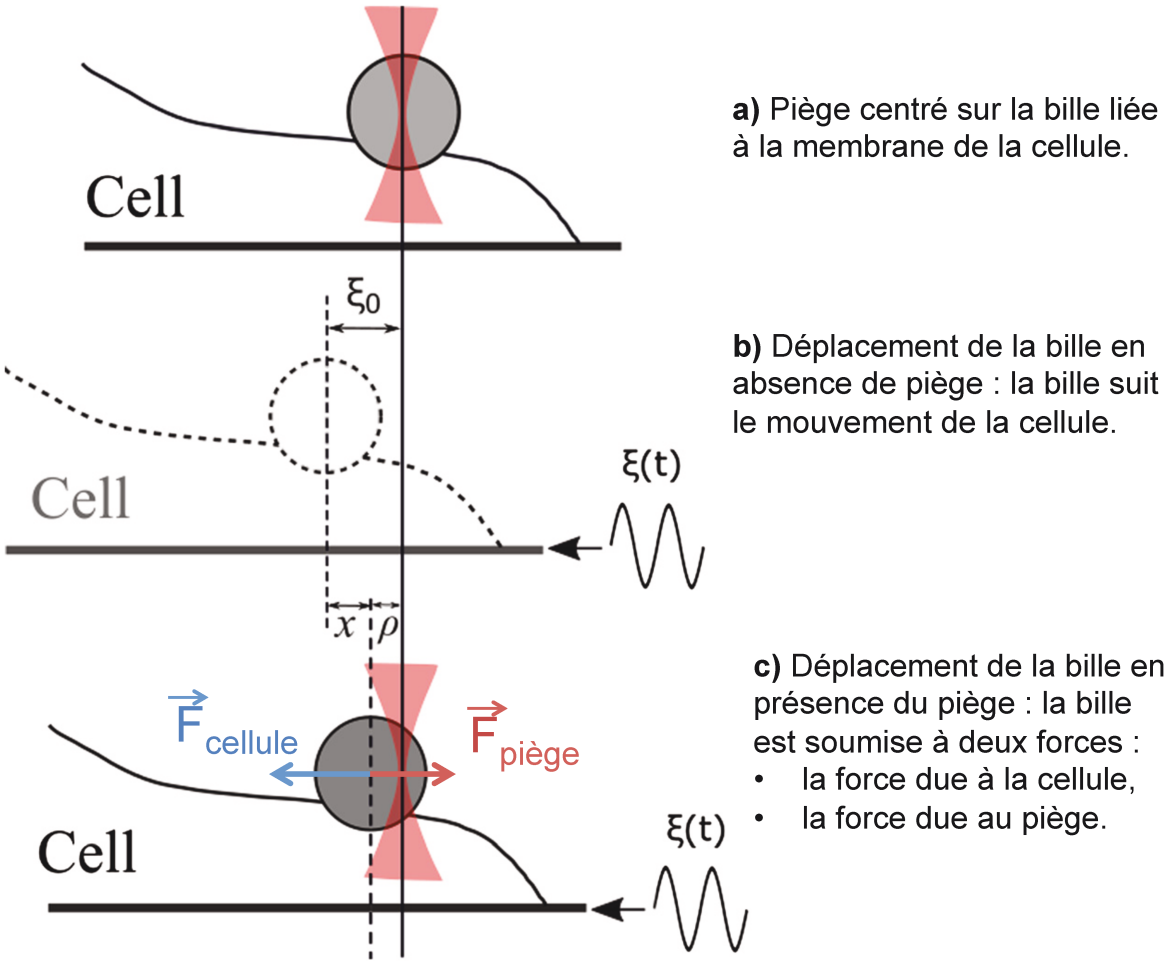


FIGURE 1.15 – Application d'une force oscillante pour une mesure de micro-rhéologie de la cellule à partir d'un piège optique et d'une platine controlée en position. Dans un premier temps la bille est centrée dans le piège (schéma du haut). La platine est ensuite déplacée avec un mouvement sinusoïdal $\xi(t)$, tout en maintenant la force de rappel du piège (schéma du bas). La bille est donc soumise à la force qu'exerce la cellule et le piège, contrairement au cas où la bille n'est pas soumise à la force du piège (schéma du centre). Adaptée de [Ayala 2016].

donneur et l'autre appelée accepteur. Ce transfert d'énergie n'a lieu que lorsque les deux dipôles sont suffisamment proches, typiquement séparés de moins de 10 nm, et à condition qu'il y ait un recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Ainsi, dans le cas du rapporteur de l'activité de Src, le donneur est une protéine fluorescente cyan, ECFP, et l'accepteur une protéine fluorescente jaune, EYFP. Lorsqu'elles sont suffisamment proches, ECFP est excitée à 433 nm, se désexcite de façon non radiative en transférant son énergie à EYFP, qui fluoresce ensuite à 527 nm (cf. figure 1.16). A contrario, lorsque les deux protéines sont éloignées, le transfert non radiatif n'est plus possible et c'est ECFP qui émet à 476 nm.

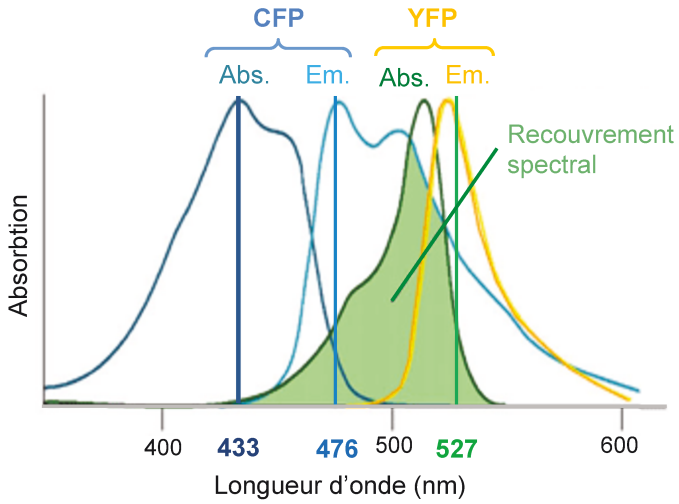


FIGURE 1.16 – Spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur d'un couple FRET, ici ECFP et EYFP. La zone de recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur permet le transfert non radiatif entre les deux protéines fluorescentes.

Dans le rapporteur, la distance entre les deux protéines fluorescentes dépend de l'activité de Src. En effet, comme cela est représenté sur la figure 1.17, le rapporteur de l'activité de Src est composé, outre les deux protéines fluorescentes, d'un domaine SH2 et d'un substrat peptidique spécifique à Src, séparés par une séquence de liaison. Le domaine SH2 (qui signifie Src Homology 2) est un domaine présent dans de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire telles que Src. Ce domaine SH2 interagit avec une tyrosine phosphorylée. Lors de la transduction, Src, par son activité de tyrosine kinase, phosphoryle des résidus tyrosines se trouvant sur le substrat du rapporteur (les acides aminés notés Y). Ensuite, le domaine SH2 du rapporteur peut interagir avec le substrat du rapporteur conduisant à un changement de conformation donnant lieu à un éloignement des deux protéines fluorescentes ECFP et EYFP, se trouvant aux extrémités N et C terminales. De fait, lorsque Src est activée, l'émission à 527 nm d'EYFP est stoppée, au profit de l'émission à 476 nm d'ECFP. L'activité de Src est donc détectée selon la longueur d'onde émise par le rapporteur.

Tout l'enjeu est d'observer des niveaux différents de FRET selon l'activation ou non de Src. Julie Lafaurie-Janvorre, post-doctorante dans l'équipe d'Abdul Barakat, était en charge de

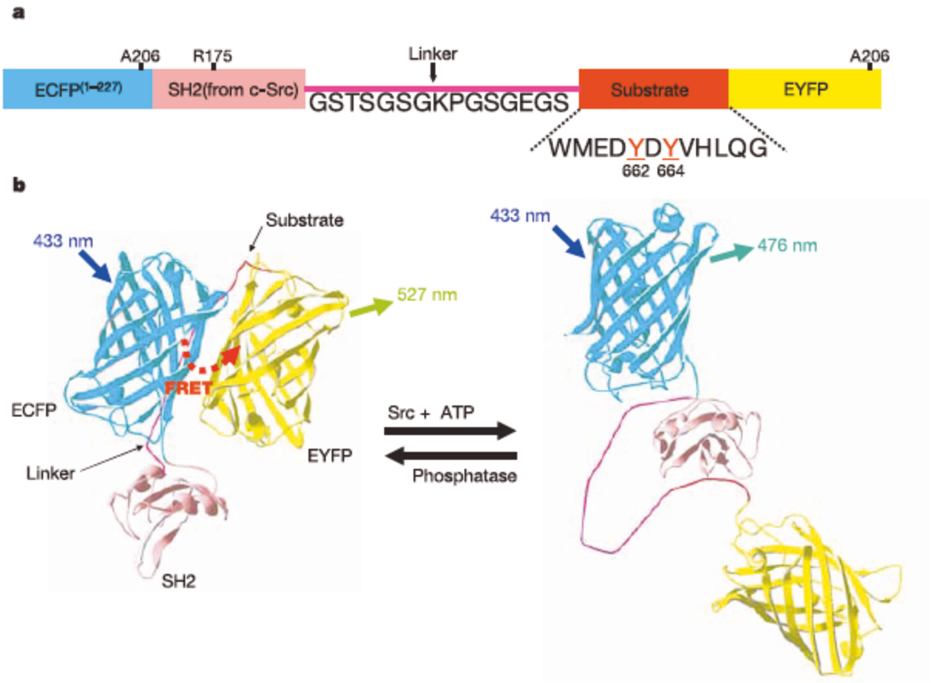


FIGURE 1.17 – Rapporteur FRET de l'activité de Src. (a) Composition du rapporteur avec les protéines fluorescentes aux extrémités N et C terminales (ECFP et EYFP), le domaine SH2, une séquence de liaison et le peptide substrat de Src contenant 2 tyrosines (Y). (b) Changement conformationnel du rapporteur en fonction de l'activation de Src : lorsque Src n'est pas active, le substrat et le domaine SH2 n'interagissent pas. ECFP et EYFP sont alors proches et l'efficacité de FRET est élevée. Sous excitation à 433 nm, il existe un transfert non radiatif de type Förster (FRET) entre les deux protéines fluorescentes, les photons sont alors préférentiellement émis à 527 nm. A contrario, lorsque Src est activée, le substrat est phosphorylé par Src et interagit avec le domaine SH2 du rapporteur donnant lieu à un éloignement des deux protéines fluorescentes. Sous excitation à 433 nm, les photons sont alors préferentiellement émis à 475 nm par fluorescence d'ECFP. Extraite de [Wang 2005].

cette partie. Cette technique implique aussi de prévoir une combinaison pince optique/microscopie de fluorescence dans le montage.

1.2.2.4 Induire une orientation préférentielle des filaments d'actine

Afin de vérifier si une force appliquée orthogonalement aux fibres de stress se propage effectivement beaucoup plus vite qu'une force appliquée longitudinalement, il est important d'induire une orientation préférentielle des fibres de stress au sein de la cellule. Pour cela, nous utilisons une technique de micro-structuration du substrat, développée par Julie Lafaurie-Janvorre, comme dans [Hu 2004] (cf. figure 1.18). Une fois le protocole établi, je l'ai appliqué sur mes propres cultures cellulaires afin d'être autonome dans la réalisation des échantillons biologiques permettant de valider le montage.

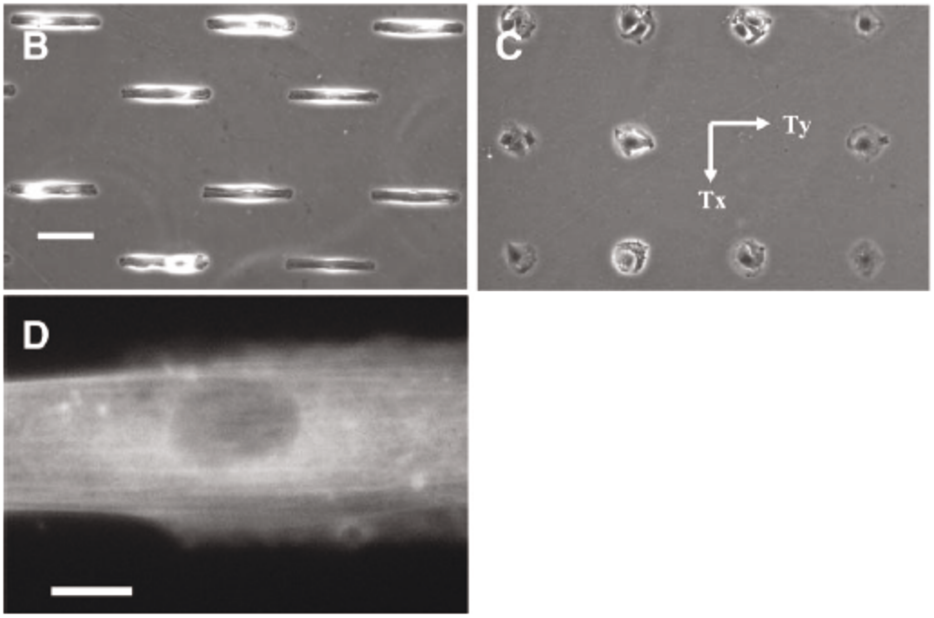


FIGURE 1.18 – Effet de la microstructuration du substrat sur les cellules adhérentes et notamment sur l'orientation des fibres de stress. (B) et (C) Images en contraste de phase de cellules ayant adhéré sur des motifs rectangulaires de rapport d'aspect 9.75 : 1 (B), ou ronds (C). Les barres d'échelle sur ces deux images correspondent à 100 µm. (D) Image de microscopie de fluorescence avec marquage des filaments d'actine, correspondant à une cellule ayant adhéré sur un substrat rectangulaire. Ces filaments sont orientés selon l'axe allongé de la cellule. La barre d'échelle correspond à 10 µm. Adaptée de [Hu 2004].

1.2.2.5 Imager les cellules en trois dimensions

Idéalement on aimerait imager la cellule et le cytosquelette en trois dimensions afin de visualiser la topographie de la cellule où est collée la bille, les fibres de stress liées à la bille et les éventuels déplacements du noyau au cours de la déformation de la membrane de la cellule.

Pour cela, nous avons pensé à la tomographie par cohérence optique (OCT pour l'acronyme anglais) plein champ.

Cette technique développée dans les années 1990 [Huang 1991, Beaurepaire 1998, Dubois 2002] peut se voir comme une analogie optique de l'échographie, mesurant les ultra-sons réfléchis par les tissus. L'OCT plein champ est basée sur un interféromètre de Michelson possédant deux objectifs de microscope identiques, un dans chaque bras, éclairés en lumière blanche, donc faiblement cohérente (cf. figure 1.19). Dans un des bras on dispose l'échantillon biologique, et dans l'autre une surface de référence. les deux sont illuminés en plein champ grâce à un éclairage en configuration Köhler. La faible cohérence de l'illumination implique que seuls les photons rétro-diffusés autour d'une profondeur donnée de l'échantillon interfèrent avec le faisceau de référence (après rétro-diffusion par la surface de référence). On obtient ainsi l'image en face de l'échantillon à cette profondeur donnée. La modification de la distance entre l'échantillon biologique et l'objectif de microscope permet de translater cette fine tranche, et ainsi de sonder l'échantillon en profondeur. On obtient donc une pile d'images en face à partir desquelles une image en trois dimensions de l'échantillon est reconstituée. Le contraste des images provient du changement d'indice entre les différents constituants de l'échantillon biologique. On peut ainsi par exemple reconstituer une image de Xenopus laevis dont l'image en face montre bien les cellules (cf. figure 1.20).

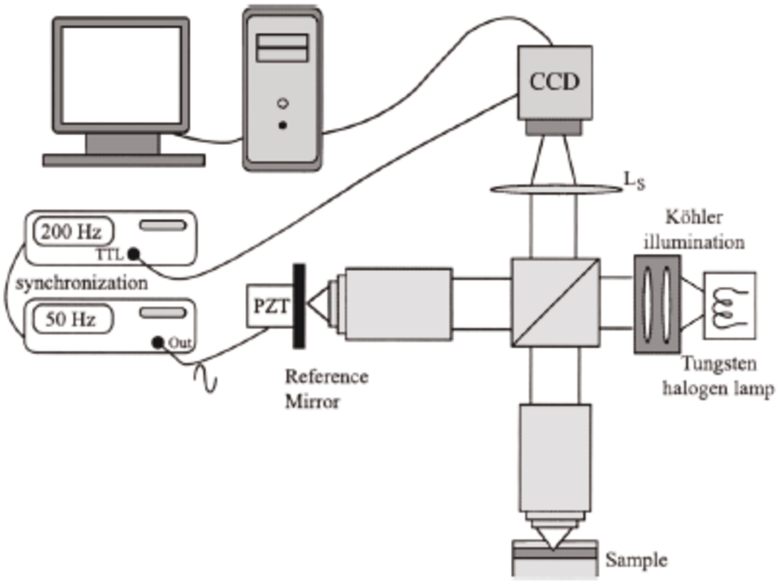


FIGURE 1.19 – Schéma d'un interféromètre de Michelson avec deux objectifs identiques à immersion dans l'eau. L'objectif dans le bras de référence collecte les photons réfléchis par le miroir de référence tandis que celui dans le bras de l'échantillon collecte les photons rétro-diffusés par l'échantillon. Seuls les photons provenant de la tranche en gris foncé interfèrent avec ceux du bras de référence pour donner lieu à l'image en face de cette section de l'échantillon. Extraite de [Vabre 2002].

Lorsqu'on souhaite combiner piégeage optique et imagerie par OCT, l'enjeu est de balayer la cellule en épaisseur tout en maintenant le piège fixe. Pour cela, l'objectif du bras de référence

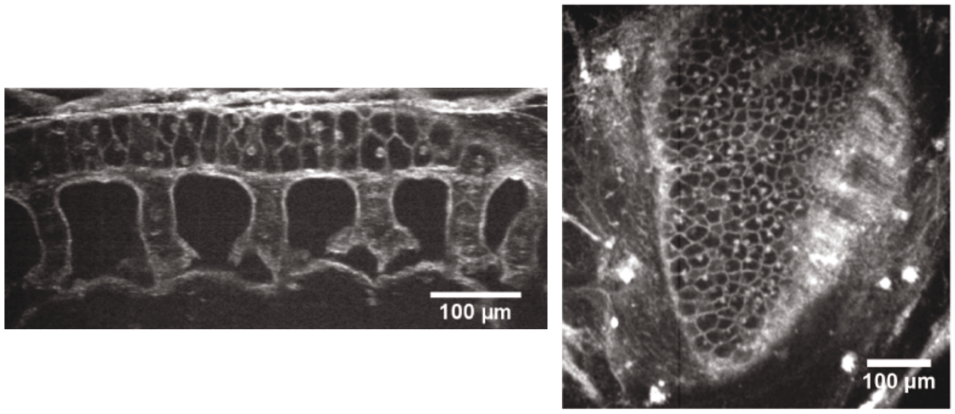


FIGURE 1.20 – Images OCT d'un Xenopus laevis. A gauche coupe après reconstitution de la pile d'images. A droite image en face. Extraite de [Ogien 2016].

sert aussi à effectuer le piège optique. Ceci étant, cet objectif doit rester fixe au cours du balayage pour que le piège reste fixe. Cela suppose donc d'adapter le montage classique d'OCT, en déplaçant non pas l'échantillon biologique pour le sonder en profondeur, mais le miroir de référence et la caméra. Cette partie sera explorée en collaboration avec l'équipe d'Arnaud Dubois, membre du groupe Biophotonique du Laboratoire Charles Fabry, et spécialiste de la tomographie par cohérence optique.

Ainsi, il s'agit d'un projet pluri-disciplinaire faisant appel à des compétences en biologie cellulaire, microstructuration de substrat, instrumentation optique, automatisation, traitement des données, etc. Ma part principale était donc de développer le montage de pince optique dédié à l'étude de la mécanotransduction dans les cellules endothéliales. La suite de ce chapitre présente les méthodes optiques adaptées au projet et les méthodes de calibration mises en œuvre au cours de ma thèse.

1.3 Le piégeage optique : principe et mise en œuvre

Afin de réaliser les expériences de mécano-transduction dans les cellules endothéliales, une force locale est appliquée sur la membrane de la cellule via une bille micrométrique piégée par un faisceau laser. Dans cette section, je vais d'abord revenir sur le principe du piégeage optique en présentant les différentes forces mises en jeu. Ensuite, je décrirai le montage de pince optique réalisé dans l'équipe avant ce projet de thèse, puis les adaptations de ce montage à mettre en œuvre afin de répondre aux contraintes imposées par notre système biologique.

1.3.1 Principe du piégeage optique

La réalisation d'une pince optique à partir de deux faisceaux lasers contra-propageants permettant de piéger une bille micrométrique, par A. Ashkin dans les années 70 [Ashkin 1970], a ouvert la voie vers la manipulation d'objets micrométriques (allant de la dizaine de nm à la dizaine de µm) pour répondre à des problématiques biologiques. Ainsi, dans cette première

expérience, A. Ashkin utilise l'interaction entre la lumière et la particule, et notamment la force de pression de radiation, qui pousse la bille dans le sens de propagation des photons.

Dans les années 80, s'ensuit la réalisation d'un piège optique à partir d'un seul faisceau laser focalisé [Ashkin 1986]. Les forces mises en jeu sont :

- la force de pression de radiation, qui contribue, comme dans le cas précédent, à pousser la bille dans le sens de propagation de la lumière,
- la force de piégeage, dite force de gradient d'intensité, car elle est proportionnelle au gradient d'intensité du faisceau laser. Cette force attire la bille vers le point de plus forte intensité, i.e. le point de focalisation du laser,

comme illustré sur la figure 1.21.

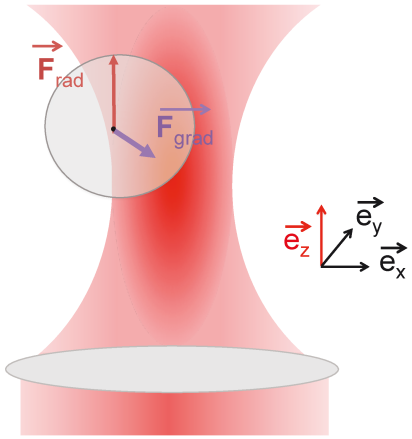


FIGURE 1.21 – Piégeage d'une bille à partir d'un seul faisceau laser, mettant en jeu la force de gradient d'intensité et la force de pression de radiation. La lumière se propage selon le vecteur $\vec{e}_z$. $(\vec{e}_x, \vec{e}_y)$ définit le plan tranverse à la direction de propagation du faisceau.

Dans le plan transverse à l'axe de propagation du faisceau de piégeage, seule la force de gradient agit sur la bille. En revanche, dans la direction longitudinale de propagation des photons, il ne peut y avoir piégeage qu'à partir du moment où la force de gradient longitudinale contre la force de pression de radiation pour amener la bille dans une position d'équilibre. Ceci implique donc de créer un fort gradient d'intensité en longitudinal, ou autrement dit d'avoir une grande divergence du faisceau lumineux. Ceci est réalisé grâce à la focalisation par une lentille de grande ouverture numérique (notée ON en abrégé), typiquement un objectif de microscope à immersion (ON>1).

Une fois la bille piégée, le piège agit comme un ressort sur la bille, si celle-ci effectue de petits déplacements autour de son point d'équilibre (de l'ordre de quelques centaines de nm). Ainsi, la force exercée par le piège sur la bille s'écrit comme le produit de la constante de raideur k du piège et du déplacement Δx de la bille par rapport à sa position d'équilibre, $F = -k\Delta x$, comme dans le cas d'un système masse-ressort. La constante de raideur est de l'ordre de 0.1 à 1 pN/nm, créant des forces de l'ordre de quelques dizaines pN.

Il existe deux modèles limites prédisant l'expression de la force selon la dimension caractéristique de la particule, a, par rapport à la longueur d'onde de piégeage λ, qui est de l'ordre

de 1 µm [Svoboda 1994] :

- si $a >> \lambda$, les rayons peuvent être décrits par l'optique géométrique faisant intervenir un phénomène de réflexion et de réfraction à la traversée de la bille. Le piégeage optique peut alors se comprendre à partir des transferts de quantités de mouvement entre les photons du faisceau de piégeage et la particule à piéger.
- si $a << \lambda$, la bille peut être vue comme un dipôle électrique soumis à un champ électrique ; on parle alors du régime de Rayleigh. Cette approche permet de calculer l'expression des forces, mettant ainsi en valeur la dépendance de la force de piégeage avec le gradient d'intensité.

Cependant, dans le cadre des expériences biologiques, les particules sont généralement de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde (autour de 1 µm). Il n'existe pas de solution analytique simple dans ce cas là, bien qu'on puisse utiliser la théorie de Mie. Néanmoins, une équipe a mis au point un modèle permettant de prédire de façon assez proche la constante de raideur transverse pour des billes de rayons voisins de la longueur d'onde [Viana 2007].

1.3.1.1 Régime de l'optique géométrique : $a >> \lambda$

Lorsque la taille de la particule a est grande devant la longueur d'onde du laser de piégeage λ, le piégeage optique d'une particule telle qu'une bille peut simplement être décrit en suivant les lois de l'optique géométrique. Ainsi, à l'interface entre le milieu d'indice n_m et la bille d'indice n_b, on assiste au phénomène de réflexion et de réfraction. Il est à noter que le piégeage ne peut avoir lieu que si l'indice de la bille est supérieur à l'indice du milieu. Les photons réfractés contribuent alors à la force de gradient qui permet de piéger la bille tandis que les photons réfléchis créent la force de pression de radiation, et donc poussent la bille dans le sens de propagation des photons. Ces forces peuvent être expliquées par le transfert de la quantité de mouvement entre les photons du laser et la bille. En effet, d'après la loi de conservation de la quantité de mouvement, la différence de quantité de mouvement observée par les photons au passage de la bille est transférée à la bille, autrement dit :

$$\Delta \overrightarrow{p}_{photons} = \overrightarrow{p}_{après} - \overrightarrow{p}_{avant} = -\Delta \overrightarrow{p}_{bille} \tag{1.1}$$

D'un point de vue purement optique géométrique, après passage par l'objectif de microscope les rayons convergent en un point puis divergent. Ceci crée le gradient d'intensité responsable de la force de piégeage. Ce gradient est d'autant plus important que la lumière est focalisée, d'où l'utilisation de grandes ouvertures numériques. Cette approche permet d'expliquer le piégeage longitudinal, par rapport à la direction de propagation des photons.

Forces impliquées dans la direction longitudinale Dans la direction longitudinale, deux forces interviennent : la force de gradient qui permet de piéger la bille et la force de pression de radiation qui pousse la bille dans la direction de propagation des photons. Il faut donc considérer les photons réfractés et les photons réfléchis par la bille. Ceci est représenté sur la figure 1.22 dans le cas où la bille est située en amont ou en aval du point focal. Nous considérons ici que la bille est centrée sur l'axe optique, ce qui implique par symétrie une annulation des contributions transverses.

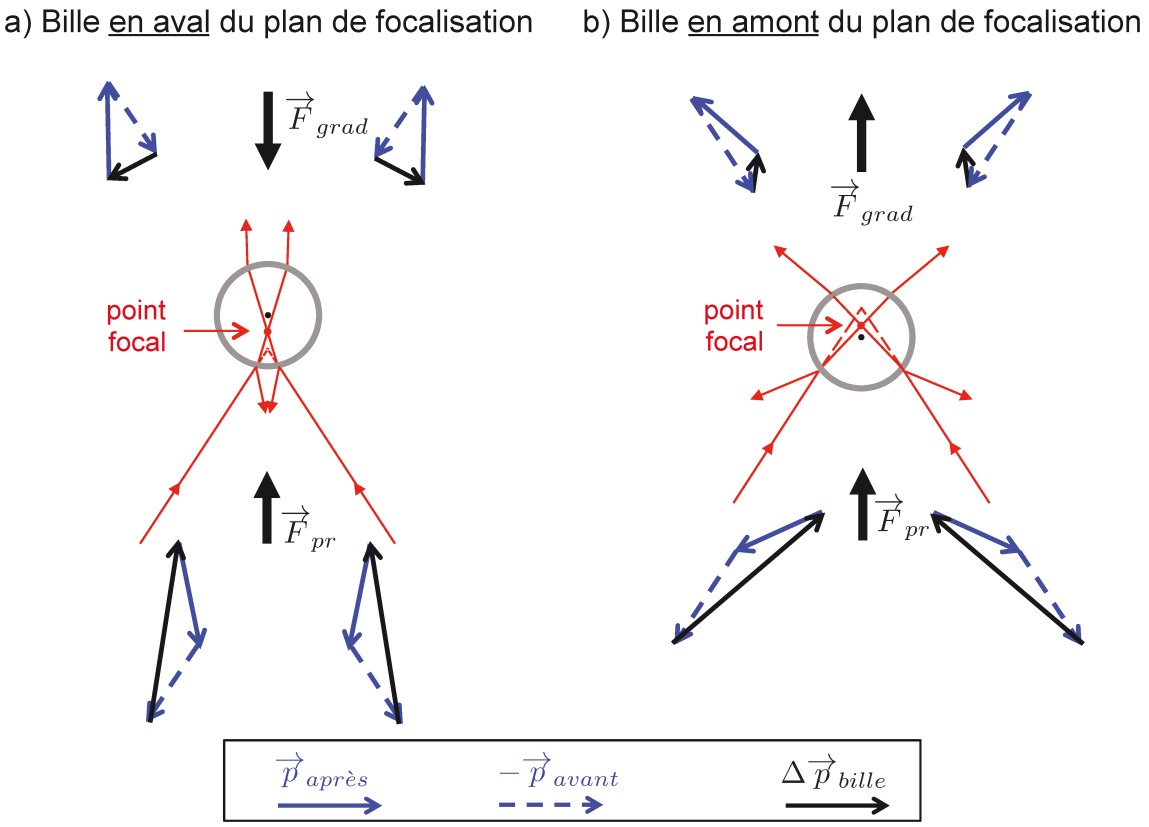


FIGURE 1.22 – Forces exercées dans la direction longitudinale. La force de pression de radiation due aux photons réfléchis par la bille, est dirigée dans la direction de propagation du faisceau laser et éloigne la bille du centre du piège, si celle-ci est positionnée en aval du plan de focalisation (a). A contrario, la force de gradient d'intensité, due aux photons réfractés par la bille, est dirigée vers le point de plus forte intensité et ramène la bille vers le centre du piège, que la bille soit en amont (b) ou en aval (a) du point de focalisation. Les flèches en bleu désignent les quantités de mouvement des photons, avec en trait pointillé avant interaction avec la bille, et en trait plein après). Les flèches noires désignent le transfert de quantité de mouvement de la bille.

- Quelle que soit la position de la bille par rapport au centre du piège, pour chaque rayon considéré, la différence de quantité de mouvement subie par les photons réfléchis est dirigée vers le bas. Ainsi, d'après la relation 1.1, la force de pression de radiation ressentie par la bille est dirigée vers le haut.
- A l'inverse, la différence de quantité de mouvement des photons réfractés change de sens selon que la bille est située en amont ou en aval du point de focalisation. Ainsi, si la bille est située en amont du point focal, la force de gradient longitudinale sera dirigée vers le haut (cf. figure 1.22b), tandis que si elle se trouve en aval, elle sera dirigée vers le bas (cf. figure 1.22a). Finalement, la force de piégeage est dirigée vers le point focal, qui est le point de plus forte intensité, quelle que soit la position de la bille, vérifiant son appellation de force de gradient d'intensité. Il est à noter que ceci n'est vrai que parce que l'indice de la bille est supérieur à l'indice du milieu.

La bille n'est piégée, qu'à condition que la force de gradient d'intensité longitudinale soit supérieure à la force de pression de radiation. C'est pour cela qu'en pratique la lentille de focalisation est un objectif à grande ouverture numérique, généralement supérieure à 1. Cela participe aussi à l'efficacité de piégeage dans le plan transverse car le gradient d'intensité est alors plus prononcé. D'autre part, la présence de la force de pression de radiation dans la direction longitudinale implique que la bille piégée n'est pas centrée sur le point focal mais légèrement en aval.

Force de piégeage dans le plan transverse Dans le plan transverse, seule la force de gradient d'intensité agit sur la bille. Pour l'expliquer simplement à partir du transfert de la quantité de mouvement, la divergence du faisceau n'est pas nécessaire. En effet, la diffraction crée un front d'onde localement plan proche du point de focalisation. On peut donc considérer que les rayons arrivent tous parallèles à l'axe optique. Ceci est représenté sur la figure 1.23 avec la bille décentrée dans le plan transverse par rapport au point de focalisation.

En supposant par exemple que le front d'onde est gaussien, pour une bille décalée sur la gauche, le rayon d'intensité I_1 sur la figure 1.23 est plus intense que le rayon d'intensité I_2. Ce rayon d'intensité I_1 va donc exercer une force plus grande sur la bille que le rayon d'intensité I_2, de sorte qu'en sommant les contributions des transferts de quantité de mouvement de chacun des rayons, la bille ressentira une force la ramenant vers le point de plus forte intensité, i.e. le centre du piège.

Ainsi, l'approche dans le cadre de l'optique géométrique permet de représenter simplement les forces mises en jeu dans le piégeage optique. Il est également possible d'exprimer ces forces en sommant la contribution de tous les rayons, en tenant compte de l'angle d'incidence des rayons, de l'angle de réfraction et du rayon de la bille [Ashkin 1992].

1.3.1.2 Régime de Rayleigh : $a << \lambda$

Lorsque la bille est petite devant la longueur d'onde du faisceau, l'interaction entre la bille et la lumière peut être vue comme celle entre un dipôle induit et un champ électrique, ce qui permet d'exprimer analytiquement les forces de gradient d'intensité et la force de pression de radiation.

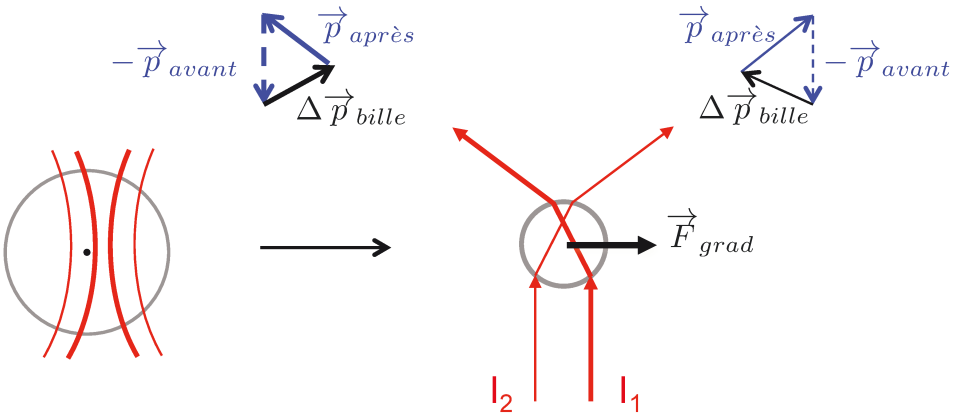


FIGURE 1.23 – Force de gradient dans le plan tranverse. La bille est décalée sur la gauche par rapport au piège. La réfraction des photons entraîne la génération d'une force sur la bille dirigée vers la droite, ramenant la bille vers le centre du piège. Les flèches en bleu désignent les quantités de mouvement des photons, avec en trait pointillé avant interaction avec la bille, et en trait plein après). Les flèches noires désignent le transfert de quantité de mouvement de la bille. L'épaisseur des traits traduit l'intensité du rayon considéré avec $I_1 > I_2$.

Forces de gradient d'intensité Le moment dipolaire induit d'une sphère de rayon R et de polarisabilité α s'exprime en fonction du champ électrique $\overrightarrow{E}$ selon :

$$\overrightarrow{p} = \alpha\overrightarrow{E} \quad \text{avec} \quad \alpha = n_m^2 R^3 \left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right) \quad \text{et} \quad m = n_b/n_m \tag{1.2}$$

n_b et n_m désignant les indices optiques de la bille et du milieu respectivement. L'énergie potentielle du dipôle induit s'écrit : $U = -\overrightarrow{p}.\overrightarrow{E}$, d'où l'expression de la force de gradient qui dérive de ce potentiel :

$$\overrightarrow{F}_{grad} \propto -\frac{1}{2}\,\alpha\,\overrightarrow{\nabla} I \quad \text{avec} \quad I \propto |E|^2 \tag{1.3}$$

Ainsi, la force de gradient d'intensité est bien proportionnelle au gradient d'intensité.

A partir de la relation 1.3, on peut remarquer plusieurs points :

- Le piégeage n'est possible que si $m > 1$, soit $n_b > n_m$, ce qui est le cas des billes de silice ($n_b = 1.45$) ou de polystyrène ($n_b = 1.57$) dans l'eau ($n_m = 1.33$).
- La force de gradient est d'autant plus grande que le rayon de la bille est important, avec une dépendance en R^3

En considérant par exemple un profil d'intensité gaussien de waist ω, dans le plan transverse l'intensité est reliée à la puissance P par la relation :

$$I(r) = \frac{2P}{\pi\omega^2} e^{-2r^2/\omega^2} \tag{1.4}$$

On obtient ainsi l'expression de la force de gradient dans le plan transverse, qui est bien proportionnelle à la puissance :

$$F_{grad}(r) = \frac{4\,\alpha\,r}{\omega^4\,c\,n_m^2} P e^{-2r^2/\omega^2} \tag{1.5}$$

Force de pression de radiation L'expression de la force de radiation est donnée par la relation [Ashkin 1986] :

$$\overrightarrow{F}_{pr} = \frac{128\ \pi^5\ R^6}{3\ \lambda^4\ c/n_m} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)^2\ I\ \overrightarrow{e_z} \tag{1.6}$$

où $\overrightarrow{e_z}$ est la direction de propagation du faisceau laser. Ainsi, la force de pression de radiation est bien dirigée dans le sens de propagation de la lumière.

A partir de la relation 1.6, on peut remarquer plusieurs points :

- Cette force est d'autant plus difficile à contrer par la force de gradient longitudinale que la différence entre les indices de la bille et du milieu est importante. En effet, la force de gradient dépend linéairement du terme $\left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)$ (cf. expressions 1.2 et 1.3) tandis que la force de pression de radiation exprime une dépendance quadratique par rapport à celui-ci (cf. expression 1.6). Cela implique que le décalage entre le point de focalisation du laser et le centre de la bille piégée est d'autant plus grand que la différence d'indice est importante.
- La force de pression de radiation est d'autant plus importante que le rayon de la bille est grand, avec une dépendance en R^6 (contre une dépendance en R^3 pour la force de gradient).

1.3.1.3 Théorie de Mie-Debye avec prise en compte de l'aberration sphérique : $a \approx \lambda$

Dans la plupart des expériences biologiques, les particules sont de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde, ne permettant pas l'utilisation de l'un ou de l'autre modèle. Récemment un modèle basé sur la théorie de Mie-Debye tenant compte de l'aberration sphérique (MDSA pour l'acronyme anglais) a été confronté aux résultats expérimentaux [Viana 2007]. La figure 1.24 représente les prédictions suivant la théorie de l'optique géométrique, les prédictions suivant la théorie MDSA et les résultats expérimentaux de la constante de raideur dans le plan transverse, normalisée par la puissance, pour des rayons de billes variant de 0.1 µm à 6.5 µm. Expérimentalement, la constante de raideur augmente rapidement avec le rayon jusqu'à 1.0 µm, puis décroît plus lentement. L'optique géométrique prévoit une décroissance monotone et les résultats sont comparables pour des rayons supérieurs à 1 µm. La théorie MDSA prévoit la même allure que les résultats expérimentaux, bien que les calculs sur-estiment la constante de raideur pour des billes de rayons inférieurs à 1 µm. Néanmoins, cette théorie a le mérite de faire la jonction entre le régime de Rayleigh et le régime de l'optique géométrique.

1.3.1.4 Résumé

Ainsi, il est possible de piéger des particules diélectriques micrométriques grâce à un faisceau laser fortement focalisé par un objectif à grande ouverture numérique, typiquement supérieure à 1. La force exercée par la lumière peut être assimilée à une force de rappel $F = -k\Delta x$, avec k la constante de raideur du piège et Δx la distance entre la position du centre de la bille et celle du centre du piège. Il existe plusieurs théories pour prédire cette force, cependant les conditions expérimentales sont différentes d'un montage à un autre et il est préférable de calibrer le piège expérimentalement afin de déterminer la constante de raideur k et de mesurer

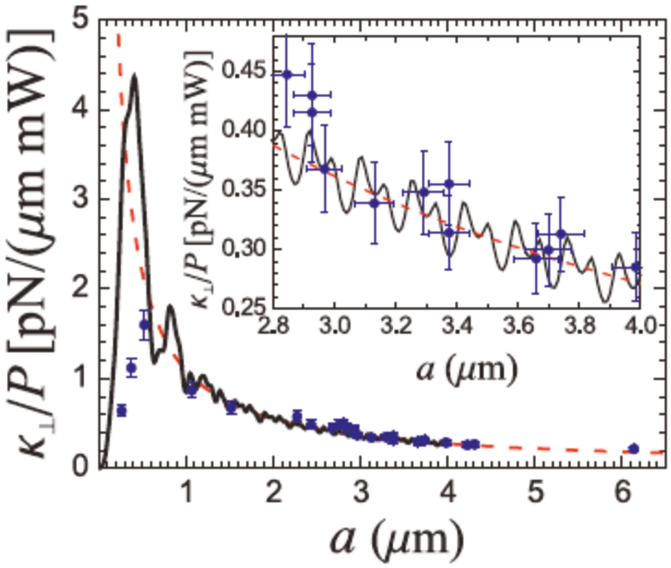


FIGURE 1.24 – Constante de raideur dans le plan transverse normalisée par la puissance en fonction du rayon de la bille noté a. Les billes sont en polystyrène ($n_b = 1.576$) dans de l'eau déionisée ($n_m = 1.332$) piégées à une hauteur de 3 µm avec une longueur d'onde de 1064 nm et un objectif d'ouverture 1.4. L'encart est un agrandissement des résultats pour des rayons allant de 2.8 µm à 4 µm. La courbe noire représente les résultats issus des calculs suivant la théorie de Mie-Debye tenant compte de l'aberration sphérique. La courbe en pointillé rouge représente les prédictions suivant les lois de l'optique géométrique. Les points bleus représentent les mesures expérimentales. Extraite de [Viana 2007].

la distance entre la position de la bille et le piège Δx. Cela fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre. Avant cela, les considérations expérimentales concernant le montage à mettre en œuvre sont abordées.

1.3.2 Point de départ du montage

Comme mentionné précédemment, avant que ce projet ne naisse, un montage de pince optique avait été développé dans l'équipe, notamment au cours de la thèse d'Antoine Le Gall. Le but du montage était d'étudier la synthèse des protéines en molécule unique grâce à la combinaison d'une pince optique et d'un microscope de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM). La partie du montage dédiée au piégeage optique est représentée sur la figure 1.25. Le faisceau laser est focalisé, après mise en forme par différents télescopes, par un objectif de microscope à grande ouverture numérique (1.45, à immersion dans l'huile). Après interaction avec la bille piégée, le faisceau est transmis par un condenseur de grande ouverture numérique (1.4, à immersion dans l'huile) avant d'être envoyé sur une photodiode à quatre quadrants. Deux particularités de ce montage sont à remarquer car elles seront utilisées dans le montage de notre projet :

- Le déflecteur acousto-optique est conjugué avec le plan focal arrière de l'objectif afin d'effectuer une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon. Ceci sera expliqué dans le chapitre 2 dédié au montage.
- Le détecteur est positionné dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur permettant de ne détecter que les mouvements relatifs de la bille par rapport au piège [Visscher 1996, Gittes 1998]. En effet, dans ce cas là, on détecte l'angle de déflexion après réflexion sur la bille, directement relié à la position de la bille par rapport au piège. Cela sera également expliqué dans le chapitre 2.

1.3.3 Les adaptations du montage pour le projet

Comme décrit dans la partie 1.2.2, le montage de pince optique doit permettre d'appliquer des forces locales sur la surface des cellules via des billes liées aux intégrines. Ceci suppose donc de pouvoir observer les cellules qui sont des échantillons faiblement contrastés en amplitude. C'est pourquoi une première adaptation consiste à combiner un dispositif de microscopie à contraste de phase, usuellement utilisé pour imager les cellules, au montage de pince optique.

D'autre part, travailler avec des cellules implique également d'avoir un accès facile à l'échantillon permettant l'injection des billes, l'ajout du milieu de culture, etc. Or, cet accès est rendu difficile dans un montage de pince optique où la détection de la position de la bille se fait en transmission comme dans le montage d'Antoine Le Gall (cf. figure 1.25). En effet, dans ce cas là les photons sont collectés par un condenseur à immersion, ce qui conduit à bloquer l'accès à l'échantillon. De plus, les dispositifs à contraste de phase commerciaux ne prévoit pas l'utilisation d'un condenseur à immersion. Pour ces deux raisons, une seconde adaptation majeure au dispositif optique sera la mise en place d'une détection de la position de la bille en utilisant le faisceau réfléchi par celle-ci.

Nous verrons dans la suite de ce manuscrit les implications profondes de ces adaptations (combinaison du montage de pince optique avec la microscopie à contraste de phase et détection des photons rétro-diffusés par la bille) sur la calibration du montage de pince optique. En

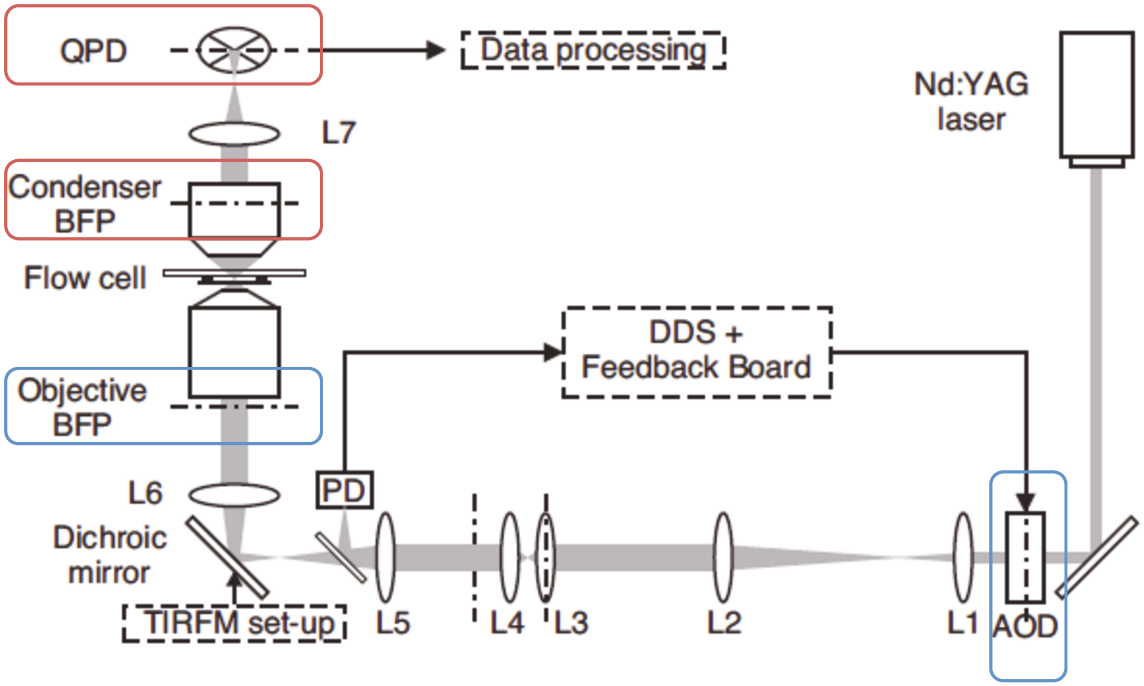


FIGURE 1.25 – Montage de pince optique développé dans l'équipe au cours de la thèse d'Antoine Le Gall. Ce dispositif est composé d'un laser Nd :YAG émettant à 1064 nm, d'un déflecteur acousto-optique (AOD), de trois télescopes (L_1, L_2), (L_3, L_4) et (L_5, L_6), assurant la mise en forme du faisceau et le relais de pupille, d'un objectif à immersion dans l'huile ouvert à 1.45, d'un condenseur à immersion dans l'huile ouvert à 1.4 et d'une photodiode à quatre quadrants (QPD). Le déflecteur acousto-optique est conjugué avec le plan focal arrière (BFP) de l'objectif, tandis que le détecteur est conjugué avec le plan focal arrière du condenseur. Extrait [Le Gall 2010].

attendant, une description succinte de ces deux aspects est donnée dans la suite, avant de conclure sur les différentes spécificités du montage réalisé au cours de ma thèse.

1.3.3.1 Microscopie à contraste de phase

La microscopie à contraste de phase a été développée par Frederik Zernike dans les années 1930, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1958. Cette technique permet d'imager des objets transparents, qui se manifestent uniquement par une modification de la phase des rayons qui le traversent, ce qui convient très bien aux échantillons biologiques tels que les cellules, comme en témoigne la figure 1.26.

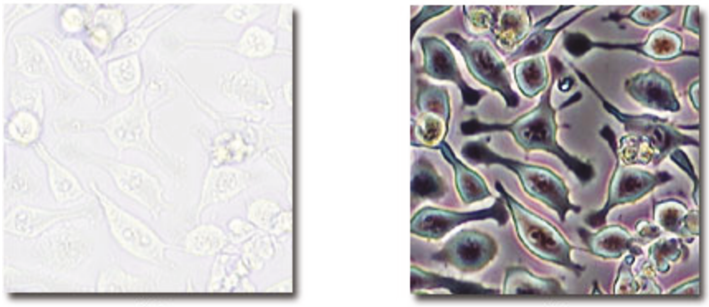


FIGURE 1.26 – Comparaison de l'imagerie de cellules avec (à droite) et sans (à gauche) contraste de phase. Images provenant du site de Nikon.

Principe de l'imagerie à contraste de phase Pour comprendre le principe de la microscopie à contraste de phase, considérons un objet faiblement déphasant. Sa transmission en amplitude s'écrit $t = e^{i\Phi}$, où Φ est le déphasage de l'objet. En faisant un développement limité à l'ordre 1, il vient : $t \simeq 1 + i\Phi$. On s'aperçoit alors que l'on peut interpréter l'onde se propageant au travers de cet objet comme la somme de deux ondes :

- une onde non perturbée par l'objet d'amplitude $A_0 \propto 1$, correspondant aux rayons directement transmis comme si l'objet était absent,
- une onde perturbée par le passage par l'objet portant l'information de phase que représente l'objet. Celle-ci a une amplitude $A_\Phi \propto i\Phi$, très faible ($\Phi << 1$) et déphasée de $\pi/2$ par rapport à l'onde non perturbée.

L'onde non perturbée se propage tout droit tandis que l'onde perturbée est diffractée. Dans le plan image, les deux ondes se recombinent et interfèrent. Cependant ces interférences ne donnent pas lieu à une modulation de l'intensité. En effet, l'intensité détectée correspondant à un objet de phase de transmission $t \simeq 1 + i\Phi$ vaut : $I = 1 + \Phi^2 \simeq 1$ à l'ordre 1. On ne détecte qu'un fond uniforme ! Ceci est dû à deux choses : d'une part les deux ondes sont en quadrature de phase, et d'autre part les deux ondes ont des intensités très différentes conduisant à un contraste très faible [3].

3. Le contraste dans le cas d'interférences à deux ondes dépend de l'amplitude relative des deux ondes : $C = 2\sqrt{r}/(1+r)$ avec $r = I_\Phi/I_0$. I_Φ et I_0 sont respectivement associées à l'onde perturbée, d'amplitude A_Φ, et à l'onde non perturbée, d'amplitude A_0. Ce contraste est d'autant meilleur que l'amplitude des deux ondes sont proches.

En partant de ce constat, on comprend que pour faire apparaître une modulation d'intensité à partir d'un objet de phase, il faut :

- retarder les rayons non perturbés en introduisant un déphasage de $\pi/2$, pour remettre en phase les deux ondes,
- atténuer l'amplitude des rayons non perturbés, pour obtenir deux ondes d'amplitudes voisines [4].

C'est le principe de l'imagerie à contraste de phase. Il faut donc agir sur les rayons directement transmis en laissant intacts les rayons diffractés. Cela est réalisable dans le plan de Fourier de l'échantillon, où les fréquences spatiales différentes sont séparées. Ainsi, dans le cas d'une source lumineuse ponctuelle les rayons directement transmis convergent sur l'axe (fréquence nulle), tandis que les rayons diffractés sont sur les bords (fréquences spatiales élevées), comme représenté sur la figure 1.27a. Un masque ponctuel atténuateur et déphaseur est alors positionné dans le plan de Fourier de l'échantillon, sur l'axe optique.

Dans le cas de la microscopie à contraste de phase, le plan de Fourier coïncide avec le plan focal arrière de l'objectif de microscope et la géométrie de la source lumineuse est définie par une ouverture située dans le plan focal arrière du condenseur. Pour un gain de signal, une géométrie annulaire est utilisée au détriment de la géométrie ponctuelle, comme représenté sur la figure 1.27b.

Combinaison du piégeage optique et de l'imagerie à contraste de phase Dans le montage à réaliser dans le cadre de ma thèse, il s'agit donc combiner la microscopie à contraste de phase avec la pince optique. Ceci implique donc d'utiliser le même objectif de microscope à contraste de phase pour créer le piège optique et pour imager les cellules en contraste de phase. L'enjeu réside donc dans la possibilité de piéger avec ce type d'objectif : l'anneau de phase déphaseur et atténuateur peut déteriorer le mode gaussien du piège. Cependant, l'équipe de Reihani a montré qu'il était possible de piéger des billes et de calibrer le piège réalisé avec un objectif à contraste de phase [Mahmoudi 2010].

Toutefois, il existe une seconde implication d'ordre pratique pour la combinaison des deux techniques. En effet, dans le montage réalisé par Mahmoudi et al., la détection de la position de la bille est effectuée en transmission, les photons étant collectés par le condenseur à contraste de phase. Or, il n'existe pas d'ouvertures annulaires commercialisées correspondant aux condenseurs à immersion. Les auteurs ont donc dû le fabriquer eux-mêmes sur mesure afin de collecter le signal transmis par la bille, en vue de détecter sa position. Cette contrainte est un argument supplémentaire en faveur d'une détection en réflexion, plutôt qu'en transmission.

1.3.3.2 Détection du signal rétro-diffusé par la bille

Les billes utilisées dans ce type d'expérience sont généralement en silice ou en polystyrène. Elles sont donc quasiment transparentes et présentent une faible différence d'indice optique avec le milieu (souvent de l'eau). Ainsi, elles transmettent beaucoup plus qu'elle ne réfléchissent.

4. On considère maintenant un masque de phase, déphasant de $\pi/2$ et atténuant la transmission directe par un facteur α. La transmission de l'objet s'écrit alors : $t = \alpha e^{i\pi/2} + i\Phi$. L'intensité alors perçue par la caméra vaut : $I = (\alpha + \Phi(x))^2 \simeq \alpha^2 + 2\alpha\Phi$. On fait donc apparaître un terme directement proportionnel à la phase de l'objet, i.e. on image la phase ! Le contraste vaut alors $2\alpha\Phi/\alpha^2 = 2\phi/\alpha$: il est d'autant meilleur que l'atténuation est importante.

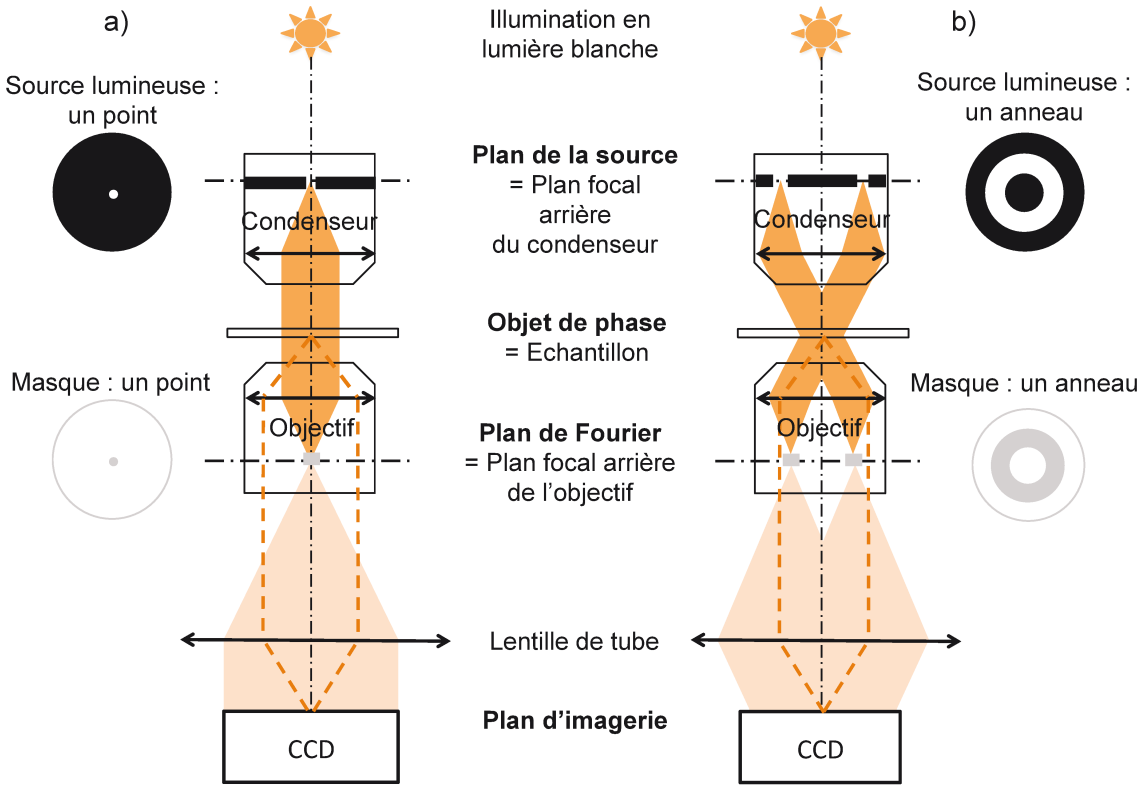


FIGURE 1.27 – Schéma de principe de la microscopie à contraste de phase. (a) Source lumineuse et masque ponctuels. (b) Source et masque annulaires. Le masque se trouve dans le plan de Fourier de l'échantillon, correspondant à l'image de la source par le condenseur et l'objectif. Le plan d'imagerie se trouve dans le plan focal de la lentille de tube. Les rayons directement transmis par l'échantillon sont atténués et déphasés par le masque permettant de révéler l'information de phase de l'échantillon, contenue dans les rayons diffractés par celui-ci.

C'est pourquoi la détection en transmission est souvent privilégiée, comme dans le montage d'Antoine Le Gall (cf. figure 1.25). Cependant, à l'instar des photons transmis par la bille qui sont collectés par un condenseur à grande ouverture numérique, les photons rétro-diffusés peuvent être collectés par le même objectif qui a servi à focaliser le faisceau pour former le piège, comme le montre la figure 1.28.

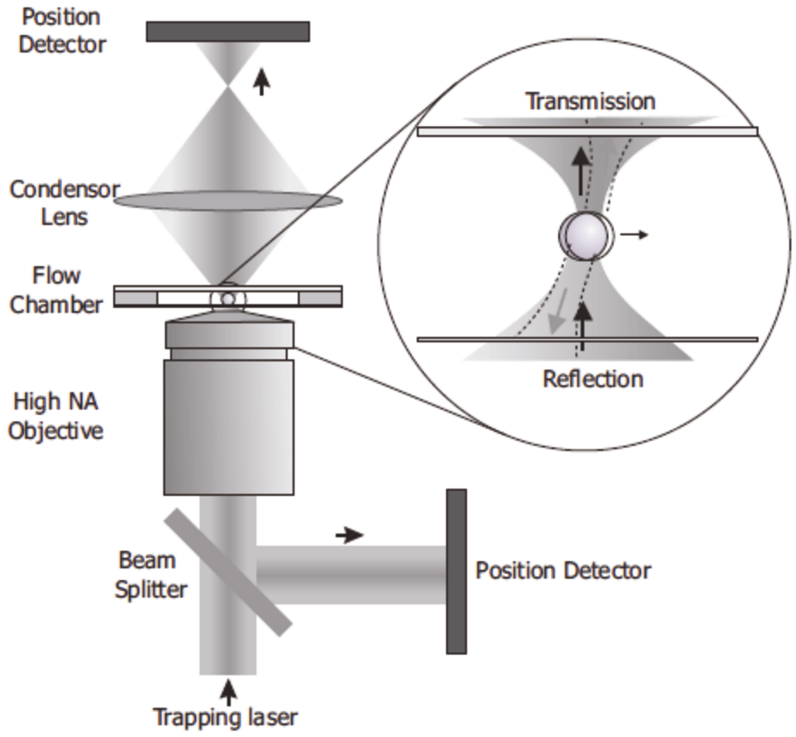


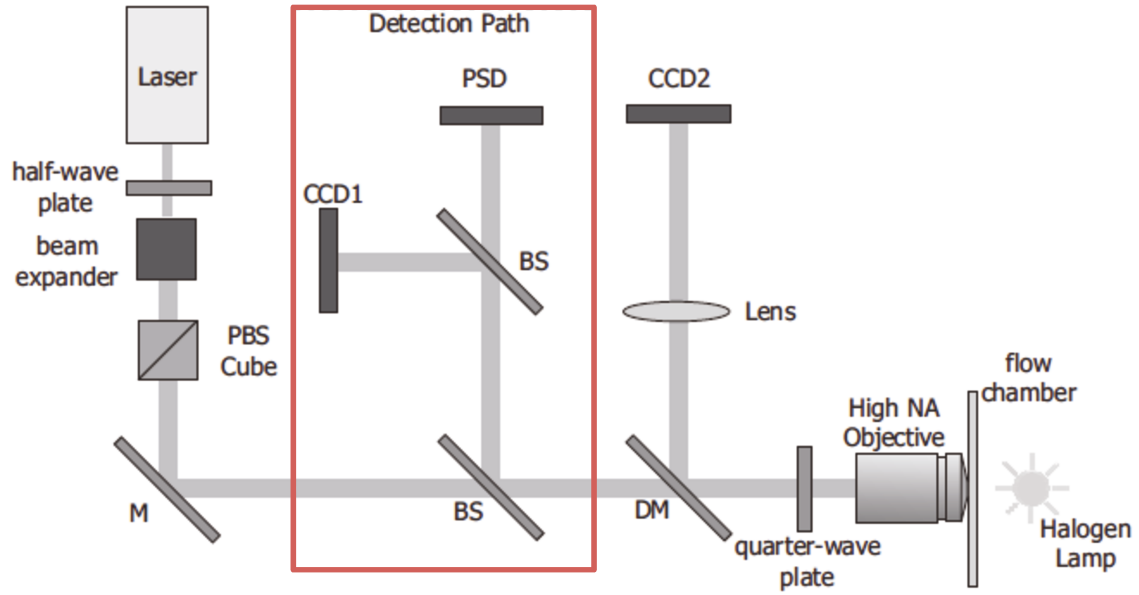
FIGURE 1.28 – Représentation des deux types de détection : en transmission via le condenseur ou en réflexion via l'objectif de piégeage. Adaptée de [Huisstede 2005].

Un montage de pince optique avec détection des photons rétro-diffusés a été réalisé par Huisstede et al. [Huisstede 2005]. Celui-ci est représenté sur la figure 1.29a. Il s'agit d'un montage de pince optique classique avec un faisceau laser mis en forme et focalisé par un objectif de microscope. Le faisceau rétro-diffusé par la bille est ensuite séparé du faisceau incident par une séparatrice, puis envoyé soit sur un détecteur de position, soit sur une caméra permettant de visualiser les signaux.

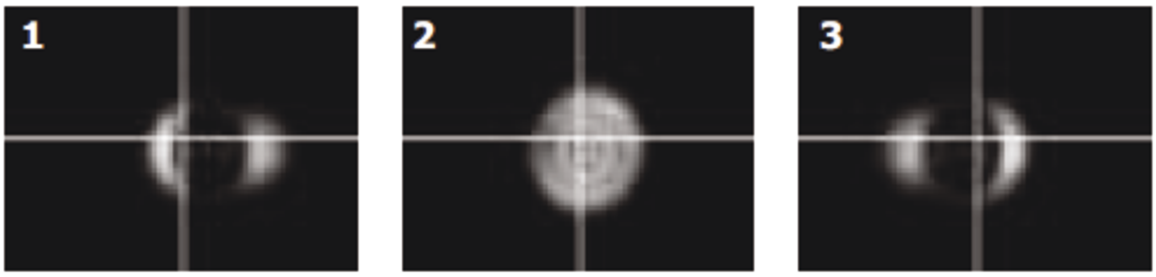
Les signaux détectés dans la configuration en réflexion selon la position centrée ou pas de la bille sont présentés sur la figure 1.29b. Dans le cas où la bille est centrée dans le piège (numéro 2) la figure est centrée et circulaire et on devine même des anneaux. Ceci est dû à un phénomène d'interférences qui sera également observé sur notre montage et détaillé dans le chapitre 3.

Il s'agit donc de modifier le montage précédent pour avoir une détection en réflexion tout en restant sensible uniquement à la position relative de la bille par rapport au piège. Pour cela, nous adapterons la conjugaison effectuée entre le plan focal arrière du condenseur et le

détecteur (cf. figure 1.25), à la détection en réflexion : le détecteur sera alors conjugué avec le plan focal arrière de l'objectif qui joue le rôle de collecteur des photons.



(a) Schéma du montage.



(b) Images des signaux détectés.

FIGURE 1.29 – Détection de la position de la bille en réflexion. (a) Schéma d'un montage avec détection des photons rétro-diffusés par la bille piégée. On peut noter qu'aucun système d'imagerie n'est représenté sur la voie de détection du détecteur de position (PSDř ou de la CCD1. (b) Images des signaux sur la CCD1, dans le cas où la bille est centrée (2), ou décentrée par rapport au piège (1 et 3). Adaptée de [Huisstede 2005].

1.3.4 Résumé sur le montage à réaliser

Ainsi, le montage de pince optique dédié à l'étude de la mécanotransduction des cellules endothéliales doit permettre :

- une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon réalisée grâce à la conjugaison

d'un déflecteur acousto-optique avec le plan focal arrière de l'objectif,

- une détection des photons rétro-diffusés par la bille piégée permettant de suivre le mouvement relatif de la bille par rapport au piège, impliquant une collecte des photons par le même objectif qui permet de focaliser le faisceau, et une conjugaison du plan focal arrière de l'objectif avec le détecteur,
- une imagerie à contraste de phase des cellules impliquant l'utilisation d'un objectif avec un anneau de phase atténuateur et déphaseur intégré dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope focalisant le faisceau de piégeage.

La mise en œuvre de ce montage est présentée au chapitre 2. Nous verrons dans le chapitre 2 l'allure des signaux dans le cas où le détecteur est conjugué avec le plan focal arrière de l'objectif à contraste de phase. Cette allure sera ensuite modélisée dans le chapitre 3.

1.4 Méthodes de calibration d'un montage de pince optique

Comme mentionné dans la partie 1.3.1, la force exercée par un piège optique sur une bille peut être simplement assimilée à une force de rappel, pour de faibles déplacements de la bille par rapport au piège. Cette force s'écrit donc comme le produit de la constante de raideur du piège k et de la distance Δx entre la position de la bille et le centre du piège. Le détecteur étant placé dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, il mesure directement Δx, puisqu'il n'est sensible qu'au déplacement relatif de la bille par rapport au piège dans le plan tranverse. Cependant, cette mesure est exprimée dans une unité propre au détecteur et non pas en unité métrique. Pour pouvoir évaluer la force de piégeage dans le plan transverse, qui nous intéresse dans le cadre des expériences sur les cellules, il est donc nécessaire de :

- calibrer la constante de raideur du piège, k,
- calibrer le détecteur pour pouvoir convertir les mesures de position en unité métrique, et donc avoir accès à Δx.

Plusieurs méthodes de calibration d'un montage optique ont été développées, principalement dans le cadre d'un montage en transmission. La revue [Neuman 2004] en présente un certain nombre. Ici, je vais me contenter de décrire les méthodes qui ont été mises en œuvre au cours de ma thèse :

- l'analyse de la densité spectrale de puissance,
- l'application du théorème de l'équipartition,
- l'inférence bayésienne,
- et finalement, la réponse à un échelon de position.

Les trois premières exploitent directement les données du mouvement brownien de la bille piégée, tandis que la dernière méthode utilise la réponse déterministe de la bille à un déplacmeent rapide du piège [Le Gall 2010]. Avant de considérer chacune d'entre elles, je vais d'abord revenir sur l'équation du mouvement d'une bille piégée.

1.4.1 Equation du mouvement d'une bille piégée

Le mouvement d'une bille piégée par un faisceau laser focalisé est régie par l'équation de Langevin suivante donnée à une dimension pour plus de simplicité :

$$m\frac{\mathrm{d}^2x}{\mathrm{d}t^2} = -\gamma\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} - kx(t) + \sqrt{2D}\gamma f(t) \tag{1.7}$$

où $x(t)$ représente la trajectoire de la bille. Cette équation traduit l'application de :

- la force d'inertie de la bille de masse m,
- la force de frottement visqueux, de constante de friction γ, due à la viscosité du fluide qui entoure la bille,
- la force de rappel exercée par le faisceau laser sur la bille, de constante de raideur k (le piège est considéré comme un puits de potentiel harmonique),
- les forces dues au mouvement brownien de la bille dans le fluide, avec D le coefficient de diffusion de la bille dans le fluide et $f(t)$ une fonction gaussienne représentant le processus aléatoire et vérifiant :

$$< f(t) >= 0 \quad \text{et} \quad < f(t)f(t') >= \delta(t-t') \tag{1.8}$$

Dans les conditions expérimentales, la force d'inertie est négligeable par rapport aux forces de frottements et de rappel [Berg-Sørensen 2004]. L'équation 1.7 s'écrit simplement :

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} + \frac{k}{\gamma}x(t) = \sqrt{2D}f(t) \tag{1.9}$$

A l'équilibre thermodynamique, en résolvant l'équation 1.9 pour des temps longs, il vient : $\langle x^2 \rangle = \gamma\ D/k$. Or, d'après le théorème de l'équipartition dans un piège harmonique :

$$\frac{1}{2}k_BT = \frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle \tag{1.10}$$

avec k_B la constante de Boltzmann et T la température locale du fluide. On en déduit alors la relation d'Einstein qui lie le coefficient de diffusion à l'énergie thermique k_BT et au coefficient de friction γ :

$$D = \frac{k_BT}{\gamma} \tag{1.11}$$

Le coefficient de friction γ est quant à lui donné par la loi de Stokes :

$$\gamma = 6\pi\eta R \tag{1.12}$$

où R est le rayon de la bille et η la viscosité du milieu. La viscosité dépend de la distance h entre le centre de la bille et la paroi que représente la lamelle de microscope, suivant la loi de Faxen :

$$\eta(h) = \frac{\eta_0}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{R}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{R}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{R}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{R}{h}\right)^5 + ...} \tag{1.13}$$

avec η_0 la viscosité dynamique du fluide loin de toute paroi. La loi de Faxen est illustrée sur la figure 1.30 pour une bille de 1.5 µm de rayon. La viscosité varie très rapidement jusqu'à une hauteur d'environ 3 µm soit deux fois le rayon de la bille. Or justement, la bille doit être calibrée à hauteur de la cellule qui fait environ 2 à 4 µm d'épaisseur. Il est donc primordial de connaître la hauteur de piégeage si la méthode de calibration utilise la viscosité locale du fluide, ce qui est le cas de la densité spectrale de puissance ou de la réponse à un échelon de position, comme nous le verrons dans les parties suivantes.

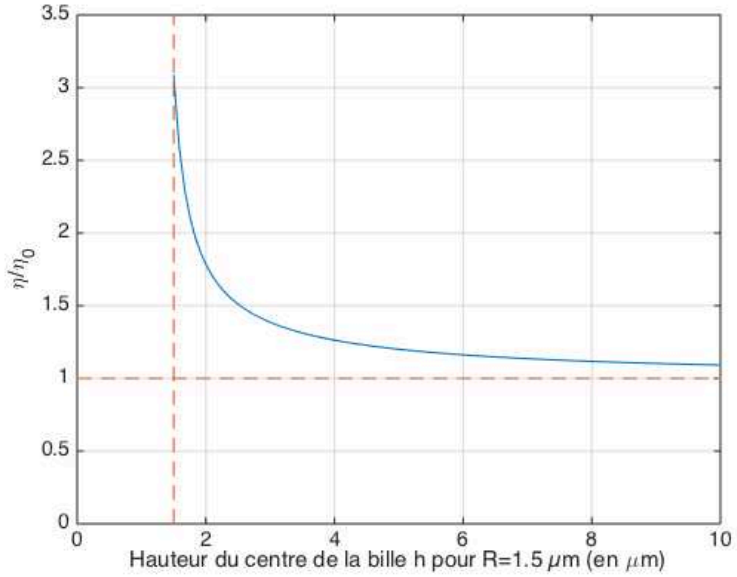


FIGURE 1.30 – Loi de Faxen pour une bille de rayon 1.5 µm. Les pointillés rouges délimitent d'une part la hauteur lorsque la bille est en contact avec la paroi et la valeur 1 vers laquelle tend η/η_0.

1.4.2 Méthodes de calibration à partir du mouvement brownien

Comme mentionné dans la partie précédente, une bille piégée est animée d'un mouvement brownien, qui peut être enregistré (cf. figure 1.31) et analysé de différentes façons pour calibrer le montage de pince optique. Au cours de ma thèse, j'ai mis en œuvre trois de ces méthodes : l'application du théorème de l'équipartition, l'inférence bayésienne et l'analyse de la densité spectrale de puissance. Seule la dernière méthode permet de calibrer entièrement le dispositif, i.e. le détecteur et la constante de raideur, tandis que les deux autres ne fournissent que la constante de raideur, une fois les données converties en unité métrique.

Je vais commencer par décrire la plus complète des trois méthodes, mais aussi la plus utilisée dans la communauté : l'analyse de la densité spectrale de puissance, puis la plus facile, mais aussi la plus entachée d'incertitudes, l'application du théorème de l'équipartition, pour finir avec la plus récente, l'inférence bayésienne.

1.4.2.1 Analyse de la densité spectrale de puissance

L'analyse de la densité spectrale de puissance est une méthode de calibration qui permet de calibrer à la fois la constante de raideur et le détecteur en exploitant la trajectoire du mouvement brownien de la bille dans le piège, en passant dans le domaine fréquentiel [Berg-Sørensen 2004]. En effet, à partir de l'équation du mouvement de la bille 1.9, il est possible en calculant la transformée de Fourier de déduire la densité spectrale de puissance :

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \tag{1.14}$$

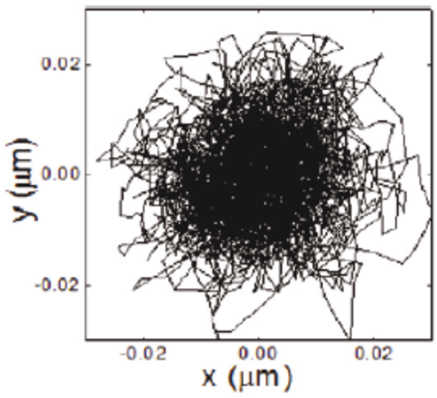


FIGURE 1.31 – Représentation du mouvement brownien d'une bille dans un piège dans le plan transverse au piège optique. Extraite de [Richly 2013].

où D est le coefficient de diffusion décrit par la relation 1.11 et f_c la fréquence de coupure du piège. L'ajustement du spectre de puissance de la trajectoire du mouvement brownien par une fonction Lorentzienne (cf. figure 1.32) permet de déterminer D et f_c, à partir desquelles on peut déduire la calibration du montage.

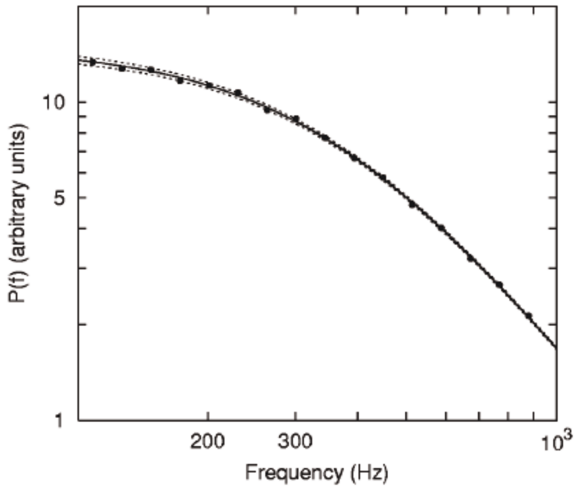


FIGURE 1.32 – Ajustement par une fonction Lorentzienne du spectre de puissance dans l'intervalle [100 Hz, 1 kHz]. La fréquence de coupure calculée vaut $f_c = 357 \pm 3$ Hz et le coefficient de diffusion $D = 585 \pm 4$ (unité arbitraire)^2/s. Extraite de [Berg-Sørensen 2004].

Calibration de la raideur La fréquence de coupure du piège s'exprime en fonction de la raideur du piège k et du coefficient de friction γ :

$$f_c = \frac{k}{2\pi\gamma} \tag{1.15}$$

La détermination de la constante de raideur dépend donc de la mesure de la hauteur de piégeage, qui influe sur la viscosité et donc sur le coefficient de friction.

Calibration du détecteur La valeur de la densité spectrale de puissance à basse fréquence et a fortiori pour la fréquence nulle, permet de calculer l'ordonnée à l'origine de la Lorentzienne, qui vaut : $P(f=0) = D/(2\pi^2\ f_c^2)$. La détermination de f_c permet donc de déduire une estimation du coefficient de diffusion. L'exploitation des données ne nécessitant pas une conversion des données en unité métrique, celles-ci sont donc exprimées dans l'unité du détecteur. Ainsi, l'évaluation du coefficient de diffusion par ce biais est exprimée en $(\textit{unité détecteur})^2/s$.

A partir de la détermination de la température locale T et du coefficient de friction, il est possible de calculer le coefficient de diffusion théorique en $\mu m^2/s$ grâce à la relation d'Einstein 1.11. Les deux valeurs permettent alors de déduire le coefficient de conversion entre l'unité du détecteur et l'unité métrique, et donc de calibrer le détecteur.

En pratique Les photodiodes quatre quadrants, telles que la nôtre, sont en silicium. Or le silicium est transparent dans le proche infra-rouge, longueur d'onde généralement employée pour piéger des particules en présence d'échantillons biologiques. Ainsi, le signal détecté est la somme de deux réponses [Berg-Sørensen 2003] :

- une réponse "instantanée" due à la fraction α des porteurs de charge créés dans la zone de déplétion,
- une réponse "retardée" due à la fraction $(1-\alpha)$ des porteurs de charge créés dans la couche n.

Les porteurs de charges créés dans la couche n accusent un retard t_d par rapport aux porteurs de charges créés dans la zone de déplétion. Ce temps t_d est relié à la fréquence de coupure f_{3dB} par la relation : $f_{3dB} = 1/(2\pi t_d)$. Ainsi, la densité spectrale de puissance s'écrit finalement :

$$P(f) = \frac{D}{(f^2+f_c^2)}\ \left[\alpha^2 + \frac{1-\alpha^2}{1+(f/f_{3dB})^2}\right] \tag{1.16}$$

La même équipe a par la suite publié un programme Matlab [Hansen 2006] permettant de calculer la densité spectrale de puissance à partir de la trajecoire du mouvement brownien de la bille, puis de l'ajuster en fonction de différents paramètres tels que α et f_{3dB}.

1.4.2.2 Application du théorème de l'équipartition

La trajectoire du mouvement brownien peut être envisagée d'un point de vue statistique. Dans la direction x, la position de la bille dans un piège optique peut être décrite comme une gaussienne de moyenne nulle et de variance $\langle x^2 \rangle$. D'après le théorème de l'équipartition, à l'équilibre thermodynamique, l'énergie potentielle de la force de rappel compense parfaitement l'énergie due à l'agitation thermique, soit :

$$\frac{1}{2}k_x \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$$

En enregistrant le mouvement de la bille pendant un temps suffisamment long, il est donc possible de calculer la variance $\langle x^2 \rangle$, et donc d'en déduire la constante de raideur du piège k_x, dans la direction x connaissant la température locale T.

Cependant, pour obtenir une constante de raideur exprimée en pN/nm, il est nécessaire d'avoir converti au préalable les données brutes exprimées en *unité détecteur* en unité métrique. D'autre part, il est à noter que cette méthode de calibration est très sensible à toute source de bruit extérieure au mouvement brownien, créant une sur-évaluation de $\langle x^2 \rangle$ et donc une sous-estimation de la constante de raideur k_x. Tout ceci est également valable pour la direction y qui implique alors la constante de raideur du piège k_y.

1.4.2.3 Inférence bayésienne

Contrairement à l'application du théorème de l'équipartition, la calibration par l'inférence bayésienne considère toute l'information contenue dans la trajectoire. Cette méthode a été initialement développée pour extraire le potentiel de confinement de récepteurs membranaires diffusant dans des micro-domaines de la membrane cellulaire [Masson 2009, Türkcan 2012a, Türkcan 2012b, Türkcan 2013]. Puis elle a été utilisée pour calibrer un piège optique, suite à une collaboration entre notre équipe et celle d'Antigoni Alexandrou du Laboratoire Optique et Biosciences de l'école Polytechnique [Richly 2013]. Cette méthode permet de déterminer le potentiel $V(\mathbf{r})$ lié à la force qu'exerce le piège sur la bille sans connaître a priori ni le rayon ni la hauteur de la bille piégée, et ce avec un nombre de points de trajectoire bien moins important que dans le cas de l'équipartition.

Pour ce faire, l'équation du mouvement 1.9 est réécrite en fonction du potentiel $V(\mathbf{r})$ où $\mathbf{r}(t)$ est le vecteur des coordonnées de la bille en deux dimensions à l'instant t :

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{r}(t)}{\mathrm{d}t} = -\frac{\nabla V(\mathbf{r})}{\gamma} + \sqrt{2D} f(t) \tag{1.17}$$

avec γ le coefficient de friction, D le coefficient de diffusion et $f(t)$, la fonction aléatoire précédemment définie par les relations 1.8. La surface explorée par la bille est divisée en $n \times m$ sous-domaines sur lesquels la force exercée par le piège, $\nabla V(\mathbf{r})$, est considérée comme constante. Pour chaque sous-domaine (i, j), il est possible de calculer la probabilité d'aller du point de coordonnées espace-temps ($\mathbf{r_n}$, t_n) au point ($\mathbf{r_{n+1}}$, t_{n+1}), connaissant le coefficient de diffusion D et la force $\nabla V(\mathbf{r})_{i,j}$: $P[(\mathbf{r_{n+1}}, t_{n+1}|\mathbf{r_n}, t_n) \mid (D, \nabla V(\mathbf{r})_{i,j})]$. La probabilité d'observer la trajectoire entière T à partir des paramètres $(D, \nabla V(\mathbf{r})_{i,j})$, $P[T|(D, \nabla V(\mathbf{r})]$, peut ensuite être déduite. Enfin, la probabilité a posteriori des paramètres $(D, \nabla V(\mathbf{r}))$ connaissant la trajectoire expérimentale T peut être calculée, grâce au théorème de Bayes :

$$P[(D, \nabla V(\mathbf{r}))|T] = P[T|(D, \nabla V(\mathbf{r}))] \frac{P_0(D, \nabla V(\mathbf{r}))}{P_0(T)} \tag{1.18}$$

où $P_0((D, \nabla V(\mathbf{r})))$ est la probabilité a priori du paramètre $(D, \nabla V(\mathbf{r}))$ avant que la trajectoire T ne soit observée (égale à 1 en pratique) et $P_0(T)$ est une constante de normalisation égale à 1. En maximisant $P((D, \nabla V(\mathbf{r}))|T)$, les coefficients du potentiel $V(\mathbf{r})$ peuvent être inférés, ainsi que le coefficient de diffusion D.

Dans le cas d'un piège optique, le potentiel est supposé harmonique et donc $V(\mathbf{r})$ est de la forme :

$$V(x, y) = C + C_x x + C_y y + C_{xx} x^2 + C_{xy} xy + C_{yy} y^2 \tag{1.19}$$

Les constantes de raideur dans les directions x et y peuvent ainsi être déduites :

$$k_x = 2\, C_{xx} \quad \text{et} \quad k_y = 2\, C_{yy} \tag{1.20}$$

La figure 1.33 représente le potentiel inféré par le programme d'inférence bayésienne développé par Jean-Baptiste Masson, correspondant au mouvement brownien de la figure 1.31.

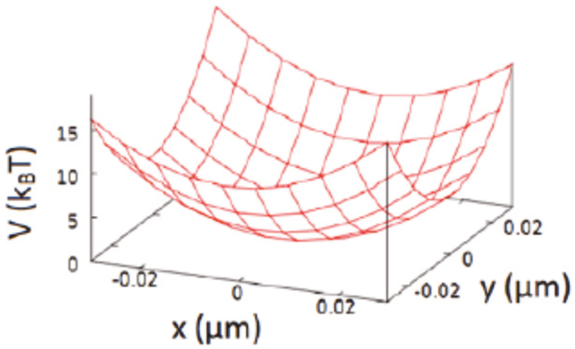


FIGURE 1.33 – Allure du potentiel inféré correspondant à la trajectoire du mouvement brownien de la figure 1.31. Il permet de déterminer les constantes de raideur dans les directions x et y : $k_x = 0.05$ pN/nm et $k_y = 0.08$ pN/n, respectivement. Extraite de [Richly 2013].

Cependant, les valeurs inférées peuvent souffrir d'un biais : les constantes de raideur sont sur-estimées, tandis que le coefficient de diffusion est sous estimé [Türkcan 2012a]. Ce biais dépend du facteur de confinement u décrit comme le rapport entre l'aire explorée par la bille pendant le temps Δt entre deux points de la trajectoire, et l'aire globale de la trajectoire :

$$u = \frac{D\Delta t}{\pi R_{0.95}^2} \tag{1.21}$$

où $R_{0.95}$ correspond au rayon du cercle contenant 95% des points de la trajectoire globale. Ce biais est lié au fait que le potentiel et le coefficient de diffusion peuvent se compenser dans les calculs des probabilités. Des "courbes de biais", donnant l'erreur sur le paramètre inféré en fonction du facteur de confinement, peuvent alors être réalisées à partir de trajectoires simulées (cf. figure 1.34). Elles permettent ensuite de corriger les valeurs obtenues à partir de la courbe expérimentale connaissant la valeur du facteur de confinement pour la trajectoire considérée [Richly 2013].

Enfin, la calibration par inférence bayésienne exploite les données du mouvement brownien exprimées en unité métrique, tout comme l'application du théorème de l'équipartition. Cette méthode nécessite moins de points par trajectoire (600 points sont suffisants d'après [Richly 2013]) et est moins sensible aux dérives (cf. [Richly 2013]) que la méthode appliquant le théorème de l'équipartition. De plus, un avantage important de cette méthode par rapport à l'analyse de la densité spectrale de puissance est qu'elle ne nécessite pas la connaissance du coefficient de friction, et donc du rayon de la bille et de sa hauteur.

1.4.3 Calibration à partir d'un échelon de position

On peut également calibrer un montage de pince optique en déplaçant très rapidement le laser de piégeage, comme l'ont montré Antoine Le Gall et al. dans [Le Gall 2010]. Cette

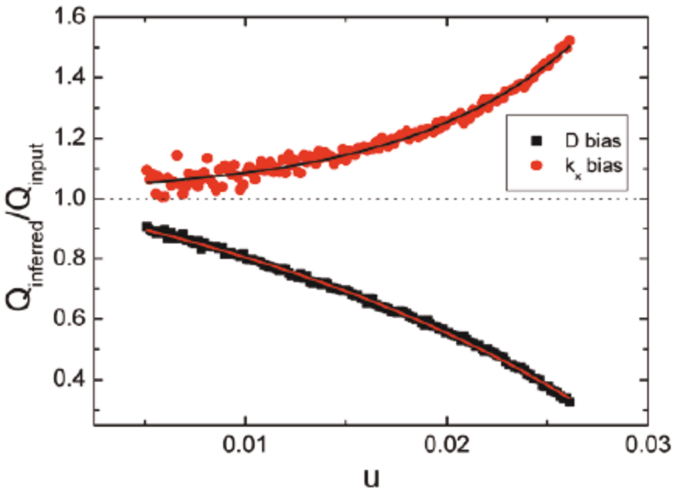


FIGURE 1.34 – Courbes de biais obtenues à partir de trajectoires simulées pour $\Delta t = 91.8$ µm et $D = 0.3$ µm^2/s, la constante de raideur $k_x = k_y$ variant de 10^{-6} à 0.2 pN/nm. Q représente soit la constante de raideur soit le coefficient de diffusion. Chaque point (rouge ou noir) est la valeur de D ou k inférée à partir de 30 trajectoires simulées pour chaque valeur de u, chaque trajectoire contenant 3000 points. Les résultats (les points rouges ou noirs) sont ensuite ajustés pour permettre une correction des estimations obtenues à partir de trajectoires expérimentales, en fonction de la valeur du facteur de confinement u. Extraite de [Richly 2013].

méthode permet de calibrer la raideur du piège et le détecteur simultanément. Pour cela, on considère initialement une bille centrée dans le piège, puis très rapidement le piège est décalé d'une distance connue, et la bille revient vers sa position d'équilibre, i.e. le centre du piège. Le détecteur n'étant sensible qu'à la position relative de la bille par rapport au piège, le signal détecté décrit cette relaxation de la bille dans le piège comme le montre la figure 1.35.

Pour obtenir une telle courbe, il faut moyenner le signal détecté. En pratique, plusieurs aller-retours sont effectués. Le signal étant moyenné, le mouvement brownien s'annule d'après 1.8. L'équation du mouvement 1.9 s'écrit donc :

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} + \frac{k}{\gamma}x(t) = 0 \tag{1.22}$$

dont la solution est simplement :

$$X(t) = X_0 e^{-t/t_b} \tag{1.23}$$

où X_0 est l'amplitude du signal au moment où le piège est décalé, soit à $t = 0$, et t_b le temps caractéristique de relaxation de la bille. Ainsi, en ajustant les données par cette fonction $X(t)$, il est possible de calibrer le montage.

Calibration de la raideur du piège Le temps caractéristique t_b est relié à la constante de raideur du piège k par la relation :

$$k = t_b/\gamma \tag{1.24}$$

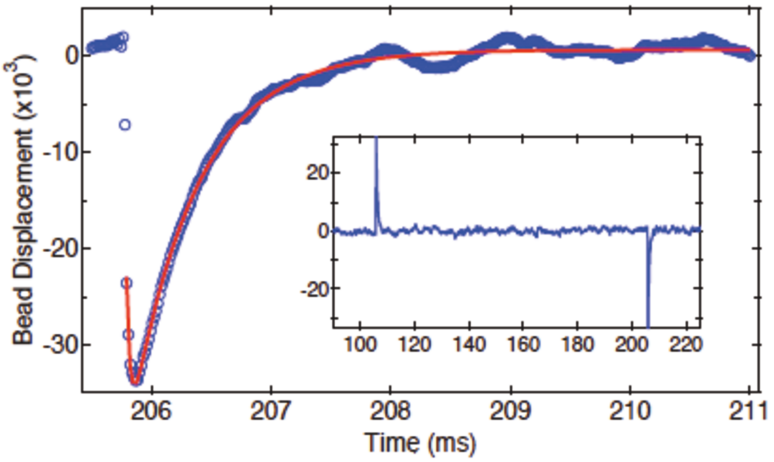


FIGURE 1.35 – Position de la bille par rapport au centre du piège lors d'un échelon de position de 77 nm, après une moyenne de 100 réponses à l'échelon de position. Les points de mesure (rond bleu) sont ensuite ajustés par la fonction 1.26 (courbe rouge) permettant de déterminer la constante de raideur (0.019 pN/nm) et la conversion entre l'unité du détecteur et l'unité métrique (0.515 μm^{-1}). L'encart représente le signal moyenné 100 fois pour un aller-retour. Extraite de [Le Gall 2010].

où γ est le coefficient de friction. Ainsi, comme dans le cas de l'analyse de la densité spectrale de puissance, la détermination de la constante de raideur dépend de la mesure de la hauteur de piégeage de la bille. D'autre part, on peut remarquer que la fréquence de coupure du piège déterminée par la réponse à un échelon de position vaut $1/(2\pi\ t_b)$, ce qui est cohérent avec les relations 1.24 et 1.15.

Calibration du détecteur L'amplitude X_0 donne accès à la calibration du détecteur via la distance de déplacement du piège. En effet, les données traitées sont exprimées dans l'unité du détecteur, donc X_0 est en *unité détecteur* et correspond d'autre part à un déplacement exprimé en unité métrique, typiquement en *nm*. Ainsi, il est facile de déterminer le facteur de conversion entre l'unité du détecteur et l'unité métrique, et donc de calibrer le détecteur.

Ceci peut être effectué pour différentes valeurs de déplacement du piège par rapport à la bille. On obtient ainsi une calibration complète du détecteur fournissant sa zone de linéarité, comme le montre la figure 1.36.

En pratique Comme mentionné dans la partie 1.4.2.1, le signal détecté par la photodiode à quatre quadrants est la somme d'une réponse instantanée (concernant une fraction α du signal) et d'une réponse accusant un retard t_d (concernant une fraction $(1-\alpha)$ du signal). Ainsi, le signal détecté est le résultat du produit de convolution de la réponse instantanée $X(t)$ donnée par la relation 1.23 et de la fonction [Berg-Sørensen 2003] :

$$g(t) = \alpha\ \delta(t) + (1-\alpha)\ \frac{1}{t_d}\ e^{-t/t_d} \tag{1.25}$$

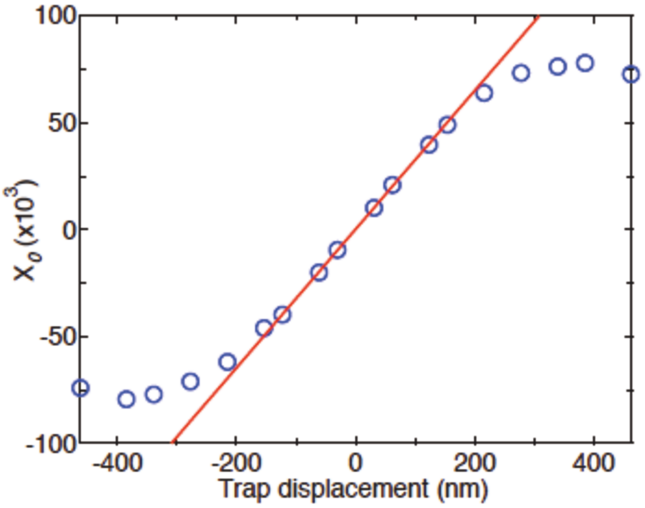


FIGURE 1.36 – Zone de linéarité du détecteur déterminée à partir de différentes valeurs de déplacement du piège par rapport à la bille. Le détecteur répond linéairement sur environ ± 150 nm. Extraite de [Le Gall 2010].

qui conduit à l'expression [Le Gall 2010] :

$$S(t) = X_0\ \alpha\ e^{-t/t_b} + X_0(1-\alpha)\frac{t_b}{t_b - t_d}\left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d}\right) \tag{1.26}$$

Enfin, comme mentionné au tout début de ce paragraphe, pour mettre en œuvre cette méthode de calibration, il est nécessaire de déplacer très rapidement le piège, i.e. beaucoup plus rapidement que le temps caractéristique de relaxation de la bille, qui est de l'ordre de la centaine de µs pour une raideur de l'ordre du pN/nm. Pour cela, on utilise un déflecteur acousto-optique comme dans le montage d'Antoine Le Gall représenté sur la figure 1.25.

1.4.4 Résumé sur les méthodes de calibration

Ainsi, parmi les quatre méthodes de calibration présentées, deux méthodes permettent de calibrer entièrement le montage, à savoir la constante de raideur du piège et le détecteur : l'analyse de la densité spectrale de puissance et la réponse à un échelon de position. Elles exploitent deux signaux différents : le mouvement brownien et un échelon de position. Dans ces deux cas, il est nécessaire de connaître précisément la hauteur de piégeage, permettant de déterminer la viscosité locale du fluide et donc le coefficient de friction, via le rayon de la bille.

A contrario cette donnée, difficile à mesurer expérimentalement, n'est pas requise dans la calibration par l'inférence bayésienne et l'application du théorème de l'équipartition, qui permettent donc une estimation indépendante de la raideur. Cependant, ces deux méthodes nécessitent la conversion préalable des données en unité métrique. Il est à noter que la calibration par l'application du mouvement brownien est très sensible à la présence de bruit autre que dû au mouvement brownien, entraînant une sous-estimation de la constante de raideur.

Le chapitre 4 sera dédié à la calibration du dispositif. Nous verrons par ailleurs dans le chapitre 3 que notre détection en réflexion dans le plan conjugué du plan focal arrière permet

de déterminer précisément la hauteur de piégeage grâce à la figure d'interférences, annulant l'inconvénient mentionné à propos de l'analyse de la densité spectrale de puissance et de la réponse à un échelon de position.

Chapitre 2

Mise en œuvre du dispositif expérimental

Sommaire

2.1 Réalisation du piégeage optique 58
2.1.1 Vue d'ensemble du montage permettant de piéger une bille 58
2.1.2 Laser 60
2.1.3 Objectif de microscope 61
2.1.3.1 Aberration sphérique : choix de l'ouverture numérique et de l'huile d'immersion 61
2.1.3.2 Aberration sphérique et indice de l'huile d'immersion 65
2.1.3.3 Transmission de l'objectif 65
2.1.4 Mise en forme du faisceau laser 66
2.1.5 Choix des billes micrométriques 68
2.2 Déplacement du piège par rapport à l'échantillon 70
2.2.1 Déplacement par la platine de nano-positionnement 70
2.2.2 Déplacement par les déflecteurs acousto-optiques 71
2.2.2.1 Déflexion du faisceau par les déflecteurs acousto-optiques 71
2.2.2.2 Translation du piège dans le plan de l'échantillon 75
2.3 Détection 77
2.3.1 Imagerie des cellules et de la bille 77
2.3.2 Détection de la position de la bille à partir du faisceau réfléchi 80
2.3.2.1 Adaptation du montage pour la détection du faisceau rétro-diffusé 80
2.3.2.2 Détection du signal 84
2.4 Application aux cellules 87
2.4.1 Exercer une force sur la cellule via la bille piégée 87
2.4.2 Orientation préférentielle des filaments d'actine 88
2.4.3 Imagerie à contraste de phase et piégeage optique 88
2.4.4 Microscopie de fluorescence et piégeage optique 88
2.4.5 Imagerie par tomographie par cohérence optique plein champ et piégeage optique 90
2.4.6 Conclusion 92

Comme présenté dans le chapitre 1, le montage de pince optique doit permettre d'étudier la réponse d'une cellules endothéliales à une contrainte mécanique locale appliquée sur sa membrane via une bille micrométrique. Le point de départ de ce montage a été réalisé au cours de la thèse d'Antoine Le Gall (cf. figure 1.25). Afin de l'adapter à notre objet d'étude,

le piégeage optique doit être combiné avec l'imagerie à contraste de phase (cf. partie 1.3.3.1). Ceci implique d'utiliser le même objectif de microscope pour piéger la bille et pour imager les cellules. Ce type d'imagerie est généralement réalisé grâce à un objectif spécifique, dont la particularité est de posséder un anneau de phase directement intégré dans l'objectif. Cette combinaison a été réalisée par l'équipe de Reihani [Mahmoudi 2010] et ne pose a priori pas de problème pour le piégeage optique. Ainsi, je ne commenterai pas particulièrement cet aspect du montage dans ce chapitre. En revanche, nous verrons en détail dans le chapitre 3 que cet anneau de phase joue un rôle important pour la mesure de la position de la bille à partir du signal rétro-diffusé.

La seconde modification majeure du montage concerne la détection de la position de la bille, comme expliqué dans le chapitre précédent (cf. partie 1.3.3.2). Pour permettre un accès plus facile à l'échantillon, nous avons choisi d'utiliser une configuration en réflexion, plutôt qu'en transmission comme réalisée dans le montage par Antoine Le Gall. La particularité de la détection mise en place précédemment est qu'elle permet de n'être sensible qu'à la position relative de la bille par rapport au piège. Ceci est réalisé en conjuguant le détecteur avec le plan focal arrière du condenseur. Il s'agit donc de transposer cela en réflexion.

Ce chapitre a pour but la description du dispositif mis en œuvre dont un aperçu global est donné sur la figure 2.1. Il est composé de trois parties principales :

- **Piégeage optique combiné à l'imagerie à contraste de phase** : l'élément clé de cette partie est l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique (ON=1.3) permettant de piéger efficacement les billes. Par ailleurs, un anneau de phase est intégré dans son plan focal arrière pour réaliser l'imagerie à contraste de phase, combiné avec l'ouverture annulaire du condenseur.
- **Déflexion du faisceau de piégeage** : ceci est réalisé dans deux directions orthogonales grâce à deux déflecteurs acousto-optiques. Ils sont conjugués avec le plan focal arrière de l'objectif permettant une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon.
- **Détection du faisceau rétro-diffusé par la bille** : le faisceau réfléchi par la bille piégée est séparé du faisceau de piégeage par des éléments de polarisation et renvoyé vers une photodiode quatre quadrants. Ce détecteur est conjugué avec le plan focal arrière de l'objectif, collectant les photons rétro-diffusés par la bille, afin de mesurer directement la position relative de la bille par rapport au piège.

Ces différents éléments seront développés dans les trois premières sections, qui permettront de construire le montage pas à pas. Dans chaque partie, une présentation de la mise en œuvre du montage sera présentée avant de détailler chaque élément en essayant lorsque c'est possible de le mettre en regard de certaines études de la littérature. Enfin, la dernière section de ce chapitre sera consacrée aux applications biologiques de ce montage de pince optique.

2.1 Réalisation du piégeage optique

Cette section est consacrée à la réalisation du dispositif de piégeage optique en vue d'exercer une force sur la cellule via une bille. Cette force s'écrit simplement $F = -k\Delta x$, où k est la constante de raideur et Δx la distance entre le centre de la bille et le centre du piège. Les éléments du montage permettant de piéger la bille vont déterminer cette constante de raideur. Il est donc important de considérer l'influence de chacun d'eux, tout en gardant à l'esprit qu'à

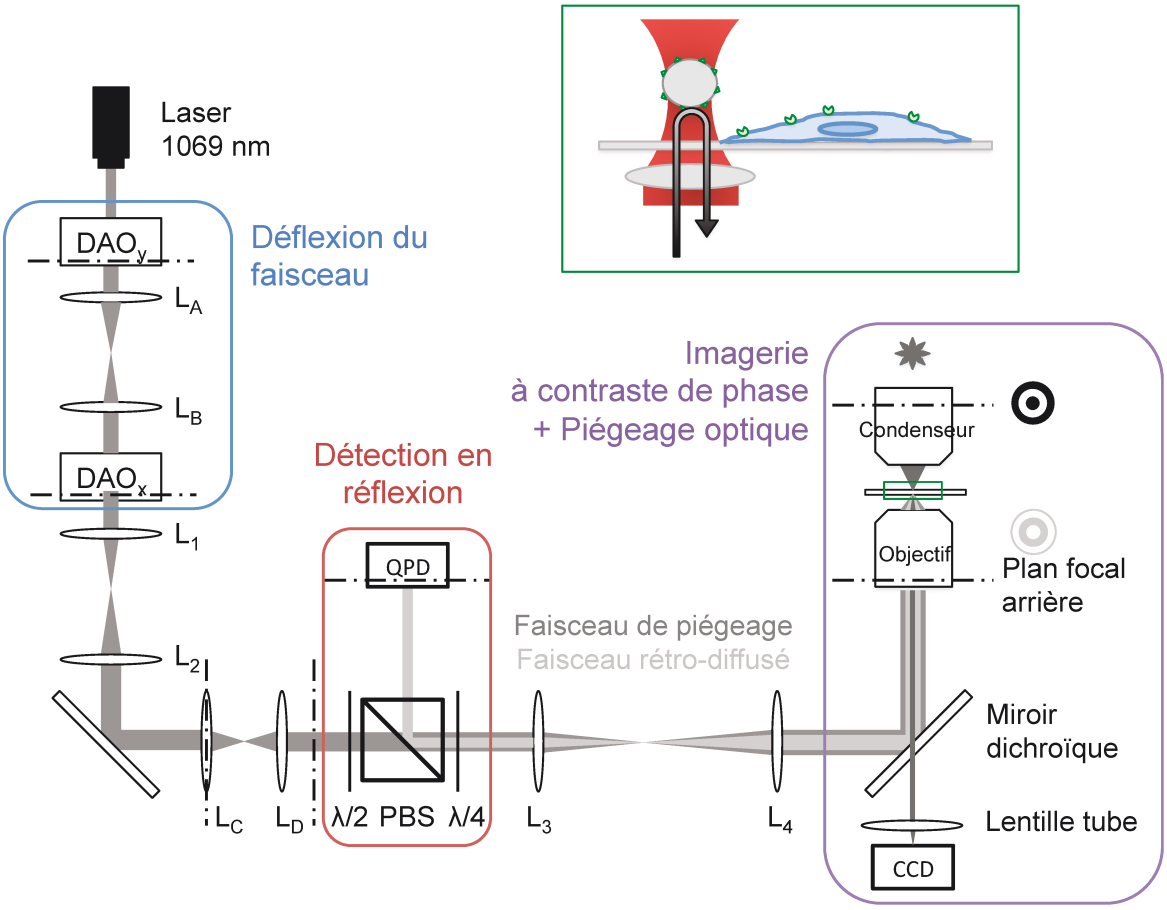


FIGURE 2.1 – Schéma du montage général comprenant les trois grandes parties : la déflexion du faisceau de piégeage, la combinaison du piège optique avec l'imagerie à contraste de phase, et la détection en réflexion. L'encart vert est un agrandissement du piégeage de la bille en présence d'une cellule. Les traits en pointillés désignent les plans conjugués.

terme il s'agit de travailler avec des cellules. Il faut donc veiller à ne pas les endommager. Ainsi la longueur d'onde du laser est choisie de façon à limiter son absorption par la cellule. D'autre part, il est important de maximiser l'efficacité de piégeage en créant un piège le plus raide possible avec un minimum de puissance laser. Ceci intervient notamment dans le choix de l'objectif de microscope, qui définit la forme du gradient d'intensité. Un paramètre important est alors l'ouverture numérique de l'objectif. Le puits de potentiel créé dépend également de la couverture de la pupille d'entrée de l'objectif par le faisceau, d'où la mise en forme du faisceau à partir de la sortie du laser. Enfin, le choix des billes influe également sur l'efficacité du piégeage par le biais de leur indice optique et de leur rayon.

Enfin, il est important de garder à l'esprit que dans les expériences que nous voulons réaliser, la grandeur physiologiquement pertinente est non pas la force, mais plutôt la pression qu'exerce le sang sur la surface de la cellule. Une pression est une force par unité de surface : $P = F/S$. Si le matériau de la bille n'a d'influence que sur la force, la diamètre au contraire a une incidence sur la force et sur la surface de contact entre la bille et la cellule, et donc finalement sur la pression. Avant de présenter le dispositif optique, il est important d'avoir quelques ordres de grandeur en tête. Dans la revue [Davies 1995], on peut trouver les ordres de grandeur suivants : la pression du flux sanguin dans les artères est de l'ordre de 20 Pa lorsque le flux est laminaire, et plutôt de l'ordre du Pa dans les zones où le flux est turbulent. In vitro, dans les études citées dans la partie 1.1.4, les auteurs se positionnant dans des conditions physiologiques appliquent des pressions comprises entre 1.8 Pa et 25 Pa [Hu 2003, Hu 2004, Hu 2005, Wang 2005, Na 2008] [1].

2.1.1 Vue d'ensemble du montage permettant de piéger une bille

Le montage de pince optique s'articule autour d'un microscope inversé (Nikon, Eclipse Ti-U) permettant de combiner le piégeage optique et la microscopie à contraste de phase. Le montage de base de pince optique, i.e. sans déplacement du piège, ni détection, est présenté sur la figure 2.2. Cette représentation a la particularité d'être à l'échelle et de reproduire la configuration exacte du montage, et sera complété dans les parties suivantes. Le montage est composé de :

- un laser à fibre dopée Ytterbium, émettant à 1069 nm avec une puissance nominale de 5W, délivrant un faisceau de mode gaussien TEM_{00} polarisé linéairement dont le diamètre est de 3 mm (Keopsys),
- un objectif Plan Fluor à immersion dans l'huile, ouvert à 1.3, à contraste de phase, de

1. Détails des pressions exercées et des diamètres des billes :
   - 17.5 Pa sont appliqués sur une bille de 4.5 µm de diamètre, à partir d'une pince magnétique [Hu 2003, Hu 2004, Hu 2005] ; les auteurs précisent se positionner dans des conditions physiologiques,
   - 25 Pa sont appliqués sur une bille de 4.5 µm de diamètre grâce à une pince magnétique [Na 2008] ; les auteurs observent une activation de Src à partir d'une pression de 1.8 Pa,
   - 300 pN sont appliqués sur une bille de 10 µm de diamètre, grâce à une pince optique sur une bille de 10 µm permettant l'observation de l'activité de Src grâce au rapporteur FRET [Wang 2005] ; d'après mes calculs, ceci correspond à une pression de 12 Pa.

   Explications des calculs : Dans [Na 2008], la surface totale de la bille de 4.5 µm vaut 254 μm^2. Ils estiment la surface utile à 5 μm^2, soit 2% de la surface totale. Dans [Wang 2005], le diamètre de la bille vaut 10 µm, ce qui fait une surface totale de 1257 μm^2. En conservant le même ratio de surface utile, cela conduit à 25 μm^2.

grandissement x100, de chez Nikon,

- une mise en forme du faisceau permettant de couvrir la pupille d'entrée de l'objectif est réalisé grâce à deux télescopes afocaux conduisant à un diamètre du faisceau de 5.3 mm à l'entrée de l'objectif.

Nous utilisons des billes de polystyrène de 3 µm de diamètre (Polybead Carboxylate 3.00±0.07 μm microspheres) fonctionnalisées COOH, injectées dans une chambre microfluidique.

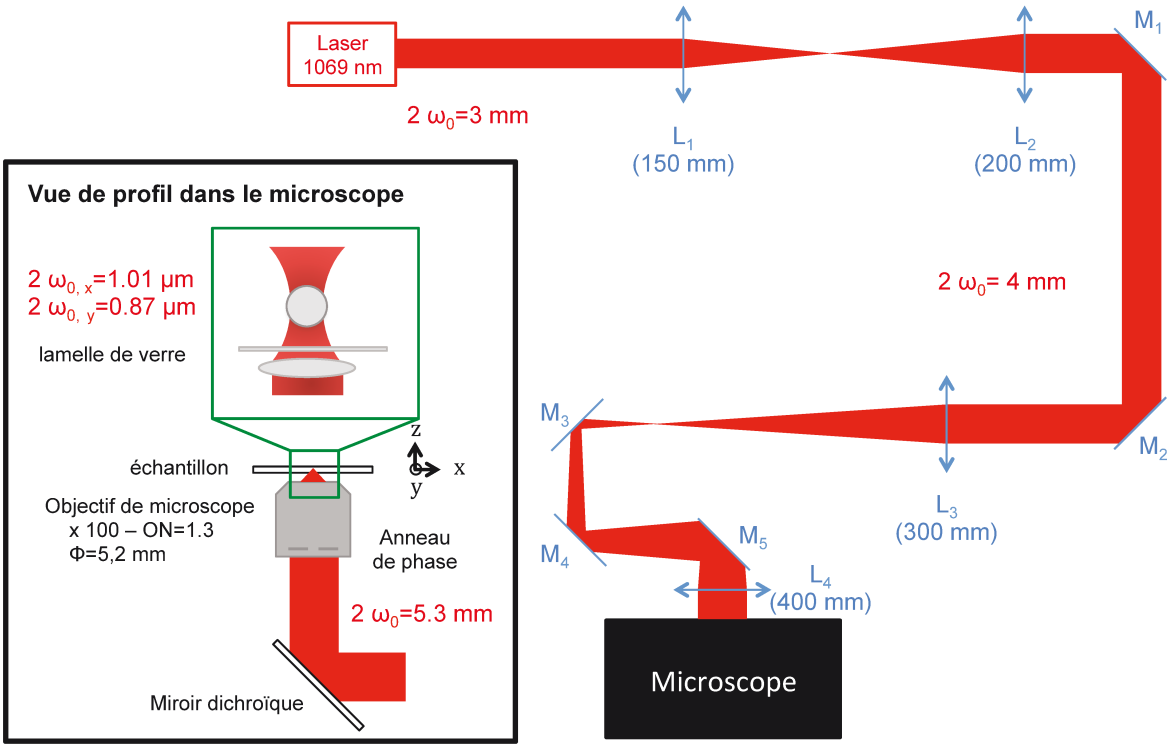


FIGURE 2.2 – Schéma du montage de piégeage optique. Le faisceau est délivré par un laser à fibre, a une longueur d'onde de 1069 nm et est focalisé par un objectif de microscope ouvert à 1.3 possédant un anneau de phase dans son plan focal arrière afin de permettre la microscopie à contraste de phase. Le faisceau laser est mis en forme par les télescopes afocaux (L_1, L_2) et (L_3, L_4) constitués de doublets dont les focales sont $f'_1 = 150$ mm, $f'_2 = 200$ mm, $f'_3 = 300$ mm et $f'_4 = 400$ mm. Ceci permet de passer d'un diamètre du waist de 3 mm à 5.3 mm en entrée de l'objectif dont la pupille a un diamètre de 5.2 mm. Le diamètre de la tache focale est respectivement dans les directions x et y : 1.0 µm et 0.87 µm.

Dans les parties suivantes, je m'attacherai à motiver dans la mesure du possible, le choix des différents éléments et leur pertinence vis-à-vis du projet. Ces parties sont plus techniques et peuvent être "sautées" pour une lecture rapide de la description du montage.

2.1.2 Laser

Comme mentionné ci-dessus, le laser du montage est un laser fibré, dopé Ytterbium, émettant à 1069 nm avec une puissance nominale de 5W (Keopsys). Il avait été utilisé sur le

montage précédent. S'agissant d'un laser fibré, il a l'avantage de posséder une bonne stabilité de pointé. De plus, il possède une boucle d'asservissement en puissance des deux diodes de pompe, permettant aussi une bonne stabilité en puissance. D'autre part, ce laser présente un mode gaussien TEM_{00} polarisé linéairement. Ce mode assure de travailler avec un diamètre de faisceau focalisé le plus petit possible, conduisant à un piège harmonique le plus raide possible [Neuman 2004]. Ceci permet d'appliquer une force plus importante à partir de la même puissance laser délivrée à la bille, et donc de limiter les effets d'endommagements dus à la lumière.

En considérant notamment la longueur d'onde et la puissance, je vais montrer que ce laser convient très bien à notre objet d'étude : les cellules.

Longueur d'onde Le choix de la longueur du laser est directement motivé par le fait de travailler avec des cellules. En effet, il s'agit ici de limiter les dégradations des échantillons par la lumière en travaillant avec une longueur d'onde la moins nocive possible. Ces effets d'endommagements sont principalement dus à un échauffement par absorption des photons par les cellules. Les spectres d'absorption des principaux constituants des échantillons biologiques, que sont l'eau et le sang, sont représentés sur la figure 2.3. L'intervalle de 750 à 1200 nm est appelé fenêtre de transparence car il s'avère un bon compromis entre les deux spectres pour limiter l'absorption. Dans le cas des cellules endothéliales, il n'y a pas de présence de sang donc on serait tenté de ne considérer que le spectre de l'eau qui conduirait à se positionner dans le domaine visible.

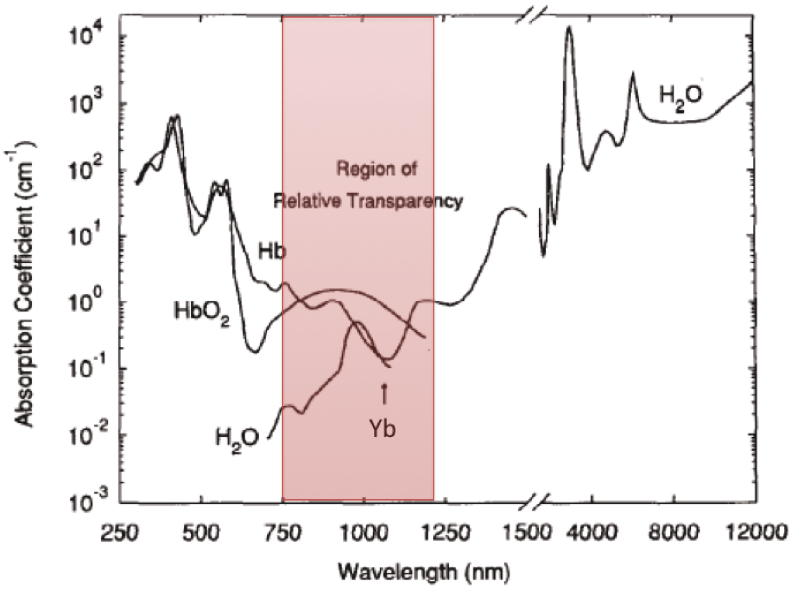


FIGURE 2.3 – Coefficients d'absorption de l'eau (H_2O) et de l'hémoglobine libre (Hb) ou liée au dioxygène (HbO_2) de l'ultra-violet à l'infrarouge. La région de relative transparence se trouve entre 750 et 1200 nm. Yb désigne le laser dopé Ytterbium dont la longueur d'onde est 1069 nm. Adaptée de [Svoboda 1994].

Or à terme, il s'agit de coupler le montage de pince optique avec la microscopie de fluorescence permettant de suivre la transmission de la contrainte mécanique au sein de la cellule. Les principaux fluorophores utilisés en biologie émettant dans le visible, il est préférable de travailler dans le proche-infrarouge. 1069 nm est donc une longueur d'onde respectant les contraintes imposées par le projet.

Puissance Les besoins en puissance sont directement reliés aux valeurs de forces nécessaires dans l'application. D'après [Neuman 2004], 10 mW dans le plan de l'échantillon génèrent une force d'environ 1 pN. Wang et al. qui, pour rappel, observent la transmission de la force à partir de l'activité de Src comme nous désirons le faire, exercent une force de 300 pN sur la bille connectée à la membrane de la cellule [Wang 2005]. Donc pour atteindre des forces de l'ordre de la centaine de piconewtons, un laser délivrant quelques watts est nécessaire, ce qui est bien le cas de notre laser qui délivre une puissance allant jusqu'à 5 W.

En conclusion, le laser utilisé précédemment dans l'équipe est totalement compatible avec les besoins liés au projet.

2.1.3 Objectif de microscope

Comme mentionné en introduction, le choix de l'objectif de microscope est crucial pour générer la forme du gradient d'intensité permettant de maximiser l'efficacité de piégeage. Intuitivement, il faut alors maximiser l'ouverture numérique de l'objectif. Il s'agit donc de travailler avec des objectifs à grande ouverture numérique, typiquement entre 1.2 et 1.4 [Neuman 2004]. Pour ces ouvertures numériques, il est nécessaire de travailler avec un milieu d'immersion (l'eau ou l'huile). De plus, avec de telles ouvertures numériques, l'aberration sphérique n'est plus négligeable et peut donc nuire à l'efficacité de piégeage. Ainsi dans cette partie je vais considérer certains résultats de la littérature concernant le compromis entre grande ouverture numérique et présence d'aberration sphérique, et nous verrons notamment que le choix de l'huile d'immersion peut avoir toute son importance, avant de conclure sur nos choix. Dans un second temps, je présenterai les mesures de transmission de l'objectif.

2.1.3.1 Aberration sphérique : choix de l'ouverture numérique et de l'huile d'immersion

La présence d'aberration sphérique dégrade le faisceau dans le plan de focalisation et donc les performances du piège. En effet, on parle d'aberration sphérique lorsque tous les rayons ne convergent pas au même foyer : plus l'angle entre le rayon considéré et l'axe optique augmente, plus le rayon focalise en amont du foyer paraxial, prévu par l'optique géométrique. C'est ce qu'on peut observer sur la figure 2.4a.

L'aberration sphérique dans un montage de pince optique a différentes origines [Reihani 2007]. D'une part elle peut être inhérente à l'objectif lui-même, car bien que corrigé, il l'est souvent pour travailler dans le visible. D'autre part, elle est due aux différences d'indice entre les différents milieux : soit entre le milieu d'immersion et la lamelle de microscope (par exemple l'eau et le verre), soit entre la lamelle de microscope et le milieu de la chambre microfluidique (par exemple entre le verre et le milieu aqueux), sachant que plus la différence d'indice est importante, plus l'aberration est conséquente. Les objectifs sont généralement corrigés de l'aberration

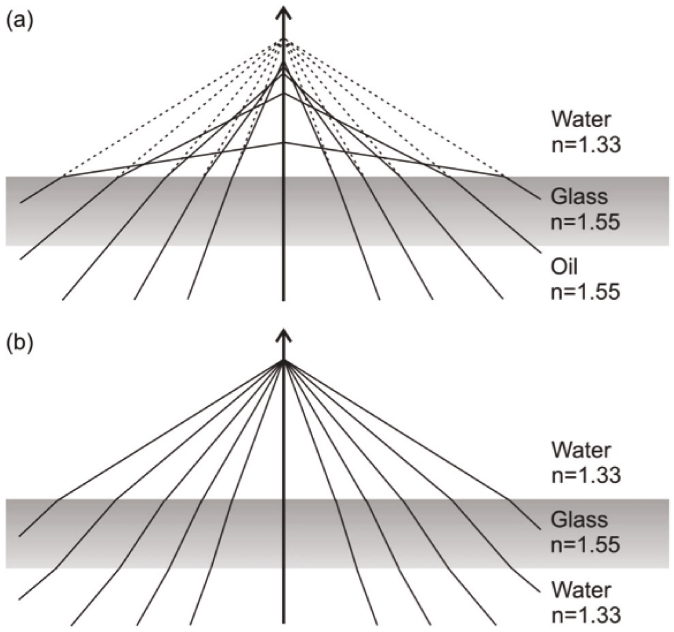


FIGURE 2.4 – Schéma des rayons optiques réfractés au passage du milieu d'immersion (l'eau (a) ou l'huile (b)), de la lamelle de microscope, puis du milieu aqueux de la chambre. Dans le cas d'un milieu d'immersion dans l'eau, les rayons convergent tous vers le même point : il n'y a pas d'aberration sphérique, contrairement au milieu d'immersion à l'huile où les rayons marginaux focalisent en amont du foyer paraxial. Extraite de [Vermeulen 2006].

sphérique pour travailler à l'interface entre la lamelle de microscope (dont l'épaisseur doit suivre les spécifications du constructeur) et le milieu aqueux de la chambre, contenant les billes et les cellules dans notre cas. Cependant, dès lors que le plan de focalisation s'en éloigne en pénétrant dans le milieu aqueux, l'aberration augmente et donc l'efficacité du piège diminue. Ainsi, dans le cas d'un objectif à immersion dans l'eau (typiquement pour des ouvertures autour de 1.2) tous les rayons convergent au même endroit, la différence d'indice ayant été corrigée (cf. figure 2.4b), tandis que pour un objectif à immersion dans l'huile (typiquement ouvert à 1.3), les différences d'indice entre le verre et le milieu aqueux n'étant pas compensées, l'aberration sphérique étale la tache de focalisation (cf. 2.4a). Plusieurs études ont été menées afin de déterminer quel était le meilleur compromis entre grande ouverture numérique et présence d'aberration sphérique pour maximiser l'efficacité de piégeage et trois d'entre elles sont succintement présentées dans la suite, deux théoriques et une troisième expérimentale.

Aberration sphérique et ouverture numérique Dans [Rohrbach 2002], les auteurs présentent une étude théorique de l'influence de l'aberration sphérique sur la constante de raideur. Celle-ci est basée sur la propagation d'ondes électromagnétiques (régime de Rayleigh). Elle s'applique donc à des billes de diamètre très inférieur à la longueur d'onde (cf. partie 1.3.1). Ils préconisent notamment l'utilisation d'un objectif à immersion dans l'eau (donc une ouverture plus faible, typiquement 1.2) ou sinon, dans le cas d'un objectif à immersion dans l'huile, de restreindre la distance entre l'interface lamelle/milieu aqueux et le plan de focalisation au maximum à 8 fois la longueur d'onde du laser (soit dans notre cas environ 8 µm).

Un autre travail théorique a été publié dans [Fällman 2003]. Il s'intéresse plutôt à des billes de diamètre comparable à la longueur d'onde et utilise l'approche de l'optique géométrique pour les calculs. Il compare l'influence de l'ouverture numérique (variant de 1.0 à 1.35) sur l'efficacité du piège dans le cas d'un objectif à immersion dans l'huile. Les auteurs concluent qu'il vaut mieux choisir un objectif de plus petite ouverture numérique si la bille doit être piégée à des hauteurs supérieures à 10 µm. Les deux études aboutissent au même résultat quelque soit le rayon de la bille considéré.

Enfin, une étude expérimentale est rapportée dans [Vermeulen 2006]. Elle compare l'influence de l'ouverture numérique sur la constante de raideur dans le plan transverse et dans la direction axiale, en utilisant un objectif à immersion dans l'eau d'ouverture numérique 1.2 et un objectif à immersion dans l'huile d'ouverture numérique 1.3. Les billes ont un diamètre de 2 µm, donc comparable à la longueur d'onde. Les résultats dans la direction transverse sont représentés sur la figure 2.5. Dans le cas de l'objectif à immersion dans l'eau, la raideur reste constante quelle que soit la hauteur de piégeage. En revanche, pour l'objectif à immersion dans l'huile, qui est donc entaché d'aberration sphérique, la raideur présente une forte dépendance avec la hauteur, d'autant plus grande que la bille est proche de la lamelle. Dans la direction longitudinale (résultats non montrés sur la figure), la constante de raideur dépend également de la hauteur pour un objectif à immersion dans l'huile.

Choix de l'objectif en fonction de l'ouverture numérique Tous ces travaux conduiraient à choisir un objectif à immersion dans l'eau avec une ouverture numérique autour de 1.2. Or, le projet impose d'utiliser le même objectif pour piéger les billes et observer les cellules. C'est pourquoi les recommandations relatives à la limitation de l'aberration sphérique ne

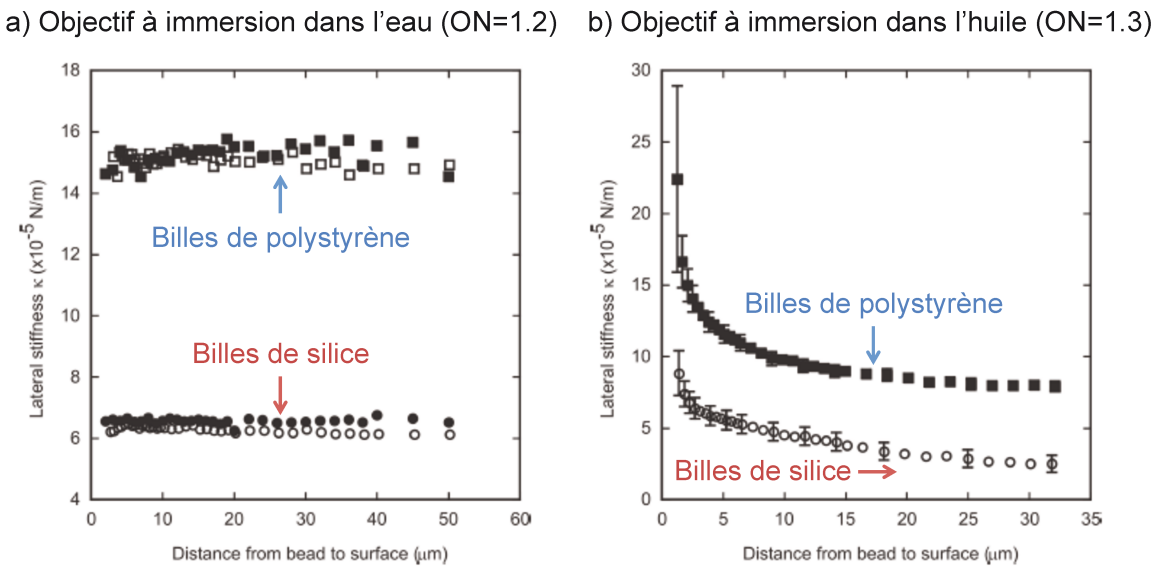


FIGURE 2.5 – Comparaison de la constante de raideur mesurée dans le plan transverse pour un objectif à immersion dans l'eau (ON=1.2) et un objectif à immersion dans l'huile (ON=1.3). Les billes sont en silice (ronds) ou en polystyrène (carré) et ont un diamètre de 2.1 μm. Adaptée de [Vermeulen 2006].

peuvent être prises en compte que dans la mesure où elles sont compatibles avec les objectifs commerciaux à contraste de phase.

Chez Nikon, les seuls objectifs conçus pour la microscopie à contraste de phase possédant une ouverture numérique supérieure à 1.0 sont à immersion dans l'huile. Notre choix s'est porté sur un objectif Plan Fluor à immersion dans l'huile ouvert à 1.3 à contraste de phase, possédant un grandissement x100 et travaillant en conjugaison infini - foyer. Il est corrigé de l'aberration sphérique pour focaliser à l'interface entre la lamelle de microscope (de 170 μm) et l'échantillon. De plus, cet objectif possède une bonne transmission sur toute la gamme visible, ce qui est adapté pour l'imagerie de fluorescence, qui est une des perspectives du projet.

La dimension de l'anneau de phase incorporé dans l'objectif va de pair avec l'ouverture annulaire Phase 3 qui se situe dans le plan focal arrière du condenseur. Le condenseur (TI-C-LWD LWD, ON=0.52) a été choisi de façon à avoir une grande distance de travail (30 mm) dans la configuration Köhler, afin de faciliter l'accès à l'échantillon.

2.1.3.2 Aberration sphérique et indice de l'huile d'immersion

S'agissant d'un objectif à immersion dans l'huile, le choix de l'huile est également important pour minimiser l'aberration sphérique. En effet, dans [Reihani 2007], une étude expérimentale montre que suivant le choix de l'indice de l'huile d'immersion, l'aberration sphérique induite par la différence d'indice entre l'huile et la lamelle de microscope peut compenser l'aberration sphérique due la différence d'indice entre la lamelle et le milieu aqueux de la chambre, et ce quelle que soit la hauteur de piégeage de la bille. Dans une autre étude, Mahamdeh et al. ont testé différentes huiles en faisant varier son indice [Mahamdeh 2011]. Ils ont conclu que pour

travailler proche de la surface (autour de 3 µm), l'huile commerciale d'indice 1.518 était la plus favorable, alors que dans le cas de [Reihani 2007] celle-ci conduisait à une efficacité réduite d'un tiers par rapport à une huile d'indice plus élevé (1.52 ou 1.53). Ce désaccord peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes concernant les caractéristiques de l'objectif et la taille des billes.

Les résultats de la littérature étant différents, il a été difficile de choisir. Néanmoins, nos conditions expérimentales semblent plus proches de celles de [Mahamdeh 2011] et les hauteurs de travail sont proches de la lamelle, nous avons donc choisi une huile d'immersion du même indice (1.517) que les lamelles de microscope (1.51) pour ne pas induire d'aberration sphérique entre l'huile et la lamelle. Cette huile (Sigma-Aldrich - Fluka - Immersion oil 10976 - 1EA) a en outre la particularité d'avoir une auto-fluorescence très faible dans le visible, ce qui est un avantage en vue de la combinaison avec la microscopie de fluorescence.

2.1.3.3 Transmission de l'objectif

Nous avons mentionné précédemment que la puissance laser était un élément important du montage à prendre en compte pour atteindre des forces de l'ordre de la centaine de piconewtons. Dans un montage de pince optique, l'objectif représente la première source de pertes. Pour mesurer la transmission d'un objectif de grande ouverture numérique à immersion, la méthode la plus utilisée a été publiée pour la première fois dans [Misawa 1991]. Elle consiste à placer deux objectifs identiques ayant le même foyer objet et à mesurer la puissance en entrée du premier objectif puis en sortie du second (cf. figure 2.6). Le ratio des deux puissances donne alors le carré de la transmission d'un seul objectif.

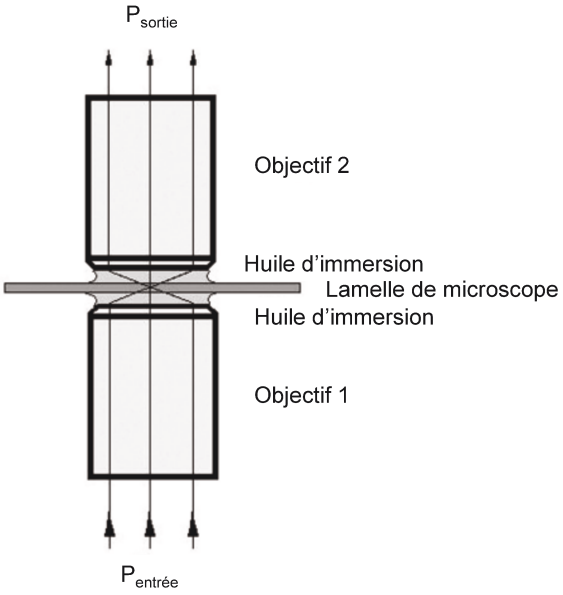


FIGURE 2.6 – Mesure de la transmission de l'objectif par la méthode des deux objectifs. Les deux objectifs 1 et 2 sont de transmission identique T. On a donc T= $\sqrt{P_{sortie}/P_{entrée}}$. Adapté de [Viana 2006].

Cela a été mis en œuvre dans [Neuman 1999] et récapitulé dans [Neuman 2004] pour différents objectifs. Ainsi pour le même objectif que le nôtre mais sans anneau de phase, ils mesurent une transmission à 1064 nm de 61 ± 5 %. La présence de l'anneau de phase dont l'une des fonctions est d'atténuer le faisceau, réduit cette estimation de la transmission. En imageant le plan focal arrière de l'objectif où se trouve l'anneau de phase, nous avons évalué qu'à 1069 nm, la transmission de l'anneau de phase est de l'ordre de 40%. Celui-ci représentant un peu moins de 10% de la surface de la pupille, la transmission serait donc d'environ 57%. Ces pertes de 4% dues à l'anneau de phase ont été vérifiées expérimentalement. En effet, nous verrons dans le chapitre 3 que nous possédons les deux objectifs identiques avec et sans anneau de phase. En focalisant à l'interface entre la lamelle de verre et l'eau pour chacun des objectifs et en positionnant un puissance-mètre au niveau d'une des sorties du microscope, la différence de transmission due à l'anneau a également été estimée à 4%.

Il est à noter que d'après [Viana 2006], la méthode des deux objectifs ne permet de mesurer qu'une valeur moyenne de la transmission de l'objectif. En effet, les auteurs ont mis en évidence une dépendance radiale de la transmission de leur objectif conduisant à une estimation plus faible de la transmission des rayons formant les angles les plus importants et donc contribuant à la force de gradient. Ceci conduit donc à une sur-estimation de la puissance laser du piège au point de focalisation. Selon les applications, cette donnée peut être importante. Afin de ne pas être obligé de posséder un deuxième objectif de microscope identique et un montage dédié à la mesure de la transmission, ils proposent une mesure de bolométrie à mercure [Viana 2002]. Dans notre cas, la détermination précise de la puissance du piège au niveau de l'échantillon n'est pas nécessaire et nous indiquerons dans la suite la puissance en entrée de l'objectif.

2.1.4 Mise en forme du faisceau laser

Pour obtenir la plus grande efficacité de piégeage possible, il est nécessaire d'élargir le faisceau de piégeage afin de couvrir la pupille d'entrée de l'objectif et ainsi générer une tache focale la plus petite possible et donc le gradient d'intensité le plus raide possible. Toutefois, le faisceau laser étant gaussien, la pupille de l'objectif va nécessairement couper une partie du faisceau, entraînant une perte de puissance transmise. Il est donc important d'obtenir un compromis entre dimension de la tache focale et puissance transmise. Plusieurs études ont été menées pour déterminer la couverture optimale de la pupille d'entrée de l'objectif. C'est ce que je vais détailler tout d'abord, avant de considérer les implications sur le diamètre de la tache focale.

Couverture de la pupille de l'objectif Il existe plusieurs travaux théoriques (comme [Fällman 2003]) ou expérimentaux (comme [Samadi 2010]) sur la couverture optimale pour obtenir la plus grande efficacité de piégeage possible. Les auteurs de [Mahamdeh 2011] reprennent les différents résultats publiés et les comparent à leur propres résultats théoriques et expérimentaux en définissant un ratio de couverture : $2\ \omega_0/\Phi$. Après normalisation, ils concluent que leurs résultats sont en accord avec la littérature et suggèrent, dans le cas d'un objectif à immersion à huile ouvert à 1.3, de couvrir la pupille avec un ratio de l'ordre de 0.95.

Sur notre montage, en sortie du collimateur de la fibre optique, la diamètre du waist du faisceau[2] est de $2\ \omega_0 = 3$ mm et le diamètre de la pupille d'entrée de l'objectif vaut $\Phi = 5.2$

2. Le diamètre du waist du faisceau est défini comme le diamètre du faisceau pour lequel l'intensité maximale

mm [3]. En tenant compte des considérations pratiques notamment concernant la distance entre l'objectif et l'entrée du microscope (autour de 370 mm), l'élargissement du faisceau laser se fait grâce à deux télescopes afocaux (L_1, L_2) et (L_3, L_4) dont les focales sont $f'_1 = 150$ mm, $f'_2 = 200$ mm, $f'_3 = 300$ mm et $f'_4 = 400$ mm, conduisant à un diamètre de waist de $2\,\omega_0 = 5.3$ mm et donc un ratio de 1.0.

Diamètre de la tache focale Un ratio de couverture de 1.0 signifie qu'au passage de l'objectif le faisceau gaussien est tronqué. Ceci a une incidence sur le profil du faisceau dans le plan focal de l'objectif. En effet, si le faisceau n'est pas tronqué (typiquement pour un ratio de 0.5), le profil image est toujours gaussien. L'autre cas extrême est lorsque le profil du faisceau entrant peut être approximé par un profil uniforme (typiquement pour un ratio de 2). Le profil du spot dans le plan image de l'objectif est alors une tache d'Airy. Avec un ratio proche de 1, nous nous trouvons dans un cas hybride. Dans le tutoriel sur l'Optique des faisceaux gaussiens, Melles Griot propose une estimation du diamètre du faisceau en fonction du ratio, de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique de l'objectif. Le diamètre de la tache image est alors évalué à 750 nm [4].

Afin d'estimer la dimension de la tache focale expérimentalement, nous avons imagé celle-ci en faisant la mise au point à l'interface entre la lamelle et l'eau de la chambre microfluidique. Les profils dans les directions orthogonales x et y sont représentés sur la figure 2.7. Nous avons choisi d'ajuster ces courbes par une fonction gaussienne pour estimer la valeur des diamètres dans les deux directions qui sont respectivement : $2\,\omega_{0,x} = 1000$ nm et $2\,\omega_{0,y} = 870$ nm.

Ces mesures sont supérieures aux prédictions théoriques mais restent du même ordre de grandeur. Toutefois, on remarque une différence d'un peu moins de 15 % entre les dimensions de la tache dans les deux directions. Cela indique que le faisceau n'est pas parfaitement symétrique, ce qui est peut être dû à un mauvais alignement ou à une déformation du faisceau par les déflecteurs acousto-optiques, que nous présenterons dans la section 2.2.2. Etonnamment, comme nous le verrons dans le Chapitre 4, cela n'a pas vraiment d'incidence sur la constante de raideur qui est la même dans les deux directions. Ceci peut être expliqué par une dégradation de l'alignement au cours du temps car cette mesure de la taille de la tache focale a été effectuée six mois après les mesures de raideur pour lesquelles l'alignement avait été optimisé.

2.1.5 Choix des billes micrométriques

Avec le laser, l'objectif et les optiques d'élargissement du faisceau, les éléments indispensables pour piéger une bille sont réunis. Mais quelle bille choisir ? Quel matériau ? Quel diamètre ?

a été divisée par e^2

3. La relation d'Abbe pour un système faisant une image à l'infini s'écrit $ny \sin\alpha = r\theta$ où n est l'indice du côté objet qui est vu sous un angle α et ayant une dimension transverse y. Le rayon émergeant du système optique de focale f fait un angle θ avec l'axe optique et intercepte la pupille de sortie à une distance r dans le plan orthogonal. Comme $f = y/\theta$, il vient : $r = n \sin\alpha * f$. D'autre part, l'ouverture numérique s'exprime en fonction de l'angle maximal α_{max} : $ON = n \sin\alpha_{max}$. On peut ainsi en déduire le diamètre de la pupille : $\Phi = 2 * r_{max} = 2 * ON * f$. En ce qui concerne le calcul de la focale de l'objectif, il faut considérer que l'ensemble objectif - lentille de tube a un grandissement de $g_y = 100$. Sachant que sur un microscope Nikon la lentille de tube a une focale de 200 mm, il est facile de déduire $f = f_{tube}/g_y = 2mm$.

4. Une illumination uniforme aurait conduit à un diamètre de 1000 nm, tandis que dans le cas d'un profil gaussien dans le plan focal, le diamètre aurait été de 520 nm.

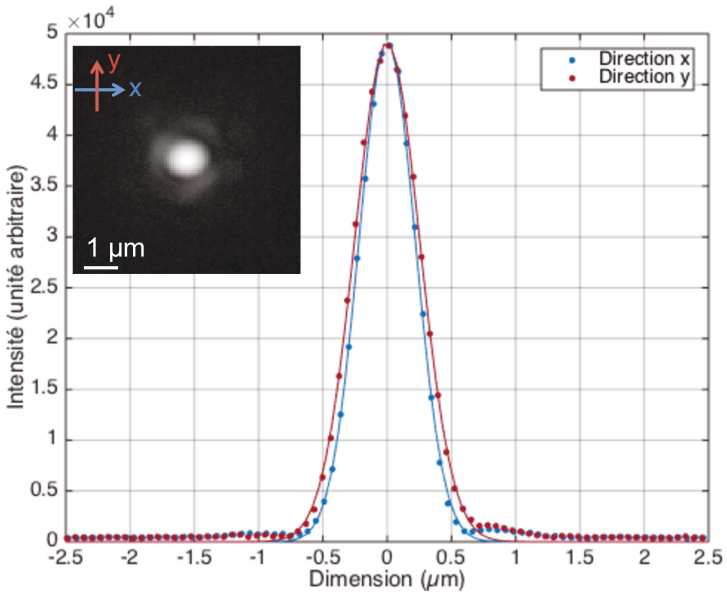


FIGURE 2.7 – Profil de la tache focale dans le plan de focalisation de l'objectif. Dans l'encart, l'image de la tache en échelle logarithmique montre que la tache est à peu près symétrique et possède un léger rebond. Les directions x et y pour lesquelles les profils ont été tracés sont indiquées sur l'image. Les points de mesures de l'intensité par pixel sont indiqués par des ronds et le trait plein représente l'ajustement gaussien permettant de déterminer la valeur des rayons à $1/e^2$, qui sont respectivement $\omega_{0,\,x} = 500$ nm et $\omega_{0,\,y} = 435$ nm.

Comme indiqué en introduction de partie, pour choisir les billes il faut considérer d'une part l'efficacité de piégeage, et d'autre part l'application biologique. Dans la partie 1.3.1, nous avons souligné la dépendance de la force de piégeage avec la différence d'indice entre la bille et le milieu aqueux, notamment avec l'expression des forces dans le régime de Rayleigh (cf. expressions 1.2 et 1.3). Le choix du matériau va donc uniquement intervenir dans l'efficacité de piégeage.

En revanche, le rayon de la bille a des conséquences à plusieurs niveaux. Tout d'abord, il intervient dans l'efficacité de piégeage comme mentionné dans la partie 1.3.1 : la force de gradient d'intensité augmente comme le cube du rayon de la bille dans le régime de Rayleigh, tandis qu'elle est pratiquement insensible à celui-ci dans le régime de l'optique géométrique. En ce qui concerne les considérations biologiques, il faut trouver un compromis entre application locale de la force et endommagement minimum de la cellule. En effet, en absence de déplacement du piège, le centre de la bille "coïncide" avec le centre du piège. Ainsi, plus le rayon de la bille est faible, plus la cellule est exposée au faisceau focalisé. Néanmoins, l'aspect local de la force est également important, donc il ne faut pas un rayon trop important. Enfin, la surface de contact entre la bille et la cellule est également une donnée importante afin de respecter des pressions physiologiques, soit entre 1 et 20 Pa.

Pour répondre à ces contraintes, je vais d'abord considérer le matériau et le diamètre de la bille pour optimiser l'efficacité de piégeage. Ensuite, le résultat de ces études permettra ensuite de discuter des exigences du point de vue biologique, permettant de conclure sur le choix des billes.

Efficacité de piégeage et choix du matériau Généralement, les billes utilisées pour le piégeage optique pour la biologie sont en polystyrène ou en silice. Les indices optiques associés valent respectivement 1.57 et 1.45. Ainsi, on s'attend à avoir une plus grande efficacité de piégeage avec des billes de polystyrène qu'avec des billes de silice. C'est bien ce que l'on observe sur la figure 2.5 : la constante de raideur dans le plan transverse est environ 2 fois supérieure avec des billes de polystyrène qu'avec des billes de silice [Vermeulen 2006].

Ce résultat est également retrouvé dans [Bormuth 2008], où les auteurs comparent les constantes de raideurs transverses et longitudinales pour des billes de polystyrène et de silice dont le rayon varie. Quel que soit le rayon considéré, le piège est plus raide avec des billes de polystyrène qu'avec des billes de silice.

Ainsi, pour maximiser l'efficacité de piégeage, il faut privilégier des billes de polystyrène.

Efficacité de piégeage et diamètre de la bille L'efficacité de piégeage varie en fonction du rayon de la bille. Ceci est visible sur la figure 1.24 qui représente l'efficacité de piégeage dans le plan tranverse pour des billes de polystyrène de différents rayons. D'après les résultats expérimentaux, l'efficacité de piégeage augmente rapidement avec le rayon jusqu'à environ 0.5 µm, puis diminue plus lentement en tendant vers une asymptote [Viana 2007]. D'autre part, Bormuth et al. obtiennent de façon indépendante la même tendance dans les directions transverse et longitudinale dans des conditions similaires : la constante de raideur est maximale pour un rayon de 0.8 µm pour des billes de polystyrène [Bormuth 2008].

D'après ces résultats, la façon la plus efficace de convertir la puissance laser pour exercer une force sur une bille est que celle-ci soit en polystyrène et fasse autour de 1 µm de diamètre.

Ce diamètre convient-t-il aux contraintes liées à une pression physiologique et à la limitation de l'endommagement des cellules par la lumière ?

Considérations biologiques et choix du diamètre D'un point de vue biologique, plusieurs points ont été listés précédemment et sont considérés un à un. Si un diamètre de bille de 1 µm répond au besoin d'appliquer une force locale, il ne permet pas vraiment de déporter suffisamment le piège pour exposer au minimum la cellule. En effet, le waist du laser est de l'ordre de 0.5 µm.

Multiplier par 3 le diamètre de la bille permettrait de mieux déporter le piège. En contrepartie, ceci diminue l'efficacité de piégeage d'environ un facteur 2 selon [Viana 2007] et 4 selon [Bormuth 2008]. Ainsi, pour exercer une pression de l'ordre de 10 Pa, il faudrait appliquer une force d'environ 20 pN.

De plus, un diamètre de 3 µm est plus proche des diamètres de bille choisis dans les études de la littérature précédemment citées qui utilisent soit des billes de 4.5 µm de diamètre [Na 2008, Hu 2003, Hu 2004, Hu 2005], soit des billes de 10 µm [Wang 2005].

Choix des billes Nous avons choisi de travailler avec des billes de polystyrène de 3 µm de diamètre (Polybead Carboxylate 3.00±0.07 µm microspheres) fonctionnalisées COOH. Ces ligands permettent la fonctionnalisation des billes avec la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui reconnait spécifiquement les intégrines se trouvant à la surface de la cellule [Schwartz 1991], comme utilisé par exemple dans [Na 2008, Hu 2003, Hu 2004, Hu 2005].

Point de vue pratique : la chambre microfluidique Dans le cadre des réglages et de la calibration du montage, des billes piégées sont contenues dans une chambre microfluidique. Cette chambre est relativement simple. Elle est réalisée grâce à une lame de microscope et une lamelle de 170 µm d'épaisseur (Fisherbrand microscope cover glass 12 542 C - 25 mm x 25 mm) collées grâce à deux morceaux de scotch double face. Ainsi, la chambre fait 25 mm de long sur environ 1 cm de large et 100 µm de hauteur. Elle est remplie par une solution de billes diluées dans de l'eau milliQ dans un ratio volumique $1 : 10^4$. Cette concentration volumique a été choisie de façon à avoir une petite dizaine de billes dans la chambre permettant qu'elles soient suffisamment espacées pour éviter de piéger plusieurs billes en même temps, tout en ayant une temps de recherche des billes relativement court [5].

Dans cette partie, j'ai passé en revue les éléments permettant de piéger une bille. Je vais maintenant compléter le schéma du montage avec la déflexion du faisceau de piégeage qui permet de déplacer le piège dans le plan de l'échantillon afin d'exercer une force sur la cellule.

2.2 Déplacement du piège par rapport à l'échantillon

A ce stade, le montage s'organise autour d'un microscope inversé permettant de focaliser le faisceau laser par un objectif de microscope dans la chambre microfluidique contenant des billes.

5. Le stock de billes est conservé au réfrigérateur et ouvert seulement sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute prolifération de bactéries et contamination. Avant dilution, un petit volume de solution mère est placé dans un bain à ultra-sons pendant 10 min pour casser les agrégats. La solution diluée est ensuite conservée au réfrigérateur pendant environ 1 mois avant d'être renouvelée.

Pour exercer des forces sur la cellule via la bille, il faut d'abord approcher la bille de la cellule jusqu'au simple contact permettant à la bille piégée d'être reconnue par les intégrines et de se lier à celles-ci. Ceci ne peut être réalisé en pratique sans une platine de nano-positionnement. Ensuite, la force est exercée grâce au déplacement du piège par rapport à la cellule. Pour cela, deux configurations sont possibles : déplacer la cellule grâce à la platine de nano-positionnement en maintenant le piège fixe, ou au contraire déplacer le piège en laissant la cellule immobile, grâce à des déflecteurs acousto-optiques. Ces deux possibilités sont décrites dans les parties suivantes.

2.2.1 Déplacement par la platine de nano-positionnement

La platine de nano-positionnement qui a été incorporée à la place de la plateforme standard du microscope est une platine piezo-électrique fournie par Physik Instrumente (P-545.3R7). Elle permet de déplacer l'échantillon sur une course maximale de 200 µm, avec une précision de 3 nm selon les trois axes. Il s'agit donc d'un moyen très précis, stable et reproductible pour approcher la bille au contact de la cellule.

Comme la platine permet de déplacer l'échantillon, et donc la cellule et la bille liée à sa membrane, par rapport au piège, il est possible d'appliquer des forces à la surface de la cellule par ce biais. Si cela ne pose aucun problème pour une force stationnaire, cela devient plus critique lorsque le mouvement est oscillant, comme dans le cas des expériences de micro-rhéologie où le domaine fréquentiel étudié va du Hz au kHz. En effet, la platine a un temps de réponse relativement lent de l'ordre de la dizaine de ms, ce qui ne permet pas d'effectuer des mouvements à des fréquences supérieures à la centaine de Hz. Nous nous sommes donc orientés vers une solution complémentaire visant à déplacer le piège en maintenant l'échantillon fixe grâce aux déflecteurs acousto-optiques, déjà utilisés sur le montage précédent.

2.2.2 Déplacement par les déflecteurs acousto-optiques

Les déflecteurs acousto-optiques (DAOs dans la suite du texte) comportent un cristal transparent dont la maille cristalline est modifiée par l'application d'une onde acoustique. Le cristal agit donc comme un réseau de diffraction. Les DAOs ont l'avantage d'être rapides avec un temps de réponse de quelques μs, i.e. une fréquence de l'ordre du MHz, et un angle de déflexion de l'ordre du degré. En associant deux DAOs diffractant dans deux directions orthogonales, il est possible de déplacer le piège dans toutes les directions du plan de la cellule et d'étudier sa réponse pour un stimulus oscillant à des fréquences de l'ordre du kHz. Toutefois, il est à noter que l'inconvénient majeur des DAOs réside dans les pertes, avec une efficacité de diffraction de l'ordre de 80 %, qui peut varier selon l'angle de déflexion. Ceci est d'autant plus critique que l'on combine deux DAOs.

En incluant le couple de DAOs (Intra Action Corp. DTD 274HA6), le montage se transforme comme indiqué sur la figure 2.8. Deux points sont à retenir sur ce montage :

- les deux DAOs sont orientés orthogonalement de façon à dévier le faisceau soit dans le plan parallèle à la table optique (DAO_x), soit dans le plan orthogonal à la table optique contenant l'axe du montage (DAO_y) ; ceci permet d'exercer une force dans tout le plan de l'échantillon,

- les deux DAOs sont situés dans des plans conjugués du plan focal arrière de l'objectif permettant une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon ; ceci est réalisé grâce à deux télescopes afocaux (L_A, L_B) et (L_C, L_D).

Ces deux points sont abordés dans les deux parties suivantes.

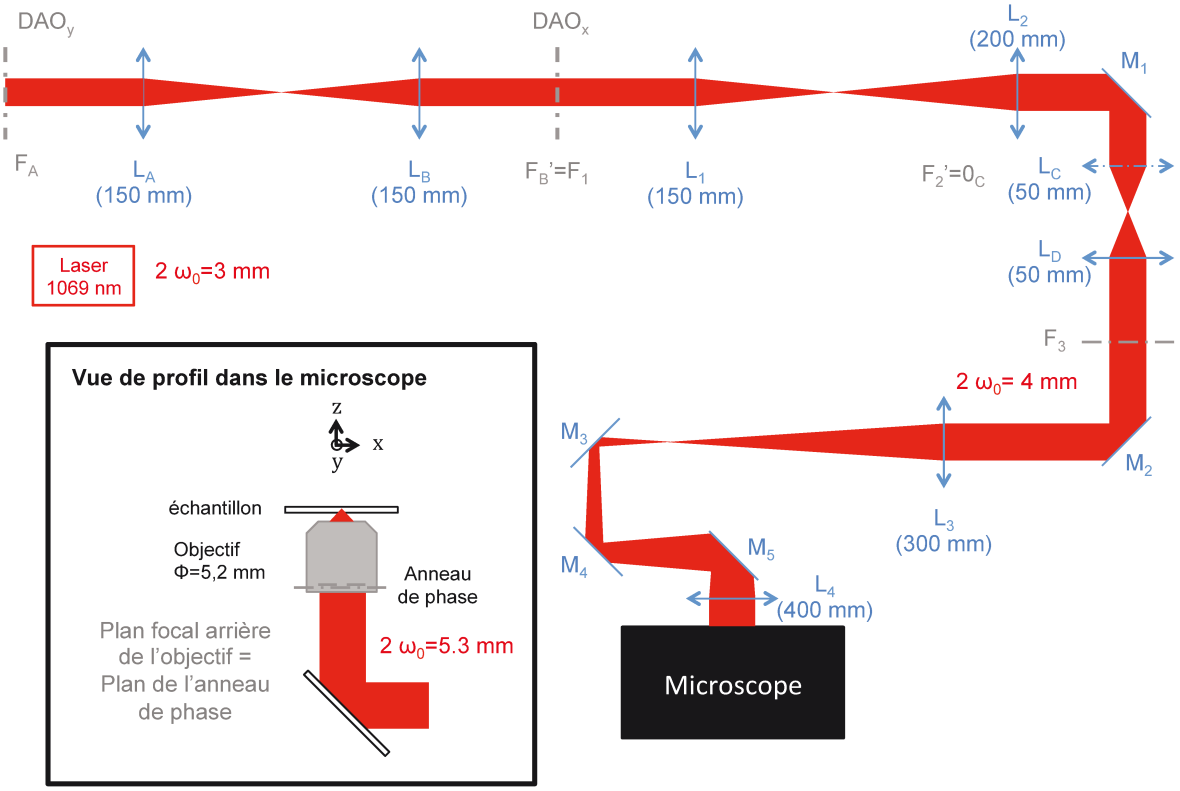


FIGURE 2.8 – Schéma du montage après intégration du couple de déflecteurs acousto-optiques. Le DAO$_y$ diffracte dans un plan orthogonal au montage et le DAO$_x$ diffracte dans le plan du montage. Les DAOs sont placés dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif afin de permettre une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon. Cela est réalisé grâce à l'ajout de deux télescopes afocaux : (L_A, L_B) conjugue les deux DAOs entre-eux ($f'_A = f'_B = 150$ mm), et (L_C, L_D) assure le relais de pupille ($f'_A = f'_B = 50$ mm). Les plans conjugués sont indiqués par un trait gris en pointillé. Il est à noter que la lentille L_C se trouve directement dans un plan conjugué. Les DAOs ne sont représentés que par le plan qui est conjugué avec le plan focal arrière de l'objectif. Sur ce schéma, le faisceau délivré par la fibre optique n'est pas représenté en entrée du DAO$_y$.

2.2.2.1 Déflexion du faisceau par les déflecteurs acousto-optiques

La déflexion du faisceau incident par les DAOs permet de translater le piège. Cependant l'inconvénient majeur des DAOs résidant dans les pertes de puissance, il est important de les minimiser, en maximisant l'efficacité de diffraction de l'ordre diffracté choisi. Cela repose d'une part sur une orientation précise des DAOs par rapport au faisceau incident et d'autre

part sur la puissance de l'onde acoustique se propageant dans le cristal. J'aborderai ces deux points dans les paragraphes suivants, après avoir présenté le principe de fonctionnement de la déflexion par un DAO.

Principe de la déflexion du faisceau par un DAO Un DAO voit son indice modulé par une onde de pression acoustique radio-fréquence. En effet, l'onde va créer périodiquement des zones de compression et de dilatation au sein du cristal. L'indice optique dépendant de la densité, le cristal va se comporter comme un réseau de Bragg, de période $\lambda_{ac} = v_{ac}/f_{ac}$, où λ_{ac}, f_{ac} et v_{ac} désignent respectivement la longueur d'onde, la fréquence et la vitesse de propagation de l'onde acoustique dans le cristal. Pour obtenir une intensité diffractée conséquente dans cette configuration, le rayon incident doit respecter la condition de Bragg[6], i.e. $\theta_B = \lambda/2\lambda_{ac}$, où λ est la longueur d'onde du faisceau laser. L'ordre diffracté est alors dévié de l'angle $\theta = 2\theta_B$ par rapport au rayon incident (cf. figure 2.9). Cet angle θ peut s'exprimer en fonction de la fréquence f_{ac} et de la vitesse v_{ac} de l'onde acoustique dans le cristal :

$$\theta = \lambda * f_{ac}/v_{ac} \tag{2.1}$$

L'onde acoustique se propageant dans les cristaux des DAOs, en dioxyde de tellurium, a une vitesse de propagation de $v_{ac} = 632$ m/s. L'angle typique de déviation vaut alors $\theta = 2.42^\circ$, pour une fréquence centrale de travail f_{ac} de 25 MHz et une longueur d'onde λ de 1069 nm. Ainsi, une variation de la fréquence de $\Delta f = 100\ kHz$ par rapport à la fréquence centrale induira une déviation du faisceau transmis d'un angle de $\Delta\theta = 0.01^\circ$ par rapport à l'angle θ.

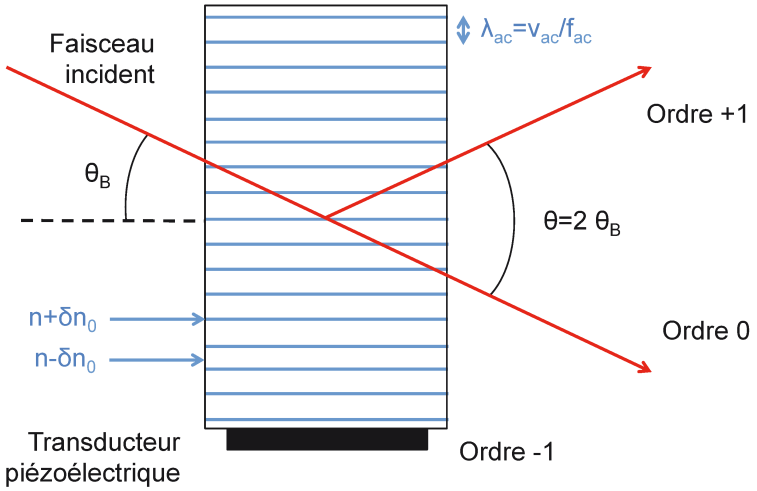


FIGURE 2.9 – Principe de la déflexion du faisceau par un déflecteur acousto-optique. L'angle θ_B signifie angle de Bragg. n est l'indice optique du cristal et δn_0 la modulation induite par la propagation de l'onde acoustique de période λ_{ac}, de fréquence f_{ac} et de vitesse v_{ac}.

L'autre caractéristique importante des DAOs est leur temps de réponse. Celui-ci est donné dans le cas d'un faisceau gaussien de waist ω_0 par le temps de propagation de l'onde acoustique

6. La condition de Bragg correspond à la condition pour laquelle toutes les ondelettes diffractées sur chaque modulation d'indice sont toutes en phase, de manière à obtenir une intensité diffractée importante, typiquement de l'ordre de 80%

sur la taille du faisceau, à un facteur multiplicatif près :

$$\tau = 0.64 \times 2\ \omega_0/v_{ac} \tag{2.2}$$

Au niveau des DAOs, le waist ayant un diamètre de 3 mm, on en déduit un temps de réponse de 3 µs. Il s'agit donc d'un temps de réponse suffisamment court pour faire d'osciller le piège à une fréquence de l'ordre du kHz.

Orientation des DAOs Afin de maximiser l'intensité du premier ordre diffracté, le faisceau incident doit faire un angle θ_B avec le DAO. Cet alignement est donc critique pour optimiser l'efficacité de diffraction. Nous travaillons avec un couple de DAOs. Le premier diffracte dans le plan orthogonal au montage, tandis que le second dévie le faisceau dans le plan du montage. Dans la suite du manuscrit, ils seront respectivement appelés DAO_y et DAO_x en référence au déplacement du piège dans le plan de l'échantillon que nous avons repéré selon les axes (x, y).

L'alignement au niveau du DAO_y doit respecter deux contraintes : d'une part le faisceau de sortie doit être à la hauteur de l'entrée du microscope[7], et d'autre part celui-ci doit être horizontal, c'est-à-dire parallèle à la table optique. Donc pour l'alignement, il faut agir non seulement sur la position du DAO en hauteur et en angle, mais aussi sur l'angle d'incidence du faisceau laser. Pour cela, le DAO est fixé sur une platine possédant cinq degrés de liberté (trois en translation et deux en rotation) et l'angle et la hauteur du faisceau incident sont contrôlés par un miroir se trouvant avant le DAO_y.

En ce qui concerne le DAO_x, le faisceau incident se trouvant dans le plan du montage doit être dévié de façon à se retrouver confondu avec l'axe optique du montage. Pour cela, le DAO_x est également positionné sur une platine possédant cinq degrés de liberté et l'angle du faisceau incident est corrigé par le même miroir en amont du DAO_y.

Génération de l'onde acoustique L'onde acoustique se propageant dans le cristal est générée grâce à une onde électrique sinusoïdale radio-fréquence (notée RF dans la suite) amplifiée puis convertie grâce à un transducteur. En pratique, ce signal électrique est généré grâce à une carte DDS (Direct Digital Synthetizer) réalisée par André Villing, ingénieur électronicien travaillant au LCF. Cette carte a une précision en fréquence de moins de 15 Hz, ce qui signifie qu'elle n'introduit pas d'incertitude sur la fréquence de consigne (de l'ordre du MHz). Cette carte est pilotée grâce à un séquenceur qui peut recevoir jusqu'à un ordre toutes les 2 µs. Cet ordre est envoyé via un programme Labview réalisé par nos soins permettant de générer le signal sinusoïdal.

L'amplitude de l'onde RF a évidemment une influence importante sur l'efficacité de diffraction, puisqu'elle joue sur l'amplitude de modulation du réseau d'indice à l'intérieur du cristal. En faisant varier l'amplitude du signal RF de commande, nous avons obtenu les résultats présentés sur la figure 2.10. Les deux DAOs ne présentent pas exactement le même comportement suivant l'amplitude du signal. En pratique, nous utilisons l'amplitude correspondant à l'efficacité maximale de chacun des deux DAOs. Ainsi, après alignement des DAOs et optimisation de la tension RF, l'efficacité de diffraction en sortie du DAO_y vaut 83% tandis qu'en sortie du

7. Les trois miroirs avant l'entrée du microscope permettent de réajuster finement la hauteur du faisceau pour qu'il soit parfaitement aligné avec l'objectif du microscope, ce qui est l'un des réglages les plus délicats du montage.

DAO_x, elle est de 80%, ce qui fait que pour le couple, nous avons une transmission totale de 66 %. Il est à noter que ce sont des efficacités de diffraction tout à fait correctes pour des DAOs.

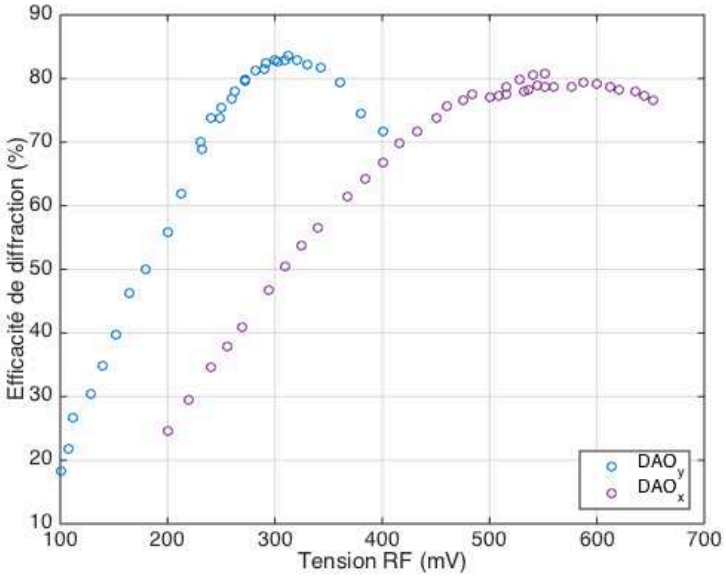


FIGURE 2.10 – Efficacité de diffraction en fonction de l'amplitude de la tension RF envoyée aux DAOs.

2.2.2.2 Translation du piège dans le plan de l'échantillon

Comme mentionné précédemment, il est important de translater le piège de façon à ce qu'une bille piégée sur l'axe optique du montage voit le même piège qu'une bille piégée hors d'axe. Il s'agit donc d'effectuer une translation pure du piège dans le plan de l'échantillon. Ainsi, la forme du puits de potentiel ne varie pas lors du déplacement du piège et donc la constante de raideur est toujours la même. De fait, la force sera directement proportionnelle au décalage du piège. C'est ce que je vais expliquer dans un premier temps, avant de calibrer ce décalage par rapport au changement de la fréquence des DAOs.

Translation pure du piège dans le plan de l'échantillon Le point essentiel pour intégrer les DAOs dans le montage est d'effectuer une translation pure du piège. Pour cela, il faut conjuguer les déflecteurs avec le plan focal arrière de l'objectif. En effet dans cette configuration, quelque soit l'angle de déviation $\Delta\theta$ du faisceau généré par le DAO, le rayon moyen du faisceau passera toujours par le centre du plan focal arrière de l'objectif et donc en ressortira parallèle à l'axe optique, décalé de $\Delta y'$, donné par la relation :

$$\Delta y' = \Delta\theta \ f'/g_y \tag{2.3}$$

où f' est la focale de l'objectif et g_y le grandissement du faisceau entre le plan du DAO et le plan focal arrière de l'objectif. Ce principe est illustré sur la figure 2.11 dans le cas d'un seul un télescope afocal.

Afin de mettre cela en œuvre sur le montage (cf. figure 2.8), les DAOs sont conjugués par un télescope afocal (L_A, L_B) et le DAO_x est positionné dans le plan focal objet de la lentille L_1. Le relais de pupille s'effectue par le biais d'un deuxième télescope afocal (L_C, L_D) de grandissement 1 ($f'_C = f'_D$) qui est intégré entre les lentilles L_2 et L_3. L_C est placée dans le plan focal de L_2, et le plan focal objet de L_3 se trouve à $2f'_D$ de L_D.

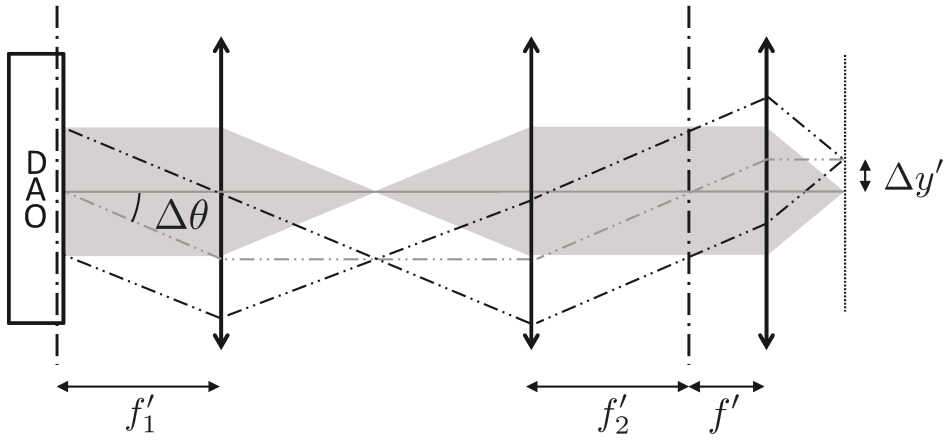


FIGURE 2.11 – Conjugaison du déflecteur acousto-optique avec le plan focal arrière de la lentille de focale f', permettant d'effectuer une translation pure du piège. Le déplacement $\Delta y'$ est simplement proportionnel à l'angle $\Delta\theta$, à la focale f' et au grandissement $g_y = f'_2/f'_1$ du télescope constitué de deux lentilles de focales f'_1 et f'_2.

Pour le télescope (L_A, L_B), une focale de 150 mm a été choisie afin d'être suffisamment grande au regard de l'épaisseur de la monture des DAOs d'environ 1 cm pour les positionner au plus près d'un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, tout en étant compatible avec les contraintes d'espace. Le couple (L_C, L_D) a quant à lui une focale commune de 50 mm.

Remarque sur le choix de la focale du télescope (L_C, L_D) L'idée de ce couple (L_C, L_D) à courte focale a été mise en œuvre sur le montage d'Antoine Le Gall (couple (L_3, L_4) sur le montage de la figure 1.25). Son objectif est double : d'une part il permet d'effectuer un relais de pupille, et d'autre part il permet de compenser le défocus dû à la pression de radiation.

En effet, dans la partie 1.3.1, nous avons vu que la bille n'était pas piégée dans le plan focal de l'objectif mais légèrement en aval à cause de la pression de radiation. Ce décalage induit donc qu'il n'est pas possible d'être simultanément au point sur le plan de focalisation et le plan de piégeage, sur la caméra d'observation en sortie du microscope. L'idée est donc de décaler légèrement L_C afin de compenser ce défocus. Ce décalage est d'autant plus efficace dans le plan de l'échantillon que la focale des lentilles du télescope (L_C, L_D) est courte[8]. Finalement, les contraintes d'espace nous ont amené à choisir une focale commune aux deux lentilles de 50 mm.

8. Le calcul d'optique géométrique permet d'estimer le décalage de la lentille L_C, x en fonction du défocus x' à partir des différentes focales des lentilles et de l'objectif (f'). On trouve $x = \frac{f'^2_D * x'}{\left(\frac{f'_3}{f'_4}\frac{f'}{}\right)^2 - f'_D * x'}$. Ainsi, pour compenser un défocus de 1 μm, il suffit de décaler la lentille de L_C de 0.4 mm, pour $f'_3 = 300$ mm, $f'_4 = 400$ mm et $f'_D = 50$ mm.

Cependant, la compensation du defocus par le décalage de la lentille L_C s'est avérée trop délicate en pratique. Nous avons donc décidé de la positionner strictement dans le plan focal image de L_2. Ainsi, le télescope (L_C, L_D) n'est utile que pour le relais de pupille.

Déplacement du piège dans le plan de l'échantillon Une fois les DAOs alignés et les lentilles placées, une bille peut être piégée et observée grâce à la caméra en sortie de microscope (voir section suivante pour plus de précisions). La première vérification consiste à déplacer la bille piegée avec chacun des deux DAOs afin de s'assurer qu'ils sont bien orthogonaux entre eux. Ensuite, une calibration précise du déplacement effectué dans le plan de l'échantillon grâce au changement de la fréquence est réalisée. Pour cela, nous avons déplacé la bille piégée par pas de 100 kHz en allant de 24.5 MHz à 25.5 MHz. En déterminant le centre de la bille sur chacune des images prises avec la caméra, la facteur de conversion est estimé à 1.94 ± 0.02 nm/kHz pour chacun des deux DAOs.

Ces valeurs peuvent être comparées à l'estimation théorique du facteur de conversion. En effet, à partir des expressions de θ, donné par la relation 2.1, et de $\Delta y'$, donné par la relation 2.3, on déduit :

$$\frac{\Delta y'}{\Delta f_{ac}} = \frac{\lambda f'}{g_y v_{ac}} = 1.90\ nm/kHz \tag{2.4}$$

sachant que la focale de l'objectif vaut $f' = 2$ mm et le grandissement total des différents télescopes $g_y = 1.8$. Cette valeur théorique est très proche des valeurs déterminées expérimentalement.

2.3 Détection

Une fois le montage effectué pour piéger une bille et exercer une force en déplaçant le piège par rapport à l'échantillon, il faut d'une part imager les billes et les cellules et d'autre part mesurer la position de la bille par rapport au piège. Cela est réalisé distinctement par deux voies de détection : l'imagerie est faite sur une caméra, tandis qu'une photodiode à quatre quadrants détecte les photons rétro-diffusés par la bille permettant de mesurer sa position. Ceci est développé dans les deux parties suivantes.

2.3.1 Imagerie des cellules et de la bille

L'imagerie des cellules et de la bille a pour principal intérêt de pouvoir les observer afin de piéger une bille et de l'approcher au contact de la cellule. La mise au point sur ces deux éléments est donc importante pour réaliser les expériences. Or, comme mentionné ci-dessus, la bille est piégée en aval du plan de focalisation. Il existe donc un défocus entre le plan de piégeage et le plan de focal de l'objectif.

Après un rapide rappel sur l'illumination Köhler dans le cas d'une imagerie à contraste de phase, je vais décrire la façon dont nous avons placé la caméra pour permettre une mise au point soit sur la bille piégée, soit sur la cellule. Cette astuce sera ensuite exploitée afin d'évaluer la distance de défocus. Enfin, la possibilité de suivre le mouvement de la bille avec la caméra sera évoquée.

Illumination Köhler L'emploi d'un microscope permet une imagerie de l'échantillon facile grâce à une caméra en sortie du microscope. Cette imagerie s'effectue grâce à un éclairage Köhler qui permet une illumination uniforme de tout l'échantillon. La présence de l'ouverture annulaire dans le plan focal arrière du condenseur ne modifie en rien cette propriété et, combinée à l'anneau de phase situé dans le plan focal arrière de l'objectif, elle permet une imagerie à contraste de phase des cellules, comme l'illustre la figure 2.12.

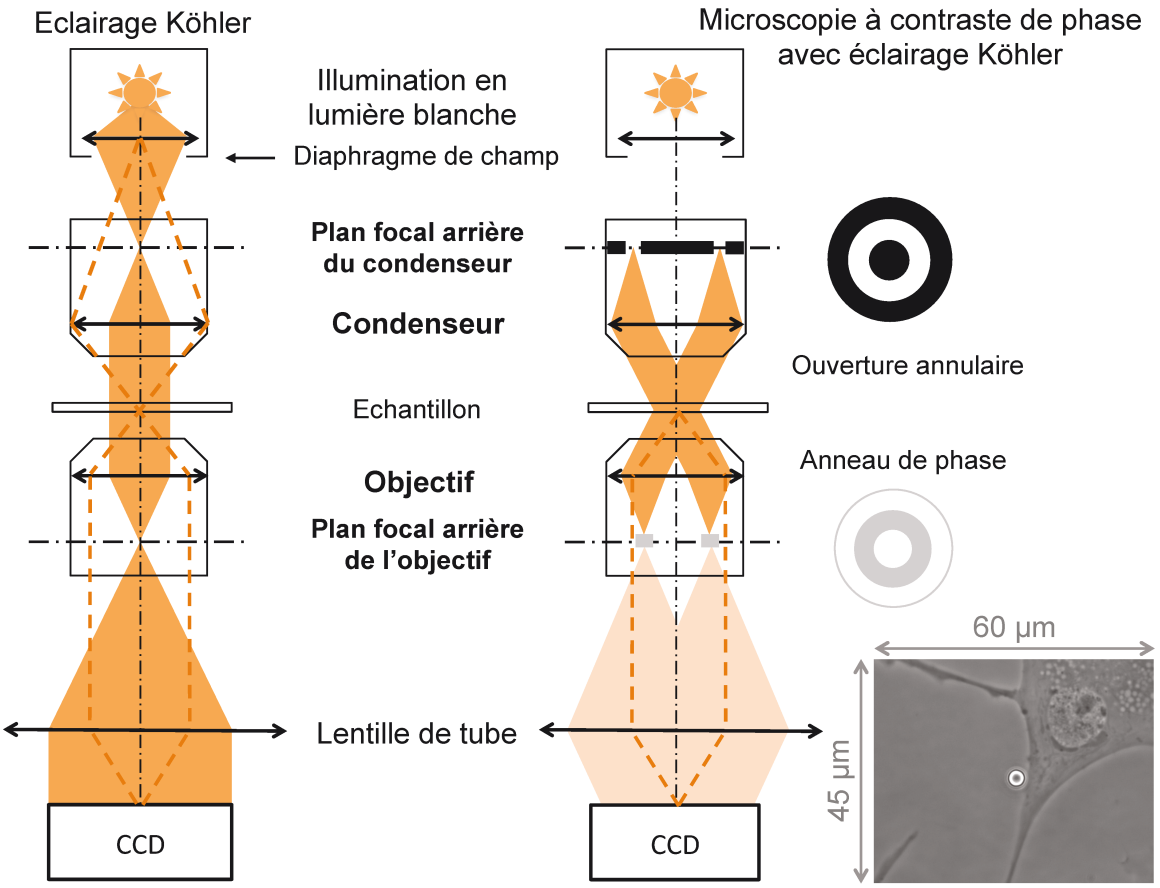


FIGURE 2.12 – Système d'imagerie d'un échantillon. A gauche, le montage de l'éclairage Köhler qui assure une illumination uniforme de l'échantillon. Celui-ci repose sur trois conjugaisons : i) le diaphragme de champ de l'éclairage avec l'échantillon via le condenseur, ii) le diaphragme d'ouverture, situé dans le plan focal arrière de l'objectif, avec la pupille d'entrée de l'objectif (à l'infini) via le condenseur, et iii) la lampe avec le diaphragme d'ouverture. A droite le montage de microscopie à contraste de phase avec un éclairage Köhler. Les plans focaux arrière du condenseur et de l'objectif sont conjugués. Ainsi, l'anneau de phase est l'image de l'ouverture annulaire permettant d'atténuer et de déphaser les rayons directs. Les rayons diffractés par l'échantillon faiblement contrasté en amplitude (en pointillés sur le schéma) sont alors imagés sur la caméra. Une image de cellule endothéliale avec une bille collée sur la membrane est donnée à titre d'exemple.

Positions de la caméra pour imager soit la bille piégée soit la cellule Une caméra u-Eye (U-Eye, UI 2240 SE MGL) est positionnée en sortie du microscope. Comme indiqué précédemment, la bille est piégée dans un plan légèrement en aval du plan focal de l'objectif conduisant à une incompatibilité de mise au point simultanée sur les cellules et la bille piégée. Ceci est visible sur l'image de la figure 2.12 qui a été acquise avec mise au point sur la cellule : la bille apparait élargie avec un centre noir, au lieu d'un point brillant plus petit lorsqu'elle est au point. Afin de palier ce problème, nous avons décidé de mettre la caméra sur un rail permettant de passer d'une première position où la mise au point est faite sur le plan focal de l'objectif (observation des cellules) et une deuxième position dans le plan de piégeage de la bille. La présence du rail et de deux marques permet de facilement passer de l'une à l'autre des mises au point selon les besoins de l'expérience.

Mesure du defocus Il est à noter que cet écart entre les deux positions de la caméra donne accès à une mesure du defocus entre le plan focal de l'objectif et le plan de piégeage. Les deux positions sont distantes de 1 cm, ce qui correspond à 1.3 μm dans l'échantillon, sachant que le système (objectif, lentille de tube) a un grandissement de 100 et que le milieu de l'échantillon est l'eau (d'indice optique 1.33). Une autre façon de mesurer cette distance est d'utiliser la platine de nano-positionnement en utilisant la mise au point sur une mire graduée. Le décalage imposé à la platine pour retrouver la mise au point effectuée dans la première position de la caméra, lorsqu'on passe à la seconde, est également de 1.3 µm. Bien que la mesure de ce défocus ne soit pas très précise car fortement tributaire de l'appréciation de la mise au point de la bille piégée par l'observateur, celle-ci confirme que la bille est piégée en aval du plan de focalisation et fournit un ordre de grandeur, qui sera important pour la modélisation du signal détecté dans le chapitre 3.

Mesure de la position de la bille Naturellement, l'imagerie dans le plan de piégeage permet de suivre la position de la bille au cours du temps grâce à des algorithmes de détection du barycentre. Ainsi, Huhle et al. ont réussi à mesurer la position de la bille en temps réel, à une cadence de l'ordre du kHz, et avec une précision de l'ordre de 0.1 nm [Huhle 2015]. Cependant, en général, pour un coût modéré, la fréquence d'acquisition des caméras est plutôt de l'ordre de la centaine de Hz.

D'autre part, un suivi de la position de la bille par caméra donne accès à la position absolue de la bille. De fait, si le piège n'est pas parfaitement stable spatialement (ce qui peut être le cas lors d'expériences à 37 $^\circ$ C comme l'impose la présence des cellules), un déplacement conjoint de la bille et du piège sera interprété comme un déplacement de la bille uniquement. Pour y remédier une solution serait d'acquérir simultanément l'image de la bille et celle du piège, pour pouvoir suivre leur position respective.

Bien que l'utilisation d'une caméra soit nécessaire pour imager et qu'elle ne nécessite donc aucun ajout au montage, le coût, la mise en place des algorithmes et la détection absolue de la position de la bille nous ont poussé à suivre la pratique la plus courante qui est une détection du faisceau défléchi par la bille piégée grâce à une photodiode quatre quadrants. En la positionnant dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur dans le cas d'une détection en transmission, ou dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif dans le cas d'une détection en réflexion, nous avons directement accès à la position relative de la bille par rapport au piège.

2.3.2 Détection de la position de la bille à partir du faisceau réfléchi

Comme motivé dans la section 1.3.3, et plus particulièrement développé dans la partie 1.3.3.2, nous avons choisi de travailler avec le faisceau rétro-diffusé par la bille, plutôt que transmis par celle-ci, facilitant ainsi l'accès à l'échantillon et la combinaison avec la microscopie à contraste de phase. Cette partie a pour but de décrire la mise en œuvre de la détection de la position de la bille dans cette configuration. Dans un premier temps, je présenterai les adaptations du montage permettant d'extraire le faisceau réfléchi par la bille, et surtout de mesurer directement la position de la bille par rapport au piège. Ensuite, je me concentrerai plus sur l'aspect technique avec la mise en œuvre de la mesure de position par la photodiode à quatre quadrants.

2.3.2.1 Adaptation du montage pour la détection du faisceau rétro-diffusé

Les adaptations du montage permettant la détection du faisceau réfléchi par la bille en vue de mesurer sa position par rapport au piège sont représentées sur la figure 2.13. On distingue ainsi :

- des éléments de polarisation permettant de séparer le faisceau réfléchi par la bille du faisceau de piégeage,
- la mise en œuvre de la conjugaison du détecteur avec le plan focal arrière de l'objectif donnant accès à la position relative de la bille par rapport au piège.

Ces deux points sont détaillés dans les paragraphes suivants. Ensuite, nous verrons que le signal détecté est entaché de signaux parasites, ce qui a donné lieu à une adaptation secondaire du montage, afin de ne détecter que le signal rétro-diffusé par la bille. Ce point sera présenté en dernier.

Utilisation de la polarisation pour séparer le faisceau réfléchi du faisceau de piégeage La détection du faisceau rétro-diffusé par la bille suppose de séparer le faisceau incident de piégeage et le faisceau réfléchi. Pour cela, nous utilisons la polarisation. En effet, en sortie de fibre, la polarisation du faisceau laser est linéaire. Celle-ci est transformée en polarisation circulaire grâce à une lame quart d'onde. A la réflexion sur la bille, la polarisation change de sens et le faisceau réfléchi, en repassant par la lame quart d'onde, est alors polarisé linéairement à 90 ° du faisceau incident. Les deux faisceaux sont alors séparés par un cube séparateur de polarisation qui transmet le faisceau incident et réfléchit à 90 ° le faisceau réfléchi par la bille. Le détecteur est alors positionné en sortie du cube (cf. figure 2.13). En pratique, une lame demi-onde a été ajoutée en amont du cube séparateur afin d'optimiser l'orientation de la polarisation linéaire du faisceau de piégeage pour minimiser les pertes au passage du cube.

Détection de la position relative de la bille par rapport au piège : positionnement du détecteur dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif Comme annoncé précédemment, il s'agit d'adapter la configuration de la détection dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur développée en transmission, au cas du faisceau rétro-diffusé. L'avantage de cette configuration est que seul le mouvement de la bille par rapport au piège est détecté, ce qui rend la mesure insensible aux mouvements du piège. En effet, l'angle que forme le faisceau réfléchi par la bille avec l'axe optique du montage est directement relié à la position

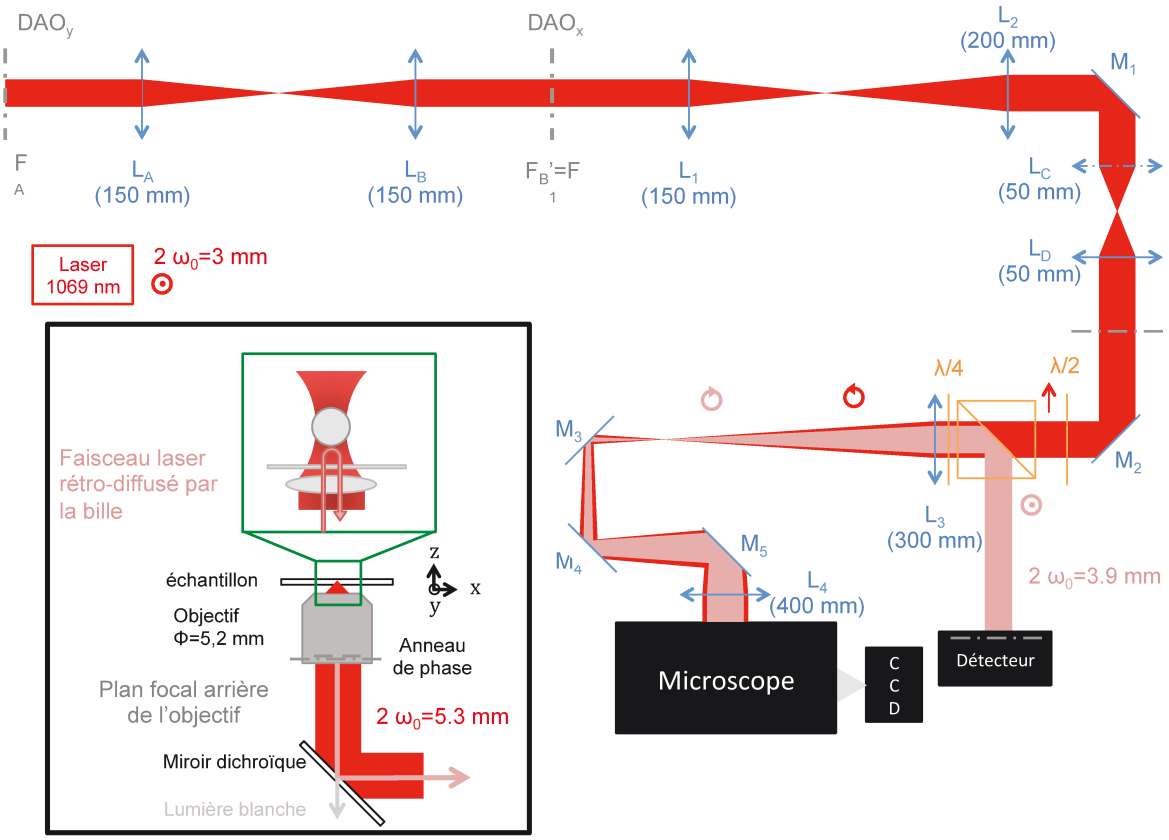


FIGURE 2.13 – Schéma du principe de la détection du signal rétro-diffusé par la bille pour mesurer la position relative de la bille par rapport au piège. Le faisceau rétro-diffusé par la bille est représenté en rose par dessus le faisceau incident permettant de piéger. Les deux faisceaux sont séparés grâce à un cube séparateur de polarisation et à une lame quart-onde, le faisceau laser étant polarisé linéairement. Les polarisations sont indiquées par des flèches rouges pour le faisceau de piégeage et rose pour le faisceau réfléchi. La lame demi-onde permet de maximiser la proportion de faisceau transmis par le cube. Le détecteur se trouve dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif (soit à 300 mm de la lentille L_3) de façon à n'être sensible qu'au déplacement relatif de la bille par rapport au piège. La caméra en sortie du microscope permet d'imager l'échantillon grâce à la transmission partielle de la lumière blanche par le miroir dichroïque.

du centre de la bille par rapport au centre du piège. Cet angle se traduit alors par une position dans le plan focal arrière de l'objectif, qui est détecté par la photodiode à quatre quadrants. Ce principe est illustré sur la figure 2.14. Ainsi, quelle que soit la position du piège par rapport à l'axe optique, lorsque la bille est centrée dans le piège, le signal sur le détecteur est centré (cf. première ligne de la figure 2.14). Si maintenant, la bille est décalée par rapport au piège, que celui-ci soit aligné sur l'axe optique ou pas, le signal sur le détecteur sera également décalé (cf. seconde ligne de la figure 2.14). La calibration du détecteur consiste donc à convertir le décalage enregistré sur le détecteur en décalage réel de la bille par rapport au piège comme nous le verrons dans le chapitre 4.

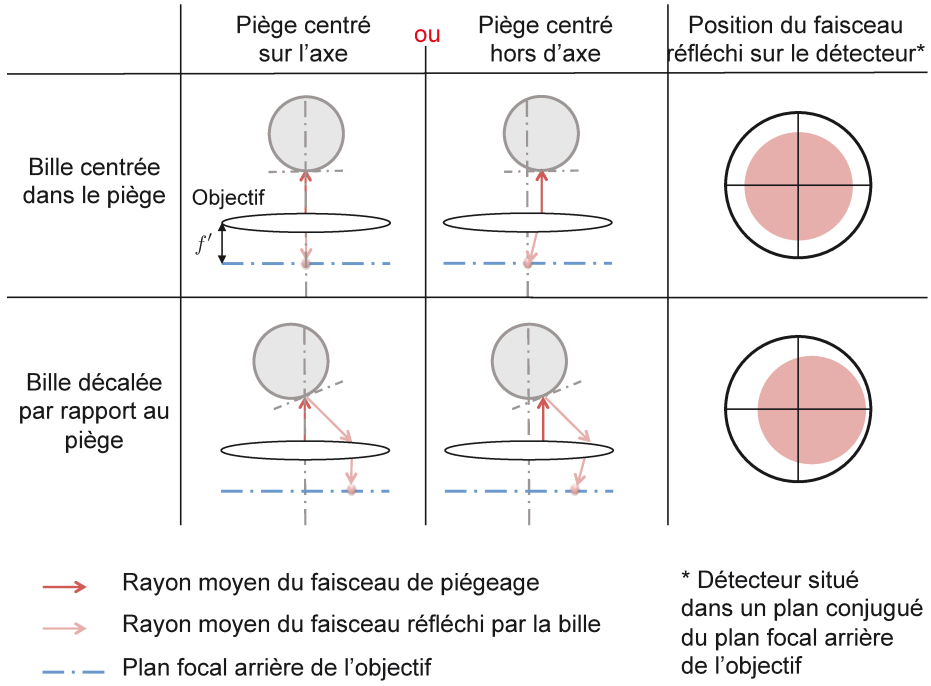


FIGURE 2.14 – Détection de la position relative de la bille par rapport au piège en plaçant le détecteur dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Dans cette configuration, tout se passe comme si on observait à l'infini : le détecteur n'est sensible qu'à l'angle que forme le faisceau incident sur la bille et le faisceau réfléchi par celle-ci, donc seul le décalage de la bille par rapport au piège sera mesuré. Seuls les rayons moyens des faisceaux de piégeage et réfléchi par la bille sont représentés mettant en évidence l'angle etre les deux faisceaux. Que le piège soit centré sur l'axe optique de l'objectif (première colonne) ou décalé par rapport à celui-ci (deuxième colonne), lorsque la bille est centrée dans le piège, le faisceau réfléchi est centré sur l'axe du plan focal arrière de l'objectif (première ligne). A contrario, quand la bille n'est pas centrée dans le piège, le faisceau réfléchi est décalé par rapport au centre du plan focal arrière.

Mise en œuvre de la détection du faisceau réfléchi En pratique, le cube séparateur de polarisation est placé entre le miroir M_2 et la lentille L_3, là où le faisceau est collimaté. Les lames demi-onde et quart d'onde sont respectivement placées en amont et en aval de celui-ci comme représenté sur la figure 2.13. Ainsi le faisceau rétro-diffusé repasse par le télescope (L_4,

L_3) et la lame quart d'onde avant d'être réfléchi par le cube. Comme tous les télescopes sont afocaux, le plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif se trouve dans le plan focal de L_3. La position exacte du détecteur a été affinée en minimisant le décalage du spot rétro-diffusé sur le détecteur quand on déplace le piège avec les DAOs [9]. Afin de pouvoir régler la position du détecteur dans le plan transverse, celui-ci a été monté sur une platine de translation possédant 2 axes. Ainsi, avant chaque déplacement du piège, la photodiode quatre quadrants est centrée sur le faisceau réfléchi par la bille située au centre du piège.

Le détecteur étant positionné dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, le signal détecté est l'image formée dans le plan focal arrière de l'objectif. Connaissant la taille de la pupille de l'objectif ($\Phi = 5.2$ mm), il est facile de déduire le diamètre de la tache sur le détecteur après passage par le télescope (L_4, L_3). Elle vaut 3,9 mm.

Elimination des signaux parasites au niveau de la détection D'après cette configuration, seul le faisceau réfléchi par la bille est censé être réfléchi par le cube dans la direction du détecteur. Or, plusieurs signaux sont présents dans la plan du détecteur. Le cube séparant les polarisations, celles-ci ont été caractérisées plus à différents endroits du montage afin d'éliminer ces signaux parasites. Nous avons ainsi commencé par vérifier la polarisation du faisceau de piégeage dans la partie amont du montage, avant transmission par le cube. Nous nous sommes alors rendus compte que les DAOs ne maintenaient pas la polarisation. Ainsi, le DAO_y fait tourner de 90 ° la polarisation du faisceau laser et le second du même angle permettant de retrouver la polarisation initiale. Cependant, la totalité du faisceau n'a pas subi ces changements, donnant lieu à des signaux parasites. Un autre cube séparateur de polarisation en sortie du DAO_x a alors été introduit afin de les éliminer. [10]

D'autre part, un trop bon alignement de la lame quart d'onde est paradoxalement peu profitable. En effet, bien que celle-ci soit traitée anti-reflet à 1069 nm, une petite proportion du faisceau est néanmoins réfléchie à sa surface et se retrouve dans le plan du détecteur. Pour éviter cela, elle doit être légèrement inclinée. Finalement, parce que le maintien de la polarisation circulaire est moins bon que celui d'une polarisation linéaire lors de la réflexion sur des miroirs, nous avons déplacé la lame quart d'onde juste en entrée de l'objectif. Cela nous permet également de supprimer toute réflexion sur celle-ci puisqu'elle est beaucoup plus éloignée du cube (environ 1 m contre 5 cm dans l'autre configuration).

Malgré toutes les précautions prises pour limiter les réflexions parasites, nous avons constaté que le cube réfléchissait une partie du faisceau incident dans la direction du détecteur. Pour éliminer ce faisceau, nous avons alors placé un second cube séparateur de polarisation en sortie du premier. Le schéma du montage réel est représenté sur la figure 2.15.

Enfin, on peut noter que la présence d'un cube dévie légèrement le faisceau par rapport au plan du montage en introduisant un angle. Pour rectifier cela, en plus de placer les cubes là où le faisceau est collimaté, nous avons veillé à ce qu'ils soient proches d'un miroir afin de compenser l'angle introduit. Ainsi chaque optique est traversée par un faisceau situé dans un plan parallèle à la table optique. Le cube en sortie des DAOs est placé entre la lentille L_2 et le miroir M_1 tandis que le cube permettant de séparer le faisceau de piégeage et le faisceau

9. Pour effectuer ce réglage, le détecteur a été monté sur un rail afin de pouvoir le déplacer facilement. Malgré tous nos efforts, un léger décalage subsiste.

10. En toute rigueur, il aurait fallu placer deux cubes pour épurer le faisceau, un à la sortie de chaque DAO.

réfléchi est lui placé entre le miroir M_2 et la lentille L_3. La lame demi-onde est placée en amont du miroir M_2 juste après L_D.

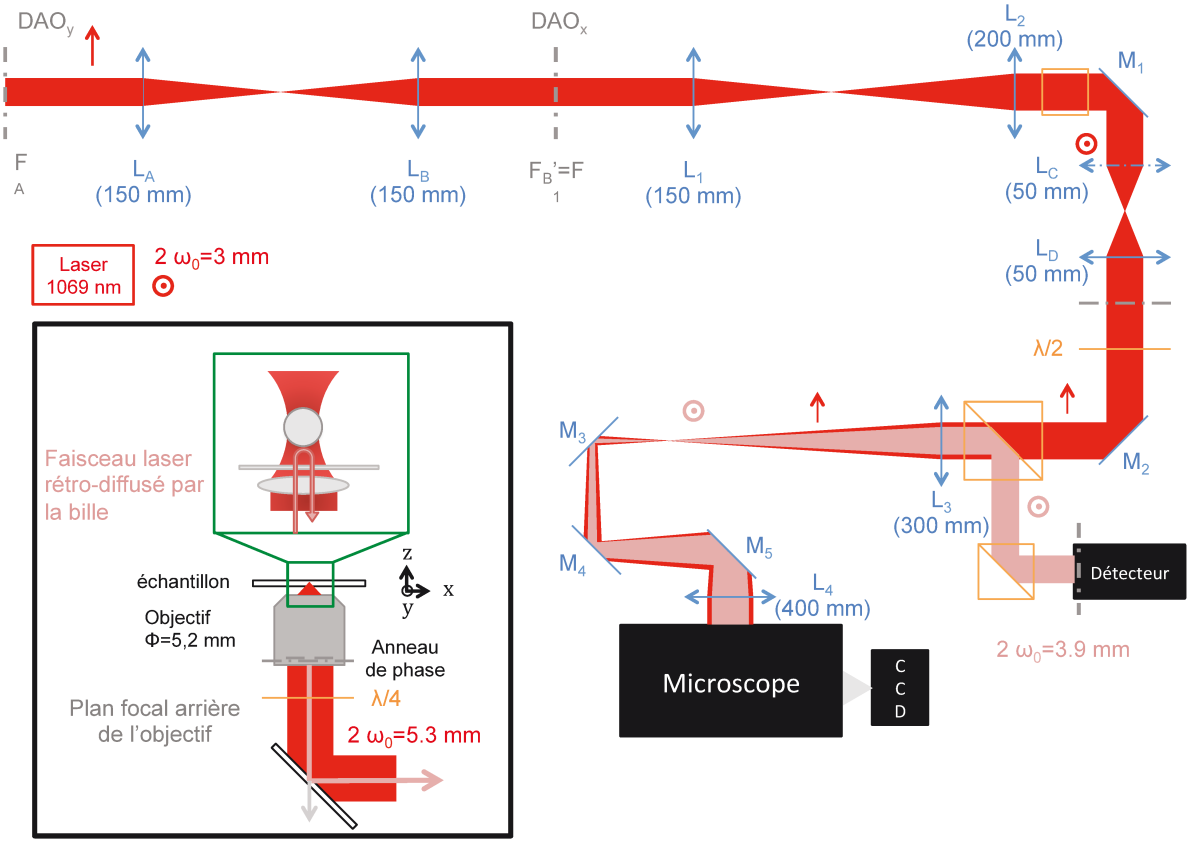


FIGURE 2.15 – Schéma complet du dispositif de pince optique mis en œuvre. Le cube ajouté après la lentille L_2 permet d'épurer la polarisation du faisceau après le passage par le couple de DAOs. Le cube ajouté sur le signal de la détection permet de limiter les réflexions parasites (de polarisation linéaire orthogonale au faisceau à détecter). Afin que les polarisations des faisceaux incident sur l'échantillon et réfléchi par la bille soient les plus mieux définies possibles, la lame quart d'onde a été placée juste en amont de l'entrée de l'objectif.

2.3.2.2 Détection du signal

Dans cette partie, je vais traiter de l'aspect pratique de la détection en présentant la photodiode à quatre quadrants et l'acquisition des signaux permettant de mesurer la position de la bille par rapport au piège, et enfin l'allure de ceux-ci.

Mesure de position de la bille avec la photodiode à quatre quadrants La photodiode à quatre quadrants utilisée est la SPOT-9DMI, OSI Optroelectonics (la même que celle du montage précédent). Le détecteur est composé de quatre photodiodes jointes. Sa surface sensible a un diamètre de 10 mm, tandis que le diamètre du faisceau est de 3.9 mm. La figure 2.16 représente le détecteur et le faisceau détecté à l'échelle.

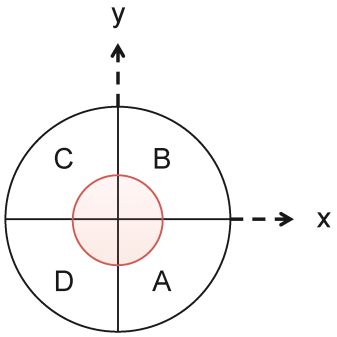


FIGURE 2.16 – Représentation schématique de la photodiode à quatre quadrants avec désignation de chacun des quadrants. En rouge est représentée la surface du faisceau détecté. Le repère (x, y) correspondant au déplacement du piège dans le plan de l'échantillon est également indiqué.

Le détecteur est composé de quatre quadrants. Chacun des quadrants reçoit un flux de photon et le transforme en tension électrique : V_A, V_B, V_C et V_D (cf. figure 2.16). Les tensions sont ensuite individuellement amplifiées puis numérisées simultanément à la cadence de 65.536 kHz par une carte Delta Sigma (National Instrument, PCI 4474), et enfin traitées par un programme réalisé sous Labview. Afin de transformer ces informations en position de la bille avec des coordonnées (X, Y), on somme et soustrait les tensions comme il suit :

$$\begin{cases} X &= (V_A + V_B) - (V_C + V_D) \\ Y &= (V_B + V_C) - (V_A + V_D) \end{cases} \tag{2.5}$$

Cela revient pour la coordonnée X à faire "tension des quadrants de droite - tension des quadrants de gauche" et pour la coordonnée Y "haut - bas". Pour s'affranchir des fluctuations de la puissance laser (soit internes au laser lui-même, soit dues à une différence d'efficacité de diffraction de l'angle de déviation des DAOs), le signal est ensuite divisé par le signal somme : $\Sigma = V_A + V_B + V_C + V_D$.

Allure du signal détecté lorque la bille est au centre du piège En positionnant une caméra CCD en regard de la photodiode quatre quadrants, le signal détecté peut être observé. La figure 2.17 représente une image typique d'un faisceau réfléchi par une bille piégée. Le signal détecté est donc bien plus complexe qu'une simple tache de faisceau comme pouvaient le laisser penser les représentations schématiques des figures précédentes. On retrouve notamment la présence d'anneaux comme dans [Huisstede 2005] (cf. figure 1.29b). Le signal détecté est en fait une figure d'interférence en anneaux correspondant aux interférence entre le faisceau réfléchi à l'interface entre la lamelle de microscope et l'eau de la chambre d'une part, et d'autre part le faisceau réfléchi à l'interface entre l'eau et la bille de polystyrène. Cette figure d'interférence sera étudiée au chapitre 3. En plus des anneaux d'interférence, on peut remarquer un anneau plus sombre qui est l'image de l'anneau de phase. En effet, le détecteur se trouvant dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, on image directement ce plan où se trouve l'anneau de phase. Enfin, le point central lumineux correspond à la réflexion du faisceau incident sur le microscope. Il s'agit d'une tache parasite.

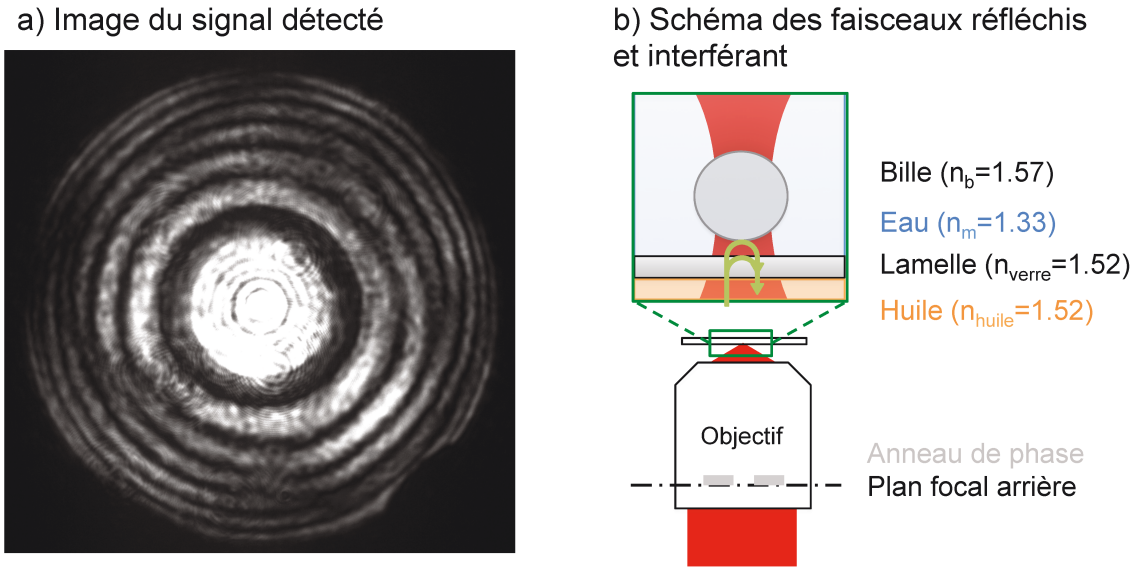


FIGURE 2.17 – Signal détecté par la photodiode à quatre quadrants. (a) Image du faisceau réfléchi par une bille piégée acquise avec une caméra située dans le même plan que la photodiode à quatre quadrants. On observe des anneaux d'interférence et l'image de l'anneau de phase en plus sombre. (b) Représentation schématique des faisceaux réfléchis au niveau de l'échantillon. Le faisceau réfléchi à l'interface entre la lamelle et l'eau, et celui réfléchi à l'interface entre l'eau et la lamelle donnent lieu à un système d'interférence observé dans le plan focal arrière de l'objectif.

Ainsi, au travers des différentes sections, j'ai présenté les mise en œuvre du dispositif développé afin d'étudier les propriétés visco-élastiques des cellules et la propagation d'une contrainte mécanique au sein de la cellule. Néanmoins, il est important de i) comprendre en profondeur le signal détecté et ii) calibrer tout le dispositif, afin de pouvoir réaliser des expériences quantitatives sur les cellules. Cela sera décrit danss les chapitres 3 et 4 respectivement. Avant cela, je terminerai ce chapitre en montrant que le montage de pince optique est tout à fait adapté pour les applications visées et j'en profiterai aussi pour faire le point sur les autres défis que présente le projet.

2.4 Application aux cellules

Dans la partie 1.2.2 du chapitre d'introduction, j'ai présenté le projet global dans lequel s'inscrit le développement de l'instrument de pince optique. Ce dispositif doit tout d'abord permettre d'exercer une contrainte oscillante ou constante locale sur la membrane de la cellule. Dans le cas où la force est oscillante, il est possible de mesurer les propriétés visco-élastiques des cellules. Dans le second cas, l'application visée est le suivi temporel de la transmision de la force au sein de la cellule. Du point de vue du développement de l'athérosclérose, il est intéressant d'étudier ces propriétés mécaniques dans deux configurations : soit la cellule présente un réseau d'actine désorganisé, comme les cellules se trouvant aux bifurcations des vaisseaux sanguins sujettes à l'athérosclérose, soit elle présente un réseau organisé et préférentiellement orienté dans le sens de la longueur de la cellule. Afin d'induire ces deux types de comportement, les cellules sont cultivées sur des substrats microstructurés. Enfin, la transmission de la force doit être suivie grâce à un rapporteur FRET ce qui implique d'imager les cellules en microscopie de fluorescence. En dernier lieu, il serait intéressant de pouvoir imager les cellules en trois dimensions afin de visualiser la topographie de la cellule où la bille est collée et les déplacements éventuels du noyau au cours d'une stimulation mécanique de la membrane. Pour cela, une combinaison piégeage optique - tomographie par cohérence optique plein champ est envisagée.

Dans cette section, je vais présenter les différents aspects mentionnés ci-dessus en montrant à chaque fois que le dispositif de piégeage optique est adapté aux applications visées.

2.4.1 Exercer une force sur la cellule via la bille piégée

Pour que la bille se lie aux intégrines de la cellule [11], les billes sont fonctionnalisées avec RGD. Le protocole de cette fonctionnalisation est donné dans l'annexe A. Nous avons notamment vérifié que les billes se lient spécifiquement à la membrane de la cellule en comparant les résultats avec une bille fonctionnalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA pour l'acronyme anglais). Au bout de quelques minutes la bille fonctionnalisée avec RGD est liée à la membrane tandis que la bille fonctionnalisée avec la BSA ne se lie pas à la membrane, sinon sur des temps beaucoup plus grand mettant en jeu un effet d'internalisation. Ceci confirme des mesures effectuées par Julie Lafaurie-Janvorre en microscopie de fluorescence qui montrent qu'après un contact d'environ dix minutes des billes fonctionnalisées avec RGD, le cytosquelette s'est réorganisé, des fibres de stress apparaissant là où la bille interagit avec les intégrines.

11. Pour rappel, les cellules étudiées sont des cellules endothéliales d'aorte de boeuf, désignées par l'acronyme anglais BAECs dans le texte.

D'autre part, des tests visuels de dégradation potentielle de la cellule ont été effectués pendant 15 minutes alors que le faisceau laser piégeait une bille liée à la cellule. Les cellules ne présentent pas de détérioration visible sur les images à contraste de phase.

Enfin, une force constante, puis une force oscillante ont été exercées sur la cellule. Les mesures effectuées en présence de la force oscillante, ont révélé un bruit parasite, dû à de faibles oscillations de la température de la platine de chauffage autour de sa température de consigne de 35 °C. Afin d'améliorer le rapport signal à bruit, un traitement par détection synchrone a été développé afin d'extraire l'amplitude et la phase du signal de réponse de la cellule. Ces premières acquisitions ont simplement permis de valider ce protocole de traitement des données mais, faute de temps, aucun résultat d'intérêt biologique n'a pu être obtenu à ce jour. C'est pourquoi je ne développerai pas plus en détail ces expériences préliminaires, ainsi que le traitement réalisé, dans ce manuscrit.

2.4.2 Orientation préférentielle des filaments d'actine

Afin d'orienter les filaments d'actine dans une direction privilégiée, permettant de repoduire l'organisation de ce réseau dans les cellules protégées de l'athérosclérose, le substrat sur lequel adhèrent les cellules est microstructuré. Le protocole de microstructuration du substrat et de culture des cellules dans ce cadre a été développé par Julie Janvorre-Lafaurie, puis réalisé par mes soins sur mes propres cultures cellulaires. Il est détaillé dans l'annexe B.

A partir de ce protocole, différents motifs de microstructuration ont été testés. Une image de microscopie de fluorescence permet de visualiser les filaments d'actine dans chaque cas, comme le montre la figure 2.18. La forme circulaire (cf. figure 2.18b) a été testée afin de tenter de reproduire un réseau d'actine désorganisé comme dans les cellules cultivées librement (cf. figure 2.18a). Or celui-ci évolue très rapidement avec le temps, ce qui le rend peu reproductible. Le choix a donc été fait de conserver des cellules cultivées librement pour reproduire les cellules ayant un réseau d'actine désorganisé.

En ce qui concerne l'orientation préférentielle dans la direction allongée des cellules, deux formes de substrats ont été testées : des lignes de 15 µm d'épaisseur (cf. figure 2.18c) et des rectangles de 13 µm par 40 µm (cf. figure 2.18d). Dans les deux cas, le réseau d'actine des cellules est organisé et orienté préférentielle dans la direction allongée des cellules. Mais les cellules peuvent être confluentes sur les lignes. Afin d'avoir des cellules bien séparées, nous avons choisi de travailler avec le motif rectangulaire.

2.4.3 Imagerie à contraste de phase et piégeage optique

Le montage a été développé afin d'étudier les propriétés mécaniques des cellules endothéliales. En effet, le piégeage optique est compatible avec la microscopie à contraste de phase grâce à l'utilisation d'un même objectif à contraste de phase pour piéger et imager les cellules avec un bon contraste. La figure 2.19 illustre cette combinaison : des images bien contrastées de cellules sont acquises pendant qu'une bille liée à la membrane de la cellule est piégée.

2.4.4 Microscopie de fluorescence et piégeage optique

La combinaison piégeage optique et microscopie de fluorescence a été testée avec une source à LEDs de large spectre Lumencor Sola, en vue de réaliser les expériences de suivi temporel

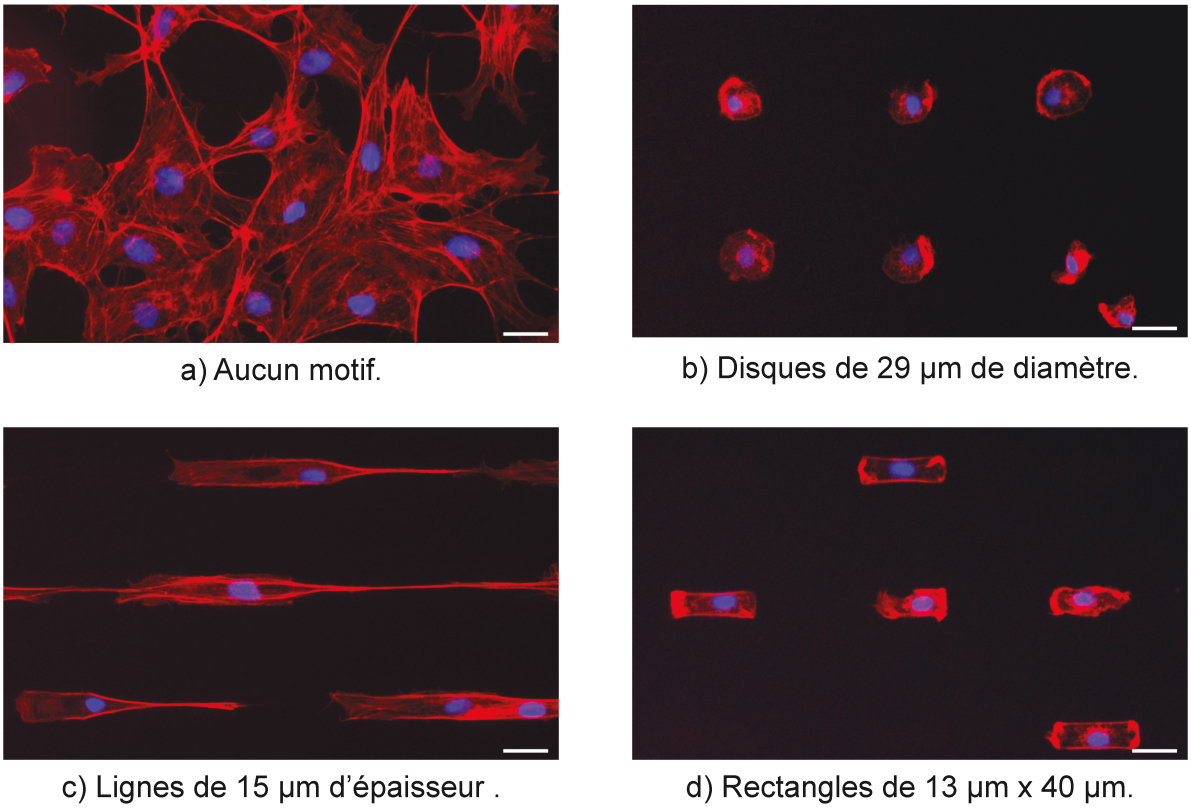
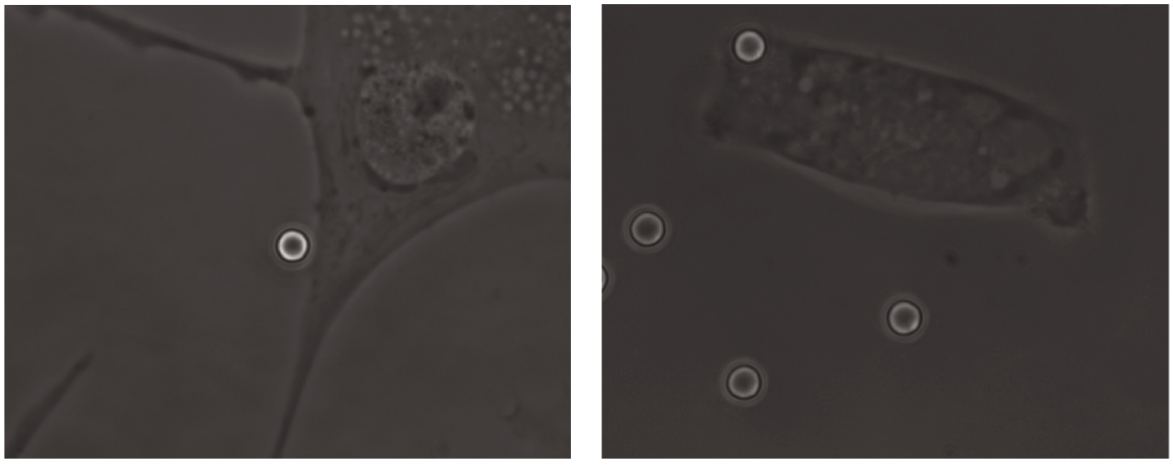


FIGURE 2.18 – Images de microscopie de fluorescence de cellules cultivées sur un substrat homogène, soit sur des substrats microstructurés avec un marquage des filaments d'actine en rouge et du noyau de la cellule en bleu. Ces images ont été acquises par Julie Lafaurie-Janvorre.



(a) Cellule cultivée sur un substrat totalement homogène.

(b) Cellule cultivée sur un substrat microstructuré rectangulaire (13 µm x 40 µm).

FIGURE 2.19 – Images de microscopie à contraste de phase en présence d'une bille piégée liée à la membrane de la cellule. Dimension des images : 60 µm x 45 µm).

de la transmission de la force au sein de la cellule. Pour rappel, ce suivi est réalisé par le biais d'un rapporteur FRET possédant deux protéines fluorescentes, l'une appelée donneur et l'autre accepteur (cf. partie 1.2.2.3). Notre microscope possède deux étages dits de fluorescence. La source lumineuse est directement connectée au port d'épifluorescence supérieur, l'entrée inférieure étant utilisée pour le faisceau de piégeage. La longueur d'onde d'excitation du fluorophore concerné est sélectionnée grâce à un filtre. Un miroir dichroïque approprié réfléchit ensuite le faisceau et l'envoie vers l'échantillon tout en transmettant le faisceau de piégeage et la longueur d'onde d'émission des fluorophores. Le signal est ensuite détecté sur la caméra. Plusieurs fluorophores utilisés en biologie, ont ainsi été testés sur des cellules fixées : DAPI, FITC, TRITC, Cy5, mais aussi le donneur (ECFP) et l'accepteur (EYFP). Afin de permettre une mesure de FRET un système d'opto-split a été mis en place permettant de séparer les longeurs d'onde du signal de FRET et du signal de fluorescence du donneur sur deux parties différentes de la caméra d'imagerie.

Cependant, il n'y a pas eu réellement de suite à ces tests car d'après les expériences réalisées par Julie Lafaurie-Janvorre, le rapporteur publié dans [Wang 2005] ne permettait pas d'obtenir un niveau de FRET différent du bruit de mesure dans nos cellules (BAECs). En effet, il semblerait que ce couple FRET ne soit pas optimal : une étude a montré notamment que l'utilisation de YPet à la place de EYFP permet d'augmenter la sensibilité du rapporteur [Ouyang 2008]. L'amélioration de la sensibilité du rapporteur dans nos cellules nécessiterait une collaboration avec une équipe de spécialistes.

2.4.5 Imagerie par tomographie par cohérence optique plein champ et piégeage optique

Tout d'abord, la combinaison pince optique - OCT plein champ suppose de balayer la cellule en z afin d'obtenir l'information tomographique tout en maintenant le piège fixe. En effet, le même objectif est utilisé pour le piégeage optique et comme bras échantillon de l'OCT. Pour réaliser cela, la solution envisagée implique de déplacer la caméra d'imagerie et le miroir de référence afin de déplacer le plan de cohérence à travers l'échantillon. Des premiers tests réalisés dans l'équipe d'Arnaud Dubois ont montré que ceci était réalisable.

Toutefois, avant de combiner les deux dispositifs, des images de BAECs fixées ont été acquises sur un montage d'OCT plein champ de l'équipe d'Arnaud Dubois. Une de ces images est présentée sur la figure 2.20. La figure (a) est une image en-face, i.e. une image acquise à une profondeur z dans l'échantillon. Malgré l'excellent sectionnement axial atteint en OCT plein champ, de l'ordre de 1 µm, l'intensité résiduelle de la réflexion sur la lamelle de verre sur laquelle repose la cellule est équivalente à celle de la cellule. Ceci se voit sur la figure (b), qui représente une coupe transverse de la cellule : le signal issu de la lamelle perturbe le signal issu de la cellule ce qui a pour conséquence de masquer la partie basse de la cellule. Une technique d'illumination du système en fond noir a été développée par Antoine Federici (doctorant d'Arnaud Dubois) permettant d'éliminer cette réflexion parasite de la lamelle et donc d'imager l'intégralité de la cellule. Cette technique est reportée dans sa thèse. Malgré cette technique, les images de BAECs en OCT plein champ permettent certes de distinguer la topographie de la cellule, mais aucune structure interne telle que le noyau n'est visible. De plus, il faut noter qu'une telle acquisition est obtenue en un peu plus de 20 min, ce qui est peu compatible avec le temps réel que requiert l'expérience.

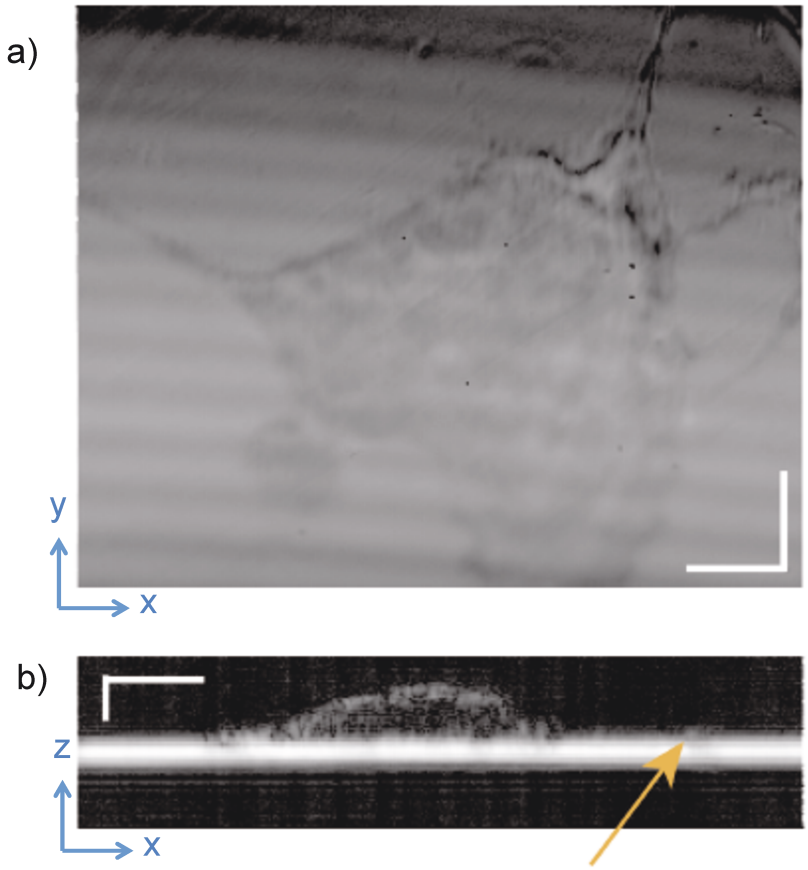


FIGURE 2.20 – Image OCT plein champ de BAECs. (a) Image en-face de la cellule, i.e. une coupe dans le plan xy. (b) Coupe transverse de la cellule. La flèche jaune pointe sur la lamelle de verre sur laquelle repose la cellule. Les barres d'échelles correspondent à 10 µm dans les directions x et y et à 5 µm dans la direction z. Extraite du manuscrit de thèse d'Antoine Federici.

Ainsi, bien que des preuves de principe instrumentales aient été apportées quant à la compatibilité entre le piégeage optique et l'OCT plein champ, cette combinaison n'a finalement pas été mise en œuvre dans le cadre de ma thèse car l'apport de cette technique n'était pas suffisant pour le projet.

2.4.6 Conclusion

Ainsi, des tests préliminaires ont montré que le dispositif de pince optique permet d'exercer une contrainte oscillante sur la membrane de la cellule, ce qui pourra à terme être utilisé pour déterminer les propriétés visco-élastiques des cellules. Faute de temps aucun résultat d'intérêt biologique n'a pu être obtenu, et c'est pourquoi ces premiers tests ne sont pas décrits en détail dans ce mémoire. De plus, grâce au développement de substrats microstructurés sur lesquels adhèrent les cellules cultivées et au montage qui permet d'exercer la force dans tout le plan de la cellule, ces propriétés visco-élastiques pourront être étudiées en fonction de l'organisation du réseau d'actine.

D'autre part, le suivi temporel de la transmission de la cellule est possible grâce à la combinaison de la microscopie de fluorescence avec l'application d'une force contante sur la cellule par la pince optique. Néanmoins, cet aspect du projet est actuellement en attente du développement d'un senseur plus adapté à nos cellules qui requiert les compétences de spécialistes.

Enfin des preuves de principe ont été apportées à la combinaison pince optique - OCT plein champ mais n'ont pas fait l'objet d'un développement plus poussé au cours de ma thèse.

Chapitre 3

Compréhension et modélisation des signaux détectés

Sommaire

3.1 Observations expérimentales et modèle simple de la lame d'eau . . . 94
3.1.1 Système d'interférence . . . 95
3.1.2 Modèle de la lame d'eau . . . 96
3.1.2.1 Description "classique" . . . 96
3.1.2.2 Une approche générale : les "points sources" effectifs S_1 et S_2 . . . 98
3.1.2.3 Approche dans le cadre de l'approximation paraxiale . . . 99
3.1.3 Mesure de la hauteur de piégeage à partir de l'interférogramme . . . 100
3.1.3.1 Mesure à partir du centre de l'interférogramme . . . 100
3.1.3.2 Mesure de la hauteur à partir de la position des anneaux . . . 101
3.1.4 Détection de la position de la bille : anneaux d'interférence et anneau de phase, une combinaison problématique ? . . . 106
3.1.4.1 Observation de la figure d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège . . . 106
3.1.4.2 Influence de l'anneau de phase couplé à la figure d'interférence sur la sensibilité de la détection . . . 109
3.2 Modèles tenant compte de la courbure de la bille . . . 112
3.2.1 Modèle du tracé de rayons suivant l'optique géométrique . . . 112
3.2.2 Modèle tenant compte de la diffraction . . . 117
3.2.2.1 Un modèle décrivant la position des anneaux . . . 117
3.2.2.2 Ajustement des profils expérimentaux : détermination de la hauteur 118
3.3 Modélisation de la sensibilité du détecteur . . . 121
3.3.1 Modélisation de l'effet du déplacement de la bille par rapport au piège sur la figure d'interférence . . . 123
3.3.1.1 Modélisation du déplacement du maximum d'intensité . . . 123
3.3.1.2 Modélisation du déplacement du centre des anneaux . . . 124
3.3.1.3 Prise en compte de ces déplacements pour le calcul de l'interférogramme . . . 126
3.3.2 Effet de l'anneau de phase sur la sensibilité du détecteur . . . 127

A la fin de la description du montage dans le chapitre 2, le signal rétro-réfléchi par la bille piégée a été imagé dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, au niveau du détecteur. Ce signal est une figure d'interférence composée d'anneaux concentriques. Ce chapitre est dédié à la compréhension de cette figure d'interférence et à sa modélisation. Cette

étude, importante en soi pour bien comprendre l'origine et le positionnement de ces anneaux, sera surtout très utile pour calibrer le dispositif expérimental de façon fiable (cf. chapitre 4).

En effet, par le biais de la figure d'interférence, nous verrons qu'il est possible de déterminer précisément la hauteur de la bille par rapport à la lamelle. La mesure de cette hauteur est une donnée nécessaire dès lors qu'on souhaite calibrer la raideur du piège en utilisant une méthode faisant intervenir la viscosité locale, comme pour la réponse à un échelon de position ou l'analyse de la densité spectrale de puissance (cf. section 1.4). Cette viscosité locale, qui varie fortement lorsque l'on s'approche de la lamelle, pourra alors être calculée de manière fiable par la loi de Faxen. La détection en rétro-diffusion dans un plan conjugué du plan focal arrière présente donc un atout véritable par rapport à la configuration en transmission.

D'autre part, la compréhension de ces figures d'interférence permettra de modéliser le plus précisément possible la sensibilité du détecteur à la position de la bille dans le piège. En effet, il est important de connaître cette sensibilité afin de convertir les signaux de la photodiode à quatre quadrants en unités métriques. Ce facteur de conversion sera utilisé pour calibrer la raideur par la méthode de l'inférence bayesienne et par l'application du théorème de l'équipartition (cf. section 1.4), mais aussi pour suivre le mouvement de la bille en présence d'un piège oscillant. Cela suppose néanmoins que la détection soit bien linéaire, c'est-à-dire que le signal détecté soit bien proportionnel au déplacement de la bille par rapport au piège. Or, nous verrons que l'anneau de phase, combiné aux anneaux d'interférence, peut générer des artefacts de mesure, la sensibilité de la détection pouvant dépendre fortement de l'amplitude du déplacement de la bille, ou de la hauteur de la bille par rapport à la lamelle.

Ce chapitre est divisé en trois parties. Tout d'abord, je vais décrire les observations expérimentales du système d'interférence. Ces observations seront mises en regard d'un modèle simplifié d'une lame d'eau, permettant d'expliquer qualitativement l'essentiel de la physique de la mesure de la hauteur de la bille et de la sensibilité du détecteur. La seconde partie sera consacrée à la modélisation quantitative de la figure d'interférence. Nous verrons notamment que la prise en compte de la diffraction est essentielle pour décrire précisément la position des anneaux. Ce modèle donnera lieu à une estimation de la hauteur grâce à un ajustement des figures d'interférence. Enfin, la dernière partie présente une étude de la sensibilité du détecteur à la position de la bille en présence de l'anneau de phase. Cette étude reposera sur la compréhension de la modification de la figure d'interférence lorsque la bille se trouve décalée par rapport au centre du piège. Ces prédictions seront comparées aux mesures expérimentales au chapitre suivant.

3.1 Observations expérimentales et modèle simple de la lame d'eau

Dans cette première section, je vais présenter les observations expérimentales de la figure d'interférence. Deux situations sont étudiées : la bille est centrée sur le piège ou décalée par rapport à celui-ci. Lorsque la bille est au centre du piège, en augmentant la hauteur, le nombre d'anneaux d'interférence augmente. Cette observation sera expliquée qualitativement grâce à un modèle simple, appelé modèle de la "lame d'eau". Lorsqu'au contraire la bille est décalée par rapport au centre du piège, la figure d'interférence perd sa symétrie de révolution avec un décalage des anneaux. En utilisant à nouveau le modèle simple de la lame d'eau, je montrerai

comment ce décalage, combiné à l'anneau de phase restant fixe, peut poser problème pour la détection de la position de la bille par la photodiode à quatre quadrants.

3.1.1 Système d'interférence

Nous avons mentionné au chapitre précédent (cf. partie 2.3.2.2) que la figure observée en rétro-réflexion était due aux interférences entre deux faisceaux réfléchis : d'une part à l'interface entre la lamelle de microscope et l'eau, et d'autre part à l'interface entre l'eau et la bille (cf. figure 3.1a). Les indices optiques de la lamelle (1.52) et de la bille de polystyrène (1.57) étant proches, les intensités réfléchies par les deux interfaces sont voisines, donnant lieu à un système d'interférence composé d'anneaux concentriques bien contrastés. La figure 3.2 présente les figures d'interférence pour différentes hauteurs de la bille par rapport à la lamelle. On observe une augmentation progressive du nombre d'anneaux avec la hauteur. En revanche, l'anneau de phase, plus sombre, reste fixe quelle que soit la hauteur. On remarque également la présence d'un point lumineux intense au centre des figures. Ce point lumineux provient d'une réflexion sur un dioptre interne de l'objectif et ne fait pas partie du système d'interférence[1]. Comme mentionné plus tard, ce signal parasite s'avère gênant pour déterminer précisément la teinte sombre ou claire du centre de la figure d'interférence.

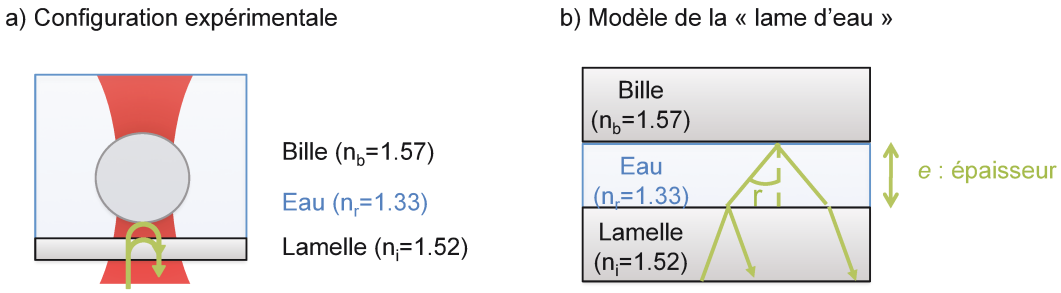


FIGURE 3.1 – (a) Configuration expérimentale : les deux faisceaux générant le système d'interférence détecté proviennent de la réflexion sur la lamelle et sur la bille. (b) Modèle de la "lame d'eau" où la courbure de la bille est négligée : les deux interfaces, espacées d'une épaisseur e, sont planes et parallèles.

Le détecteur étant positionné dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, les interférences sont observées à l'infini, i.e. dans une direction de rétro-diffusion donnée. La figure d'interférence détectée s'apparente donc intuitivement aux anneaux d'égale inclinaison observés à partir d'un interféromètre de Michelson réglé en configuration "lame d'air". Dans notre cas, le terme de "lame d'eau" est plus approprié puisque les deux interfaces sont séparées par de l'eau (cf. figure 3.1b). Ce rapprochement a d'autant plus de sens que dans le cas usuel des anneaux d'égale inclinaison le nombre d'anneaux augmente bien avec l'épaisseur de la lame.

1. Les deux points lumineux situés à l'horizontale sur l'anneau de phase sont en fait deux réflexions parasites provenant de la lame séparatrice utilisée pour imager le faisceau détecté sur une caméra. Ils ne sont pas présents sur le faisceau détecté par la photodiode quatre quadrants.

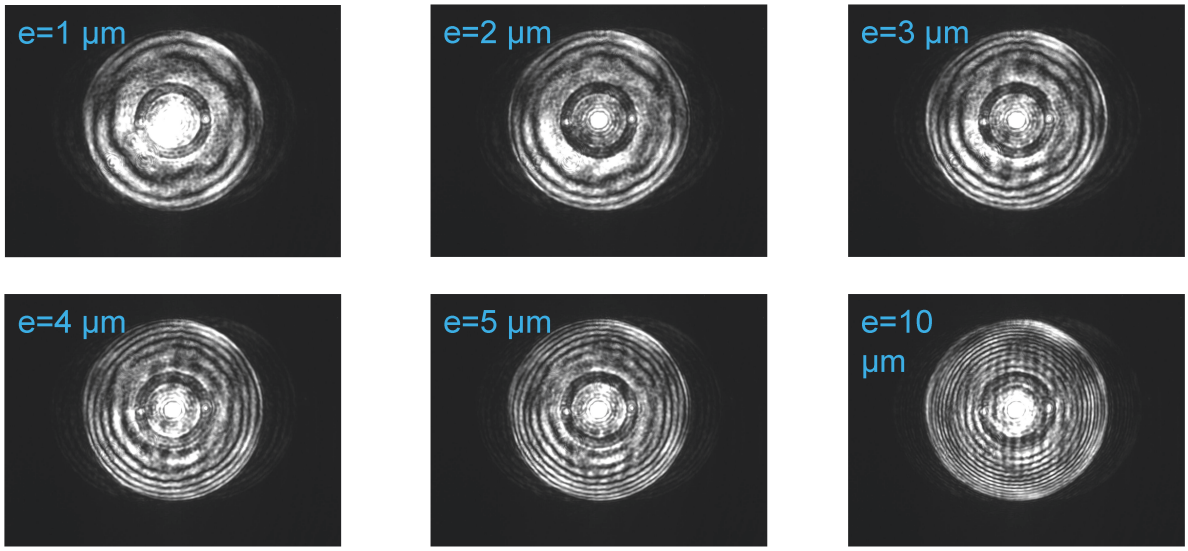


FIGURE 3.2 – Images d'interférogrammes acquises pour différentes hauteurs de piégeage. Les valeurs correspondent à l'épaisseur e entre la lamelle et le bas de la bille, estimées à partir de la vis de réglage de l'objectif.

3.1.2 Modèle de la lame d'eau

Dans cette partie, je vais décrire le modèle simple de la lame d'eau et calculer la différence de marche entre les rayons interférant à l'infini, en commençant par une approche classique, comme dans le cas d'une lame d'air générée par un interféromètre de Michelson. Ensuite, je vais l'aborder selon une approche différente grâce à l'identification de deux points sources effectifs générant des ondes sphériques interférant à l'infini. Bien que cette approche paraisse à première vue plus complexe, elle sera très utile par la suite pour le calcul de la différence de marche dans le cas d'un modèle plus élaboré. Enfin, il s'agit d'une approche idéale pour simplifier les expressions de la différence de marche dans le cas des petits angles, i.e. dans le cadre de l'approximation paraxiale. Cette approximation sera essentielle dans la suite pour obtenir un modèle fidèle des figures d'interférence tenant compte de la diffraction.

3.1.2.1 Description "classique"

Dans ce modèle simple la courbure de la bille est négligée, de sorte que les rayons incidents se réfléchissent sur deux interfaces parfaitement planes, séparées par un milieu rempli d'eau, comme représenté sur la figure 3.3a. L'observation étant "à l'infini", i.e. pour une inclinaison i donnée en réflexion, le profil d'intensité résulte de l'interférence entre deux rayons réfléchis issus du même rayon incident (faisant un angle i avec l'axe optique). Ces deux rayons réfléchis respectivement par la première et la seconde interface seront appelés (a) et (b) par la suite. La différence de marche à l'infini étant nulle à partir des points L et I (L étant le point de sortie du rayon (b) et I sa projection sur le rayon (a), cf. figure 3.3a), la différence de marche totale entre ces deux rayons s'écrit :

$$\delta(i) = n_r\big[KJL\big] - n_i[KI] = 2\,n_r\,e\,\cos r + \lambda/2 \tag{3.1}$$

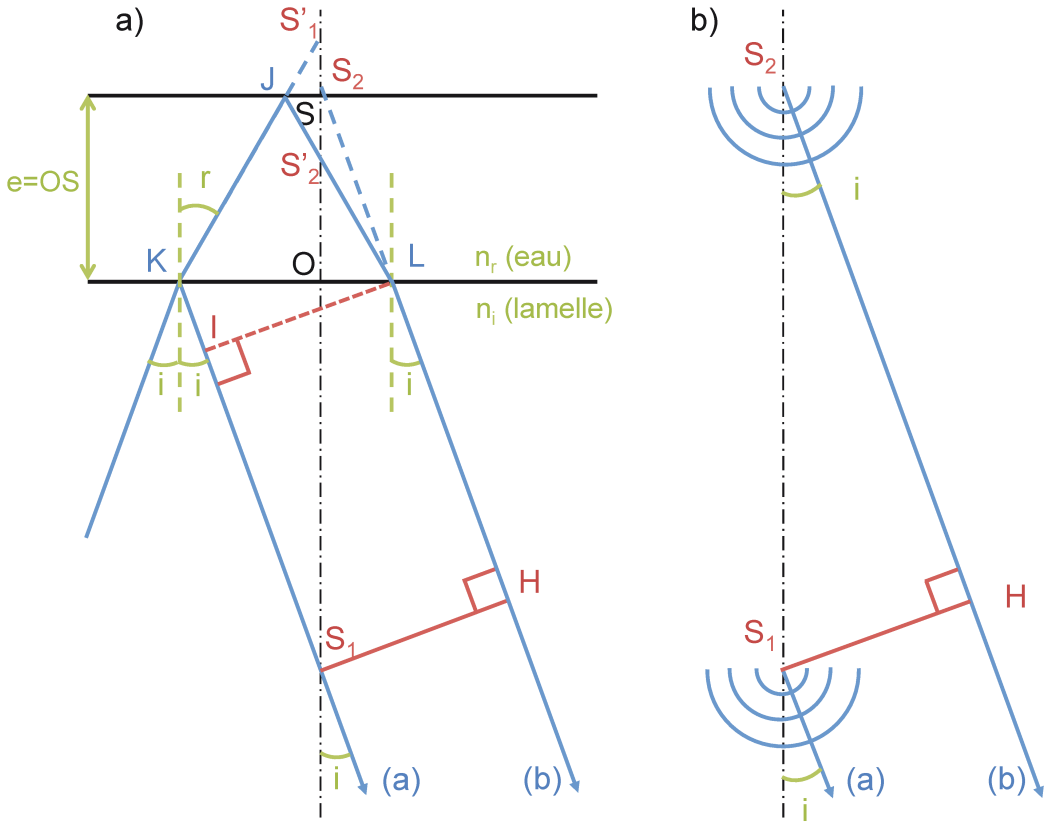


FIGURE 3.3 – Modèle de la "lame d'eau". La lame d'eau, d'épaisseur e et d'indice n_r, sépare la lamelle d'indice n_i de la bille d'indice n_b. **(a)** Approche "classique" : les rayons (a) et (b) qui donnent lieu aux interférences dans la direction i sont issus du même rayon incident. L'angle r correspond à l'angle du rayon réfracté à l'intérieur de la lame. Les différents points de référence I, J K et L identifiés sur le trajet des rayons (a) et (b) permettent de calculer la différence de marche à l'infini suivant l'expression 3.1. **(b)** Interprétation de la figure d'interférence à l'aide des points sources effectifs S_1 et S_2 à partir desquels sont "émis" les rayons (a) et (b) interférant à l'infini dans la direction i. S_1 et S_2 correspondent aux "images" du point de focalisation S'_1 du rayon incident dans l'eau : S_1 est son "image" en réflexion par la lamelle et S_2 est son "image" après réflexion sur la bille (donnant le point source intermédiaire S'_2) puis transmission à travers la lamelle. Les différents points S_1, S'_1, S_2 et S'_2 sont indiqués sur la figure **(a)**. En pratique, le laser focalise à l'intérieur de la bille, d'où une focalisation au delà de la seconde interface. Le point H est la projection du point S_1 sur le rayon (b). Enfin les guillemets utilisés sont pour rappeler que l'interprétation en terme d'image de ces points sources n'est valide que pour de petits angles.

où n_r correspond à l'indice de l'eau et n_i celui du milieu incident (la lamelle de verre). L'angle r, donné par la relation de Snell-Descartes $n_r \sin r = n_i \sin i$, correspond à l'angle réfracté dans l'eau. Le terme $\lambda/2$ tient compte quant à lui du changement de signe de l'amplitude du champ électrique sur la seconde interface (déphasage de π), l'indice de la bille étant supérieur à celui de l'eau.

Avec cette approche classique, on retrouve l'expression de la différence de marche dans le cas d'interférences générées par une lame d'air avec un interféromètre de Michelson. Toutefois, il est important de remarquer que, dans notre configuration, les différentes inclinaisons donnant lieu aux interférences ne proviennent pas d'une source incohérente spatialement étendue, comme dans le cas usuel, mais de l'illumination du système par un faisceau laser cohérent convergeant au niveau de la lame. Ainsi, le système d'interférence n'est pas uniquement localisé à l'infini, mais est totalement délocalisé dans tout l'espace en réflexion.

3.1.2.2 Une approche générale : les "points sources" effectifs S_1 et S_2

Dans notre configuration parfaitement cohérente, la figure d'interférence peut également s'interpréter comme le système d'interférence généré par l'émission de deux points sources S_1 et S_2, comme illustré sur la figure 3.3b. Ces points S_1 et S_2 correspondent aux "images" par les interfaces du point de focalisation du laser, noté S_1'. La différence de marche s'écrit alors :

$$\delta(i) = n_i \, S_1S_2 \, \cos i \, + \, \delta_{S_1-S_2}(i) \, + \, \lambda/2 \tag{3.2}$$

Le premier terme de cette expression correspond simplement à la différence de marche à l'infini entre les points S_1 et S_2, i.e la distance S_2H parcourue dans l'indice n_i. Toute la complexité du calcul de la différence de marche $\delta(i)$ réside dans la détermination de la différence de marche $\delta_{S_1-S_2}(i)$ entre les deux points S_1 et S_2, puisqu'il est nécessaire de tenir compte du fait que la position précise de ces points, et donc la différence de marche associée, dépend de l'angle d'incidence i considéré. En effet, désigner les points S_1 et S_2 comme les images du point S_1' est un abus de langage car les dioptres constituant les différentes interfaces ne satisfont pas la condition de stigmatisme rigoureux, i.e. la condition de stigmatisme est uniquement approchée et valable pour de petits angles. Or, en pratique, la focalisation est effectuée avec un objectif à très grande ouverture numérique ($ON = 1.3$) donnant lieu à des angles incidents pouvant être très importants ($i_{\max} = 58.8^\circ$ et $r_{\max} = 77.8^\circ$). En suivant pas à pas le tracé de rayon entre S_1 et S_2, on déduit l'expression de la différence de marche $\delta_{S_1-S_2}(i)$:

$$\delta_{S_1-S_2}(i) = \delta_{S_1-S_1'} + \delta_{S_1'-S_2'} + \delta_{S_2'-S_2} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{lcl} \delta_{S_1-S_1'} & = & -n_i \; S_1K + n_r \; KS_1' \\ \delta_{S_1'-S_2'} & = & -n_r \; S_1'J + n_r \; JS_2' \\ \delta_{S_2'-S_2} & = & n_r \; S_2'L - n_i \; LS_2 \end{array} \right. \tag{3.3}$$

où toutes les distances sont prises ici comme positives. Dans cette expression, le tracé de rayons a été décomposé en trois (cf. figure 3.3a) :

- de S_1 on va S_1', en passant par K en remontant le rayon réfléchi (a) et en suivant le rayon transmis (b). S_1' est le point de focalisation du rayon transmis par la première interface. S_1 est l'image en réflexion d'un point S_0 (non représenté sur la figure 3.3) symétrique par rapport à l'interface et S_1' est l'image en transmission de ce même point S_0. Dans la suite, on dira simplement que S_1' est l'image en réflexion de S_1 ;

- de S'_1 à S'_2, en passant par J. S'_2 est l'image de S'_1 par la seconde interface, en réflexion. On peut noter que la différence de marche entre ces deux points est nulle dans le cas d'une interface plane ;
- de S'_2 à S_2, en passant par L. S_2 est l'image de S'_2 par la première interface, en transmission, et donc l'image de S'_1 par les deux interfaces.

En combinant les expressions 3.2 et 3.3, on peut vérifier que l'on retrouve bien l'expression 3.1 donnée par l'approche classique. Comme nous l'avons dit, bien qu'en apparence complexe, cette approche prendra tout son sens pour traiter le cas général où la courbure de la bille sera prise en compte.

3.1.2.3 Approche dans le cadre de l'approximation paraxiale

Cas général Dans le cas des petits angles, les dioptres plans et sphériques satisfont la condition de stigmatisme approché, de sorte que l'on peut maintenant réellement identifier les points sources effectifs S_1 et S_2 comme des images du point de focalisation S'_1. La condition de stigmatisme entre ces différents points implique que la différence de marche $\delta_{S_1-S_2}$ entre les deux points sources, intervenant dans l'expression 3.2, ne dépend plus de l'angle d'incidence. La différence de marche s'écrit alors simplement :

$$\delta(i) = n_i S_1S_2 \ \cos i + \delta_{S_1-S_2} + \lambda/2 \tag{3.4}$$

où $\delta_{S_1-S_2}$ est maintenant une constante. Ce terme peut se calculer directement en étudiant la différence de marche accumulée entre les deux points sources S_1 et S_2 pour un rayon sur l'axe $(i = 0)$. De façon plus astucieuse, on peut utiliser le fait que sur l'axe optique la différence de marche vaut simplement l'aller-retour entre les deux interfaces, i.e. $\delta(i = 0) = 2\,n_r\,e$. D'après l'expression 3.4, on en déduit que $\delta_{S_1-S_2} = 2\,n_r\,e - n_i S_1S_2$, donnant l'expression suivante pour la différence de marche totale dans le cadre de l'approximation paraxiale :

$$\delta(i) = n_i\,S_1S_2\,(\cos i - 1) + 2\,n_r\,e + \lambda/2 \tag{3.5}$$

Il faut bien remarquer que cette expression est totalement générale et peut s'appliquer quelle que soit la courbure des interfaces, le "jeu" étant simplement de déterminer la position des points sources effectifs S_1 et S_2. Pour revenir au cas de la lame d'eau, nous allons considérer d'abord que la première interface est plane puis la seconde.

Cas où la première interface est plane Dans le cas où la première interface est plane, la position des points S_1 et S_2 est directement reliée à la position des points S'_1 et S'_2 par les relations :

$$\overline{OS}_1 = -\frac{n_i}{n_r}\,\overline{OS'}_1 \quad \text{et} \quad \overline{OS}_2 = \frac{n_i}{n_r}\,\overline{OS'}_2 \tag{3.6}$$

le signe $(-)$ sur la première expression étant dû au fait que le point S_1 est obtenu par réflexion sur la première interface. L'expression 3.5 se simplifie alors :

$$\delta(i) = \frac{n_i^2}{n_r}\left(2\,e + \overline{SS'_1} + \overline{SS'_2}\right)\Big(\cos i - 1\Big) + 2\,n_r\,e + \lambda/2 \tag{3.7}$$

Cette expression sera utilisée lorsque la courbure de la bille sera prise en compte dans la partie 3.2.

Cas où les deux interfaces sont planes : la lame d'eau Dans le cas où la seconde interface est plane, $\overline{SS'}_1 = -\overline{SS'}_2$, de sorte que l'expression 3.7 se réduit finalement à :

$$\delta(i) = 2\frac{n_i^2}{n_r} e \left(\cos i - 1\right) + 2\, n_r\, e + \lambda/2 \tag{3.8}$$

$$\sim 2\, n_r\, e \left(1 - \frac{r^2}{2}\right) + \lambda/2 \tag{3.9}$$

L'expression 3.9 correspond au développement limité de l'expression 3.8 pour de petits angles. On peut ainsi aisément vérifier que l'on retrouve bien le développement limité de l'expression générale 3.1, ce qui permet de valider les calculs menés jusqu'à présent. Nous verrons dans la suite de ce chapitre que les expressions données ci-dessus dans le cadre de l'approximation paraxiale fournissent une bonne approximation de la différence de marche, et ce pour des angles finalement relativement élevés, c'est-à-dire couvrant plus de la moitié de la pupille [2].

3.1.3 Mesure de la hauteur de piégeage à partir de l'interférogramme

La figure d'interférence présente un véritable avantage dans la mesure où elle permet de déterminer la distance e entre la lamelle et le bas de la bille. Dans toute la suite de ce chapitre, la mesure de la hauteur de la bille fera référence à la mesure de cette épaisseur e [3]. S'agissant d'une mesure interférométrique, elle est a priori très précise. Dans cette partie, je vais d'abord rappeler comment, à partir du centre de l'interférogramme, il est possible de déterminer cette distance e en considérant l'ordre d'interférence au centre. Il est important de noter que cette mesure ne suppose pas une compréhension précise de la figure d'interférence, la différence de marche au centre ne dépendant pas de la courbure de la bille, mais seulement de l'épaisseur e.

Cependant, l'estimation de la hauteur par cette méthode peut s'avérer délicate d'un point de vue expérimental. Il serait donc plus intéressant d'exploiter toute la richesse de la figure d'interférence via la position des anneaux. Pour cela, un modèle décrivant les figures d'interférence est nécessaire. Je présenterai ici une première étape dans cette direction en confrontant le modèle de la lame d'eau aux interférogrammes expérimentaux.

3.1.3.1 Mesure à partir du centre de l'interférogramme

Au centre de l'interférogramme, quelle que soit la courbure des interfaces, la différence de marche s'écrit simplement en fonction de l'épaisseur e : $\delta = 2\, n_r\, e + \lambda/2$. L'interfrange au centre, i.e. la distance entre deux ordres d'interférence consécutifs, s'écrit donc :

$$\Delta i = \frac{\lambda}{2\ n_r} = 402\ \pm 2\ nm\ , \tag{3.10}$$

l'incertitude donnée ici correspondant à l'incertitude sur la valeur de l'indice de l'eau n_r valant 1.325 à 1069 nm. La valeur de cet interfrange en épaisseur est en accord avec une estimation

2. Les expressions de 3.4 à 3.9 sont a priori valides uniquement pour les petits angles, c'est-à-dire qu'elles supposeraient le développement limité $\cos i \simeq 1 - i^2/2$. Cependant, afin d'étendre au maximum ces expressions approchées aux grands angles, le cosinus sera conservé.

3. Dans le chapitre 4, le terme hauteur de la bille désignera la distance entre la lamelle et le centre de la bille, et non le bas de la bille. Ainsi si h désigne la hauteur du centre de la bille, on a : $h = e + R$, où R est le rayon de la bille. Connaissant R, la mesure de l'épaisseur e revient à la mesure du centre de la bille.

expérimentale à partir des graduations de la vis micrométrique du microscope permettant de varier continûment la hauteur de la bille.

Le décompte de l'alternance des centres sombres et clairs défilant au fur et à mesure que l'épaisseur e augmente permet donc de déterminer expérimentalement la hauteur de piégeage, ce qui a été fait pour chaque interférogramme présenté par la suite. Pour repérer la hauteur de la bille, j'utiliserai dans la suite l'ordre d'interférence $p = e/\Delta i$, de sorte que chaque ordre d'interférence entier correspondra à un interférogramme présentant un centre sombre. En effet, l'indice de la bille étant supérieur à celui de l'eau, le rayon réfléchi sur cette interface acquiert un déphasage de π supplémentaire (voir ajout de $\lambda/2$ dans l'expression de la différence de marche 3.1). En particulier, lorsque la bille est au contact de la lamelle ($e = 0$), le centre de l'interférogramme est effectivement sombre.

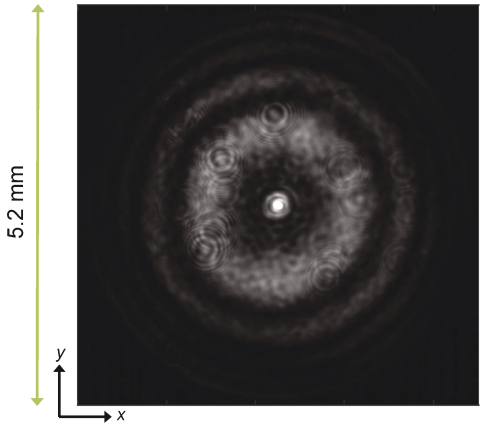
Ainsi, si la figure d'interférence permet de mesurer la hauteur du bas de la bille par rapport à la lamelle grâce au centre de l'interférogramme, cette détermination est intimement liée à l'appréciation de la figure par l'observateur. De plus, elle est rendue plus difficile par la présence de la réflexion sur l'objectif qui a pour conséquence d'introduire un signal parasite au centre de la figure. Enfin, elle nécessite un suivi de l'évolution de la figure d'interférence depuis le contact de la bille avec la lamelle, ce qui est assez fastidieux et long. Il serait donc intéressant d'exploiter l'intégralité de l'interférogramme afin d'obtenir une mesure directe et précise de la hauteur.

3.1.3.2 Mesure de la hauteur à partir de la position des anneaux

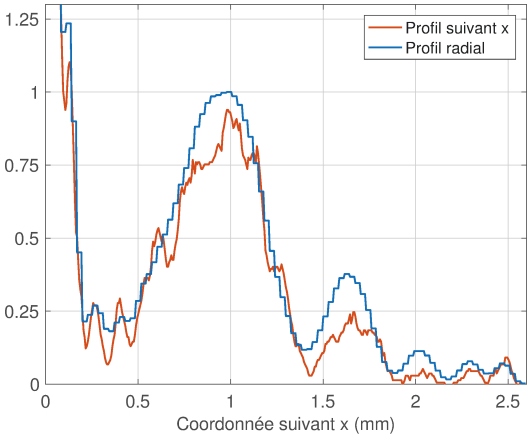
Afin de mesurer la hauteur de la bille grâce à la position des anneaux, il faut disposer d'un modèle permettant de reproduire fidèlement les figures d'interférence. Un travail important sera donc de développer ce modèle, dont les résultats seront comparés à toute une série d'interférogrammes correspondant à différentes hauteurs. Ces hauteurs sont connues via l'observation de la teinte au centre de l'interférogramme (cf. méthode ci-dessus). Avant de complexifier le modèle, il est intéressant de regarder les résultats fournis par le modèle de la lame d'eau. Pour cela, je vais commencer par présenter l'exploitation des interférogrammes expérimentaux, en vue d'une comparaison avec ceux produits par le modèle. La génération de ces figures d'interférence à partir du modèle est décrite dans un second temps. Enfin, le modèle sera confronté à l'expérience pour différentes hauteurs.

Exploitation des interférogrammes expérimentaux Pour une évaluation plus aisée de la pertinence d'un modèle, les profils expérimentaux ont été acquis avec l'objectif sans anneau de phase, qui possède les mêmes caractéristiques que l'objectif à contraste de phase. D'autre part, à cause du signal parasite au centre, nous travaillerons préférentiellement sur les interférogrammes présentant un centre sombre, bien que les résultats aient aussi été vérifiés sur les interférogrammes présentant un centre clair.

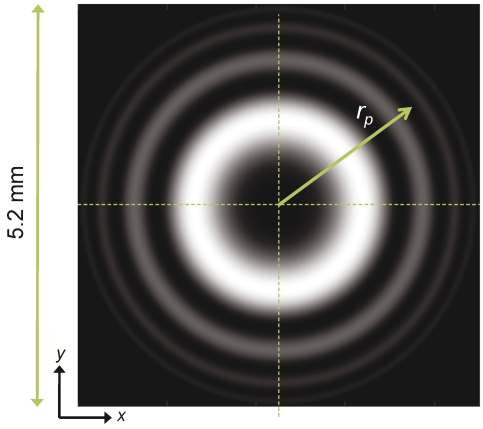
La figure 3.4a présente la figure d'interférence observée pour le cinquième ordre d'interférence au centre, i.e. pour $e = 5\Delta i = 2.03$ µm. Sur la figure 3.4b sont superposés deux profils d'intensité radiaux obtenus à partir de cet interférogramme. Le profil en rouge a été déterminé suivant une direction particulière (x). Il est très bruité et ne permet pas une identification facile de la position des anneaux. C'est pourquoi un programme permettant de moyenner angulai-



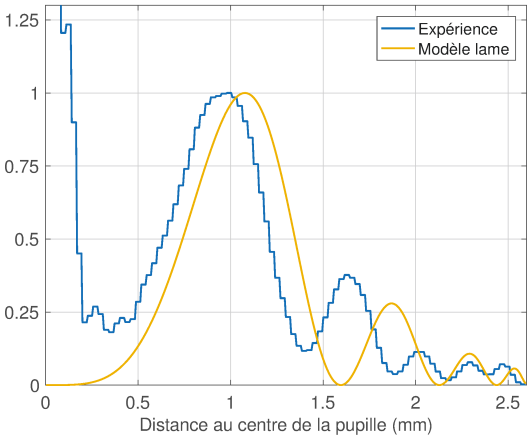
(a) Interférogramme expérimental.



(b) Profils bruts suivant l'axe x.



(c) Interférogramme modélisé.



(d) Comparaison modèle expérience.

FIGURE 3.4 – Comparaison entre l'interférogramme expérimental (a) et la prédiction du modèle de la lame d'eau (c) pour la hauteur correspondant au cinquième ordre d'interférence ($e = 5\,\Delta i = 2.03$ µm - centre sombre). Ces figures d'interférence sont représentées au niveau du plan focal arrière (pupille) de l'objectif, dont le rayon maximal est de 2.6 mm. (b) Superposition de deux profils expérimentaux de l'intensité issus de l'interférogramme (a) : l'un effectué dans une seule direction (courbe rouge) et l'autre en moyennant toutes les directions angulaires (courbe bleue). (d) Superposition des profils issus de (a) et (c). Les profils présentés sont des profils d'intensité radiaux, dont l'intensité du premier anneau brillant a été normalisée à 1. Ils sont représentés en fonction de la distance r_p au centre de la pupille.

rement tous les profils radiaux issus de l'interférogramme a été réalisé. Ce programme génère donc un profil moyen, comme celui représenté en bleu sur la figure 3.4b. Le moyennage permet de lisser le profil radial obtenu à partir d'une seule direction et donc une identification plus facile de la position des anneaux.

Cependant, du fait que les anneaux ne sont pas parfaitement circulaires et aussi en raison du bruit important présent sur la caméra utilisée, cette procédure conduit artificiellement à une baisse du contraste qui n'a pas d'origine physique. En effet, les calculs des coefficients de réflexion en intensité basés sur les différences d'indice entre l'eau et la bille d'une part et l'eau et la lamelle d'autre part, conduisent à un contraste quasi parfait de 98% [4], ce qui est compatible avec ce que nous observons sur les interférogrammes (cf. figure 3.4a) ou sur les profils selon une seule direction (cf. figure 3.4b courbe rouge). Dans un premier temps, seule la position des anneaux sera considérée pour évaluer la pertinence du modèle, sans prise en compte du contraste (cela sera effectué uniquement dans la partie 3.2.2.2).

Génération des interférogrammes modélisés Pour générer un interférogramme à partir du modèle établi, l'intensité est calculée à partir de l'expression de la différence de marche déterminée dans le cadre de ce modèle (cf. expression 3.1 pour le modèle de la lame d'eau). Elle s'écrit :

$$I(e,i) = 2 * I_0 \left[1 + \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}\delta(e,i)\right)\right] \cdot \exp\left(-2r_p^2/w^2\right) \cdot \mathrm{Disc}\left(\frac{r_p}{r_{p,\max}}\right) \tag{3.11}$$

Dans cette expression, on a supposé que l'intensité décroît radialement suivant un profil gaussien de waist w afin de reproduire au mieux les profils [5]. r_p désigne la distance au centre de la pupille et est relié à l'angle d'inclinaison i par la relation d'Abbe :

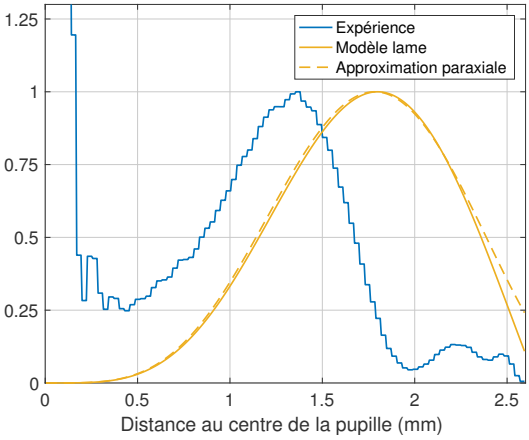
$$r_p = n_i \sin i \; f' \tag{3.12}$$

avec f' la focale de l'objectif. Le diaphragme de la pupille au niveau du plan focal arrière de l'objectif, de dimension $r_{p,\max} = 2.6$ mm, a également été pris en compte, conduisant à un angle d'inclinaison maximal $i_{\max}$ de 58.8°. La figure 3.4c illustre le résultat obtenu à partir du modèle de la lame d'eau pour le cinquième ordre d'interférence au centre.

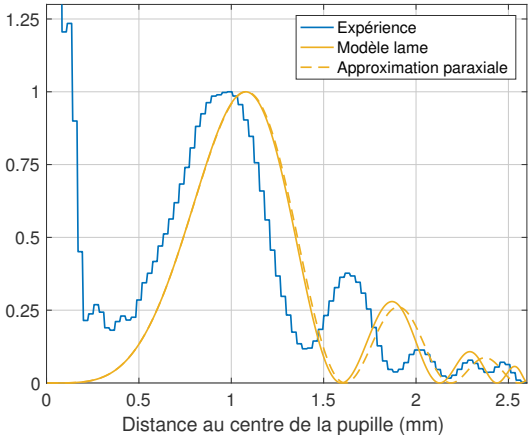
Comparaison modèle et expérience Pour comparer de façon quantitative les résultats obtenus à partir du modèle de la lame d'eau et les interférogrammes expérimentaux, les profils radiaux sont superposés. Ceci est représenté sur la figure 3.4d pour le cinquième ordre d'interférence. Le contraste n'étant pas pris en compte pour générer les interférogrammes modélisés, pour faciliter la comparaison, les profils ont été normalisés à 1 pour le premier anneau brillant (convention qui sera utilisée dans toute la suite). En observant la figure 3.4d, on constate rapidement que le modèle de la lame est effectivement trop simple pour décrire correctement le profil expérimental. En effet la position du premier anneau est décalée. De plus, l'espacement entre deux anneaux consécutifs est trop important, ce qui conduit à un nombre d'anneaux inférieur dans le modèle que dans l'expérience (4 contre 5).

4. En prenant les différents indices optiques de l'eau (1.33), de la bille (1.57) et de la lamelle (1.52), on obtient à la réflexion lamelle / eau un coefficient de réflexion en intensité de 0.44% et à la réflexion entre l'eau et la bille de 0.68%.

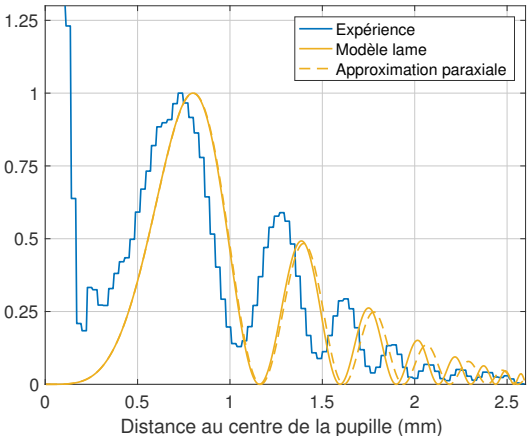
5. La valeur $w = 1.8$ mm a été choisie pour correspondre à la valeur qui sera déterminée précisément dans la partie 3.2.2.2.



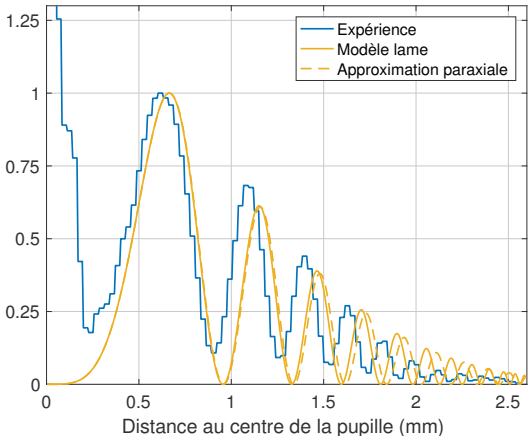
(a) $e = 1\Delta i = 0.40$ µm.



(b) $e = 5\Delta i = 2.03$ µm.



(c) $e = 10\Delta i = 4.02$ µm.



(d) $e = 15\Delta i = 6.03$ µm.

FIGURE 3.5 – Comparaison des profils expérimentaux et modélisés par une lame d'eau, dans le plan de la pupille pour les différentes hauteurs correspondant aux ordres d'interférence 1 (a), 5 (b), 10 (c), et 15 (d). Les profils calculés dans le cadre de l'approximation paraxiale sont également superposés aux autres profils afin d'illustrer son domaine de validité. Le profil expérimental et celui du modèle de la lame d'eau montrés en (b) sont identiques à ceux de la figure 3.4d.

Comparaison pour différentes hauteurs La figure 3.5 présente la superposition des profils radiaux expérimentaux et issus du modèle de la lame d'eau pour quatre hauteurs de référence correspondant aux ordres d'interférence $p = 1$, 5, 10 et 15. Quelle que soit la hauteur, le modèle de la lame d'eau ne décrit pas correctement la position des anneaux. Cependant, le désaccord est d'autant moins marqué que la hauteur augmente (cf. figure 3.5d).

Il est possible de comprendre cette observation en revenant aux expressions obtenues pour la différence de marche dans le cadre de l'approximation paraxiale. Il est donc intéressant de voir dans un premier temps comment cette approximation se compare au calcul "exact" du modèle de la lame d'eau. Les profils obtenus grâce à l'expression pour la différence de marche 3.8 sont également représentés sur la figure 3.5. On constate que l'accord entre le calcul "exact" et "approché" reste très correct, même pour des angles importants. Bien qu'il se dégrade pour les plus grandes hauteurs, on peut considérer que cet accord reste raisonnable jusqu'à des rayons r_p de l'ordre de 2 mm pour l'ensemble des profils présentés, soit environ 2/3 de la pupille. Cette observation est très encourageante pour l'utilisation de cette approximation par la suite, et notamment quand nous tiendrons compte de la diffraction.

Une interprétation simple dans le cadre de l'approximation paraxiale L'un des avantages du calcul de la différence de marche dans le cadre de l'approximation paraxiale est de donner des formules simples permettant de mieux comprendre ce qui détermine la position des anneaux. En effet, l'expression 3.7 peut se réécrire :

$$\delta(i) = \frac{n_i^2}{n_r} 2e_{\text{eff}} (\cos i - 1) + 2\ n_r\ e + \lambda/2 \quad \text{avec} \quad e_{\text{eff}} = e + \frac{\overline{SS'_1} + \overline{SS'_2}}{2} \tag{3.13}$$

Sous cette forme, on distingue deux termes dans l'expression :

- Le terme $2\ n_r\ e + \lambda/2$ correspond au centre de la figure et donne accès à la hauteur. Il ne dépend pas de la courbure de la bille.
- Le terme $\frac{n_i^2}{n_r}\ e_{\text{eff}}\ (\cos i - 1)$ donne quant à lui la dépendance angulaire et décrit la position des anneaux. Il fait intervenir une épaisseur effective $e_{\text{eff}} = e + (\overline{SS'_1} + \overline{SS'_2})/2$, qui n'est rien d'autre que l'épaisseur réelle e dans le cas du modèle de la lame d'eau.

Ainsi, dans le cadre de l'approximation paraxiale, la position des anneaux est décrite non pas par l'épaisseur réelle e mais par cette épaisseur effective e_{eff}. Cette remarque permet donc de comprendre intuitivement pourquoi la courbure de la bille a une forte influence sur le positionnement des anneaux : les points S'_1 et S'_2 étant donnés par les formules de conjugaison sur un dioptre sphérique, on a $\overline{SS'_1} + \overline{SS'_2} \neq 0$ et donc $e \neq e_{\text{eff}}$. D'autre part, on comprend aussi pourquoi en augmentant la hauteur, l'accord entre les profils et le modèle de la lame d'eau s'améliore : le terme constant $(\overline{SS'_1} + \overline{SS'_2})/2$ devient négligeable par rapport à l'épaisseur, de sorte que $e_{\text{eff}} \sim e$.

Conclusion Le modèle de la lame d'eau, bien que simple, permet de comprendre qualitativement l'évolution de la figure d'interférence avec la hauteur de piégeage. Il montre aussi la pertinence de l'approximation paraxiale pour décrire les profils. Dans la suite de cette partie, nous allons étudier le comportement des anneaux d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège. Le modèle de la lame d'eau servira à illustrer simplement la problématique qui existe pour mesurer la position de la bille par rapport au piège.

3.1.4 Détection de la position de la bille : anneaux d'interférence et anneau de phase, une combinaison problématique ?

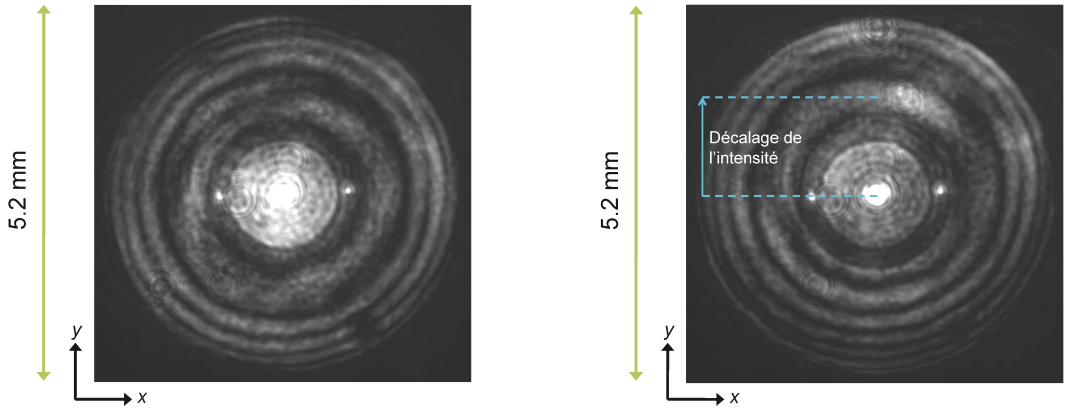
Dans la partie 3.1.3, nous avons étudié le comportement de la figure d'interférence lorsque la bille est au centre du piège, en observant l'évolution de cette figure en fonction de la hauteur de piégeage. Dans cette seconde partie, nous nous intéressons aux modifications de la figure détectée par la photodiode à quatre quadrants lorsque la bille n'est pas au centre du piège, pour une hauteur de piégeage donnée. Il s'agit d'une brique élémentaire primordiale pour comprendre le signal détecté. Dans un premier temps, je vais présenter les observations expérimentales de la figure détectée. Puis, à partir du modèle de la lame qui permettra de générer une figure avec des anneaux, je montrerai en quoi la présence de l'anneau de phase peut engendrer des artefacts de mesure de la position de la bille.

3.1.4.1 Observation de la figure d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège

Afin de comprendre ce qu'il se passe lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège, il est nécessaire d'imager le signal détecté lorsque la bille est effectivement piégée mais décentrée. Or, une bille piégée est perpétuellement en mouvement et il n'est pas possible d'acquérir à une cadence suffisamment élevée son mouvement avec la caméra du montage (sa cadence d'acquisition maximale est de seulement une image toutes les 100 ms alors que le temps caractéristique du mouvement de la bille dans le piège est plutôt de l'ordre de la centaine de µs). Donc au lieu d'avoir un piège fixe et une bille en mouvement dans le piège, nous avons fixé une bille et déplacé le piège. Pour cela, des billes ont été placées dans un gel de polydimethylsiloxane (PDMS) [6]. Toute la difficulté est d'aligner correctement le faisceau sur la bille pour partir d'un cas où la bille est centrée par rapport au piège. En particulier, on peut remarquer qu'il est difficile de savoir où focaliser précisément le faisceau laser afin de simuler au mieux une bille piégée. Cette position de focalisation (point S_1' décrit dans la partie précédente) peut avoir un effet important sur le déplacement de la figure d'interférence, comme nous le verrons en détail dans la partie 3.3.

Une fois ces réglages effectués, le piège est déplacé d'une distance connue. La figure 3.6 présente les interférogrammes avant et après déplacement du piège de 400 nm dans la direction y, obtenus avec l'objectif à contraste de phase. On observe un décalage du maximum d'intensité sur la pupille de l'objectif d'une part et du centre des anneaux d'autre part. Mais ces deux décalages sont différents. En effet, bien que la mesure ne soit pas évidente (l'étude des profils radiaux est très subjective ceux-ci étant fortement bruités, cf. figure 3.4b), le décalage de l'intensité vaut environ 1.3 mm d'après les interférogrammes, et seulement 0.1 mm pour les anneaux d'après les profils radiaux exploités à partir des interférogrammes dans la direction y. En effectuant des décalages similaires de 100 et 200 nm, on observe également ces deux décalages qui semblent proportionnels avec la longueur du déplacement. Les valeurs moyennes ont ainsi été estimées autour de 3.25 mm/µm pour le décalage du profil d'intensité et autour

6. Les billes avaient d'abord été incorporées dans un gel d'agarose dont l'indice optique est très proche de celui de l'eau, afin de de se placer dans des conditions les plus proches possibles des conditions expérimentales. Cependant, le gel avait tendance à fondre avec la chaleur du laser focalisé et l'illumination de la lumière blanche. C'est pourquoi nous avons choisi un polymère plus dur, mais dont l'indice optique est plus élevé, de l'ordre de 1.4.



(a) Piège centré sur la bille.

(b) Piège décalé de 400 nm en y.

FIGURE 3.6 – Effet d'un décalage du piège par rapport à la bille sur l'interférogramme. Ces interférogrammes sont enregistrés pour une hauteur estimée de la bille dans le PDMS correspondant environ au cinquième interfrange et demi (centre clair), i.e. autour de $e \sim 5.5\Delta i \sim 2.2\,\mu$m. Sur la figure (a), le laser est centré sur la bille, tandis que sur la figure (b), il est décalé de 400 nm dans la direction y par rapport à sa position centrée. On observe un décalage du maximum d'intensité depuis le centre de la figure jusqu'au dessus de l'anneau de phase lorsque le piège est déplacé. Les anneaux sont quant à eux plus resserrés en bas de la figure après déplacement.

de 0.25 mm/µm pour le décalage des anneaux.

Je reviendrai sur les explications de ces deux décalages et pourquoi ils sont différents dans la partie 3.3. Nous verrons notamment que les mesures du décalage de l'intensité sont totalement compatibles avec un calcul simple de la position du rayon moyen du faisceau laser sur la pupille. Pour ce qui est du décalage des anneaux, nous verrons que l'accord est moins bon. Du point de vue expérimental, il faut cependant bien réaliser que la détermination est délicate. D'une part, comme mentionné ci-dessus, la mesure a été faite à partir de profils qui ne peuvent être moyennés angulairement du fait de la perte de symétrie axiale. D'autre part, la répartition et le déplacement des anneaux étant très sensible à la position du point S_1', des valeurs très différentes peuvent être obtenus en fonction du plan précis de focalisation du faisceau laser à l'intérieur de la bille. Il faut donc considérer ces mesures de décalage des anneaux avec précaution, bien qu'elles indiquent clairement qu'il y a bien un décalage.

Ce qu'il faut retenir à ce stade pour comprendre le problème que pose la présence de l'anneau de phase pour la détection de la position de la bille, est qu'on observe un déplacement de la figure d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège, tandis que l'anneau de phase reste fixe.

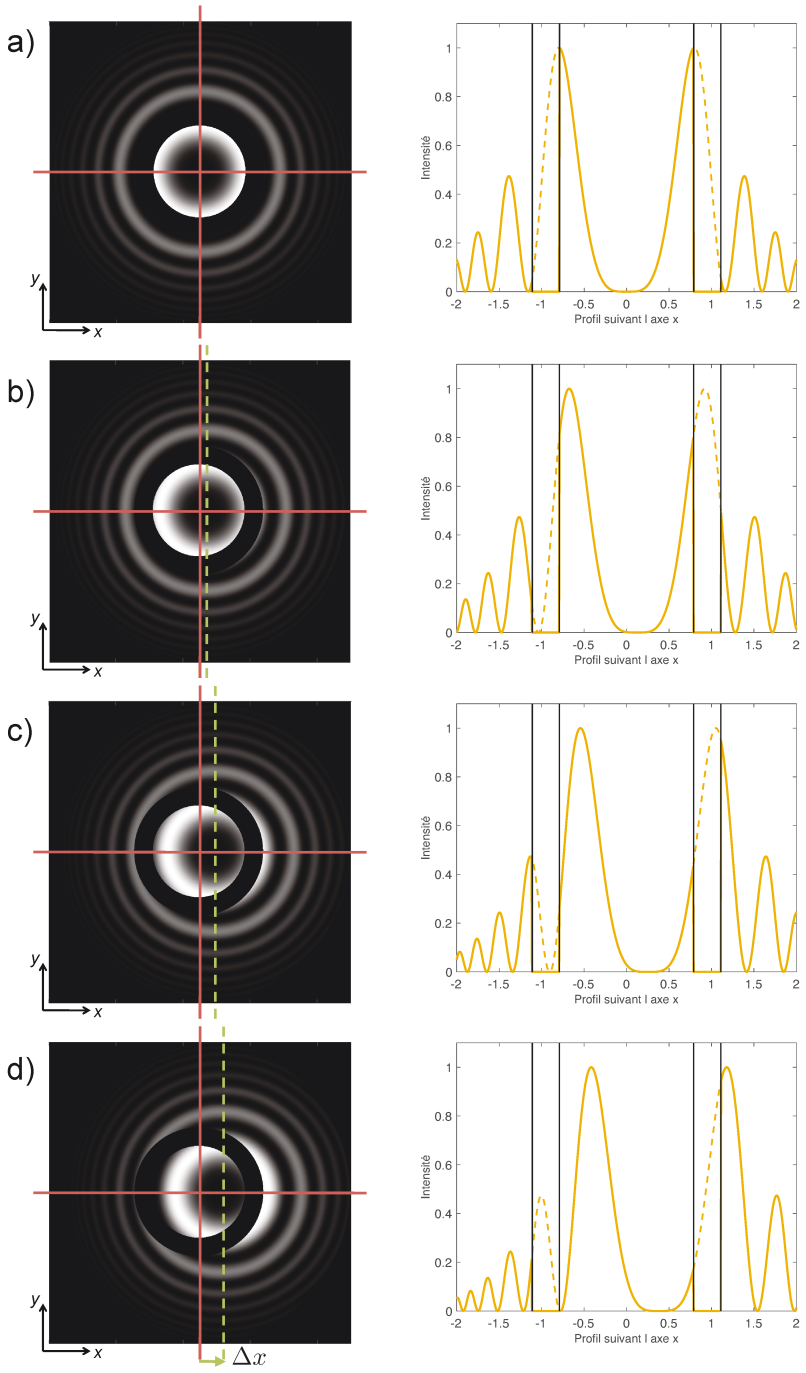


FIGURE 3.7 – Mise en évidence de l'influence de l'anneau de phase combiné aux anneaux d'interférence sur la sensibilité de la détection en position en déplaçant globalement la figure d'interférence d'une amplitude Δx suivant l'axe x, l'anneau de phase restant fixe. Pour les différentes figures de (a) à (d), le déplacement Δx vaut respectivement 0, 0.125, 0.25 et 0.375 mm. Les interférogrammes et les profils correspondants sont réalisés à partir du modèle de la lame d'eau pour le neuvième ordre d'interférence. Les axes de la photodiode à quatre quadrants (QPD) sont représentés en rouge. Le résultat du signal mesuré par la QPD pour ces quatre déplacements est représenté par des losanges sur la figure 3.8a.

3.1.4.2 Influence de l'anneau de phase couplé à la figure d'interférence sur la sensibilité de la détection

Afin de comprendre qualitativement à quel point l'impact de l'anneau de phase sur la détection de la position de la bille peut être important, nous allons raisonner sur un modèle simple conduisant à des interprétations les plus claires possibles. D'une part, le modèle de la lame d'eau est utilisé pour générer l'interférogramme. D'autre part, nous supposons que le déplacement de la bille conduit à une simple translation globale de toute la figure d'interférence, comme présenté sur la figure 3.7. L'anneau de phase, qui reste fixe, est superposé en veillant à respecter les échelles établies à partir de la dimension de la pupille. De plus il est considéré comme totalement opaque ici. Enfin le signal de la photodiode à quatre quadrants suivant l'axe x sera déterminé suivant l'expression 2.5 donnée au chapitre 2, à savoir en soustrayant la somme des intensités des quadrants de gauche à la somme des intensités des quadrants de droite.

Un signal de détection qui n'est pas proportionnel au déplacement de la bille Nous avons volontairement choisi sur la figure 3.7a une configuration "extrême" conduisant à une mesure de la position de la bille particulièrement problématique. Cette configuration correspond à l'interférogramme obtenu pour une épaisseur $e = 9\Delta i$, pour lequel le premier anneau clair est presque masqué sur sa moitié extérieure par l'anneau de phase (cf. profil associé). Suivant l'amplitude du décalage de la figure d'interférence la position mesurée peut être alors très différente de celle attendue. Dans la suite, cet effet est décrit à partir de trois décalages différents : $\Delta x = 0.125$, 0.25 et 0.375 mm qui sont représentés respectivement sur les figures 3.7b, c, et d. Chacun de ces points particuliers est repéré sur la courbe bleue de la figure 3.8a qui représente la courbe de sensibilité calculée pour cette même hauteur. Par courbe de sensibilité, on entend dans cette partie la courbe représentant la position mesurée par le détecteur par rapport au décalage Δx de l'anneau de phase au niveau de la pupille [7].

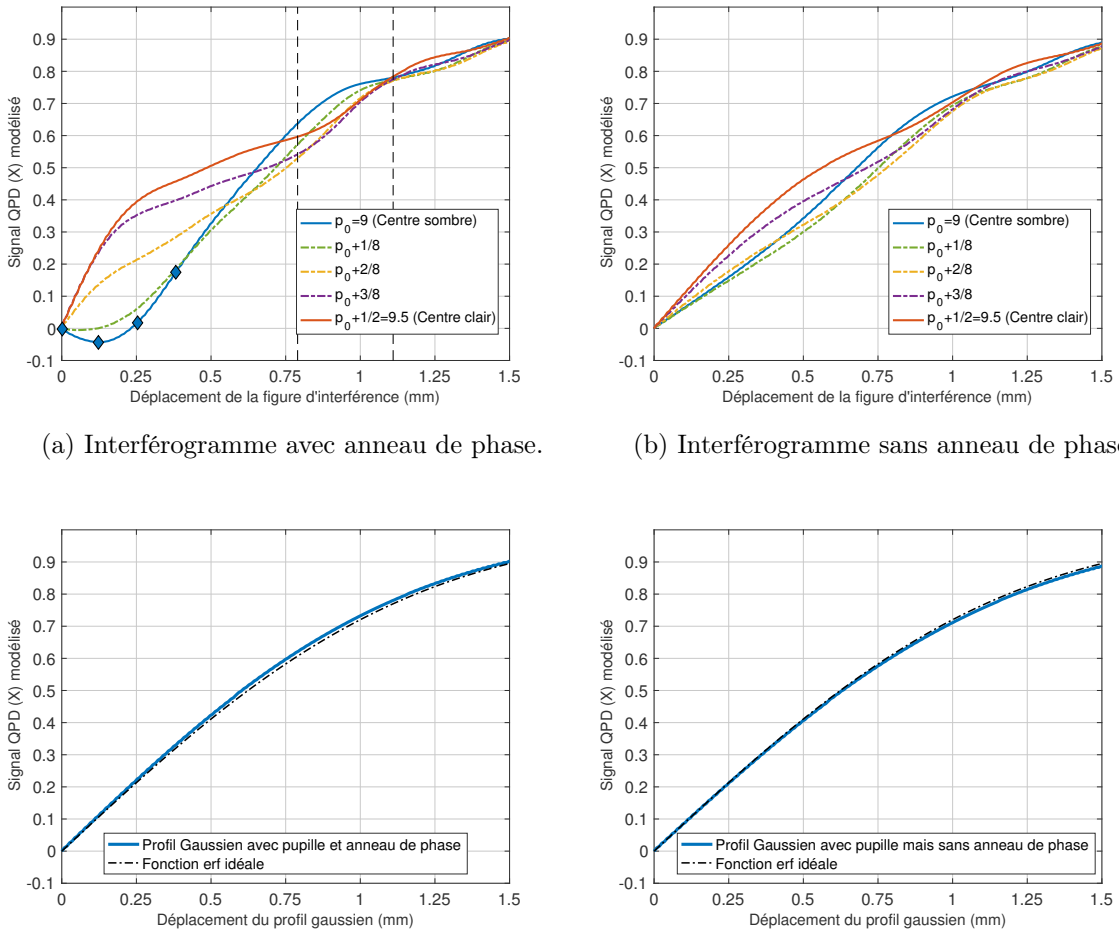
Pour un petit déplacement de l'interférogramme ($\Delta x = 0.125$ mm cf. figure 3.7b), l'intensité du premier anneau clair se trouvant sur la droite est presque totalement masquée par l'anneau de phase (cf. profil associé). L'intensité des quadrants de droite est ainsi fortement diminuée, tandis que l'inverse se produit pour les quadrants de gauche, l'anneau clair se découvrant de l'anneau de phase. De fait, le signal mesuré par le détecteur est alors négatif pour ce déplacement, comme le montre la figure 3.8a. Cette mesure de position est à l'opposé du déplacement de la figure d'interférence, et donc de la bille !

En augmentant le déplacement, comme sur les figures 3.7c et d, la situation revient progressivement "à la normale", le premier anneau situé sur la droite apparaissant de nouveau. On obtient ainsi un signal détecté qui conduit d'abord à un décalage de la bille nul pour $\Delta x = 0.25$ mm, puis positif pour $\Delta x = 0.37$ mm, comme en témoignent les points de mesure correspondants sur la figure 3.8a.

Ainsi la position mesurée par la photodiode à quatre quadrants n'est pas du tout proportionnelle au déplacement Δx pour cette configuration particulière (cf. figure 3.8), ce qui est réellement problématique pour obtenir une mesure fiable du déplacement de la bille dans le

7. Dans la partie 3.3 où un modèle réaliste de déplacement des anneaux sera étudié, la courbe de sensibilité fera référence au signal de position mesuré par rapport au déplacement de la bille par rapport au centre du piège, comme ce sera également le cas dans la chapitre 4 pour la présentation des résultats.

piège.



(a) Interférogramme avec anneau de phase.

(b) Interférogramme sans anneau de phase.

(c) Sans interférences avec anneau de phase.

(d) Sans interférences sans anneau de phase.

FIGURE 3.8 – Calcul de la sensibilité du détecteur (QPD) pour différents déplacements de la figure d'interférence au niveau de la pupille de l'objectif. Pour les figures (a) et (b), la courbe de sensibilité est représentée pour cinq hauteurs différentes, séparées chacune de $\Delta i/8 = 50$ nm, permettant de passer continûment d'un interférogramme à centre sombre ($p_0 = 9$) à un interférogramme à centre clair ($p = p_0 + 1/2 = 9.5$). Les losanges bleus représentés sur la figure (a) correspondent aux quatre cas particuliers illustrés sur la figure 3.7, à savoir $\Delta x = 0$, 0.125, 0.25 et 0.375 mm. Les traits en pointillé indiquent les positions interne et externe du diamètre de l'anneau de phase. (c) et (d) Courbes de sensibilité obtenues avec ou sans anneau de phase, dans le cas d'un profil d'intensité gaussien (de même waist $w = 1.8$ mm) sans anneaux d'interférence et prenant en compte la pupille de l'objectif (r_p, max $= 2.6$ mm). En pointillé la fonction erreur suivant l'expression 3.14, correspondant au cas sans pupille et sans anneau.

Une sensibilité qui dépend de la hauteur A partir du cas particulier présenté sur la figure 3.7, on peut comprendre un autre problème tout aussi important posé par la combinaison

entre les anneaux d'interférence et l'anneau de phase. En effet l'allure de la courbe de sensibilité détaillée ci-dessus est directement liée au fait d'avoir un centre sombre et un premier anneau clair coïncidant avec l'anneau de phase. En augmentant très légèrement la hauteur, c'est-à-dire d'une distance de l'ordre d'un demi-interfrange, le système d'interférence passe d'un centre sombre à un centre clair, induisant une toute autre réponse du détecteur. En effet dans ce cas, le premier anneau sombre est masqué par l'anneau de phase, et un léger décalage a cette fois tendance à "amplifier" le signal détecté.

L'effet de la figure d'interférence sur la courbe de sensibilité est illustré sur la figure 3.8a représentant les différentes courbes de sensibilité pour des hauteurs variant d'un huitième d'interfrange, passant ainsi progressivement de l'interférogramme présentant un centre sombre (i.e. celui représenté sur la figure 3.7a) à un interférogramme présentant un centre clair. Bien que les hauteurs ne soient espacées que de 50 nm [8], les courbes de sensibilité sont très différentes. Par exemple, pour la hauteur correspondant à un centre sombre, le signal détecté est très faible et négatif pour de petits déplacements, tandis que pour la hauteur présentant un centre clair, la sensibilité est positive et très importante pour cette même gamme de déplacements. Enfin, il est important de noter qu'aucune de ces courbes de réponse du détecteur ne donne une variation linéaire du signal en fonction du déplacement de l'interférogramme.

Influence de l'anneau de phase : comparaison de la sensibilité avec et sans anneau de phase Afin de vérifier qu'il s'agit bien de la combinaison anneau de phase et anneaux d'interférence qui génère ce comportement, les courbes de sensibilité ont été simulées pour les mêmes hauteurs mais sans anneau de phase. Les résultats sont représentés sur la figure 3.8b. Comme on pouvait le pressentir à partir de l'étude de cas de la figure 3.7, les courbes de sensibilité ont une allure bien différente. En particulier il n'y a plus de mesure nulle ou négative pour un déplacement positif, mettant ainsi bien en évidence le rôle prépondérant joué par l'anneau de phase. D'autre part, elles présentent un comportement plus linéaire, bien que la sensibilité continue à dépendre de manière non négligeable de la hauteur. Cette dépendance avec la hauteur se comprend qualitativement par le fait que le signal détecté dépend fortement du profil d'intensité qui se déplace (celui-ci étant différent selon que le centre soit clair ou sombre). De plus, nous avons vérifié que la troncature des interférogrammes par la pupille ne jouait qu'un rôle très faible dans l'allure de ces courbes.

Comparaison au cas idéal d'un profil gaussien sans interférence Enfin, il est intéressant d'observer l'effet de la présence des anneaux d'interférence sur les courbes de sensibilité. Pour cela, les courbes de sensibilité ont été simulées pour un signal présentant un profil d'intensité gaussien de waist identique à celui utilisé pour générer les interférogrammes dans l'expression 3.11. Les courbes de sensibilité sont représentées pour une configuration avec ou sans anneau de phase sur les figures 3.8c et 3.8d respectivement. Dans les deux cas, on retrouve une allure très proche du cas "idéal" que l'on obtiendrait en considérant un profil gaussien infiniment étendu, c'est à dire sans diaphragme de la pupille :

$$X = \frac{\int_0^{+\infty} e^{-2(x-\Delta x)^2/w^2} dx - \int_{-\infty}^{0} e^{-2(x-\Delta x)^2/w^2} dx}{\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-2x^2/w^2} dx} = \mathrm{erf}\left(\sqrt{2}\Delta x \,/\, w\right) \tag{3.14}$$

8. On peut noter que 50 nm est une distance caractéristique du mouvement brownien de la bille piégée dans la direction axiale.

où $\mathrm{erf}(x) = 2\int_0^x e^{-t^2}dt/\sqrt{\pi}$ est la fonction erreur. La très faible différence entre ces deux figures montre le rôle négligeable joué par l'anneau de phase et par la pupille pour un simple profil gaussien sans interférences pour nos paramètres.

Finalement, toutes ces comparaisons des courbes de sensibilité (avec ou sans anneau, et avec ou sans interférences) montrent que l'anneau de phase ne pose pas de problème en lui-même, mais qu'il s'agit bien de la combinaison de l'anneau de phase avec une figure présentant des anneaux qui est problématique.

Conclusion Ainsi, cette étude montre que la combinaison de l'anneau de phase avec la figure d'interférence peut fortement perturber la sensibilité de la détection de la position de la bille. D'une part, le signal détecté présente des défauts importants de linéarité et d'autre part, il varie très rapidement avec la hauteur de piégeage, et ce même pour une variation d'une fraction d'interfrange. Ces deux effets peuvent réellement poser problème pour obtenir une détection fiable du mouvement de la bille et il est important de pouvoir les prédire de façon plus quantitative. Ceci sera présenté dans la partie 3.3 une fois que nous disposerons d'un modèle reproduisant fidèlement les interférogrammes expérimentaux.

3.2 Modèles tenant compte de la courbure de la bille

Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle de la lame d'eau ne permet pas de reproduire précisément les figures d'interférence observées. Afin de reproduire plus fidèlement les profils expérimentaux, un modèle tenant compte de la courbure de la bille est nécessaire. Dans cette partie, deux modèles sont présentés. Le premier repose sur un tracé de rayons, méthode expliquée dans le cas de la lame dans le paragraphe 3.1.2. Avec cette approche, il n'est pas possible de décrire correctement la figure d'interférence. En effet, dans ce modèle, le tracé de rayons suit les lois de l'optique géométrique négligeant les effets de la diffraction. Ce phénomène de diffraction est alors considéré dans un second modèle, qui, bien qu'a priori valable uniquement dans le cadre de l'approximation paraxiale, décrit de façon remarquable les interférogrammes expérimentaux, allant jusqu'à un ajustement total des profils expérimentaux permettant de déduire la hauteur de la bille. Il sera utilisé dans la suite pour discuter de la sensibilité du détecteur.

Il est important de remarquer que lorsqu'on veut tenir compte de la courbure de la bille, un paramètre important, qui est difficile à déterminer expérimentalement, et commun aux deux modèles, est la position du point de focalisation S_1'. Ce paramètre a un impact important sur les profils et sera adapté au mieux pour chaque modèle.

3.2.1 Modèle du tracé de rayons suivant l'optique géométrique

Dans cette première approche, le modèle est basé sur la propagation des rayons selon les lois de l'optique géométrique. Il découle directement du raisonnement mené dans la partie 3.1.2.2 qui considère les points sources effectifs S_1 et S_2, "images" du point de focalisation S_1'. Bien qu'il ne décrive pas correctement les profils expérimentaux comme nous le verrons, il est cependant intéressant de le considérer car il permet de voir :

- comment tenir compte de la courbure de la bille dans le cadre de l'optique géométrique,

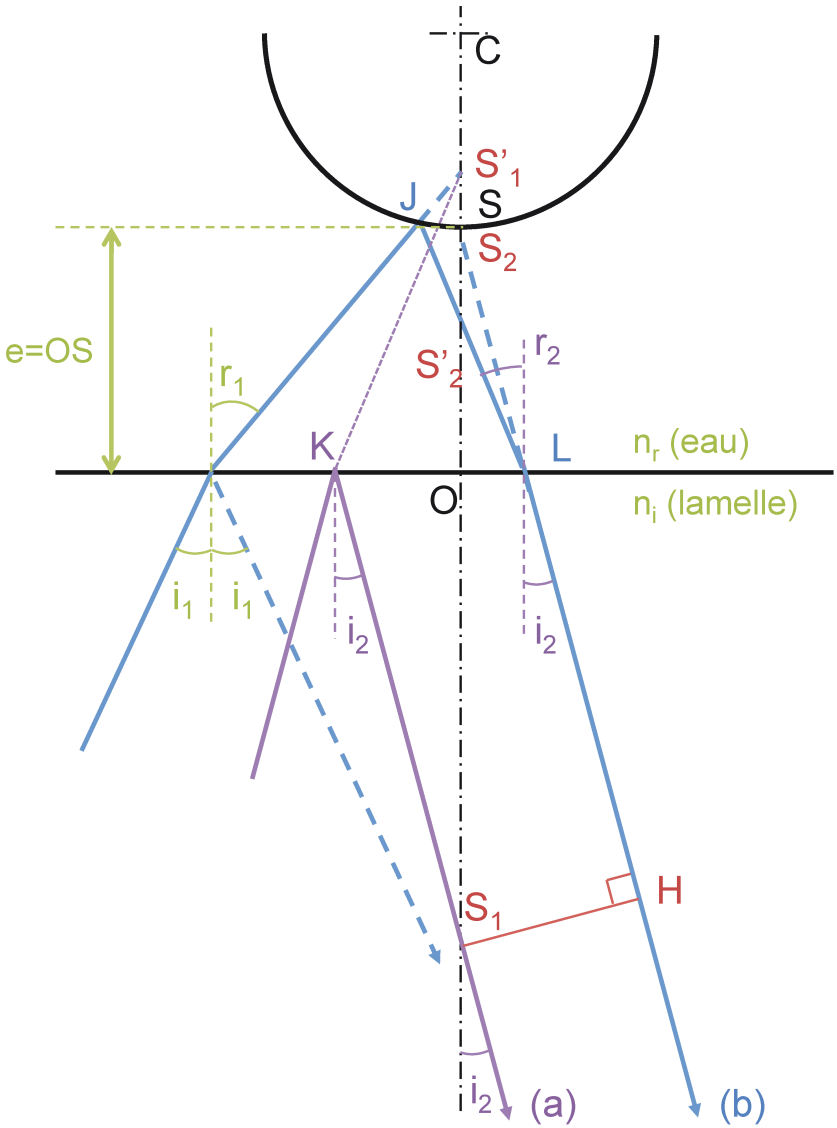


FIGURE 3.9 – Modèle suivant le tracé de rayons d'après les lois de l'optique géométrique. Cette représentation suppose que tous les rayons incidents focalisent au point S_1' dans l'eau (milieu d'indice n_r), et ce quel que soit l'angle d'incidence. O désigne l'intersection de l'axe optique avec la première interface, et S le sommet de la bille. Avant l'interface plane, les rayons se propagent dans un milieu d'indice $n_i = 1.52$ (verre) et ensuite dans un milieu d'indice $n_r = 1.33$ (eau). Les rayons (a) et (b) interférant à l'infini sont maintenant issus de deux rayons incidents distincts, contrairement au cas de la lame d'eau. En bleu : le rayon (b) d'incidence i_1 et focalisant en S_1' est réfracté à l'interface plane avec un angle r_1. Ce rayon est ensuite réfléchi sur la bille en J et repart avec un angle r_2. Ce rayon réfléchi par la bille intercepte l'axe optique en S_2' avant d'être finalement réfracté par la première interface en L avec un angle i_2. En violet : le rayon (a) d'angle d'incidence i_2, focalisant après réfraction sur la première interface en S_1', est réfléchi avec un angle i_2 et intercepte l'axe optique en S_1. Les deux rayons (a) et (b) interférant à l'infini, leur différence de marche est nulle à partir des points S_1 et H.

- l'influence du point de focalisation S_1' sur les interférogrammes,
- et la pertinence du cadre de l'approximation paraxiale, qui permet de calculer la différence de marche très simplement dans ce cas a priori complexe.

Modification de la géométrie avec la prise en compte de la courbure de la bille La figure 3.9 représente le tracé de rayons dans le cas où tous les rayons convergent en S_1', se trouvant dans la bille. Ce tracé de rayon est plus complexe que dans le cas de la lame d'eau (cf. figure 3.3.a), puisque la prise en compte de la courbure de la bille induit que les deux rayons qui interfèrent à l'infini ne sont plus issus du même rayon incident. La différence majeure par rapport au schéma de la lame d'eau concerne l'angle du rayon après réflexion sur la bille. Dans le cas de la lame, la seconde interface étant plane, l'angle réfléchi est égal à l'angle incident r. Le rayon émergeant du système ressort alors avec un angle i et interfère avec le rayon réfléchi sur la première interface. En revanche, lorsque la courbure de la bille est prise en compte, l'angle après réflexion sur la bille r_2 est maintenant différent de l'angle d'incidence r_1, conduisant à un rayon émergeant du système faisant un angle i_2 avec la normale à la première interface. Le rayon émergeant (b) va donc interférer avec un autre rayon incident : le rayon (a), d'angle d'incidence i_2, focalisant en S_1' et réfléchi par la première interface avec le même angle i_2.

Calcul de la différence de marche Pour calculer la différence de marche, il suffit de reprendre les expressions générales 3.2 et 3.3 établies dans la partie 3.1.2.2 :

$$\delta(i) = \delta_{S_1-S_2}(i) + \delta_{S_2-H}(i) + \lambda/2 \quad \text{avec} \quad \delta_{\mathrm{S_2-H}}(\mathrm{i}) = \mathrm{n_i\ S_1S_2\ \cos i} \quad \text{et}$$

$$\delta_{S_1-S_2}(i) = \delta_{S_1-S_1'} + \delta_{S_1'-S_2'} + \delta_{S_2'-S_2} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \delta_{S_1-S_1'} &= -n_i\ S_1K + n_r\ KS_1' \\ \delta_{S_1'-S_2'} &= -n_r\ S_1'J + n_r\ JS_2' \\ \delta_{S_2'-S_2} &= n_r\ S_2'L - n_i\ LS_2 \end{cases}$$

Les différents points sont définis comme précédemment et indiqués sur la figure 3.9, avec notamment les points S_1 et S_2 désignant les points sources effectifs. Nous rappelons également que les angles étant importants, la position des points S_1 et S_2 dépend de l'angle d'incidence i, et donc la différence de marche entre ces deux points $\delta_{S_1-S_2}$ aussi.

Par convention, nous avons choisi que tous les rayons convergent en S_1'. S_1' représente donc la référence de phase pour les rayons (a) et (b) [9]. Cette référence de phase implique que $\delta_{S_1-S_2}(i)$ s'écrit de façon légèrement différente :

$$\delta_{S_1-S_2}(i) = -\delta_{S_1'-S_1} + \delta_{S_1'-S_2'} + \delta_{S_2'-S_2} \tag{3.15}$$

Après calculs, on obtient une expression très simple dépendant uniquement de l'angle r_2 après réflexion sur la bille, du point d'intersection entre le rayon et la bille J, des points S_1' et S_2' et de l'indice dans le milieu n_r :

$$\delta(i) = -n_r\left(\overline{JS_1'} + \overline{JS_2'}\right) + n_r\left(\overline{OS_1'} + \overline{OS_2'}\right)\cos r_2 + \lambda/2 \tag{3.16}$$

9. Implicitement, le fait que S_1' soit considéré comme référence de phase suppose que les rayons convergent tous en phase en un seul point S_1' et donc que les aberrations sphériques sont corrigées pour ce point. Nous avions initialement choisi S_1 comme étant le point de focalisation de tous les rayons, cependant le modèle qui en découlait donnait des résultats trop aberrants pour être retenu. En effet, dans ce cas S_1' est variable et peut focaliser aussi bien à l'intérieur de la bille, qu'à l'extérieur induisant de grandes différences sur les positions des points S_2' et S_2.

A partir de cette relation générale, quelques cas limites peuvent être mentionnés :

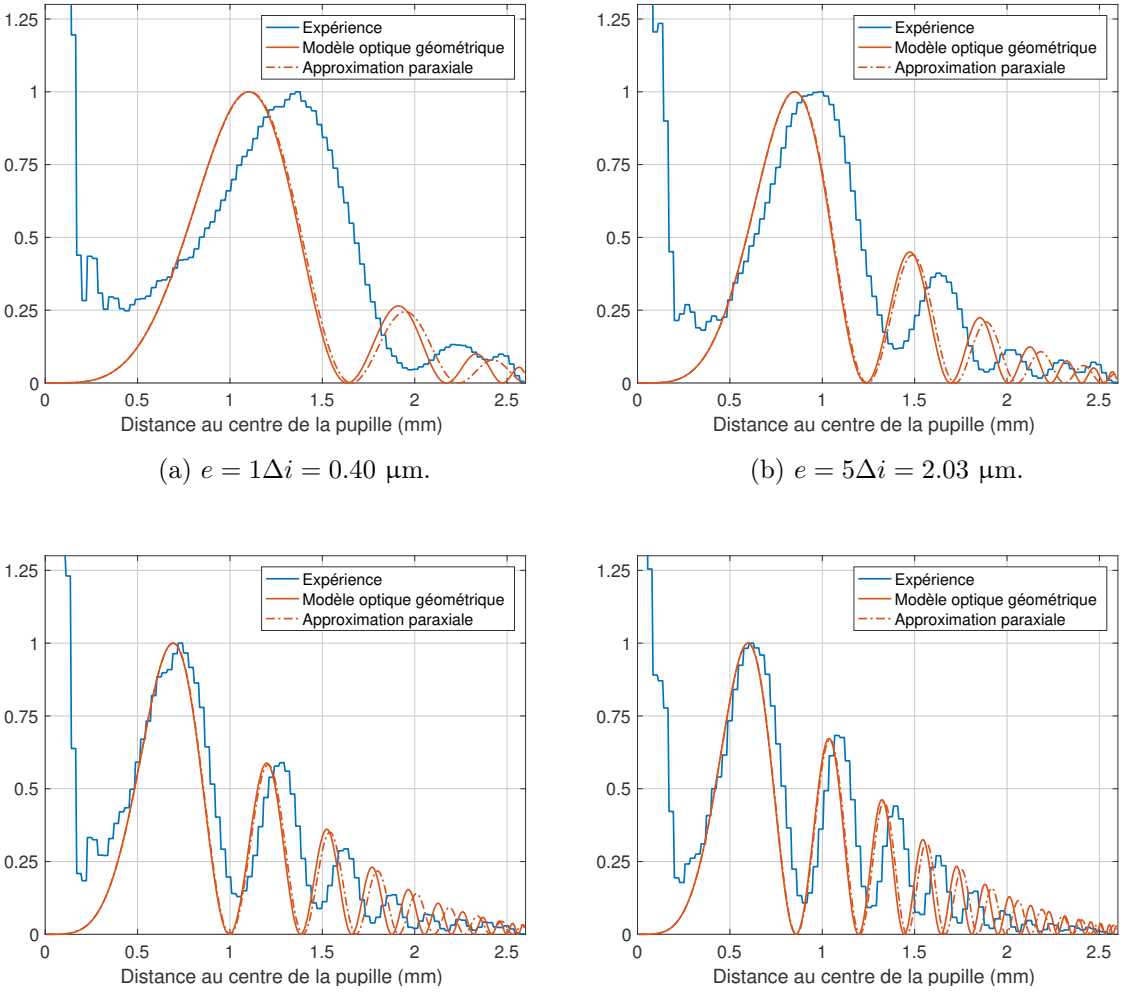
- Premièrement, on peut vérifier que lorsque l'angle d'incidence est nul la relation 3.16 vaut simplement $2\ n_r\ e$ comme attendu.
- Si maintenant on choisit de focaliser sur le sommet de la bille, soit $S'_1 = S$, en considérant tous les angles d'incidence, on retrouve l'expression de la différence de marche de la lame (cf. équation 3.1). De plus, les deux rayons interférant sont de nouveau issus du même rayon incident sur la première interface.
- Enfin, dans le cas où S'_1 se trouve au centre de la bille, les deux rayons interférant sont issus des rayons d'incidence i_1 et $-i_1$. De plus, on a $S'_1 = S'_2 = C$, où C désigne le centre de la bille, ce qui conduit à l'expression simple de différence de marche $2\ n_r\ (e + R)\cos r_1 - 2\ n_r\ R$. Le premier terme renvoie directement l'interprétation donnée par l'expression 3.13 en terme de l'épaisseur effective $e_{\text{eff}} = e + (\overline{SS'_1} + \overline{SS'_2})/2 = e + R$ pour le positionnement des anneaux. Le second terme $-2\,n_r\,R$ est juste un déphasage supplémentaire constant à prendre en compte pour retrouver la différence de marche au centre $\delta(i = 0) = 2\,n_r\,e$.

Comparaison des profils Pour obtenir l'interférogramme, les distances et les angles ont été déterminés sans approximation à partir de l'angle d'incidence i_1 et de la hauteur e correspondant à l'ordre d'interférence considéré. S'_1 reste donc le seul paramètre libre. Contrairement au cas de la lame, la position du point de focalisation S'_1 fait varier les profils, comme le montrent les deux derniers cas limites. Un autre cas remarquable est obtenu lorsque S'_1 est situé à la moitié de la distance entre S et C : le miroir que représente la bille renvoie alors tous les rayons à l'infini.

On a donc cherché à approcher au mieux les profils expérimentaux en faisant varier la position du point S'_1 avec comme seule contrainte : $0 \leq \overline{SS'_1} \leq R$, où $R = \overline{SC}$ est le rayon de la bille ($R > 0$). En effet, à cause de la pression de radiation, la bille n'est pas piégée dans le plan de focalisation du piège (contenant S'_1) mais légèrement en aval, d'où la restriction $\overline{SS'_1} \leq R$. D'autre part, dans la partie 2.3.1 du chapitre précédent, nous avions cherché à évaluer le defocus qui existe entre le plan de focalisation et le plan de piégeage de la bille, soit la distance CS'_1 où C désigne le centre de la bille. La mesure n'était pas précise (environ 1.3 µm), néanmoins celle-ci nous a permis de savoir que le plan de focalisation est à l'intérieur de la bille, d'où la seconde contrainte : $0 \leq \overline{SS'_1}$.

La valeur optimale du paramètre $\overline{SS'_1}$ pour maximiser l'accord entre les profils issus du modèle et de l'expérience vaut $R = 1.5$ µm quelle que soit la hauteur de la bille. La superposition des profils pour $\overline{SS'_1} = R$ pour les quatre hauteurs correspondant aux ordres d'interférence 1, 5, 10 et 15 est présentées sur la figure 3.10. Malgré cette optimisation, le modèle ne décrit pas correctement les profils expérimentaux. Comme pour le modèle de la lame d'eau, ni la position du premier anneau, ni l'écart entre deux anneaux consécutifs ne coïncident. On remarque aussi que l'accord s'améliore avec l'augmentation de la hauteur, comme expliqué précédemment à partir des calculs de la différence de marche dans le cadre de l'approximation paraxiale.

Modèle dans le cadre de l'approximation paraxiale Sur ces figures, ont été ajoutés les profils obtenus dans le cas où la différence de marche est calculée dans le cadre de l'approximation paraxiale. Comme dans le cas de la lame d'eau (cf. figure 3.5), les profils obtenus dans



(a) $e = 1\Delta i = 0.40$ µm.

(b) $e = 5\Delta i = 2.03$ µm.

(c) $e = 10\Delta i = 4.02$ µm.

(d) $e = 15\Delta i = 6.03$ µm.

FIGURE 3.10 – Comparaison des profils expérimentaux et modélisés d'après le tracé de rayons appliquant les lois de l'optique géométrique et tenant compte de la courbure de la bille, pour les différentes hauteurs correspondant aux ordres d'interférence 1 (a), 5 (b), 10 (c), et 15 (d). Les profils obtenus dans le cadre de l'approximation paraxiale correspondant au modèle considéré sont également superposés aux autres profils. Dans le modèle, les rayons convergent au centre de la bille ($\overline{SS'_1} = R$).

le cadre de cette approximation sont très proches de ceux décrits de façon "exacte" pour une distance au centre r_p d'environ 2 mm.

Ce calcul de la différence de marche est très simple, comme le rappelle l'expression 3.7 établie dans la partie 3.1.2.3 :

$$\delta(i) = \frac{n_i^2}{n_r}\left(2\,e + \overline{SS'_1} + \overline{SS'_2}\right)\left(\cos i - 1\right) + 2\,n_r\,e + \lambda/2$$

Il s'agit simplement de déterminer la position du point S'_2, SS'_1 étant fixé à la valeur optimale R. S'_2 étant l'image de S'_1 par la bille, SS'_2 se calcule simplement par la relation de conjugaison :

$$\frac{1}{\overline{SS'_1}} + \frac{1}{\overline{SS'_2}} = \frac{2}{R} \tag{3.17}$$

Ainsi la simplicité de mise en œuvre du calcul dans le cadre de l'approximation paraxiale et sa pertinence, même en présence de la courbure de la bille, sont de nouveau remarquables. Mais évidemment, cette approximation n'améliore pas la description de la figure d'interférence selon un modèle basé sur le tracé de rayons suivant les lois de l'optique géométrique. En effet, dans cette approche il manque un ingrédient essentiel qui est la diffraction. Ce phénomène a pour effet de modifier la courbure du front d'onde qui devient localement plan, ce qui va être incorporé dans le second modèle.

3.2.2 Modèle tenant compte de la diffraction

Pour tenir compte des effets de diffraction, en plus de la courbure de la bille, il faut suivre la déformation du front d'onde au cours de la propagation du faisceau laser. Cela n'est pas si simple, sauf si on se place dans le cadre de l'approximation paraxiale en considérant que le faisceau est gaussien. Dans ce cas, on travaille avec le plan du waist du faisceau et ses images, et non plus avec des points comme dans les modèles précédents. Les différents plans sont désignés par les points d'intersection du plan considéré avec l'axe optique, notés S'_1, S_1, S_2 et S'_2, suivant les mêmes définitions qu'avant.

Dans un premier temps, je vais décrire le modèle tenant compte de la diffraction et montrer à quel point il reproduit bien la position des anneaux. Cette première étape permet notamment de définir la position de focalisation du piège S'_1. Ensuite, ce modèle sera utilisé pour ajuster tout le profil en tenant compte du contraste, permettant de déterminer précisément la hauteur.

3.2.2.1 Un modèle décrivant la position des anneaux

Calcul de la différence de marche La taille du waist dans le plan de focalisation contenant le point S'_1 vaut $w_0 = \lambda/(\pi\ ON) = 470$ nm, valeur moyenne de la taille des waists mesurés expérimentalement dans les directions x et y (cf. partie 2.1.4). Cette valeur permet de calculer la longueur de Rayleigh $z_R = \pi\ w_0^2\ n_r/\lambda = 860$ nm. Pour déterminer la position des autres plans du waist, il suffit d'utiliser les matrices ABCD. S_1 et S_2 sont donc déterminés à partir de la matrice d'un dioptre avec le rapport d'indice n_r/n_i par rapport aux positions des plans S'_1 et S'_2. Les calculs mènent aux mêmes relations 3.6 qu'établies dans la partie 3.1.2.3 dans le cas où la première interface est plane :

$$\overline{OS}_1 = -\frac{n_i}{n_r}\,\overline{OS'}_1 \quad \text{et} \quad \overline{OS}_2 = \frac{n_i}{n_r}\,\overline{OS'}_2$$

De fait, on peut utiliser la relation 3.7 pour calculer la différence de marche, comme dans le cas de l'optique géométrique :

$$\delta(i) = \frac{n_i^2}{n_r}\left(2\,e + \overline{SS'_1} + \overline{SS'_2}\right)\left(\cos i - 1\right) + 2\,n_r\,e + \lambda/2$$

Le but est donc encore une fois de déterminer la relation entre la position du plan du waist S'_2, image du plan du waist S'_1 par la bille. Les calculs par les matrices ABCD, considérant que S'_2 est l'image de S'_1 par le miroir de focale $R/2$ après propagation du faisceau sur une distance $-SS'_1$, mènent à l'égalité :

$$\overline{SS'_2} = R/2\frac{-\overline{SS'_1}(R/2 - \overline{SS'_1}) + z_R^2}{(R/2 - \overline{SS'_1})^2 + z_R^2} \tag{3.18}$$

A partir de la relation 3.18, on peut remarquer deux cas limites :

- En prenant $z_R = 0$, i.e. en négligeant les effets de la diffraction, on retrouve la formule de conjugaison utilisée dans le cas du modèle suivant les lois de l'optique géométrique (cf. expression 3.17),
- Si on fait tendre z_R vers l'infini, cela revient à avoir un faisceau avec un front d'onde plan sur une grande distance et donc à reporter S'_1 à l'infini. Cela entraîne une focalisation au foyer du miroir en $R/2$, ce qui est également vérifié par l'expression 3.18.

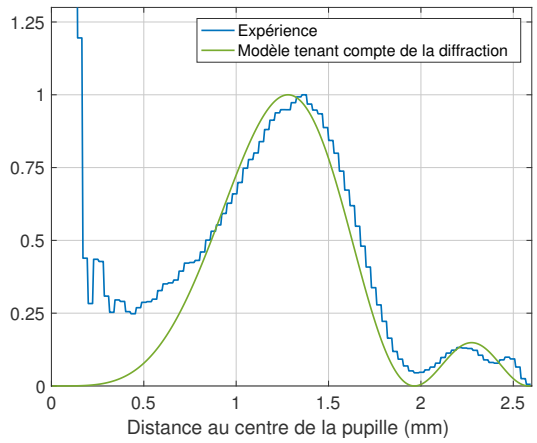
La position du plan S'_2 est finalement la seule différence par rapport au modèle élaboré dans le cadre de l'optique géométrique. Par exemple, pour $\overline{SS'_1} = 0.92$ µm (position de S'_1 optimale pour reproduire les profils comme discuté ci-dessous), l'image géométrique est située à $(\overline{SS'_2})_{géo} = 4.1$ µm (d'après l'expression 3.17), tandis que la position de S'_2 est maintenant située à $(\overline{SS'_2})_{diff} = 0.87$ µm si on prend en compte la diffraction (expression 3.18).

Comparaison des profils La figure 3.11 compare les profils expérimentaux aux profils modélisés pour les quatre hauteurs de "référence". Comme précédemment, le seul paramètre ajustable est la position du plan de focalisation S'_1, qui est optimisée pour maximiser l'accord entre le modèle et l'expérience. Cela conduit à une même valeur $\overline{SS'_1}$ de 0.92 µm, quelle que soit la hauteur considérée.

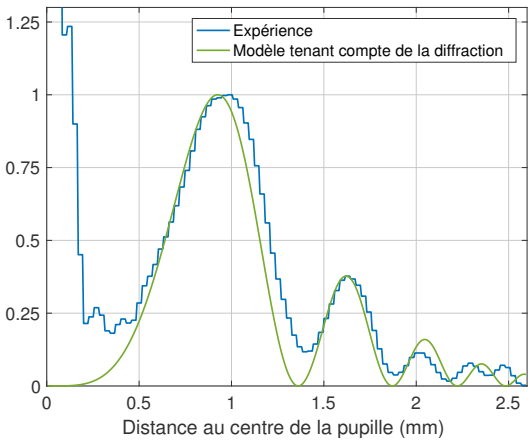
Bien que restreint au cadre de l'approximation paraxiale, ce modèle décrit très bien la position des anneaux. On constate un très bon accord surtout pour une distance au centre de la pupille r_p inférieure à 2 mm, soit environ jusqu'à un angle de 40 °, correspondant à un peu plus de 2/3 de l'ouverture maximale. Il s'agit du modèle qui décrit le mieux les figures d'interférence en fonction de la hauteur. Dans la suite, je vais l'utiliser pour décrire entièrement les profils expérimentaux, permettant finalement de les ajuster pour déterminer plus précisément la hauteur de piégeage sans décompte des ordres d'interférence.

3.2.2.2 Ajustement des profils expérimentaux : détermination de la hauteur

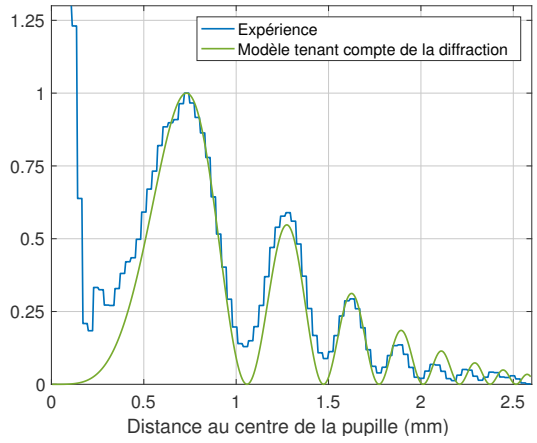
Afin de déterminer précisément la hauteur de piégeage, il est intéressant d'ajuster au mieux les profils expérimentaux. En effet, dans les modèles précédents, nous partions du principe que la hauteur de piégeage était connue grâce au décompte des ordres d'interférence. Cela a permis de déterminer un modèle permettant de décrire la position des anneaux de façon assez



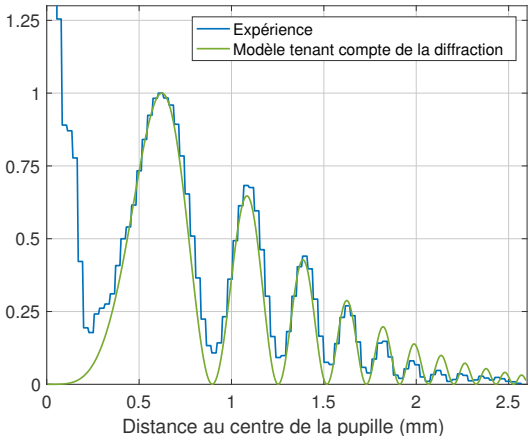
(a) $e = 1\Delta i = 0.40$ µm.



(b) $e = 5\Delta i = 2.03$ µm.



(c) $e = 10\Delta i = 4.02$ µm.



(d) $e = 15\Delta i = 6.03$ µm.

FIGURE 3.11 – Comparaison des profils expérimentaux et modélisés en tenant compte de la courbure de la bille et de la diffraction, pour les différentes hauteurs correspondant aux ordres d'interférence 1 (a), 5 (b), 10 (c), et 15 (d). Les profils sont obtenus en se plaçant dans le cadre de l'approximation paraxiale et en considérant la propagation d'un faisceau gaussien. Dans le modèle, la distance $\overline{SS'_1}$ a été optimisée pour maximiser l'accord entre les profils expérimentaux et modélisés. La valeur optimale vaut $\overline{SS'_1}$ =0.92 µm.

remarquable. Néanmoins, la mesure de la hauteur ne reposant que sur l'observation des interférogrammes, il est possible qu'il existe un léger décalage par rapport à l'ordre d'interférence entier. Le but de l'ajustement des profils est donc de déterminer le plus précisément possible la hauteur. La position du plan de focalisation ayant été optimisée, par la relation 3.18, la position de S_2' est fixée. Ainsi, dans la relation 3.7, seul le paramètre e est libre et va être déterminé. Néanmoins, pour ajuster au mieux les profils, il est nécessaire d'introduire un nouvel ingrédient : le contraste.

Prise en compte du contraste sur les profils Jusqu'à présent nous nous sommes focalisés sur le modèle permettant de décrire la position des anneaux, sans tenir compte du contraste, qui était alors supposé idéal valant 1. Or, sur tous les profils expérimentaux, on observe un faible contraste. Comme mentionné dans la partie 3.1.3, ce contraste n'a pas d'origine physique et est seulement dû au moyennage radial des profils avec des anneaux qui ne sont pas parfaitement circulaires. Néanmoins, pour décrire totalement les profils, il est nécessaire de prendre en compte un contraste.

Pour cela, au lieu de considérer comme avant que les intensités réfléchies par la lamelle et la bille sont identiques et valent : $I_0 \exp\left(-2r_p^2/w^2\right)$ où I_0 est l'intensité au centre et w le waist du faisceau réfléchi dans le plan focal arrière de l'objectif (cf. relation 3.11), il est nécessaire de les différencier. Elles sont notées $I_{0,a}$ pour la lamelle et $I_{0,b}$ pour la bille. D'autre part, les waists des faisceaux réfléchis étaient identiques et définis à partir de la mesure de la taille du waist du faisceau réfléchi par la lamelle, valant 1.8 mm. Or, les waists des faisceaux réfléchis par la lamelle et la bille, dans le plan focal arrière de l'objectif, ne sont a priori pas égaux. En les différenciant, cela permet de moduler spatialement le contraste. Ils sont notés w_a et w_b respectivement. Ainsi, les intensités des deux faisceaux s'écrivent :

$$\left\{ \begin{array}{rcl} I_a & = & I_{0,a} \ \exp\left(-2r_p^2/w_a^2\right) \\ I_b & = & I_{0,b} \ \exp\left(-2r_p^2/w_b^2\right) \end{array} \right. \tag{3.19}$$

Fonction d'ajustement En prenant en compte les calculs de la différence de marche et le contraste, la fonction d'ajustement des profils expérimentaux s'écrit alors :

$$I(e,i) = I_a + I_b + 2\sqrt{I_a \ I_b}\cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}\delta\right)$$

$$\text{avec} \left\{ \begin{array}{rcl} I_a(e,i) & = & I_{0,a} \ \exp\left(-2r_p^2/w_a^2\right) \\ I_b(e,i) & = & I_{0,b} \ \exp\left(-2r_p^2/w_b^2\right) \\ \delta(e,i) & = & \frac{n_i^2}{n_r}\left(2\,e + \overline{SS_1'} + \overline{SS_2'}\right)\left(\cos i - 1\right) + 2\,n_r\,e + \lambda/2 \end{array} \right. \tag{3.20}$$

où la dépendance entre r_p et i est donnée par la relation d'Abbe (cf. 3.12). Lors de l'ajustement :

- $\overline{SS_1'} = 0.92$ µm et $\overline{SS_2'} = 0.87$ µm d'après la relation 3.18 pour un waist dans le plan de focalisation $w = 0.470$ µm,
- pour rappel $\lambda = 1069$ nm, $n_i = 1.52$ et $n_r = 1.33$.

Les paramètres ajustables sont donc : $I_{0,a}$, $I_{0,b}$, w_a, w_b et e. Or seuls w_a, w_b et e sont des paramètres d'intérêt physique. En effet, le rapport des intensités $I_{0,a}/I_{0,b}$, qui rend compte du contraste, est artificiel comme mentionné ci-dessus, et l'intensité globale est normalisée de façon à ce qu'elle vaille 1 pour le maximum du premier anneau. Ainsi, dans la suite, nous ne porterons pas d'intérêt à ces deux paramètres.

Résultats de l'ajustement de la hauteur e Les résultats de l'ajustement correspondant aux quatre profils présentés sur la figure 3.11 sont illustrés sur la figure 3.12. La description des profils expérimentaux par la fonction d'ajustement est remarquable jusqu'à une distance r_p de 2 mm, quelle que soit la hauteur considérée. Ces ajustements permettent de déterminer la hauteur e entre la lamelle et le bas de la bille avec une précision de 4 nm soit un centième d'interfrange ! Si on compare la hauteur déduite à partir de l'ordre d'interférence et celle obtenue par l'ajustement, l'écart est en moyenne de 40 nm, soit seulement un dixième d'interfrange. Il est à noter que les valeurs de l'incertitude et de l'écart des hauteurs ont été évaluées sur plus de 15 interférogrammes différents.

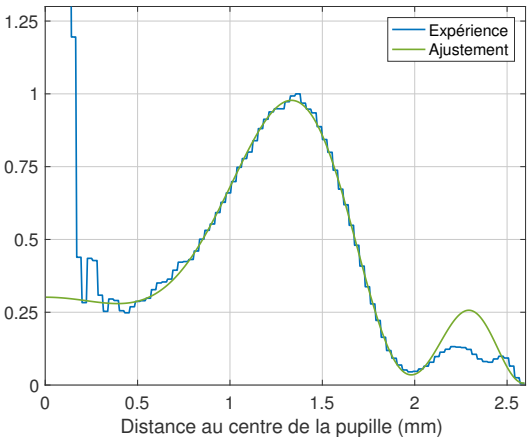
Valeur des waists après ajustement Les valeurs des waists issus des ajustements de chaque profil varient peu en fonction de la hauteur, à l'exception de la hauteur la plus faible ($e = 1\Delta i = 0.40$ µm) qui donne des valeurs légèrement supérieures. D'autre part, les waists des faisceaux réfléchis par la lamelle et la bille sont légèrement différents. En moyennant ces valeurs pour les interférogrammes correspondant aux quinze premiers ordres d'interférence entiers, on obtient : $w_a = 1.85$ mm et $w_b = 1.75$ mm. Ces valeurs moyennes seront utilisées pour modéliser la sensibilité du détecteur dans la partie suivante.

Conclusion Ainsi, nous avons élaboré un modèle décrivant remarquablement bien les profils expérimentaux correspondant au signal détecté, et notamment la position des anneaux. De plus ce modèle permet de déterminer très précisément la hauteur de la bille à partir du profil radial moyen issu de l'interférogramme, ce qui est exactement ce que nous voulions. Ces résultats permettront de connaître précisément la hauteur du centre de la bille piégée qui sera utilisée pour calibrer soigneusement le dispositif dans le chapitre suivant. En attendant, ce modèle est utilisé pour étudier quantitativement l'influence de l'anneau de phase combiné à la figure d'interférence sur la sensibilité du détecteur.

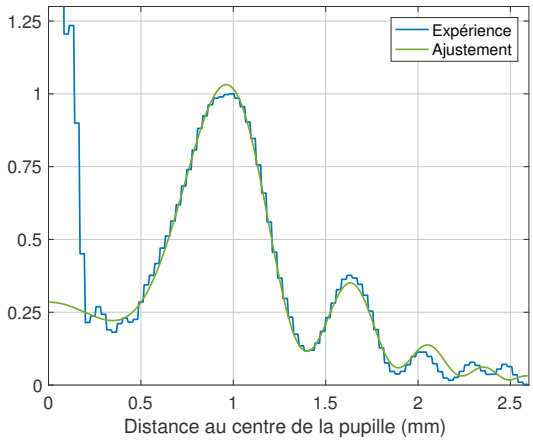
3.3 Modélisation de la sensibilité du détecteur

Le but de cette dernière partie est de prévoir de façon la plus réaliste possible la sensibilité du détecteur à un déplacement de la bille par rapport au piège. Dans le paragraphe 3.1.4.2, nous avons mis en évidence que l'anneau de phase crée des artefacts avec une mesure de la position de la bille qui n'est pas proportionnelle au déplacement réel de celle-ci, et qui varie très rapidement avec la hauteur. Cependant, ces résultats reposaient sur un modèle simplifié : la figure d'interférence était générée à partir du modèle de la lame d'eau et les conséquences sur l'effet d'un déplacement de la bille par rapport au piège était modélisé par une translation de toute la figure d'interférence.

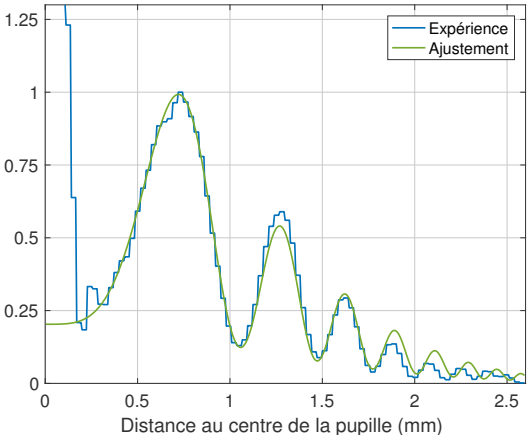
Or, dans le paragraphe 3.1.4.1, nous avons observé que lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège, la figure d'interférence est modifiée de manière plus compliquée : le maximum d'intensité et les anneaux sont décalés mais différemment. Ces décalages sont différents et bien plus importants pour l'intensité que pour les anneaux. Ceci n'était pas pris en compte dans les résultats précédents. Dans cette section, je vais donc commencer par expliquer l'origine des modifications de la figure d'interférence lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège. Ceci permettra de modéliser ces effets. Ensuite, j'utiliserai le modèle tenant compte de la diffraction



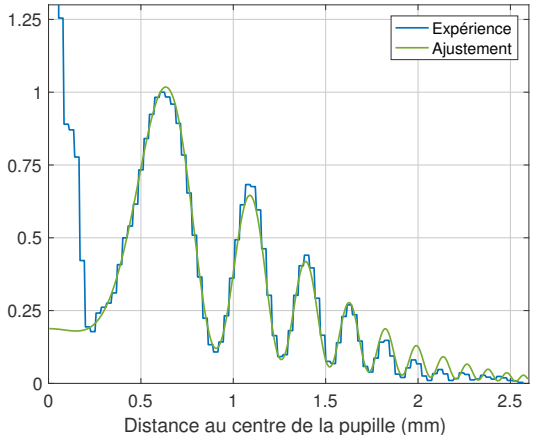
(a) $e = 1\Delta i = 0.40$ µm.



(b) $e = 5\Delta i = 2.03$ µm.



(c) $e = 10\Delta i = 4.02$ µm.



(d) $e = 15\Delta i = 6.03$ µm.

FIGURE 3.12 – Ajustement des profils expérimentaux pour quatre hauteurs différentes correspondant correspondant aux ordres d'interférence 1 (a), 5 (b), 10 (c), et 15 (d), à partir de la fonction 3.20 . La hauteur e ajustée pour chacun des profils vaut respectivement : 0.401, 2.031, 4.015 et 6.037 µm, contre 0.402, 2.001, 4.018 et 6.028 µm d'après le décompte des ordres d'interférence depuis le contact de la bille avec la lamelle. En ce qui concerne les waists des faisceaux réfléchis par la lame et la bille , w_a et w_b , ils valent respectivement pour chaque profil : 2.0 et 2.1, 1.81 et 1.57, 1.85 et 1.77 et 1.79 et 1.79 mm. Enfin les intensités des deux faisceaux $I_{0,a}$, $I_{0,b}$ pour chaque profil valent respectivement : 1 et 0.21, 0.87 et 0.21, 0.65 et 0.12, 0.61 et 0.12.

pour étudier de façon quantitative la sensibilité du détecteur, en se concentrant sur l'influence de l'anneau de phase.

3.3.1 Modélisation de l'effet du déplacement de la bille par rapport au piège sur la figure d'interférence

Les observations expérimentales des modifications du signal détecté lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège ont été décrites dans la partie 3.1.4.1. Cela a permis d'identifier deux effets : le décalage de l'intensité d'une part et le décalage des anneaux d'autre part. Bien qu'ils soient différents, ces deux décalages sont proportionnels au déplacement de la bille. Dans la suite, le décalage de l'intensité est noté dx_{int} et celui des anneaux dx_a. Pour comprendre ces modifications de la figure d'interférence, il faut revenir au fait que celle-ci est due à deux composantes : le faisceau réfléchi par la lamelle et le faisceau réfléchi par la bille. Or, seul le faisceau réfléchi par la bille est influencé par la position de la bille par rapport au piège. Ainsi, le terme "décalage de l'intensité" signifie décalage du profil de l'intensité réfléchie par la bille. Il s'agit donc de comprendre et de modéliser les modifications entraînées par le décalage de la bille sur le faisceau réfléchi par celle-ci, en considérant d'abord le profil d'intensité réfléchie par la bille et ensuite le centre des anneaux.

3.3.1.1 Modélisation du déplacement du maximum d'intensité

Si on veut décrire le déplacement du maximum d'intensité lorsque la bille n'est pas au centre du piège, il faut s'intéresser au déplacement du rayon moyen du piège réfléchi par la bille, le rayon moyen réfléchi par la lamelle étant toujours réfléchi orthogonalement à la surface. La figure 3.13 représente le rayon moyen réfléchi par la bille lorsque le piège est décalé d'une distance dx par rapport à celle-ci, centrée sur l'axe optique. Au lieu d'être réfléchi par la bille avec un angle nul lorsque le piège est centré sur la bille, le rayon moyen est réfléchi avec un angle α' par rapport à l'axe optique, induisant après réfraction par la lamelle un rayon formant un angle α avec la normale à la surface.

Les déplacements du piège étant petits, dans toute la suite nous donnerons toutes les expressions linéarisées. Ainsi, l'angle α s'écrit simplement :

$$\alpha = 2\ dx/R\ n_r/n_i \tag{3.21}$$

où R est le rayon de la bille. D'après la relation d'Abbe (cf. expression 3.12), ceci implique que dans le plan focal arrière de l'objectif le rayon moyen est décalé par rapport à l'axe optique d'une distance dx_{int} vérifiant :

$$dx_{int} = f'\ n_r\ 2\ dx/R \tag{3.22}$$

Cette expression est totalement indépendante de la hauteur de la bille. De plus, le décalage de l'intensité est proportionnel au décalage qui existe entre le rayon moyen du faisceau de piège et le centre de la bille. La relation 3.22 fournit un rapport de proportionnalité, entre le décalage de l'intensité et celui du piège, du même ordre de grandeur que celui déduit des observations expérimentales. En effet, en utilisant les paramètres définis précédemment ($R = 1.5\,\mu m$, $n_r = 1.33$ et $f' = 2$ mm) on obtient respectivement un déplacement estimé à $dx_{int}/dx = 3.55 mm/\mu m$, à comparer à la valeur estimée expérimentalement de 3.25 $mm/\mu m$. Cet accord est très bon dans la mesure où la determination expérimentale est peu précise et très subjective.

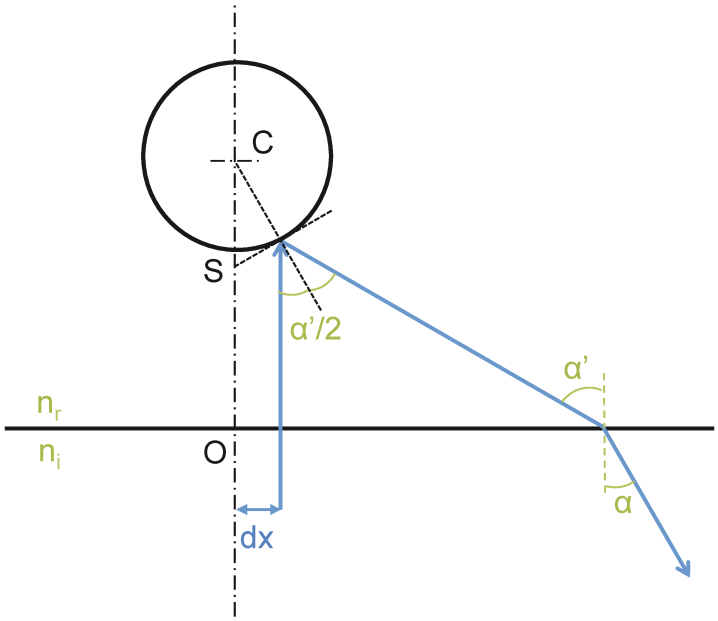


FIGURE 3.13 – Conséquence du déplacement du piège par rapport à la bille sur le rayon moyen du faisceau laser. Ce rayon moyen est décalé de dx par rapport au centre de la bille, ce qui fait qu'il est réfléchi par la bille avec un angle α', puis réfracté par la lamelle avec un angle α.

De plus, il faut noter que ces mesures correspondent au décalage de l'intensité globale de la combinaison des deux faisceaux réfléchis, et non pas seulement au faisceau de la bille (le profil d'intensité correspondant à la réflexion sur la lamelle reste lui fixe).

3.3.1.2 Modélisation du déplacement du centre des anneaux

Nous nous intéressons maintenant au décalage des anneaux. Le système d'interférence est décrit dans le cadre de l'approximation paraxiale par deux points sources émettant des ondes sphériques dans un milieu d'indice n_i. Dans cette approche, le centre des anneaux est déterminé par l'angle γ que forme la droite reliant les deux points sources S_1 et S_2 avec l'axe optique. Ainsi, lorsque la bille est centrée dans le piège, les points sources sont alignés sur l'axe optique et l'angle γ est nul donc les anneaux sont centrés sur l'axe optique. Lorsque la bille est décalée par rapport au piège, la position du point S_1 reste inchangée puisqu'elle provient de la réflexion sur la lamelle. En revanche, S_2 dépend de la réflexion sur la bille et donc se déplace. La figure 3.14 représente les différentes positions des points S_1, S_2, S_1' et S_2' pour une bille centrée sur le piège (points en bleu ou noir) et une bille décalée de dx (points en rouge ou noir). Pour ce modèle simple, nous avons considéré que les positions des différents points étaient simplement translatées par rapport à leur position lorsque la bille est centrée en respectant d'une part que S_2' est aligné sur la droite (CS_1') et d'autre part que S_2 est l'image de S_2' par rapport à la lamelle. Ceci permet de déterminer l'angle γ, qui est décrit par la relation :

$$\gamma = \frac{dx \; S_1'S_2'}{S_1S_2 \; CS_1'} \tag{3.23}$$

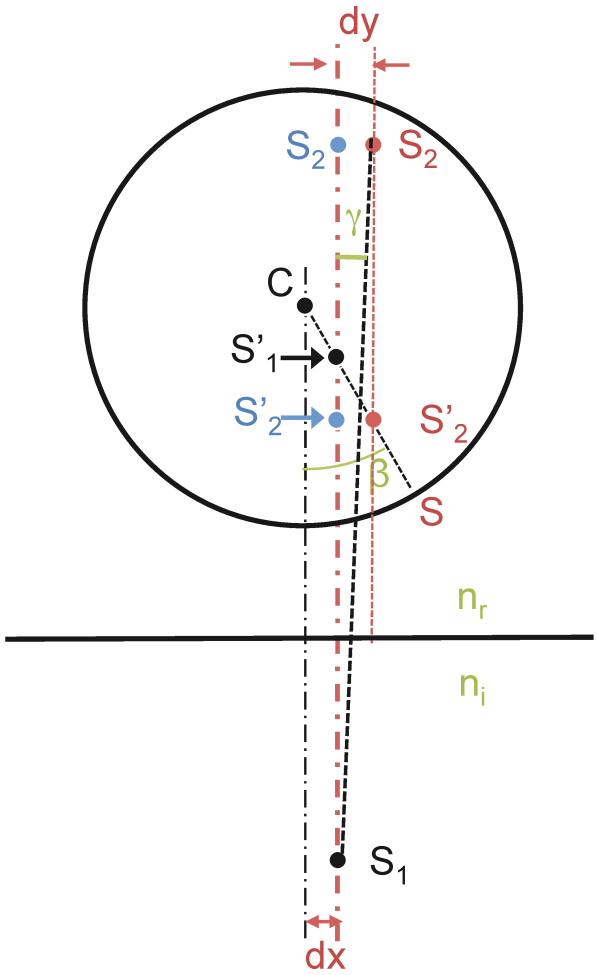


FIGURE 3.14 – Conséquence du déplacement du piège par rapport à la bille sur la droite reliant les points source S_1 et S_2. On rappelle que les deux points sources émettent dans un milieu d'indice n_i. En bleu sont indiquées les positions des deux points sources S_1 et S_2, ainsi que le point de focalisation S_1' et son image par la bille S_2' lorsque la bille est centrée dans le piège, selon le modèle tenant compte de la diffraction. En rouge sont indiqués ces mêmes points lorsque le piège est décalé par rapport à la bille de dx. Le point de focalisation S_1' est alors décalé de cette même distance dx par rapport à sa position d'origine. Le point S_2' est aligné sur la droite reliant le centre de la bille C (faisant un angle β avec l'axe de la bille) et la nouvelle position de S_1', il est donc décalé par rapport à sa position d'origine d'une distance dy. Enfin, S_2 est aligné sur la nouvelle position de S_2' et donc décalé par rapport à sa position d'origine de dy. S_1 est quant à lui inchangé. La nouvelle droite reliant les deux points sources fait un angle γ avec l'axe optique de l'objectif.

où les distances sont déterminées dans le cas où la bille est centrée sur le piège par le modèle tenant compte de la diffraction. Grâce à la relation d'Abbe (cf. expression 3.12), le décalage du centre des anneaux par rapport à l'axe optique s'écrit :

$$dx_a = f' \; n_i \; \frac{dx \; S_1'S_2'}{S_1S_2 \; CS_1'} \tag{3.24}$$

D'après cette expression, le décalage des anneaux est proportionnel au déplacement. D'autre part, il dépend de la hauteur (le terme S_1S_2 peut se mettre sous la forme $2\,e + \overline{SS_1'} + \overline{SS_2'}$ en faisant apparaître explicitement la dépendance en hauteur). Ainsi pour comparer les résultats issus de cette expression théorique et ceux extraits des observations expérimentales, il est nécessaire de se placer à la même hauteur que celle considérée dans l'étude expérimentale, i.e. à une hauteur de $e = 5.5\Delta i = 2.2\,\mu\text{m}$. Dans ces conditions, le coefficient de proportionnalité dx_a/dx entre le décalage des anneaux et celui de la bille donné par l'expression 3.24 vaut autour de 0.04 mm/µm, à comparer avec la valeur estimée expérimentalement à 0.25 mm/µm. L'écart est donc très important ici (environ un facteur 6).

Pour essayer de comprendre l'origine d'un tel écart, il est important de noter que l'expression 3.24 dépend très fortement de la position du point de focalisation S_1', au travers du terme $S_1'S_2'$ qui varie très rapidement avec la distance SS_1'. Ainsi la prédiction ci-dessus a été obtenue pour une position S_1' telle que $\overline{SS_1'} = 0.92$ µm, valeur optimale pour décrire les profils expérimentaux à partir du modèle tenant compte de la diffraction. Dans ce cas, la distance $S_1'S_2' = 0.05\,\mu\text{m}$ est très faible, donnant lieu à ce très faible déplacement. Toutefois, la valeur optimale de la distance $\overline{SS_1'}$ dépend fortement du choix du waist dans l'expression 3.18. Par exemple, en reprenant la même analyse mais pour un waist choisi maintenant légèrement supérieur à w_0=0.55 µm, cela aurait conduit à la valeur optimale $\overline{SS_1'} = 0.96$ µm pour le point de focalisation S_1', et à une prédiction de déplacement bien supérieure de $dx_a/dx = 0.12$ mm/µm. Sans atteindre exactement l'estimation, l'écart est dans ce cas très réduit (plus qu'un facteur 2). D'autre part, la même analyse peut être faite sur la mesure expérimentale, où un léger décalage de la position du laser au niveau de la bille peut fortement changer l'estimation.

Enfin, pour finir cette analyse, on peut noter que ce modèle de déplacement des anneaux est aussi sûrement un peu simple. En effet, lorsque la bille n'est pas centrée dans le piège, en plus du décalage du centre des anneaux, l'ordre d'interférence peut également varier, affectant ainsi directement la figure d'interférence. Cet effet n'est pas pris en compte dans ce modèle.

Ces remarques montrent que l'estimation du déplacement des anneaux est difficile (aussi bien pour la prédiction que pour son estimation expérimentale) et que cette difficulté est probablement responsable de l'écart important trouvé au-dessus. Une étude plus approfondie aurait pu être menée, mais nous avons décidé de nous fier pour la suite aux mesures expérimentales, i.e. en multipliant les résultats de l'expression 3.24 par un facteur 6 correctif pour obtenir le coefficient $dx_a/dx = 0.25$ mm/µm.

3.3.1.3 Modélisation de l'interférogramme lorsque la bille n'est pas centrée

L'origine des déplacements de l'intensité et des anneaux a été expliquée dans cette partie, et des relations simples et physiques permettant de les décrire ont été établies. Avec le modèle tenant compte de la diffraction, tous les ingrédients sont réunis pour modifier la figure d'interférence de façon plus réaliste, en vue de prévoir la sensibilité du détecteur.

En effet, la fonction d'ajustement 3.20 établie dans la partie 3.2.2.2 donne l'expression de l'intensité permettant de modéliser l'interférogramme correspondant à la hauteur e, qui est rappelée ici :

$$I(e,i) = I_a + I_b + 2\sqrt{I_a\ I_b}\cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}\delta\right)$$

$$\text{avec}\begin{cases} I_a(e,i) &=& I_{0,a}\ \exp\left(-2r_p^2/w_a^2\right) \\ I_b(e,i) &=& I_{0,b}\ \exp\left(-2r_p^2/w_b^2\right) \\ \delta(e,i) &=& \frac{n_i^2}{n_r}\left(2\,e + \overline{SS_1'} + \overline{SS_2'}\right)\left(\cos i - 1\right) + 2\,n_r\,e + \lambda/2 \end{cases}$$

Pour effectuer ce calcul, l'amplitude des intensités sont choisies égales ($I_{0,a} = I_{0,b}$) de manière à reproduire les conditions d'un contraste parfait, proche des conditions expérimentales. D'autre part, les valeurs moyennes des waists obtenues par les ajustements de différents profils, à savoir $w_a = 1.85$ mm et $w_b = 1.75$ mm (cf partie 3.2.2.2), sont prises en compte pour décrire la décroissance des profils d'intensité de la lame et de la bille.

Pour tenir compte d'un décalage dx de la bille par rapport au piège dans la direction x, l'expression de l'intensité 3.20 est modifiée par le biais de l'intensité réfléchie par la bille I_b et la différence de marche δ, via le paramètre r_p. Dans le calcul de l'intensité I_b, $r_p = \sqrt{x^2+y^2}$ est remplacé par $\sqrt{(x-dx_{int})^2+y^2}$, où le décalage du profil d'intensité dx_{int} est donné par l'expression 3.22. Le décalage des anneaux impacte le calcul de la différence de marche au travers de l'angle i, qui est relié à r_p par la relation d'Abbe 3.12. Dans ce cas-là, r_p s'écrit $\sqrt{(x-dx_a)^2+y^2}$, où dx_a est donné par l'expression 3.24 multipliée par 6.

Notons enfin que, contrairement au modèle simplifié traité dans la partie 3.1.4.2 où les courbes de sensibilité faisaient référence au signal détecté par rapport au déplacement global Δx de la figure d'interférence dans le plan de la pupille, les courbes de sensibilité présentées par la suite correspondent au signal détecté par rapport au déplacement réel de la bille dx par rapport au centre du piège. En outre, nous avons tenu compte du fait que l'anneau de phase a une transmission de 40% et non pas nulle.

3.3.2 Effet de l'anneau de phase sur la sensibilité du détecteur

Je vais maintenant étudier les effets de la figure d'interférence combinée à l'anneau de phase sur la sensibilité du détecteur dans deux configurations. D'abord, il s'agit de reproduire les courbes de sensibilité calculées à partir du modèle simplifié de la partie 3.1.4.2 (cf. figure 3.8) dans un cas plus réaliste. Nous porterons notre attention sur deux points : est-ce que la position de la bille mesurée par le détecteur est bien proportionnelle au déplacement de la bille par rapport au piège ? et est-ce que la sensibilité est la même pour des hauteurs similaires, i.e. sur un demi-interfrange ? Comme précédemment, les résultats seront donnés avec et sans anneau de phase afin de déterminer son impact sur le signal détecté. Dans un second temps, je vais présenter la position de la bille mesurée par la photodiode à quatre quadrants pour un déplacement donné de la bille, en faisant varier cette fois la hauteur de la bille sur un peu plus de 15 ordres d'interférence, soit environ 6µm.

Courbes de sensibilité et effet d'une variation locale de la hauteur En utilisant la description de la figure d'interférence avec le modèle tenant compte de la diffraction, et

les estimations des déplacements de l'intensité et des anneaux, les courbes de sensibilité avec et sans anneau de phase ont été de nouveau évaluées et sont présentées sur les figures 3.15a et b respectivement. Sur la figure 3.15a, les courbes de sensibilité ont une allure beaucoup plus proche de ce que nous attendons dans le cas d'un faisceau gaussien sans figure d'interférence (cf. figure 3.8c) que dans le cas modèle simple présenté dans la partie 3.1.4.2 . Pour de faibles déplacements, environ jusqu'à 200 nm, la sensibilité est proportionnelle au déplacement, contrairement à ce que nous observions sur la figure 3.8a. Ceci est dû à un modèle beaucoup plus proche de la réalité. Cependant, la sensibilité est différente pour des hauteurs voisines (moins de 200 nm entre les deux hauteurs extrêmes). Ainsi pour des déplacements inférieurs à 200 nm, la sensibilité entre la hauteur présentant un centre sombre (courbe bleue) vaut 1.28 μm^{-1} et celle pour la hauteur présentant un centre clair (courbe rouge), vaut 1.42 μm^{-1}, soit un écart de 10%.

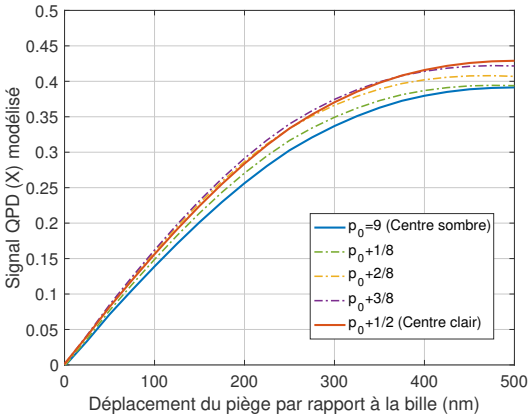
La comparaison des figures 3.15a et b montre que cette dépendance de la sensibilité avec la hauteur est attribuée à la combinaison anneau de phase et anneaux d'interférence, et non pas à la figure d'interférence elle-même. Néanmoins, même sans anneau de phase, une légère différence de sensibilité apparaît en changeant de hauteur. Les sensibilités extrêmes pour de petits déplacements (inférieurs à 200 nm typiquement) valent 1.32 μm^{-1} et 1.40 μm^{-1} (soit un écart inférieur à 6%). Enfin, on peut noter que les sensibilités sans anneau de phase sont comprises dans l'intervalle des sensibilités avec anneau de phase.

Comparaison au cas idéal d'un profil gaussien sans interférence Comme dans la partie 3.1.4.2, il est intéressant de comparer les résultats obtenus si l'on considère maintenant le cas sans interférences, c'est-à-dire le cas où l'on somme de manière incohérente les profils d'intensités correspondant aux réflexions sur la lamelle et sur le microscope. Les courbes sont présentées sur les figures 3.15c et d. Dans les deux cas, on retrouve à nouveau des courbes proches du cas "idéal" (profil gaussien infiniment étendu) pour lequel la sensibilité est donnée par une fonction erreur, comme dans l'expression 3.14. Cependant, on peut remarquer que l'amplitude est ici diminuée de moitié environ. Cette diminution se comprend par le fait que seul le profil d'intensité lié à la réflexion sur la bille est déplacé, celui provenant de la lamelle étant fixe. La normalisation du signal de la photodiode à quatre quadrants par l'intensité totale reçue fait alors chuter le signal suivant l'expression :

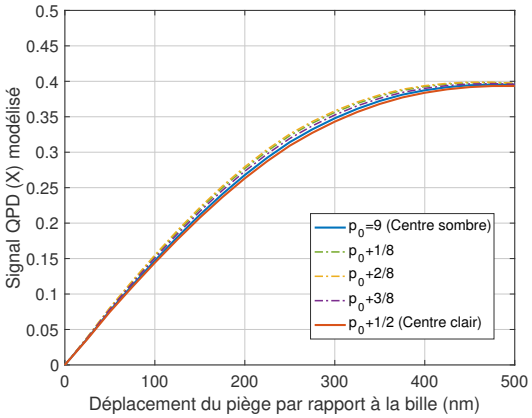
$$X = \frac{I_{0,b} w_b^2}{I_{0,a} w_a^2 + I_{0,b} w_b^2} \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2}\Delta x}{w_b} \right) \tag{3.25}$$

En prenant de nouveau $I_{0,a} = I_{0,b}$ et les valeurs $w_a = 1.85$ mm et $w_b = 1.75$ mm pour les waists respectifs des profils provenant de la lamelle et de la bille, comme dans le cas avec interférences, le signal de déplacement maximal vaut $w_b^2/(w_a^2 + w_b^2) = 0.47$. Enfin il est intéressant de noter que l'influence de la pupille commence à se faire sentir sur ces courbes, entraînant une légère baisse du signal pour les plus grands déplacements.

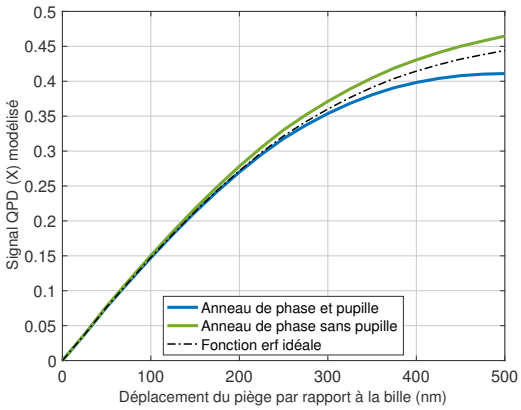
Sensibilité en fonction de la hauteur pour un déplacement donné Afin de voir comment évoluent les sensibilités sur une plus large gamme de hauteurs, nous allons maintenant calculer la position de la bille pour un déplacement du piège donné, en faisant varier la hauteur sur plus de quinze ordres d'interférence. La figure 3.16 présente les résultats obtenus avec et



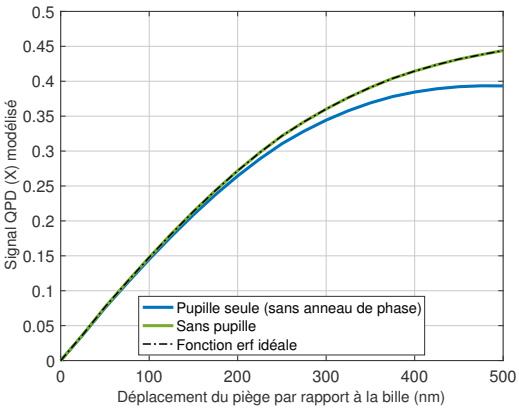
(a) Interférogramme avec anneau de phase.



(b) Interférogramme sans anneau de phase.



(c) Sans interférences avec anneau de phase.



(d) Sans interférences sans anneau de phase.

FIGURE 3.15 – Calcul de la sensibilité du détecteur : signal de la photodiode à quatre quadrants en fonction du déplacement de la bille dx par rapport au piège. Pour les figures (a) et (b), la courbe de sensibilité est représentée pour cinq hauteurs différentes, séparées chacune de $\Delta i/8 = 50$ nm, permettant de passer continûment d'un interférogramme à centre sombre ($p_0 = 9$) à un interférogramme à centre clair ($p = p_0 + 1/2 = 9.5$). Pour simuler l'interférogramme, le modèle tenant compte de la diffraction est utilisé. Les déplacements de l'intensité, dx_{int}, et des anneaux, dx_a, selon le déplacement du piège par rapport à la bille sont déterminés par les formules 3.22 et 3.24 (corrigée d'un facteur 6). Les déplacements maximums de ces deux quantités sont respectivement 1.77 mm et 0.125 mm (à comparer au déplacement total $\Delta x = 1.5$ mm de la figure 3.8). (c) et (d) Courbes de sensibilité obtenues avec ou sans anneau de phase, et en prenant en compte ou non la pupille de l'objectif, dans le cas d'un profil d'intensité gaussien (de même waist $w = 1.8$ mm) sans anneaux d'interférence. En pointillé la fonction erreur suivant l'expression 3.25, correspondant au cas sans pupille et sans anneau. Dans tous ces calculs, la transmission de l'anneau de phase vaut 40%.

sans anneau de phase pour des déplacements du piège de 300 nm, pour des hauteurs correspondant au premier ordre d'interférence entier ($p = 1$) jusqu'au quinzième demi-entier ($p = 15.5$). Bien que le déplacement soit le même pour toutes les hauteurs, en présence d'anneau de phase (courbe bleue), le déplacement détecté varie très fortement avec la hauteur. On observe des oscillations périodiques de l'ordre d'un interfrange, qui sont modulées par une enveloppe. L'amplitude pic à pic maximale des oscillations (autour de $p = 5$) vaut 36%. Autour du battement, entre les ordres d'interférence 12 et 13, on observe en plus une inversion : le déplacement détecté le plus important correspond avant le battement à des ordres d'interférence demi-entiers, tandis qu'après il correspond à des ordres d'interférence entiers.

Sans anneau de phase (courbe rouge), le déplacement détecté varie lui aussi selon la hauteur suivant une période légèrement supérieure à un interfrange. En revanche, l'amplitude des oscillations est quasiment constante et bien moins importante qu'en présence d'anneau de phase (elle vaut environ 10%). Ainsi, l'oscillation du déplacement détecté est due à la nature de la figure d'interférence en forme d'anneaux concentriques, tandis que la modulation de l'amplitude est seulement due à la présence de l'anneau de phase.

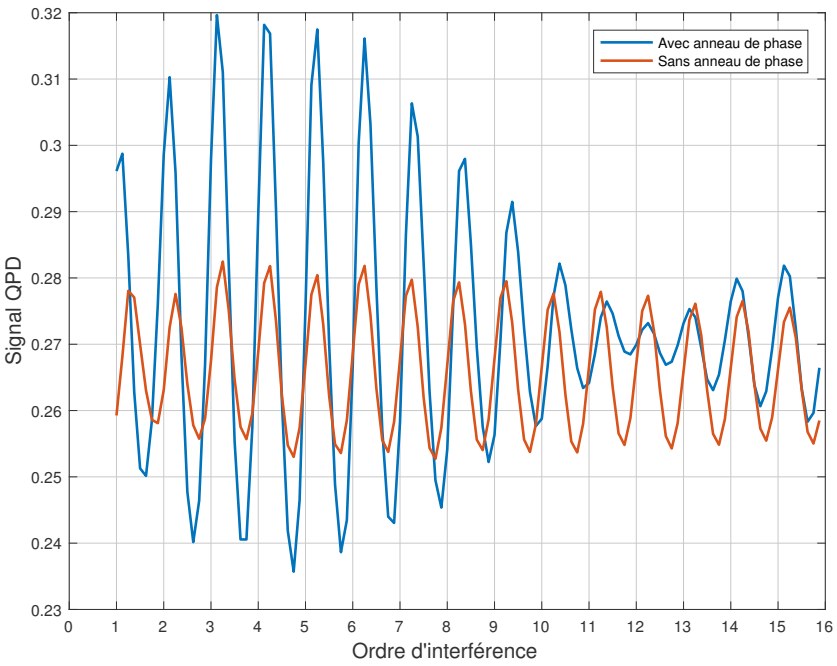


FIGURE 3.16 – Influence de l'anneau de phase sur la sensibilité du détecteur en fonction de la hauteur pour un déplacement du piège par rapport à la bille de 300 nm. Les interférogrammes sont obtenus de la même façon que les résultats présentés sur la figure 3.15.

Ces différents résultats tendent à montrer que l'anneau de phase représente un véritable obstacle pour une détection fidèle des déplacements de la bille par rapport au piège. Il est donc très important de vérifier si ces prévisions sont en adéquation avec les mesures expérimentales. Si celles-ci se confirment il faudra envisager une modification du montage pour utiliser un

objectif classique sans anneau de phase. Néanmoins, malgré cette adaptation, une variation non négligeable de la sensibilité sera toujours présente.

Chapitre 4

Calibration du montage de pince optique en rétro-diffusion

Sommaire

4.1 Acquisition et traitement des signaux pour la calibration 134
4.1.1 Acquisition et traitement de la réponse à un échelon de position 134
4.1.1.1 Acquisition d'une réponse à un échelon de position 134
4.1.1.2 Traitement d'une réponse à un échelon de position 135
4.1.2 Acquisition et traitement du mouvement brownien 140
4.1.2.1 Acquisition d'un mouvement brownien 140
4.1.2.2 Traitement par analyse de la densité spectrale de puissance . . . 140
4.1.2.3 Traitement par application du théorème de l'équipartition 143
4.1.2.4 Traitement par inférence bayésienne 143
4.1.3 Paramètres expérimentaux 146
4.1.3.1 Température 146
4.1.3.2 Rayon de la bille 147
4.1.3.3 Hauteur du centre de la bille 148
4.2 Mesure de la sensibilité du détecteur 149
4.2.1 Méthodologie : réponse de la bille à un déplacement rapide du piège . . . 149
4.2.2 Courbes de sensibilité du détecteur 150
4.2.3 Calibration en fonction de la hauteur 152
4.2.4 Conclusion sur le montage combinant pince optique et imagerie à contraste de phase 154
4.3 Mesure de la raideur du piège et comparaison des méthodes de calibration 156
4.3.1 Calibration de la raideur en fonction de la hauteur : détérioration de l'efficacité de piégeage par l'aberration sphérique ? 156
4.3.2 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la hauteur 158
4.3.3 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la puissance 165
4.4 Comment calibrer le dispositif lors des expériences avec les cellules ? 168

Dans un montage de pince optique, pour effectuer des mesures quantitatives, l'expérimentateur a besoin de connaître la force qu'il exerce $F = -k\Delta x$, où k est la constante de raideur du piège et Δx la position du centre de la bille par rapport au piège. Nous avons vu dans la section 1.3.1 que pour cela, il est nécessaire de calibrer le dispositif de façon expérimentale. Cela suppose donc de déterminer d'une part la constante de raideur du piège pour une

puissance laser donnée, et d'autre part la sensibilité du détecteur i.e. le facteur de conversion permettant de traduire en unité métrique la position de la bille par rapport au piège mesurée par le détecteur.

Ce chapitre est consacré à la calibration du montage de pince optique décrit dans le chapitre 2, dont les particularités sont d'une part de piéger avec un objectif possédant un anneau de phase situé dans son plan focal arrière et d'autre part de détecter les photons rétro-diffusés par la bille dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Cette calibration est développée dans un contexte plus général que celui de l'application visée et a fait l'objet d'un article qui est à ce jour soumis dans le journal Optics Letters. Pour cela, les quatre méthodes de calibration présentées dans la section 1.4 : l'application du théorème de l'équipartition, l'analyse de la densité spectrale de puissance, l'inférence bayésienne et la réponse à un échelon de position, et développées dans le cas d'une détection en transmission, sont adaptées à notre dispositif.

Je commencerai par décrire l'acquisition des signaux puis leur mise en forme et enfin leur exploitation afin de déterminer les différents paramètres d'intérêt suivant chacune des méthodes. Ensuite, je présenterai les résultats de calibration du dispositif avec dans un premier temps la calibration du détecteur, où l'impact de la présence de l'anneau de phase sera particulièrement étudié. Ces résultats seront directement mis en regard de ceux obtenus dans le chapitre précédent. Dans un second temps la constante de raideur sera évaluée en fonction de la hauteur de piégeage ou de la puissance du laser. Cette mesure sera déterminée à partir de quatre méthodes différentes donnant lieu à une comparaison des résultats. Enfin, dans la dernière section je proposerai comment on pourrait calibrer le dispositif lors des expériences sur les cellules.

4.1 Acquisition et traitement des signaux pour la calibration

Comme présenté dans la section 1.4, le dispositif de pince optique peut être calibré à partir du mouvement brownien d'une bille piégée ou de la réponse de cette bille à un déplacement rapide du piège. Le premier enregistrement est alors traité par trois méthodes : l'analyse de la densité spectrale de puissance, l'application du théorème de l'équipartition et l'inférence bayésienne et le second par la réponse à un échelon de position. L'acquisition et le traitement de ces deux types de signaux selon les méthodes appropriées sont décrits dans la suite de cette section. Pour finir, une mesure des paramètres expérimentaux importants pour une calibration précise sera présentée.

4.1.1 Acquisition et traitement de la réponse à un échelon de position

4.1.1.1 Acquisition d'une réponse à un échelon de position

Comme cela a été décrit dans la partie 1.4.3, pour calibrer le montage de pince optique à partir de la réponse de la bille à un déplacement du piège, initialement la bille se trouve au centre du piège. En 2 μs, le piège est déplacé d'une distance connue d_0 dans une des directions x ou y grâce aux DAOs. La bille relaxe alors vers le centre du piège, d'autant plus vite que le piège est raide, soit typiquement en quelques centaines de µs. Après une pause de 100 ms, le piège est ramené vers sa position d'origine et la bille revient également vers le point d'origine.

Le piège et la bille effectuent ainsi un aller-retour. Afin de réduire l'impact du mouvement brownien sur la réponse de la bille, les signaux sont moyennés sur plusieurs "allers-retours" (typiquement 30) [1]. Le signal de la photodiode quatre quadrants est numérisé à une cadence de 62.5 kHz.

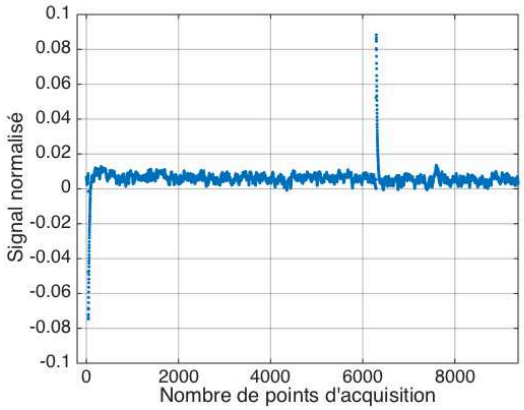
Les signaux typiques de la réponse de la bille à un échelon de position pour un aller-retour sont présentés sur la figure 4.1. Les figures (a), (c) et (e) de la colonne de gauche correspondent à un déplacement du piège dans la direction x, tandis que les figures (b), (d), (f) de la colonne de droite correspondent à un déplacement du piège dans la direction y (pour un rappel des directions x et y de déplacement du piège, le lecteur peut se reporter à la figure 2.15 par exemple). Pour chaque direction de déplacement du piège, la position de la bille selon les directions X et Y du détecteur sont représentées sur les lignes 1 et 2 respectivement (pour un rappel des directions X et Y du détecteur, le lecteur peut se reporter à la figure 2.16). Ces signaux sont normalisés par l'intensité totale reçue par les quatre quadrants au cours du déplacement du piège. Cette intensité totale est indiquée sur la troisième ligne pour chaque direction x et y de déplacement du piège.

Sur la figure 4.1a correspondant à un déplacement du piège selon la direction x et une observation de la position de la bille dans la direction X, on observe bien deux pics traduisant le retour de la bille dans le piège, à l'aller puis au retour du piège. Si on se concentre sur le deuxième pic (cf. figure 4.2) celui-ci se comprend en plusieurs étapes, en gardant à l'esprit que le détecteur n'est sensible qu'à la position relative de la bille par rapport au piège :

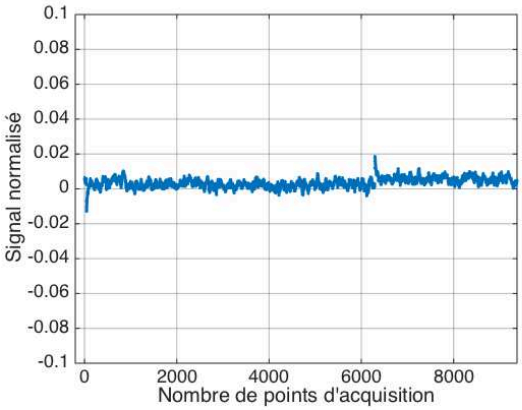
1. la bille est au centre du piège : le faisceau réfléchi par la bille est centré sur le détecteur,
2. le piège est déplacé très rapidement, la bille n'est plus au centre du piège : le faisceau réfléchi n'est plus centré sur le détecteur d'où le pic,
3. la bille relaxe vers le centre du piège : observation d'une décroissance exponentielle,
4. la bille est de nouveau au centre du piège : le faisceau réfléchi est de nouveau centré sur le détecteur, bien que le piège ne soit plus dans sa position d'origine.

Le fait que l'amplitude des pics soit très faible dans la direction de détection Y pendant un déplacement du piège dans la direction x (cf. figure 4.1c) indique que les axes du détecteur sont bien alignés avec ceux de déflexion du faisceau par les DAOs. Enfin, le signal somme des quatre quadrants (cf. figure 4.1e) est légèrement différent (moins de 2%) selon la position du piège : l'intensité totale détectée est légèrement inférieure lorsque le piège est décalé de d_0 par rapport à sa position initiale. Ceci est dû à une efficacité de diffraction différente selon l'angle défléchi par les DAOs, ce qui implique une puissance laser différente selon la position du piège. Dans le cadre d'une comparaison entre les différentes méthodes de calibration, les autres méthodes se basant sur l'acquisition du mouvement brownien pris dans la position initiale du laser, seuls les résultats issus du deuxième pic seront considérés. Toutes ces observations sont également valables lors d'un déplacement du piège dans la direction y en échangeant les directions de détection, mais la variation d'efficacité de diffraction de ce DAO ne varie quasiment pas.

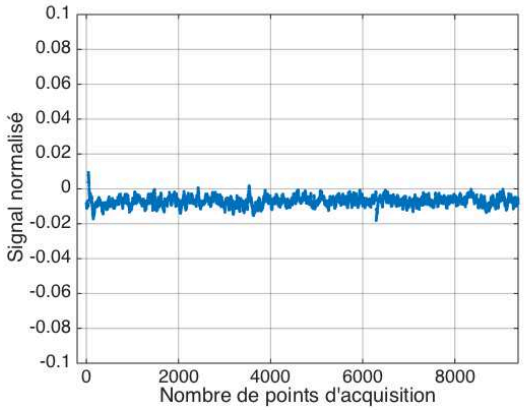
1. Nous avons pris le soin d'acquérir dans un premier temps tous les allers-retours afin de s'assurer que le fait de moyenner les signaux n'avait un effet que sur la réduction du bruit et ne dissimulait pas des disparités sur la réponse à l'échelon. En particulier, le programme d'acquisition sous Labview déclenche tous les allers-retours exactement au même moment par rapport au peigne d'échantillonage.



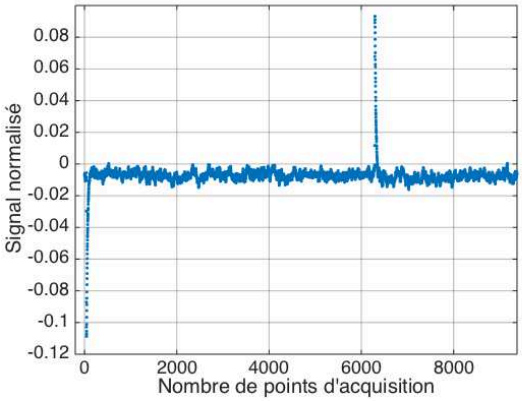
(a) Déplacement dans la direction x - Détection sur la voie X.



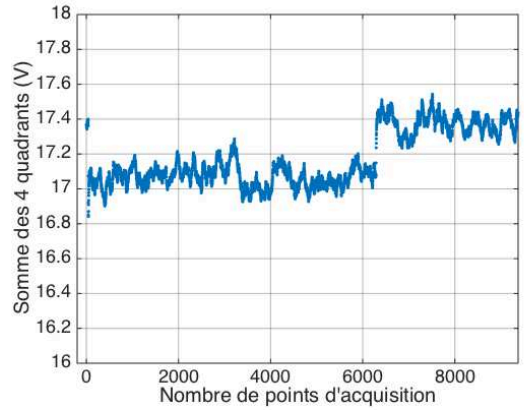
(b) Déplacement dans la direction y - Détection sur la voie X.



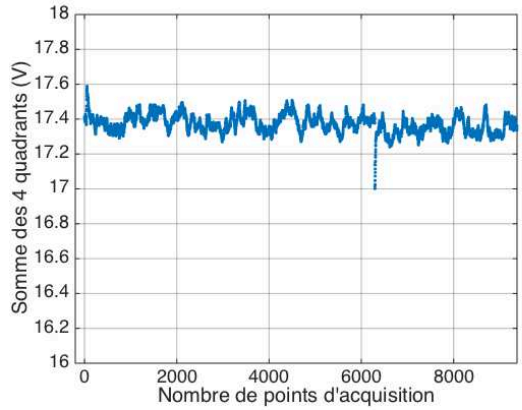
(c) Déplacement dans la direction x - Détection sur la voie Y.



(d) Déplacement dans la direction y - Détection sur la voie Y.



(e) Déplacement dans la direction x - Signal somme des quatre quadrants.



(f) Déplacement dans la direction y - Signal somme des quatre quadrants.

FIGURE 4.1 – Signaux enregistrés lors de l'application d'un échelon de position faisant un aller-retour de 100 nm dans la direction x (4.1a, 4.1c et 4.1e) puis dans la direction y (4.1b, 4.1d et 4.1f) pour une puissance de 230 mW en entrée de l'objectif.

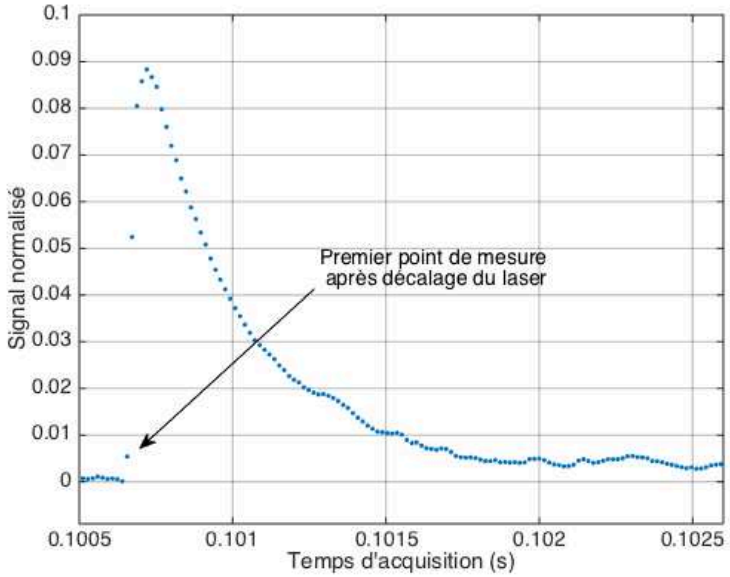


FIGURE 4.2 – Agrandissement du deuxième pic de la figure 4.1a en convertissant le nombre de points en temps d'acquisition. La flèche indique le premier point de mesure où le laser a été décalé de 100 nm.

4.1.1.2 Traitement d'une réponse à un échelon de position

La figure 4.2 présente un signal typique à traiter par la méthode de la réponse à un échelon de position. Il s'agit du deuxième pic de la figure 4.1a où l'échelle des abscisses a été convertie en temps d'acquisition. On retrouve une décroissance exponentielle de temps caractéristique t_b et d'amplitude X_0, les deux paramètres permettant de calibrer entièrement le dispositif de pince optique. En effet, comme indiqué dans la partie 1.4.3, le temps t_b permet de déduire la constante de raideur du piège d'après la relation :

$$k = \frac{\gamma}{t_b} \tag{4.1}$$

avec γ le coefficient de friction du milieu, tandis que l'amplitude X_0 permet de calibrer le détecteur en déterminant le facteur de conversion entre l'unité du détecteur et l'unité métrique. En effet, X_0, exprimée en $\Delta V/V$, i.e. en unité du détecteur normalisée, correspond à la distance d_0 entre les deux positions du piège. Cette distance d_0 étant connue en nm, il est facile de convertir les $\Delta V/V$ en nm.

Pour calibrer le montage de pince optique à partir de la réponse de la bille au déplacement du piège, il est nécessaire d'ajuster les courbes expérimentales. D'après [Le Gall 2010], la réponse à un échelon de position acquise par une photodiode, utilisée en limite de sensibilité spectrale, est donnée par la formule :

$$f_{th}(t) = X_0 \alpha e^{-t/t_b} + X_0(1-\alpha)\frac{t_b}{t_b - t_d}\left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d}\right) \tag{4.2}$$

avec α la fraction de porteurs de charge créés dans la zone de déplétion et donc engendrant une réponse de la diode dite "instantanée" et $(1-\alpha)$ la fraction des porteurs de charge créés

dans la couche n (du fait de la transparence du silicium à 1069 nm) qui accusent un retard t_d par rapport à la réponse instantanée. Dans la suite de cette partie, la fonction d'ajustement sera clairement redéfinie à partir de plusieurs conditions expérimentales :

- la proportion de signal instantané et de signal retardé dans le signal de la réponse de la bille,
- l'instant précis où le piège est déplacé,
- la position absolue du piège détectée par la photodiode à quatre quadrants.

Ces différents paramètres sont étudiés un à un dans la suite, conduisant à la procédure d'ajustement des courbes expérimentales, qui sera également présentée.

Proportion de signal instantané et de signal retardé dans le signal de la réponse de la bille Dans la fonction d'ajustement 4.2, le paramètre α représente la proportion de porteurs de charge participant à la réponse instantanée du détecteur et donc au signal instantané de la réponse de la bille. Or ce paramètre n'est a priori pas connu. Ceci est assez problématique car dans cette fonction, les paramètres X_0 et α ne sont pas complètement découplés, ce qui conduit à une indétermination numérique.

De plus, bien que le détecteur utilisé sur ce montage soit identique à celui utilisé précédemment, une observation des courbes expérimentales indique que l'estimation de α à 40% publiée dans [Le Gall 2010], n'est pas valable ici. En effet, à l'instant $t = 0$, d'après la fonction 4.2, $f_{th}(t = 0) = X_0\alpha$. D'après la figure 4.2, si on approxime le temps initial au premier point après le décalage du piège, on a $X_0\alpha \approx 0.005$. Avec $X_0 \approx 0.1$, on en déduit $\alpha \approx 5\%$. Et ceci est une estimation haute !

Une étude approfondie a alors été menée afin de déterminer la pertinence du paramètre α dans nos conditions expérimentales. Elle compare la fiabilité des résultats d'ajustement de deux fonctions l'une tenant compte du paramètre α, i.e. la fonction 4.2 et l'autre considérant que celui-ci est nul :

$$f_{\alpha=0}(t) = X_0 \frac{t_b}{t_b - t_d} \left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d} \right) \tag{4.3}$$

Une attention particulière a été portée sur la détermination des deux paramètres permettant la calibration du montage de pince optique t_b et X_0. Afin de ne pas alourdir le texte, cette étude est rapportée dans l'annexe C et seuls les résultats sont repris ici.

La fonction d'ajustement 4.2 conduit à une estimation peu fiable du paramètre X_0 ce qui induirait une calibration fausse du détecteur. En revanche, la fonction d'ajustement 4.3 qui considère que le paramètre α est nul fournit des résultats très satisfaisants puisque, pour les deux paramètres d'intérêt X_0 et t_b, l'erreur numérique est de seulement quelques pourcents et d'environ 10% pour le retard t_d. Ainsi, dans la suite les courbes expérimentales sont ajustées en considérant que le signal de la réponse de la bille est uniquement dû aux porteurs de charge créés dans la couche n du détecteur, correspondant à un signal retardé de t_d.

Détermination de l'instant où le piège est déplacé L'instant où le piège est déplacé est très important pour une détermination précise de l'amplitude X_0 de l'exponentielle décroissante, et donc sur la calibration du détecteur. Cet instant est différent du moment où l'ordre est envoyé par l'opérateur. En effet, cet ordre est envoyé depuis un programme Labview vers le séquenceur qui ensuite le transmet jusqu'aux DAOs, qui voient leur réseau modifié selon

la fréquence de l'onde acoustique qui se propage en leur sein. Cette modification du réseau se traduit ensuite par un changement de l'angle défléchi en sortie du DAO qui conduit à un déplacement du piège.

Afin de déterminer expérimentalement le temps qui s'écoule entre l'envoi de l'ordre par le séquenceur et le déplacement effectif du piège[2], une photodiode ultra-rapide (dont le temps de réponse est de 1 ns, négligeable par rapport au temps de réponse des DAOs) est placée sur le trajet du faisceau en aval des DAOs. En faisant varier la fréquence acoustique, comme dans le cas d'une acquisition d'échelon de position, le temps de réponse du système est estimé à $\tau_{DAO-x} = 12.6$ µs dans le cas d'un déplacement du piège dans la direction x et $\tau_{DAO-y} = 12.7$ µs dans le cas d'un déplacement dans la direction y.

Ainsi pour l'ajustement de la courbe expérimentale, il faut considérer que le premier point après décalage du piège se trouve non pas à l'instant $t = 0$, mais à $t_0 = T_{éch} - \tau_{DAO}$, qui est légèrement différent selon que le déplacement du piège est effectué dans la direction x ou y, $T_{éch} = 15.3$ µs désignant la période du peigne d'échantillonnage. La fonction d'ajustement s'écrit alors :

$$f(t) = X_0 \frac{t_b}{t_b - t_d} \left(e^{-\frac{t-t_0}{t_b}} - e^{-\frac{t-t_0}{t_d}} \right) \tag{4.4}$$

Prise en compte de la position absolue du laser dans le programme Bien que la photodiode à quatre quadrants ait été positionnée au mieux dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, il reste néanmoins un petit décalage résiduel de la position du spot réfléchi par la bille entre deux positions du laser. Celui-ci est visible par exemple sur le signal de la figure 4.2, qui présente deux niveaux légèrement différents avant et après décalage du piège. Il est important de prendre cela en considération lors de l'ajustement des courbes expérimentales afin que l'exponentielle décroissante atteigne bien 0 à la fin.

Pour cela, le niveau du signal pour chacune des positions du laser est déterminé sur la courbe expérimentale ce qui donne une estimation de ce décalage. Ainsi la courbe d'ajustement 4.4 est finalement remplacée par :

$$f(t) = X_0 \frac{t_b}{t_b - t_d} \left(e^{-\frac{t-t_0}{t_b}} - e^{-\frac{t-t_0}{t_d}} \right) + \varepsilon \left(1 - e^{-(t-t_0)/t_d} \right) \tag{4.5}$$

où ε correspond au décalage absolu du laser[3] .

Le programme d'ajustement Cette partie sur le traitement de la réponse de la bille à un échelon de position du piège se termine par un récapitulatif des différentes étapes du programme qui permet d'ajuster les courbes expérimentales de façon totalement automatique selon l'expression 4.5.

1. Calcul du temps initial t_0 pour chaque direction du déplacement du piège.
2. Décalage des données en ordonnée afin que le signal avant déplacement du piège soit en moyenne à zéro.

2. Le séquenceur pilote de façon synchronisée l'ordre envoyé au DAO et le déclenchement de l'acquisition par la carte National Instrument.

3. Pour obtenir cette équation, nous considérons un décalage absolu ε qui est convolué par la réponse de la diode puis nous prenons le cas où $\alpha = 0$.

3. Estimation des valeurs initiales de t_b et X_0 à partir d'un ajustement exponentiel sur des données restreintes à partir du maximum du pic et sur une plage de 125 points [4].
4. Restriction des données pour l'ajustement sur une plage de $6 * t_b$ pour éviter d'inclure trop de bruit.
5. Estimation du décalage ε entre les deux niveaux sur les 200 points de mesure après $5 * t_b$.
6. Estimation de la valeur initiale de t_d comme coefficient directeur de la droite liant les deux premiers points de mesure (partie montante du signal).
7. Ajustement par la formule suivante tenant compte des remarques faites dans les paragraphes précédents :

$$f(t) = A' \left(e^{-\frac{t-t_0}{t_b}} - e^{-\frac{t-t_0}{t_b}} \right) + \varepsilon \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{t_b}} \right) \quad \text{avec} \quad \mathrm{A'} = \mathrm{X_0} \frac{\mathrm{t_b}}{\mathrm{t_b} - \mathrm{t_d}} \tag{4.6}$$

4.1.2 Acquisition et traitement du mouvement brownien

4.1.2.1 Acquisition d'un mouvement brownien

L'acquisition et le traitement du mouvement brownien est une autre façon de calibrer le montage. Pour cela, juste après l'acquisition de la réponse à un échelon de position, le mouvement de la bille à l'intérieur du piège est acquis pendant 8 s à la cadence de 65,536 kHz [5] à la même hauteur et à la même puissance que pour la réponse à un échelon de position. Comme précédemment, le signal détecté par la photodiode est traité de façon à connaître les variations de position de la bille sur les voies X et Y au cours du temps. Le signal traité est également normalisé par la somme de tous les quadrants afin de nous affranchir des petites fluctuations de puissance laser. Le signal est donc exprimé en $\Delta V/V$. Sur la figure 4.3, un signal typique de mouvement brownien en XY au cours du temps est représenté.

Dans la suite, je vais décrire la mise en forme des données et le traitement par trois méthodes de calibration basées sur le mouvement brownien : l'analyse de la densité spectrale de puissance, l'inférence bayésienne et le théorème de l'équipartition, qui ont été présentées dans la section 1.4.2.

4.1.2.2 Traitement par analyse de la densité spectrale de puissance

Comme expliqué dans la partie 1.4.2.1, l'analyse de la densité spectrale de puissance du mouvement brownien de la bille piégée permet de totalement calibrer le dispositif de pince optique. Ces deux points sont développés dans la suite en appliquant la théorie aux données expérimentales. Pour finir, je reviendrai sur un point qui sera utilisé dans la section suivante sur la calibration : le lien entre la variance et la densité spectrale de puissance du mouvement brownien de la bille.

4. Une fonction exponentielle voit son amplitude réduite de 99,5% pour un temps correspondant à 5,2 fois son temps caractéristique. Nous avons donc choisi de considérer nos données sur un temps de $5 * t_{b-max}$ quelle que soit la puissance laser utilisée avec $t_{b-max} = 400\mu s$.

5. Cette fréquence a été choisie de façon à être une puissance de 2 (2^{16}) pour être compatible avec un calcul de FFT dans le cas de l'analyse de la densité spectrale de puissance.

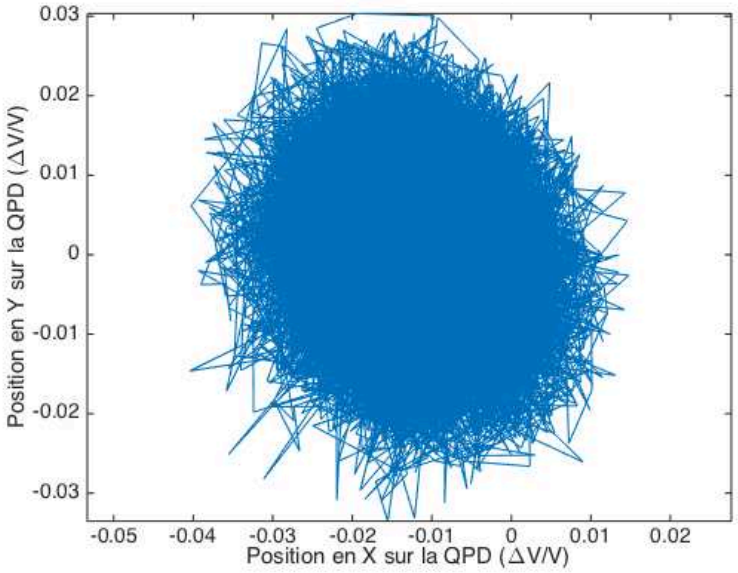


FIGURE 4.3 – Mouvement brownien de la bille à l'intérieur du piège reconstitué à partir du signal acquis par la photodiode quatre quadrants en ne prenant qu'un point sur dix (puissance laser 230 mW).

Calibration de la constante de raideur du piège L'ajustement du spectre de puissance par une fonction lorentzienne permet de déterminer la fréquence de coupure du piège et donc la constante de raideur du piège k, comme le rappelle l'expression :

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \quad \text{avec} \quad f_c = \frac{k}{2\pi\gamma} \tag{4.7}$$

où D est le coefficient de diffusion et γ le coefficient de friction.

Les courbes expérimentales sont ajustées grâce au programme publié par l'équipe de Berg-Sorensen [Hansen 2006]. Le signal traité est directement le signal brut normalisé en $\Delta V/V$. La figure 4.4 représente la densité spectrale de puissance sur la voie X calculée à partir du mouvement brownien de la figure 4.3. Le spectre a bien une allure d'une lorentzienne comme le prédit la théorie, à la réponse temporelle de la photodiode à quatre quadrants près. Cependant ce spectre n'est pas constant pour les faibles fréquences ce qui indique la présence d'un bruit basse fréquence, probablement d'origine mécanique, acoustique et thermique. Afin de pouvoir déterminer le plus précisément possible la fréquence de coupure f_c, l'ajustement lorentzien n'est effectué que sur les fréquences supérieures à 200 Hz. De plus, en accord avec les résultats obtenus sur l'ajustement de l'échelon de position, un filtre passe-bas d'ordre 1 pour la photodiode a été retenu ($\alpha = 0$, fréquence de coupure $1/2\pi t_d$). Sur la figure, un très bon accord est observé entre le spectre et l'ajustement [6].

En pratique, la plage d'ajustement est réduite de 200 à 5000 Hz (au lieu d'aller jusqu'à 32 768 Hz, la moitié de la fréquence d'échentillonnage) afin de s'affranchir de considérer un

6. En faisant varier le nombre de points par bloc dans le programme de traitement, nous avons obtenu une asymptote à partir de 3000 points, c'est donc le paramètre que nous avons retenu pour ajuster les courbes.

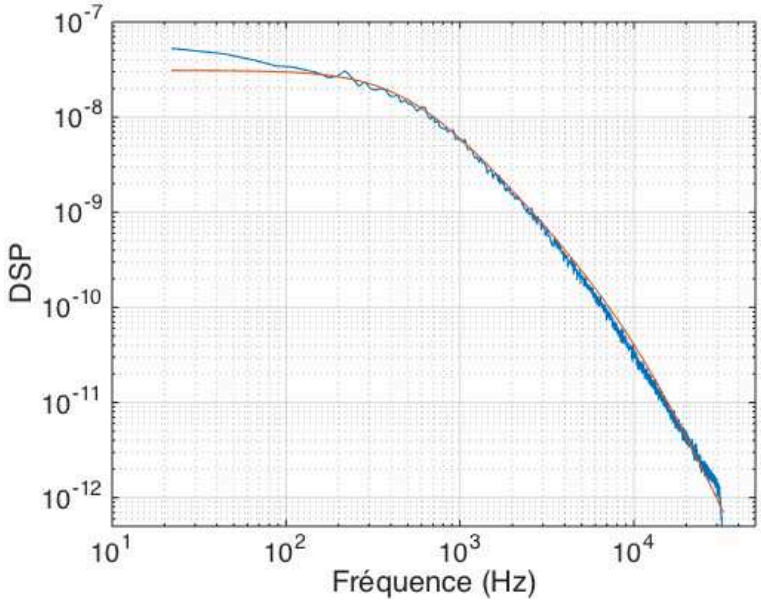


FIGURE 4.4 – Densité spectrale de puissance sur la voie X pour une puissance laser de 230 mW en entrée du microscope. L'ajustement est fait pour les fréquences supérieures à 200 Hz fournissant une fréquence de coupure de 490 Hz pour le piège et une fréquence de coupure de la photodiode de $1/2\pi t_d = 10.5$ kHz.

filtre passe-bas pour le détecteur (sa fréquence de coupure étant supérieure à 5 kHz) et limiter les erreurs sur le paramètre d'intérêt f_c.

Calibration du détecteur L'ajustement du spectre de puissance permet également de calibrer le détecteur grâce à l'ordonnée à l'origine du spectre. En effet, pour une fréquence nulle, la puissance est directement relié au coefficient de diffusion, grâce à la fréquence de coupure f_c, selon l'expression :

$$D = P(f = 0) * f_c^2 * 2\ \pi^2 \tag{4.8}$$

Ce coefficient de diffusion est alors exprimé en $\left(\frac{\Delta V}{V}\right)^2 / s$. D'autre part, il peut également être calculé en $\mu m^2/s$ par la relation d'Einstein :

$$D_{Einstein} = \frac{k_B T}{\gamma} \tag{4.9}$$

où T est la température locale et γ le coefficient de friction. En faisant le rapport des deux, il est possible de déduire le coefficient de conversion Γ entre l'unité du détecteur et l'unité métrique :

$$\Gamma = \sqrt{D_{Einstein}/D} \tag{4.10}$$

qui s'exprime donc en $\mu m/\frac{\Delta V}{V}$.

En pratique, cette méthode de calibration n'est pas très précise car elle est déterminée par l'ordonnée à l'origine d'un ajustement donné en échelle logarithmique. C'est pourquoi, nous

avons privilégié l'utilisation de la réponse à un échelon de position pour calibration le détecteur. Néanmoins, nous avons vérifié que les valeurs trouvées étaient du même ordre de grandeur.

Lien entre variance et densité spectrale de puissance du mouvement brownien Il est intéressant de remarquer que l'intégrale de la densité spectrale de puissance est liée à la variance du mouvement brownien par le théorème de Wiener-Khintchine :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} P(f)df = \langle x^2 \rangle \tag{4.11}$$

Cette propriété sera utilisée dans les parties 4.3.2 et 4.3.3 pour comparer les résultats obtenus par analyse de la densité spectrale de puissance à ceux déduits du théorème de l'équipartition, dont l'application est décrite dans la partie suivante.

4.1.2.3 Traitement par application du théorème de l'équipartition

Les données de mouvement brownien ont également été traitées par le théorème de l'équipartition. En calculant la variance de la trajectoire, à partir de la température locale, il est facile d'en déduire la constante de raideur du piège dans la direction considérée par conservation de l'énergie (cf. partie 1.4.2.2) :

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle x^2 \rangle \tag{4.12}$$

Pour obtenir un résultat en pN/nm, il est nécessaire que les données soient exprimées en unité métrique. Pour cela, le facteur de conversion obtenu par la méthode de la réponse à un échelon de position est utilisé. Il serait aussi possible d'enregistrer la trajectoire du mouvement brownien de la bille directement sur la caméra d'imagerie de l'échantillon se situant à la sortie du microscope. Cependant, la caméra utilisée sur notre montage a une faible dynamique. De plus, celle-ci permet de suivre le mouvement absolu de la bille et non relatif par rapport au piège, donnant lieu à une forte sensibilité aux dérives. Ainsi, cela ne permet pas une estimation fiable de la constante de raideur.

Enfin, sur le spectre de la figure 4.4, nous avons vu que du bruit basse fréquence entachait la trajectoire du mouvement brownien. Cela va directement se répercuter sur la variance de celui-ci qui va être sur-estimée et donc conduire à une sous-estimation de la constante de raideur. Ceci peut également se voir grâce à la relation 4.11. En effet, celle-ci relie la variance du mouvement brownien à l'aire sous le spectre de puissance. La présence de bruit rajoutant une aire par rapport à l'ajustement lorentzien, on comprend bien que la variance sera nécessairement sur-estimée. Cela sera confirmé dans les parties 4.3.2 et 4.3.3 de la section suivante.

4.1.2.4 Traitement par inférence bayésienne

Comme expliqué dans la section 1.4.2.3, à partir d'une trajectoire complète de la bille dans le piège, la méthode d'inférence bayésienne donne le potentiel (et donc les raideurs k_x et k_y) et le coefficient de diffusion les plus probables pour conduire à cette trajectoire.

Le traitement par inférence bayésienne a été réalisé en collaboration avec Antigoni Alexandrou et Maximilian Richly du Laboratoire d'Optique et Biosciences de l'école Polytechnique. Dans cette partie, je vais commencer par expliquer la nécessité de convertir les données acquises par le détecteur, puis la façon dont la fréquence de coupure de la photodiode à quatre

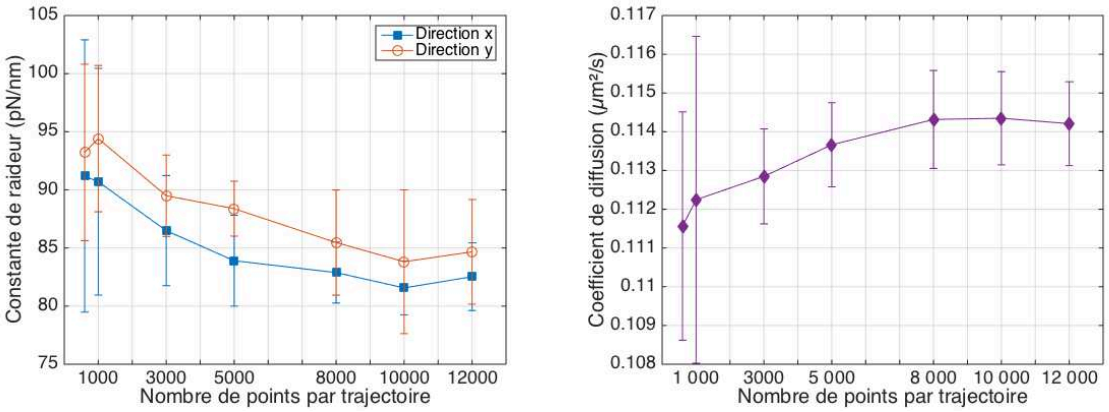
quadrants est prise en compte. Ensuite, le choix du nombre de points par trajectoire à analyser sera discuté, avant de finir sur la correction du biais qui entâche les résultats obtenus par le programme.

Conversion des données de la trajectoire en unité métrique Théoriquement le traitement par inférence bayésienne pourrait se faire directement sur les signaux bruts normalisés, donc exprimés $\Delta V/V$ au cours du temps. Le programme fournirait alors des raideurs en $pN/\frac{\Delta V}{V}$ et un coefficient de diffusion en $\left(\frac{\Delta V}{V}\right)^2/s$. En déterminant le coefficient de diffusion par la relation d'Einstein comme précédemment (en supposant la viscosité connue), nous pourrions ainsi déduire le facteur de conversion et donc convertir le résultat de raideur en pN/nm. Cependant, nous avons préféré convertir les données en unité métrique avant tout traitement par le programme d'inférence bayésienne, grâce au facteur de conversion obtenu par la réponse à un échelon de position, comme pour l'application du théorème de l'équipartition. Ceci permettra de comparer les mesures selon différentes méthodes. Le point fort du traitement par inférence bayésienne réside dans le fait que cette méthode ne nécessite pas de connaître a priori le rayon de la bille et la viscosité dynamique locale du fluide (et donc la hauteur) pour obtenir un résultat de calibration, à partir du moment où les données sont en unité métrique. Cela permet donc de comparer les résultats obtenus avec la méthode de la réponse à un échelon de position ou de l'analyse de la densité spectrale de puissance qui dépendent elles directement de la connaissance de ces paramètres au travers du coefficient de friction de l'eau γ.

Prise en compte de la réponse temporelle de la photodiode Le traitement par inférence bayésienne suppose que les points de mesure de position de la bille sont indépendants. Or la photodiode a une réponse temporelle dont la fréquence de coupure est d'environ 6 kHz d'après la mesure par la réponse à un échelon de position. Le signal étant échantillonné à la fréquence de 65.536 kHz, on ne retient qu'un point sur dix de la trajectoire totale du mouvement brownien pour tenir compte de la réponse temporelle de la photodiode à quatre quadrants.

Nombre de points par trajectoire Le programme infère le potentiel du piège à partir d'une trajectoire de la bille formée de N points. Il faut donc choisir ce nombre de points N par trajectoire à analyser. Pour cela, une acquisition de 8 s, comportant au total 524 288 points, est convertie en unité métrique grâce à la conversion obtenue par la méthode de la réponse à un échelon de position. Elle est ensuite découpée en plusieurs trajectoires indépendantes dont on peut choisir le nombre de points. Chaque trajectoire est ensuite analysée grâce au programme. La figure 4.5 présente les résultats pour la constante de raideur et pour le coefficient de diffusion en fonction du nombre de points par trajectoire. Chaque point correspond à la moyenne des résultats obtenus pour plusieurs trajectoires possédant le même nombre de points, et la barre d'erreur indique à l'écart-type obtenu pour les différentes réalisations. Une asymptote est observée à partir de 8000 points aussi bien pour la constante de raideur que pour le coefficient de diffusion, avec des barres d'erreur du même ordre de grandeur. Nous avons donc choisi de travailler avec des trajectoires de 8000 points permettant de moyenner 6 trajectoires indépendantes. Il est à noter que quel que soit le nombre de points, la durée de la trajectoire est grande par rapport à la période typique du bruit basse fréquence mentionné précédemment. Ce bruit affecte donc toutes nos mesures quelle que soit la durée de la trajectoire choisie et on ne peut

malheureusement pas s'en affranchir en travaillant avec des trajectoires courtes.



(a) Constante de raideur.

(b) Coefficient de diffusion.

FIGURE 4.5 – Evolution de la constante de raideur (a) dans les deux directions x et y et du coefficient de diffusion (b) en fonction du nombre de points par trajectoire. Pour les trajectoires constituées de 500, 1000, 3000 et 5000 points, les valeurs données sont une moyenne des résultats de 10 trajectoires différentes ; pour la valeur à 8000 points par trajectoire 6 résultats ont été moyennés, et pour les valeurs à 10 000 et 12 000 points, 4 trajectoires ont été traitées.

Correction du biais entachant les résultats du programme d'inférence Enfin, comme mentionné dans la partie 1.4.2.3, les résultats obtenus à partir du programme d'inférence peuvent souffrir d'un biais dû à une compensation entre la constante de raideur et le coefficient de diffusion. Il est alors possible de corriger celui-ci grâce à des calculs théoriques effectués à partir de courbes simulées. Ce biais est fonction du facteur de confinement u représentant le rapport entre l'aire explorée par la bille pendant le temps $\Delta t = 152.6$ µs entre deux points de la trajectoire et l'aire globale explorée par la bille pour une trajectoire de N points :

$$u = \frac{D\Delta t}{\pi R_{0,95}^2} \tag{4.13}$$

où $R_{0,95}$ est le rayon d'un domaine circulaire contenant 95% du nombre total de points de la trajectoire.

Les "courbes de biais" ont été réalisées à partir de nos conditions expérimentales et sont représentées sur la figure 4.6. Des trajectoires de 8000 points sont générées à partir de deux paramètres d'entrée : le coefficient de diffusion qui vaut 0.13 µs^2/s et une constante de raideur comprise entre 0.01 et 1 pN/nm. L'intervalle entre deux points est identique à celui pris pour les trajectoires expérimentales i.e. $\Delta t = 152.6$ µs. Pour chaque trajectoire simulée, les valeurs inférées pour la constante de raideur et pour le coefficient de diffusion sont comparées à celles utilisées pour générer la courbe. En moyennant les résultats pour 30 trajectoires générées à partir du même jeu de données d'entrée, le biais peut être estimé. Ce jeu de données est associé à une valeur du facteur de confinement, d'où les courbes de biais en fonction du facteur de confinement.

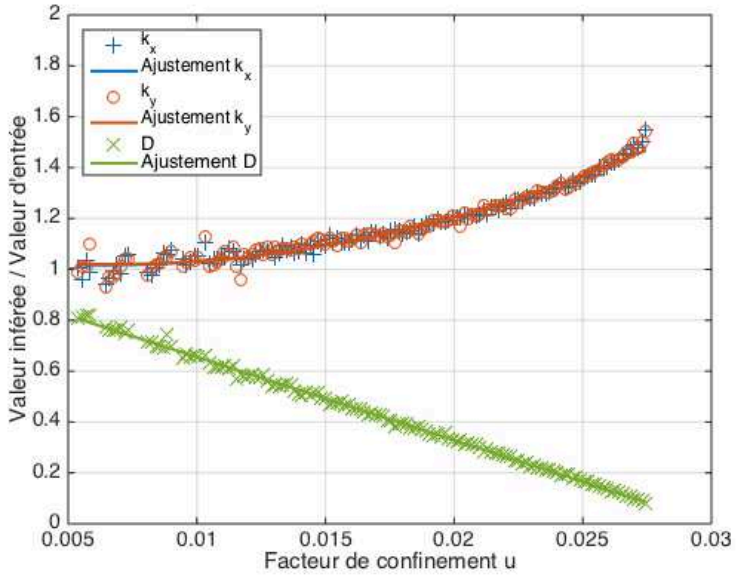


FIGURE 4.6 – Courbes de biais pour la constante de raideur dans les directions x (k_x) et y (k_y) et pour le coefficient de diffusion (D). Chaque courbe a été ajustée par une fonction polynômiale : $1007 * u^2 - 12.64 * u + 1.056$, $1033 * u^2 - 13.63 * u + 1.065$ et $-32.63 * u + 0.9816$ respectivement.

Sur les trajectoires expérimentales, le facteur de confinement est de l'ordre de 0.01, ce qui conduit à un biais relativement faible pour la constante de raideur : la valeur inférée par le programme est surestimée d'environ 3%.

Cependant, nous avons vu sur le spectre précédent (cf. figure 4.4) que le mouvement brownien est entaché d'un bruit basse fréquence. On comprend aisément qu'un bruit parasite modifie la distance entre deux points de mesure par rapport à ce qu'elle aurait dû être, et donc conduit à une sous-estimation de la raideur.

4.1.3 Paramètres expérimentaux

Au travers de ces quatre méthodes de calibration trois paramètres expérimentaux apparaissent : la température locale, le rayon de la bille et la hauteur de piégeage. En effet, tous ces paramètres influencent la valeur du coefficient de friction de l'eau qui s'exprime grâce à la loi de Stokes :

$$\gamma = 6\pi\eta(T, h)R \tag{4.14}$$

où η est la viscosité dynamique de l'eau, et R le rayon de la bille, T la température locale de l'eau et enfin h la hauteur du centre de la bille. Au vu de leur importance pour la calibration de la constante de raideur, il est important de les déterminer expérimentalement avec une bonne précision.

4.1.3.1 Température

La température locale est un des paramètres importants puisqu'il intervient dans chacune des méthodes. En effet, dans le cas du théorème de l'équipartition, la constante de raideur est directement proportionnelle à la température. D'autre part, la température locale intervient aussi dans le programme d'inférence bayésienne, la réponse à un échelon de position et l'analyse de la densité spectrale de puissance au travers de la viscosité dynamique, qui est un paramètre qui dépend de la température comme l'illustre la figure 4.7.

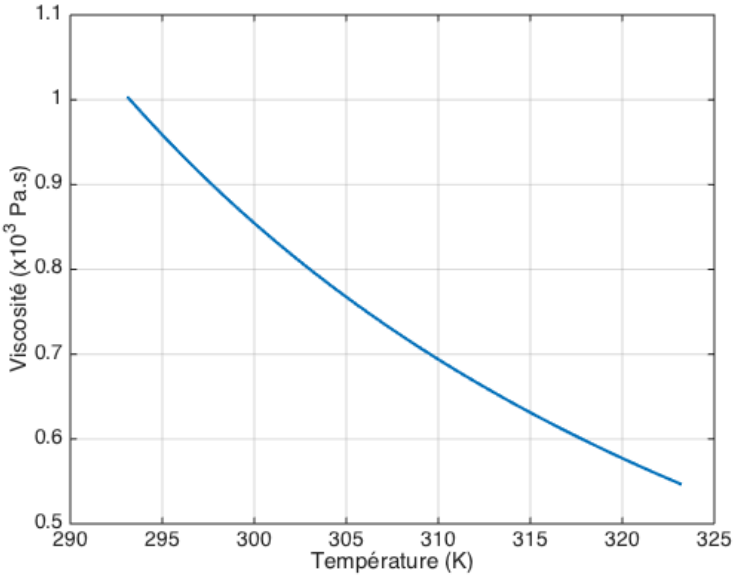


FIGURE 4.7 – Evolution de la viscosité dynamique de l'eau en fonction de la température d'après [Peterman 2003].

L'importance de ce paramètre nous a amenés le mesurer expérimentalement en fonction de la puissance du laser. Pour cela, un micro-thermocouple est inséré dans la chambre microfluidique et placé au plus près d'une bille piégée (à quelques dizaines de micromètres de distance). Les mesures de la température en fonction de la puissance laser sont présentées sur la figure 4.8. La température mesurée est proportionnelle à la puissance du laser. Elle augmente de seulement de 2°C entre les puissances extrémales. Cela correspond à une variation relative de viscosité inférieure à 5%. Cette mesure a également montré que l'équilibre thermique est atteint très rapidement (moins de 2 min), ce qui permet de considérer la température comme constante dans toutes les expériences. Ces résultats sont en accord avec la littérature [Peterman 2003].

Pour chaque méthode de calibration, la température locale correspondant à la puissance laser utilisée sera prise en compte.

4.1.3.2 Rayon de la bille

Le rayon de la bille intervient directement dans la relation de Stokes. Il importe donc de le connaître précisément dans le cas d'une calibration de la raideur par la méthode de la réponse

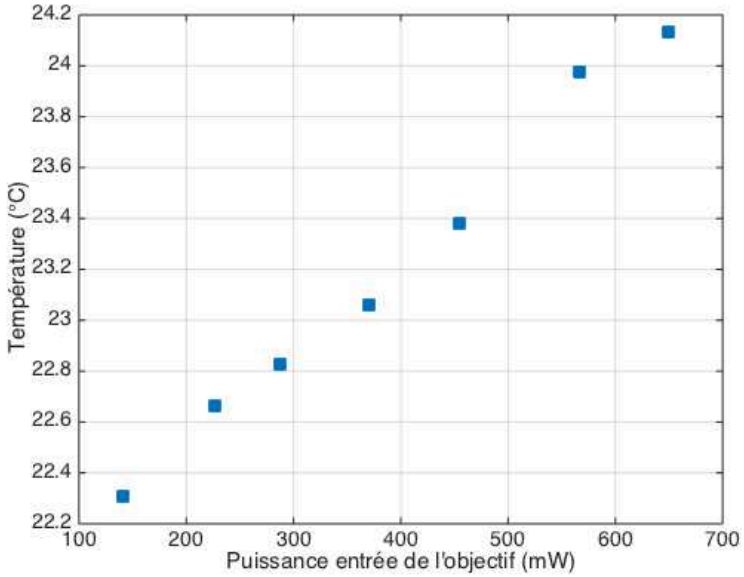


FIGURE 4.8 – Température locale de l'eau dans la chambre microfluidique mesurée au plus près de la bille piégée, en fonction de la puissance du piège.

à un échelon de position ou par l'analyse de la densité spectrale de puissance. Le constructeur annonce un diamètre de $3,00 \pm 0.07$ µm. Pour vérifier cette donnée, une mesure par diffusion dynamique de la lumière a été réalisée au Laboratoire d'Optique et Biosciences. Le diamètre moyen mesuré vaut 2.9 ± 0.2 µm avec une dispersion autour d'une seule et même valeur moyenne. Nous en avons conclu que la valeur du constructeur était fiable et que la solution était bien mono-disperse. La valeur du constructeur sera donc conservée dans les calculs de la viscosité.

4.1.3.3 Hauteur du centre de la bille

La hauteur de piégeage est un paramètre qui intervient lors de la calibration de la constante de raideur du piège par la réponse à un échelon de position ou par l'analyse de la densité spectrale de puissance, via la viscosité locale (cf. expressions 4.1 et 4.7). Cette hauteur est d'autant plus importante à déterminer que la bille est piégée proche de la lamelle de microscope. En effet, d'après la loi de Faxen (cf. figure 1.30), la viscosité dépend très fortement de la hauteur du centre de la bille tant que celle-ci reste inférieure à quelques fois le rayon de la bille.

Dans le chapitre 3, nous avons vu qu'un ajustement des profils radiaux issus des figures d'interférence du signal détecté permettait de déterminer précisément la distance entre la lamelle de microscope et le bas de la bille, e. Pour obtenir la hauteur du centre de la bille h, il suffit donc d'ajouter le rayon R de la bille à cette mesure : $h = e + R$ (cf. figure 4.9). Ainsi, lors de la calibration, une image de la figure d'interférence est systématiquement acquise pour permettre de connaître la hauteur.

Ainsi dans cette première section, nous avons vu comment les signaux sont acquis, mis en

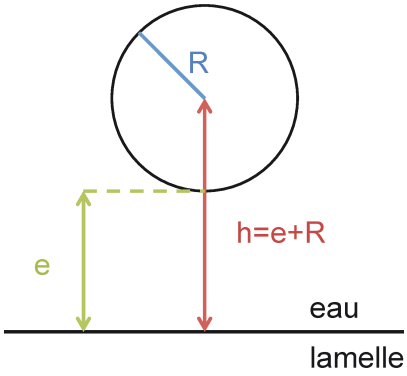


FIGURE 4.9 – Hauteur de piégeage de la bille. e est la distance entre la lamelle et le bas de la bille et R le rayon de la bille,.De fait la hauteur du centre de la bille vaut $h = e + R$. La distance e est déterminée grâce à l'ajustement des interférogrammes.

forme et exploités pour calibrer le montage de pince optique par quatre méthodes différentes : la réponse à un échelon de position, l'analyse de la densité spectrale de puissance, l'application du théorème de l'équipartition et l'inférence bayésienne. Dans les deux sections suivantes, ces méthodes sont mises en œuvre afin de calibrer le montage de pince optique, i.e. le détecteur et la constante de raideur du piège.

4.2 Mesure de la sensibilité du détecteur

Comme nous l'avons dit précédemment, la calibration du détecteur revient à déterminer le facteur de conversion entre la mesure de la position de la bille par la photodiode à quatre quadrants, exprimée en $\Delta V/V$, et la position effective de la bille par rapport au piège, donnée en unité métrique.

Cette partie est directement reliée à la section 3.3 du chapitre précédent consacrée à la modélisation de la sensibilité du détecteur. Je vais d'abord comparer les courbes de sensibilité du détecteur pour un objectif avec et sans anneau de phase. En effet, nous possédons deux objectifs présentant les mêmes caractéristiques géométriques, la seule différence étant que l'un possède un anneau de phase intégré (l'objectif à contraste de phase) et l'autre pas (objectif classique). Je présenterai ensuite l'évolution de la mesure de la position de la bille en fonction de la hauteur, pour un déplacement donné de la bille par rapport au piège, en comparant toujours les mesures pour les deux objectifs. Ces résultats sont conformes aux prédictions théoriques : l'anneau de phase engendre des artefacts de mesure de la position de la bille. Ceci a conduit à reconsidérer le montage pour permettre l'imagerie des cellules sans impliquer de perturbations sur la détection des signaux. Cette adaptation sera décrite à la fin de cette partie. Avant de présenter tout cela, un petit point de méthodologie est décrit très rapidement.

4.2.1 Méthodologie : réponse de la bille à un déplacement rapide du piège

Pour étudier la réponse de la photodiode à quatre quadrants à un déplacement de la bille par rapport au centre du piège, la réponse à un échelon de position est utilisée. En effet, cette

méthode fournit l'amplitude du signal X_0 en $\Delta V/V$ à l'instant initial i.e. au moment où le piège a été déplacé d'une distance d_0 connue par l'expérimentateur (section 4.1.1.2). Ainsi, la courbe de sensibilité du détecteur est décrite par la fonction $X_0 = f(d_0)$. Pour de petits déplacements (typiquement inférieurs à 200 nm), cette fonction est linéaire. Sa pente à l'origine détermine la sensibilité du détecteur, soit le facteur de conversion entre l'unité du détecteur et l'unité métrique.

Lors de l'acquisition, le piège part d'une position initiale et se déplace d'une distance d_0, puis revient à sa position d'origine. Donc pour chaque acquisition on obtient deux signaux, correspondant à un déplacement du piège de $+d_0$ et de $-d_0$ fournissant ainsi la valeur X_0 pour ces deux distances opposées (voir figure 4.1).

Pour tous les résultats présentés sur la calibration du détecteur, chaque point de mesure indiqué sur les figures correspond à la moyenne de trois acquisitions différentes pour un même déplacement d_0 et l'écart-type entre les résultats fournit les barres d'erreur.

4.2.2 Courbes de sensibilité du détecteur

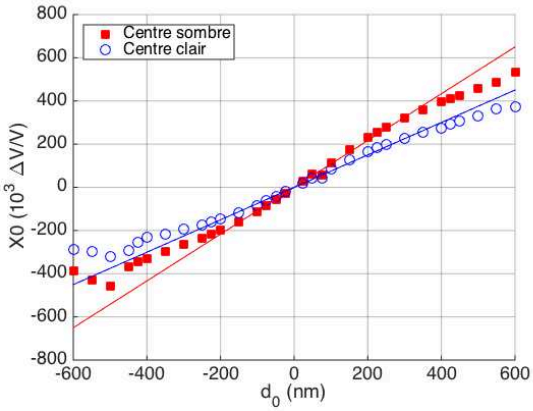
La sensibilité du détecteur correspond théoriquement au facteur de proportionnalité entre la mesure de la position de la bille, d'après le signal détecté par la photodiode à quatre quadrants, et le décalage réel de la bille par rapport au centre du piège. Théoriquement, pour un faisceau gaussien en absence d'interférences, la réponse du détecteur à un déplacement de la bille est une fonction d'erreur (cf. figure 3.8c et expression 3.14). Ainsi, on peut délimiter un intervalle de déplacements où la réponse du détecteur est linéaire, i.e. où la position mesurée est bien proportionnelle au décalage réel de la bille.

Rappel des prédictions du modèle Dans la partie 3.3.2, nous avons vu que d'après les prédictions, la réponse du détecteur a bien une allure de fonction d'erreur, mais que la sensibilité (donc la partie linéaire de la courbe) dépend de la hauteur de la bille (cf. figure 3.15). Cette dépendance avec la hauteur est beaucoup plus importante avec anneau de phase. Dans cette partie, il s'agit de vérifier expérimentalement si la présence de l'anneau de phase représente vraiment un problème sur la réponse du détecteur.

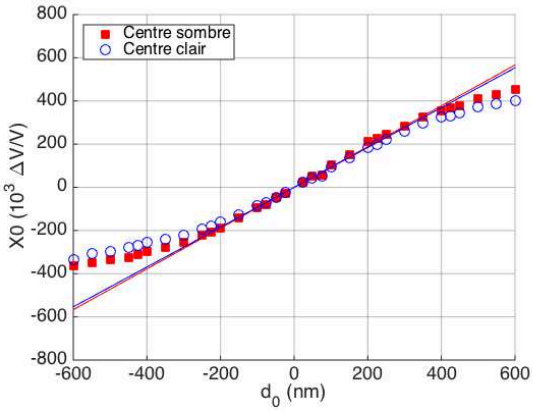
Résultats expérimentaux La figure 4.10 présente les différentes courbes de sensibilité dans les directions x (a et b) et y (c et d), pour un objectif avec (a et c) ou sans anneau de phase (b et d), et pour un déplacement du piège d_0 variant de 24 nm à 600 nm [7]. Dans chaque cas, la position mesurée par la photodiode à quatre quadrants X_0 a été évaluée pour deux hauteurs voisines correspondant aux ordres d'interférence $p = 3$ et 3.5 [8], et donc présentant respectivement un centre sombre ou un centre clair. Cela permet de déterminer expérimentalement l'impact de l'allure de la figure d'interférence. Ces résultats sont à mettre en regard de ceux obtenus à partir du modèle sur la figure 3.15, bien que dans le modèle les hauteurs correspondaient aux ordres d'interférence $p = 9$ et 9.5.

7. Pour mémoire, le rayon ("waist") du faisceau focalisé est de 500 nm dans la direction x et 435 dans la direction y

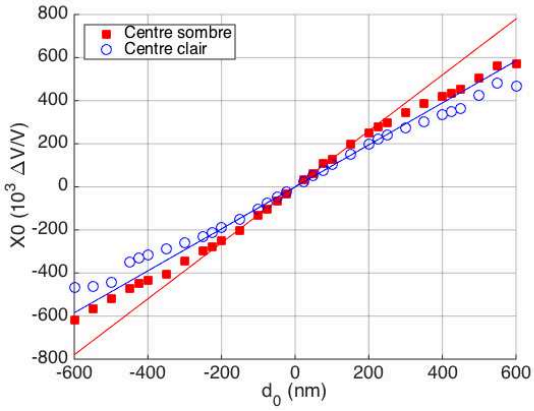
8. Il existe une dérive en z qui peut être plus ou moins importante selon l'équilibre établi entre l'huile d'immersion et la lamelle de microscope. Typiquement en laissant évoluer le système librement on passe d'un centre noir à un centre clair ($\Delta z = 200nm$) en 5 minutes.



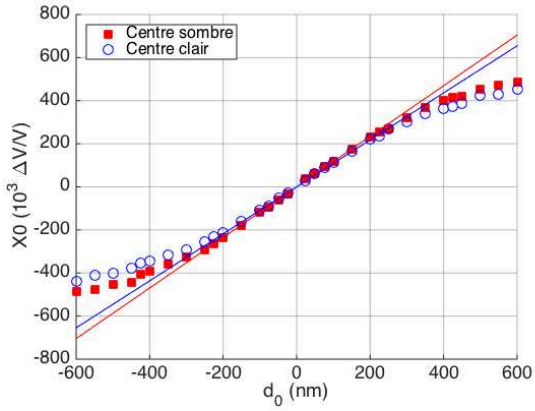
(a) Avec anneau - Déplacement en x.
Sensibilités : 1.08 μm^{-1} (sombre), 0.751 μm^{-1} (clair).



(b) Sans anneau - Déplacement en x.
Sensibilités : 0.945 μm^{-1} (sombre), 0.923 μm^{-1} (clair).



(c) Avec anneau - Déplacement en y.
Sensibilités : 1.30 μm^{-1} (sombre), 0.975 μm^{-1} (clair).



(d) Sans anneau - Déplacement en y.
Sensibilités : 1.17 μm^{-1} (sombre), 1.09 μm^{-1} (clair).

FIGURE 4.10 – Courbes de sensibilité pour un objectif avec (figures (a) et (c)) ou sans anneau de phase (figures (b) et (d)) pour un déplacement de la bille dans deux directions orthogonales x (figures (a) et (b)) et y (figures(c) et (d)). Pour chaque cas, la bille a été piégée pour deux hauteurs distantes d'un demi-interfrange, l'interférogramme présentant ainsi un centre sombre ($h = 3\Delta i + R = 2.7$ µm) ou un centre clair ($h = 3.5\Delta i + R = 2.9$ µm). Ces résultats sont obtenus à partir de la réponse de la bille à un déplacement du piège dans la direction x ou y pour une puissance laser de 227 mW en entrée de l'objectif. Les ajustements linéaires permettant de déterminer la sensibilité sont réalisés sur l'intervalle [-200 ; +200] nm.

Quelle que soit la courbe observée, la réponse du détecteur a bien une allure de fonction d'erreur et présente une zone de linéarité tant que le décalage de la bille par rapport au piège est inférieur à 200 nm. Avec l'objectif classique, les courbes de sensibilité, correspondant aux interférogrammes à centre clair et sombre, sont relativement proches, conduisant à des sensibilités voisines pour les deux hauteurs aussi bien en x qu'en y (cf. figures 4.10b et d). En revanche, avec anneau de phase, l'allure de la figure d'interférence a beaucoup plus d'impact, et ce même pour des déplacements inférieurs à 200 nm (cf. figures 4.10a et c). En effet, l'ajustement linéaire des courbes sur l'intervalle $[-200; +200]$ nm indique que la différence de sensibilité entre les deux hauteurs est de l'ordre de 30 % avec anneau de phase alors qu'elle de seulement quelques pourcents sans anneau de phase aussi bien en x qu'en y[9]. Par ailleurs, on observe que le détecteur présente une sensibilité 20% plus grande dans la direction y (cf. figures 4.10c et d) que la direction x (cf. figures 4.10a et b), quel que soit l'objectif utilisé.

Conclusion Ces résultats expérimentaux sont en accord avec les prédictions du modèle :

- la réponse du détecteur correspond à une fonction erreur, qui est linéaire pour des déplacement inférieurs à 200 nm,
- la sensibilité du détecteur dépend de l'allure de la figure d'interférence, et donc de la hauteur de la bille,
- la présence de l'anneau de phase exacerbe les différences de sensibilité en fonction de la hauteur.

Cette dépendance de la sensibilité avec la hauteur est un véritable problème pour convertir les données acquises avec le détecteur en unité métrique. Dans la partie suivante, nous explorons cet effet sur une plus large gamme de hauteurs.

4.2.3 Calibration en fonction de la hauteur

Le but de cette expérience est de comparer la mesure de la position de la bille pour un même déplacement, sur une large gamme de hauteur (environ 6 µm), avec et sans anneau de phase.

Rappel des prédictions du modèle Dans la partie 3.3.2, le modèle a permis de prédire l'évolution de la position de la bille mesurée à partir du signal détecté pour un même décalage de la bille par rapport au centre de 300 nm, en fonction de la hauteur (cf. figure 3.16). On observait alors que sans anneau de phase, la position de la bille oscillait entre deux valeurs proches (écart de l'ordre de 10% par rapport à la valeur moyenne) avec une période d'un interfrange. Avec anneau de phase, la valeur calculée oscillait également mais entre des valeurs beaucoup plus éloignées (écart maximal d'environ 30% pour l'ordre d'interférence $p = 5$), l'amplitude de ces oscillations variant avec la hauteur : elles est maximale pour l'ordre d'interférence $p = 5$ et s'annule pratiquement entre les ordres 12 et 13.

9. On peut aussi remarquer que les valeurs des sensibilités dans le cas de l'objectif classique sont à peu près égales à la moyenne de celles obtenues avec l'objectif à contraste de phase pour un centre sombre et un centre clair.

Résultats expérimentaux Pour étudier la variation de la sensibilité en fonction de la hauteur, et donc de l'allure de l'interférogramme, nous avons fait varier la hauteur pour un déplacement d_0 donné de 300 nm dans la direction x. Cette distance a été choisie afin de visualiser clairement les effets de l'anneau de phase. La hauteur varie sur plus de 15 ordres d'interférence, avec une mesure pour chaque ordre entier (centre sombre) et demi-entier (centre clair), soit tous les 200 nm. En effet, il est difficile à partir de l'observation à l'œil de la figure d'interférence de faire une discrétisation plus fine. La hauteur la plus faible accessible sans risquer de coller la bille à la lamelle correspond au premier ordre d'interférence entier, soit une hauteur $h = \Delta i + R = 1.9$ µm. La dernière hauteur correspond à l'ordre d'interférence 15.5, soit $h = 15.5\Delta i + R = 7.7$ µm. Les mesures ont d'abord été faites avec l'objectif avec anneau de phase puis sans anneau de phase et sont présentées sur la figure 4.11.

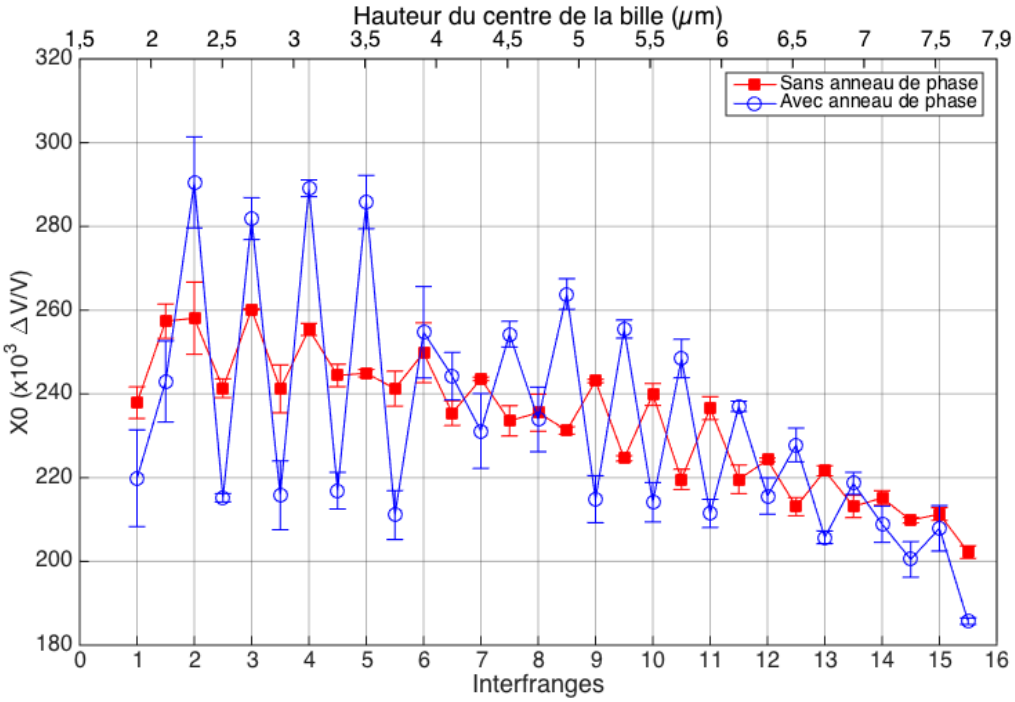


FIGURE 4.11 – Mesure de l'amplitude X_0 de la réponse de la bille à un déplacement donné du piège de 300 nm en fonction de la hauteur, pour l'objectif classique et l'objectif à contraste de phase. La hauteur est incrémentée d'un demi-interfrange soit de 200 nm entre chaque mesure passant ainsi d'un centre sombre à un centre clair, à partir du premier ordre d'interférence entier (i.e. $h = \Delta i + R = 1.9$ µm) jusqu'à l'ordre d'interférence demi-entier 15.5 (i.e. $h = 15.5\Delta i + R = 7.7$ µm).

La réponse du détecteur dépend de la hauteur et on observe bien des oscillations. Ces oscillations sont bien plus importantes en présence de l'anneau de phase : elles forment un écart d'environ 30% pic à pic, contre seulement 8% sans anneau de phase. D'autre part, l'amplitude des oscillations avec anneau de phase est maximale pour les ordres d'interférence allant de 2 à 5.5 et présente une quasi annulation pour les ordres allant de 7.5 à 8.5 et autour de 14. Sans anneau de phase, l'amplitude des oscillations est moindre mais présente aussi des quasi

annulations autour des ordres 5, 8 et 14. Ces résultats sont proches de ceux obtenus à partir du modèle (cf. figure 3.16), bien qu'il y ait quelques différences sur la présence et la position des battements [10].

Enfin, on observe que globalement le signal mesuré sur la photodiode à quatre quadrants pour un déplacement fixe diminue avec la hauteur de la bille. Ceci a été attribué à une différence d'intensité qui revient sur le détecteur, mais n'a pas vraiment été étudié sachant que les hauteurs pour lesquelles ce phénomène se produit sont supérieures à l'épaisseur d'une cellule (4 µm).

Conclusion Les résultats expérimentaux sont en accord avec les prédictions du modèle :

- la sensibilité du détecteur varie "localement" avec la hauteur de piégeage : une augmentation de la hauteur de seulement 200 nm induit une mesure de la position de la bille relativement différente,
- cette variation est exacerbée par la présence de l'anneau de phase,
- les mesures avec anneau de phase présentent jusqu'à un écart de 30% pic à pic en fonction de la hauteur, ce qui est beaucoup trop important pour faire des mesures précises,
- les mesures sans anneau de phase présentent un écart de l'ordre de 8% pic à pic, ce qui est nettement plus faible et acceptable au vu des incertitudes de mesures liées aux expériences sur les cellules.

4.2.4 Conclusion sur le montage combinant pince optique et imagerie à contraste de phase

Ainsi en présence d'anneau de phase, la sensibilité du détecteur est fortement liée à l'allure de la figure d'interférence. En pratique, cela n'est pas acceptable car la sensibilité est modifiée en déplaçant la hauteur de la bille de seulement 200 nm. En effet, si la bille est animée d'un mouvement brownien dans la direction transverse (dans le plan (x, y)), elle l'est aussi dans la direction longitudinale (en hauteur), entraînant une variation de hauteur estimée à 50 nm (soit un huitième d'interfrange) dans nos conditions expérimentales. De plus, dans le cadre des expériences avec les cellules, la calibration du montage doit se faire sur chaque bille avant que celle-ci ne soit approchée puis collée à la cellule. Il serait donc illusoire de penser qu'entre la hauteur où la calibration a eu lieu et la hauteur où la bille est collée sur la cellule il y a moins de 200 nm. L'anneau de phase présente donc un réel problème pour convertir fidèlement les données mesurées par le détecteur en unité métrique, afin d'effectuer des mesures quantitatives.

Afin de conserver l'imagerie à contraste de phase des cellules, nous avons opté pour un système d'imagerie à contraste de phase avec un anneau déporté : au lieu de se situer directement dans le plan focal arrière de l'objectif, l'anneau est placé dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif (cf. figure 4.12). Cette configuration permet donc d'utiliser un objectif de microscope classique pour piéger, tout en étant compatible avec l'imagerie à contraste de phase. L'anneau ne se trouvant plus sur le trajet du faisceau laser, il ne perturbe plus le signal rétro-diffusé. Cette adaptation diminue fortement les écarts de sensibilité observés en

10. Nous avons vérifié à partir du modèle qu'en discrétisant tous les demi-interfranges, cela fait apparaître articiellement des battements.

présence d'anneau de phase, bien qu'elles restent quand même de l'ordre de 8%. Cet écart devrait être négligeable devant les incertitudes de mesures en présence des cellules. En revanche, pour les mesure de raideur qui suivent il sera important de convertir les données acquises par le détecteur à partir de la sensibilité correspondant à la hauteur d'acquisition des mesures.

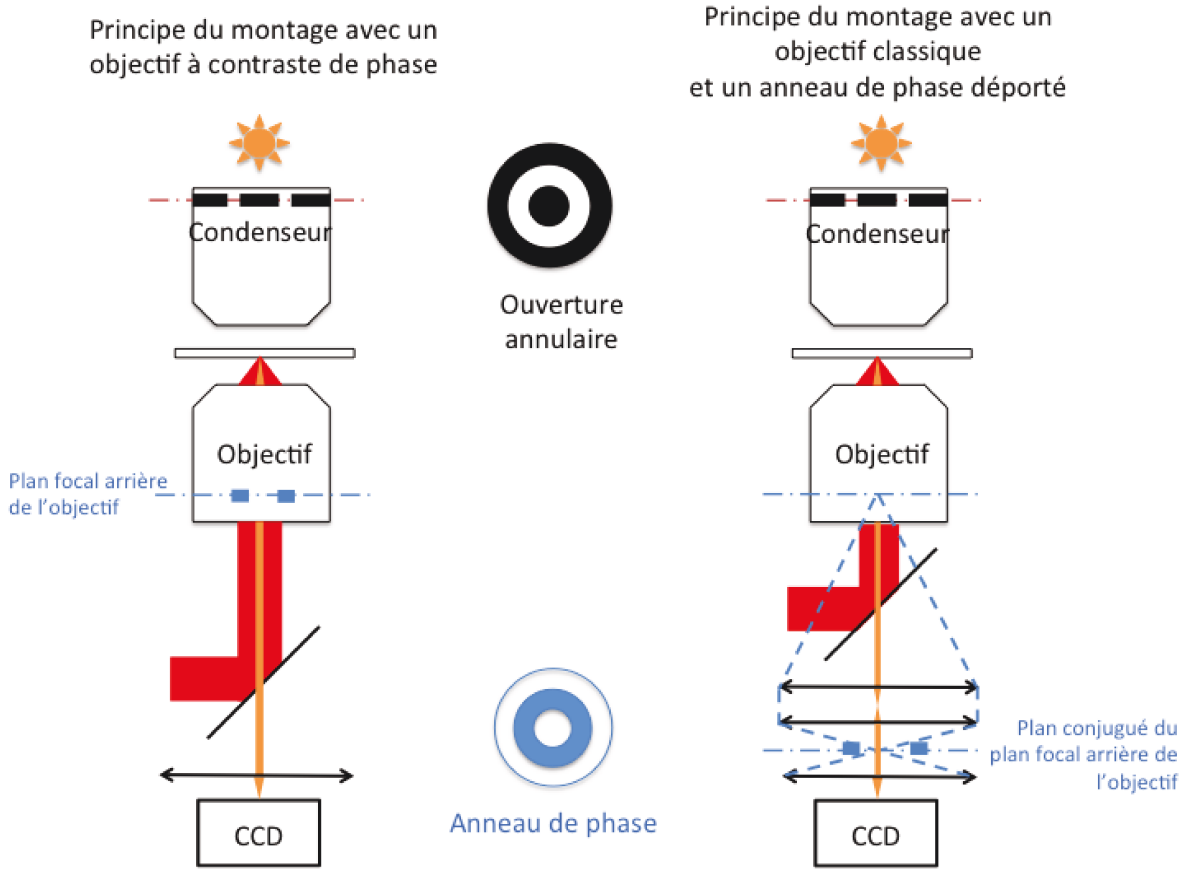


FIGURE 4.12 – Principe du montage combinant piège optique et contraste de phase soit avec un objectif à contraste de phase soit avec un objectif classique et un anneau de phase déporté.

4.3 Mesure de la raideur du piège et comparaison des méthodes de calibration

Dans cette partie, je vais présenter les résultats de calibration de la constante de raideur du piège, avec l'objectif sans anneau de phase. Tout d'abord, je vais présenter les résultats de calibration en fonction de la hauteur de piégeage. Cela permet de montrer que l'aberration sphérique n'altère pas l'efficacité de piégeage pour les hauteurs d'intérêt. Ensuite, je comparerai les résultats fournis par les différentes méthodes de calibration décrites dans la première partie de ce chapitre. Cette comparaison sera faite dans un premier temps pour une calibration en fonction de la hauteur, puis dans un second temps en fonction de la puissance.

4.3.1 Calibration de la raideur en fonction de la hauteur : détérioration de l'efficacité de piégeage par l'aberration sphérique ?

Dans la partie 2.1.3.1 du chapitre 2 dédié au montage, nous avons expliqué que la présence d'aberration sphérique détériorait l'efficacité de piégeage. Pour un objectif à immersion dans l'huile, les effets de l'aberration sphérique sont d'autant plus importants que la hauteur de piégeage de la bille est importante. Dans cette partie, le comportement de la constante de raideur en fonction de la hauteur de piégeage est donc étudié.

Méthodologie Pour déterminer l'influence des aberrations sphériques sur la constante de raideur, nous utilisons les données déjà exploitées pour la calibration du détecteur en fonction de la hauteur dans la partie précédente. Cela signifie que la hauteur varie de 1.9 µm à 7.7 µm, par pas de 200 nm.

Les données sont traitées par la méthode de la réponse à un échelon de position qui permet de déterminer le temps caractéristique de décroissance exponentielle t_b. A partir de celui-ci, on déduit la constante de raideur d'après l'expression 4.1 : $k = \gamma(h)/t_b$. En effet, la hauteur étant précisément connue grâce aux interférogrammes, il est facile de calculer la viscosité locale $\gamma(h)$ à partir de la loi de Faxen pour chaque hauteur.

La raideur est-elle constante avec la hauteur ? Les mesures de raideur pour chaque hauteur sont représentées sur la figure 4.13. La raideur est quasiment constante sur toute la gamme de hauteur explorée, et ce dans les deux directions x et y. La présence d'aberration sphérique aurait eu tendance à faire diminuer la raideur lorsque la hauteur augemente, mais ce n'est pas le cas ici. D'autre part, les raideurs dans les deux directions ont des valeurs très similaires ce qui indique que le piège est bien symétrique.

Une autre façon de constater cela est de revenir à la mesure du temps caractéristique t_b pour chaque hauteur. La figure 4.14 représente l'évolution du temps caractéristique t_b en fonction de la hauteur du centre de la bille dans la direction x. On remarque que celle-ci a la même allure que la loi de Faxen, comme le montre la superposition de la loi de Faxen multipliée par un facteur constant aux mesures de t_b. Le fait que t_b évolue comme la loi de Faxen signifie que la constante de raideur est constante.

Conclusion Les mesures de raideur en fonction de la hauteur indiquent que jusqu'à une hauteur d'environ 8 µm l'aberration sphérique n'altère pas la qualité du piège et que donc la raideur peut être considérée comme constante. Ceci est en désaccord avec les résultats publiés dans [Vermeulen 2006] et représentés sur la figure 2.5. Cependant, nos résultats correspondent aux prédictions théoriques [Rohrbach 2002, Fällman 2003] qui conseillaient de travailler à une hauteur inférieure à 8 µm pour ne pas souffrir de la dégradation du piège due à l'aberration sphérique (cf. partie 2.1.3.1). De plus, ceci est confirmé par les résultats obtenus par les autres méthodes de calibration, comme je vais le présenter dans la partie suivante.

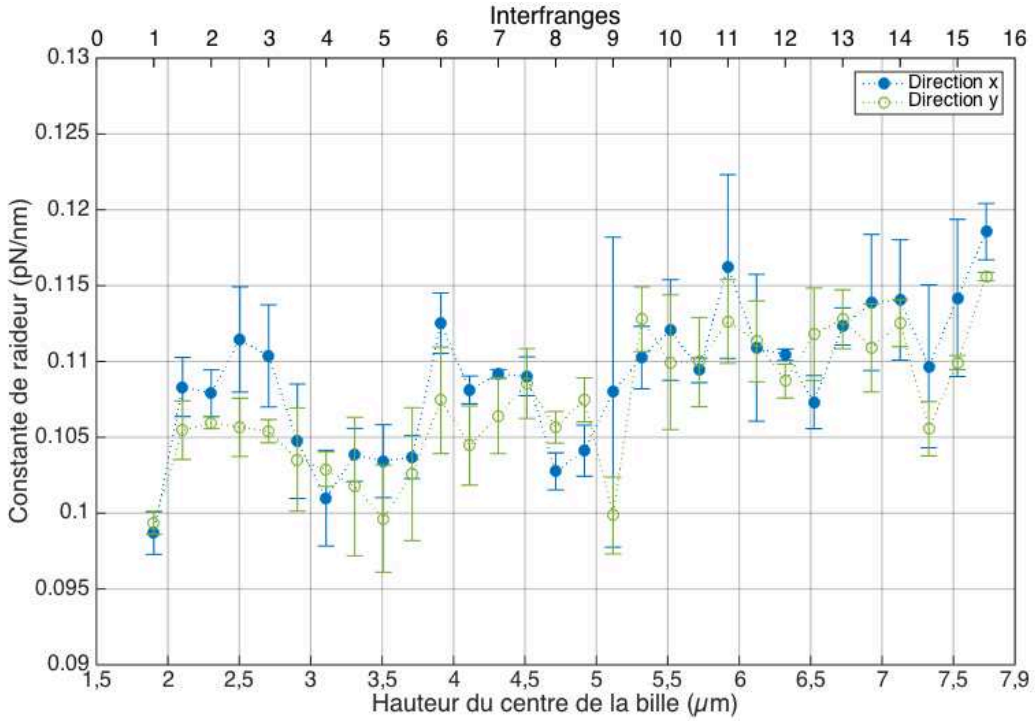


FIGURE 4.13 – Evaluation de la constante de raideur à partir de la réponse à un échelon de position dans les directions x et y en fonction de la hauteur de piégeage connue. Ces mesures ont été obtenues pour un déplacement du piège de 300 nm, pour une puissance du laser de 230 mW.

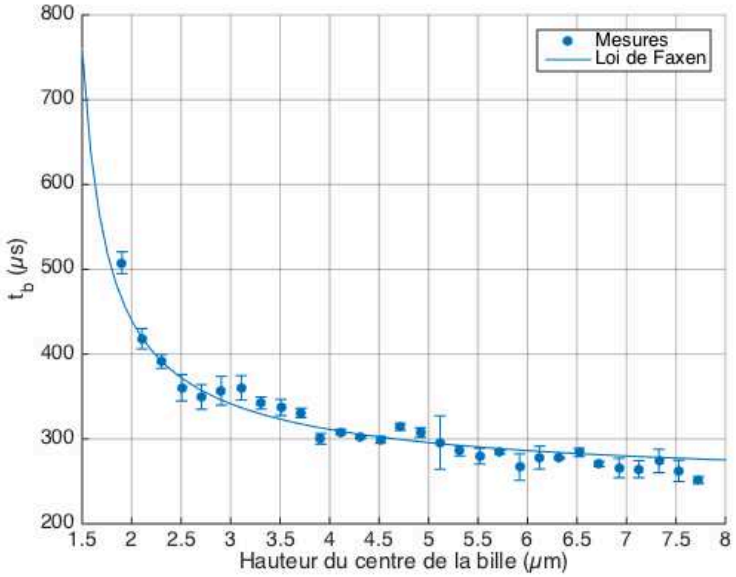


FIGURE 4.14 – Evolution du temps caractéristique t_b en fonction de la hauteur de piégeage, dans la direction x. La loi de Faxen multipliée par un terme correctif a été superposée aux mesures afin de bien remarquer que t_b évolue comme celle-ci. Ces mesures ont été obtenues pour un déplacement du piège de 300 nm, pour une puissance du laser de 230 mW.

4.3.2 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la hauteur

L'intérêt de la pluralité des méthodes de calibration est qu'on peut comparer leurs résultats. Dans cette partie et la suivante, seuls les résultats dans la direction x sont présentés et permettent de mener la discussion sur la comparaison des méthodes. Ceux obtenus dans la direction y sont regroupés dans l'annexe D. Je vais commencer ici par comparer les résultats des méthodes de calibration de la raideur en faisant varier la hauteur de piégeage pour une puissance du laser fixe. La méthodologie pour la prise de mesure et l'obtention des résultats présentés sur les figures ci-après est exposée avant la comparaison des résultats.

Méthodologie Les hauteurs varient de 1.9 µm à 7.7 µm. Pour chaque hauteur de piégeage, la puissance laser a été fixée à 230 mW et toutes les étapes suivantes sont effectuées pour l'acquisition des données :

1. acquisition de l'interférogramme correspondant au signal détecté,
2. acquisition de 10 réponses indépendantes de la bille à un déplacement du piège de 100 nm,
3. vérification que la bille est toujours piégée à la même hauteur via l'image de l'interférogramme,
4. acquisition d'un mouvement brownien de la bille de 8 s.

A partir de l'interférogramme, la hauteur de piégeage est évaluée, ce qui permet de déterminer la constante de raideur par la méthode de la réponse à un échelon de position et l'analyse de la densité spectrale de puissance. Pour les traitements par inférence bayésienne et application du théorème de l'équipartition, les données sont converties en unité métrique grâce au facteur déterminé par la méthode de la réponse à un échelon de position.

Points de mesure et barres d'erreur Pour chaque méthode les points de mesure et les barres d'erreur indiquées sur les figures correspondent à :

- Réponse à un échelon de position : le point de mesure correspond à la moyenne des 10 résultats obtenus à partir des 10 réponses de la bille. L'écart-type fournit la barre d'erreur.
- Analyse de la densité spectrale de puissance : le point de mesure correspond à la constante de raideur déduite de la fréquence de coupure déterminée par le programme publié dans [Hansen 2006]. La barre d'erreur correspond à l'incertitude donnée par le programme sur la fréquence de coupure.
- Inférence bayésienne : le point de mesure correspond à la moyenne des résultats obtenus à partir de 6 trajectoires distinctes d'une durée de 1.2 s chacune. La barre d'erreur correspond à l'incertitude sur la calibration du détecteur qui se répercute sur les résultats du programme.
- Application du théorème de l'équipartition : le point de mesure correspond à la constante de raideur calculée à partir de la variance du mouvement brownien sur les 8 s. La barre d'erreur correspond à l'incertitude sur le facteur de conversion des données.

Comparaison des résultats : le bruit basse fréquence à l'origine des écarts Les résultats de la calibration par les différentes méthodes en fonction de la hauteur sont présentés sur la figure 4.15. Tout d'abord, comme dans la partie précédente, quelle que soit la méthode utilisée, qu'elle dépende ou non de la connaissance de la viscosité locale via la mesure de la hauteur, la raideur est constante sur la gamme de hauteurs explorée. Bien que tous les résultats soient du même ordre de grandeur, on distingue deux familles :

- les résultats issus de la réponse à un échelon de position et ceux issus de l'analyse de la densité spectrale de puissance d'une part, donnant les valeurs de raideurs les plus élevées,
- les résultats issus de l'inférence bayésienne et ceux issus de l'application du théorème de l'équipartition d'autre part, donnant les valeurs légèrement inférieures.

Pour expliquer ces écarts de valeur, il faut avoir à l'esprit que les résultats sont obtenus à partir de deux signaux différents : la réponse de la bille à un échelon de position et le mouvement brownien. Le premier est enregistré sur une période de temps très courte (quelques centaines de µs). Le second est traité par les trois méthodes exploitant le signal sur un temps beaucoup plus long (1.2 s pour l'inférence bayésienne et 8 s pour les autres). Or, l'analyse fréquentielle du mouvement brownien sur 8 s indique la présence d'un bruit basse fréquence, comme cela a été mentionné dans la partie 4.1.2.2 et visible sur les spectres de puissance de la figure 4.16, qui seront détaillés dans la suite. Ce bruit basse fréquence perturbe l'acquisition du mouvement brownien proprement dit et donc influe sur les méthodes qui l'exploitent conduisant à une

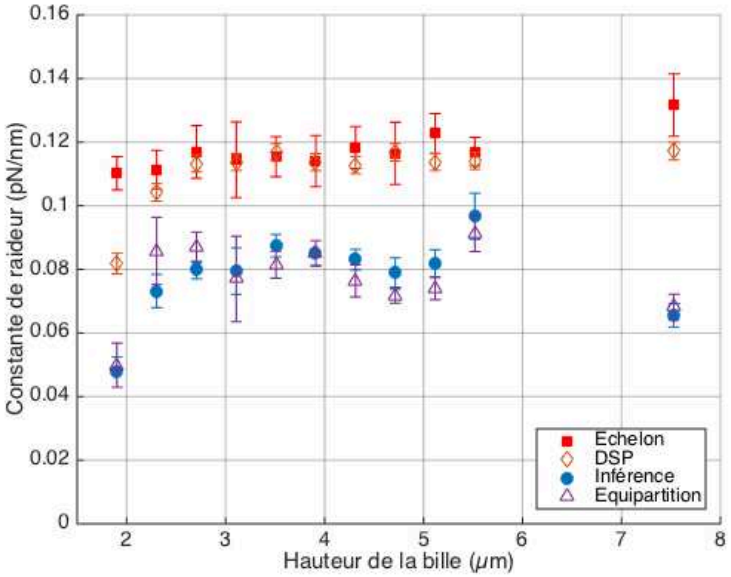


FIGURE 4.15 – Comparaison des résultats de mesure de la raideur du piège en fonction de la hauteur pour les quatre méthodes de calibration. La puissance laser en entrée de l'objectif vaut 230 mW.

sous-estimation de la raideur. Dans le cas de l'analyse de la densité spectrale de puissance, il est possible de s'en affranchir grâce à une séparation fréquentielle du bruit par rapport à la fréquence de coupure du piège. En effet, ce bruit est présent pour des fréquences inférieures à 200 Hz environ et les fréquences de coupure du piège sont généralement supérieures à cette valeur. Cela sera détaillé dans le paragraphe suivant. Ainsi la présence de bruit basse fréquence perturbant l'acquisition du mouvement brownien et le traitement particulier de la densité spectrale de puissance du signal acquis explique pourquoi on obtient deux familles de résultats.

Dans la suite, je vais comparer plus en détail les résultats issus de la réponse à un échelon de position et ceux issus de l'analyse de la densité spectrale de puissance. Ensuite, je montrerai qu'il est possible d'évaluer la proportion de bruit qui entache la trajectoire du mouvement brownien. Enfin, j'expliquerai que cette quantification du bruit permet de corriger a posteriori les valeurs obtenues par l'application du théorème de l'équipartition et par l'inférence bayésienne.

Comparaison de la réponse à un échelon de position et de l'analyse de la densité spectrale de puissance Tout d'abord, il est important de noter que l'accord entre les résultats issus de la réponse à un échelon de position et ceux issus de l'analyse de la densité spectrale de puissance n'est pas étonnant. En effet, les deux traitements sont fondés sur la même équation du mouvement, la première en réponse à un échelon de position et la seconde à une force aléatoire. Dans les deux cas on détermine la même grandeur, soit en temporel avec le temps caractéristique t_b pour la réponse à l'échelon, soit en fréquentiel avec la fréquence de coupure f_c pour la densité spectrale de puissance (pour rappel $t_b = \gamma/k = 1/2\pi f_c$, d'après les

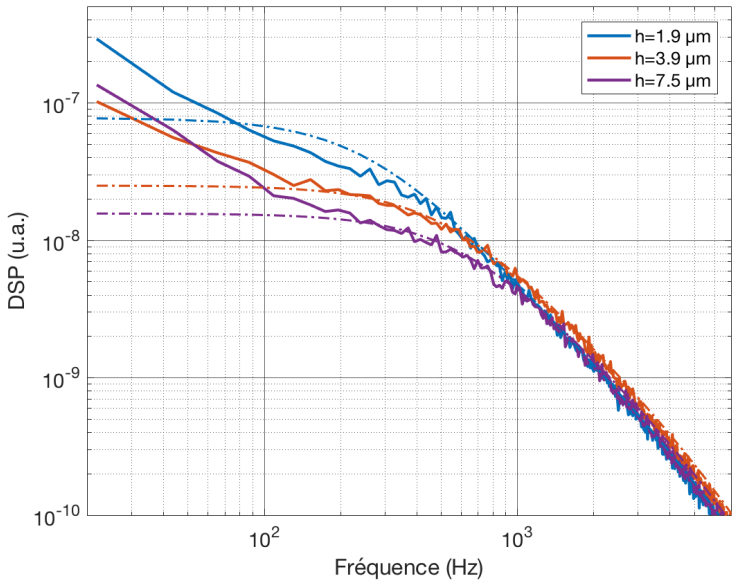


FIGURE 4.16 – Densités spectrales de puissance correspondant au mouvement brownien de la bille pour trois hauteurs différentes. Les mouvements browniens traités ici correspondent à ceux dont les résultats sont présentés sur la figure 4.15 pour les mêmes hauteurs. Les ajustements lorentziens sur l'intervalle de fréquences allant de 200 à 5000 Hz ont été ajoutés pour chacune des hauteurs 1.9 µm, 3.9 µm et 7.5 µm, fournissant les fréquences de coupure du piège qui sont respectivement : 260, 536 et 623 Hz. L'ajustement lorentzien pour la hauteur la plus faible n'est pas vraiment correct ce qui conduit à une sous-estimation de la fréquence de coupure et donc de la raideur du piège pur cette hauteur.

expressions 4.1 et 4.7). Ainsi, sur la figure 4.15, les résultats obtenus par les deux méthodes sont en très bon accord, sauf pour la hauteur la plus faible. Afin d'expliquer cette observation, je vais m'appuyer sur les spectres de puissance de la figure 4.16.

Le spectre correspondant à la hauteur 3.9 µm (cf. figure 4.16 courbe rouge), correspond au sixième point de mesure sur la figure 4.15. Il représente un cas typique où l'ajustement lorentzien à partir de 200 Hz permet de déterminer la fréquence de coupure du piège en s'affranchissant du bruit basse fréquence. Ainsi, la calibration de la raideur par l'analyse de la densité spectrale de puissance n'est quasiment pas affectée par la présence du bruit basse fréquence, dans la mesure où la fréquence de coupure du piège est supérieure aux fréquences du bruit. Ceci est également le cas pour les résultats obtenus à partir de la réponse de la bille à un déplacement rapide du piège car la mesure se fait sur des temps très courts (quelques centaines de µs). Ceci explique le très bon accord obtenu entre les résultats issus de ces deux méthodes.

On peut cependant remarquer que pour la hauteur la plus faible (1.9 µm), l'accord entre les résultats issus de la réponse à un échelon de position et de l'analyse de la densité spectrale n'est pas si bon (cf. figure 4.15). Ceci s'explique directement par le spectre de puissance pour cette même hauteur (cf. figure 4.16 courbe bleue). La fréquence de coupure du piège est très voisine de la fréquence maximale du bruit. En effet, la raideur est constante sur la gamme de hauteur explorée dans ces expériences. Or, d'après l'expression 4.7, $k = 2\pi\,\gamma(h)\,f_c$: plus la hauteur est faible, plus la viscosité est importante (cf. loi de Faxen), donc plus la fréquence de coupure du piège f_c est faible pour une même constante de raideur (ceci est vérifié par la valeur des fréquences de coupure associées aux spectres pour différentes hauteurs présentés sur la figure 4.16). Ceci implique que l'ajustement du spectre est d'autant plus difficile que la hauteur de piégeage est faible. Ainsi, l'ajustement du spectre de puissance pour la hauteur 1.9 µm conduit à une sous-estimation de la fréquence de coupure et donc de la constante de raideur, ce qui se traduit sur les résultats de la figure 4.15. En revanche, la réponse à un échelon de position ne souffre pas de cet effet, d'où la différence des résultats entre les deux méthodes pour cette faible hauteur.

Estimation de la proportion de bruit dans la trajectoire du mouvement brownien
Pour le traitement des données par inférence bayésienne et application du théorème de l'équipartition, il n'est pas possible de corriger les données avant leur exploitation. Cependant, il est possible de vérifier que le bruit basse fréquence est à l'origine des différences de résultats entre l'application du théorème de l'équipartition et les deux autres méthodes mentionnées précédemment, en quantifiant la proportion du signal due au mouvement brownien propre et celle due au bruit.

En effet, d'après le théorème de Wiener-Khintchine (cf. expression 4.11), la variance du mouvement brownien de la bille correspond à l'intégrale de la densité spectrale de puissance de ce même mouvement brownien. De fait, en présence de bruit, la variance mesurée à partir de la trajectoire acquise correspond à la somme de la variance due au mouvement brownien et de la variance due au bruit (ceux-ci étant décorrélés), ce qui se traduit mathématiquement par :

$$\langle x^2 \rangle_{total} = \langle x^2 \rangle_{Brownien} + \langle x^2 \rangle_{bruit} \tag{4.15}$$

$$\int P_{total}(f)df = \int P_{Brownien}(f)df + \int P_{bruit}(f)df \tag{4.16}$$

Pour simplifier les notations, A désigne l'aire correspondante à l'intégrale du spectre de puissance P. Pour appliquer le théorème de l'équipartition, on a calculé la variance de la trajectoire totale $\langle x^2 \rangle_{total}$. A partir du spectre de puissance du signal acquis, il est possible de calculer A_{total}. De même, à partir de l'ajustement lorentzien du spectre de puissance, on peut calculer $A_{Brownien}$. Ainsi par un rapport de proportionnalité, on est capable de déterminer la fraction de la variance totale due au mouvement brownien (correspondant à $\langle x^2 \rangle_{Brownien}$) et donc par soustraction celle due au bruit (correspondant à $\langle x^2 \rangle_{bruit}$) :

$$\langle x^2 \rangle_{Brownien} = \frac{A_{Brownien}}{A_{total}} \langle x^2 \rangle_{total} \quad \text{et} \quad \langle x^2 \rangle_{bruit} = \langle x^2 \rangle_{total} - \langle x^2 \rangle_{Brownien} \tag{4.17}$$

Pour éviter toute confusion entre le mouvement Brownien propre et le signal détecté, je parlerai plutôt de la proportion de bruit entachant le signal détecté, soit :

$$\frac{\langle x^2 \rangle_{bruit}}{\langle x^2 \rangle_{total}} = \frac{\langle x^2 \rangle_{total} - \langle x^2 \rangle_{Brownien}}{\langle x^2 \rangle_{total}} = \frac{A_{total} - A_{Brownien}}{A_{total}} \tag{4.18}$$

Ainsi, pour les trajectoires correspondant aux résultats présentés sur la figure 4.15, en moyenne la proportion de bruit est de l'ordre de 25%. Mais celui-ci varie d'une trajectoire à l'autre. A titre d'exemple, pour la hauteur à 5,1 µm la fraction de bruit vaut 38%, à 5.5 µm, elle vaut 25% et à 7.5 µm, elle remonte à 41% (cf. annexe D). Il faut donc la déterminer au cas par cas. On peut également noter que la fiabilité de la quantification du bruit dépend de la qualité de l'ajustement du spectre de puissance. Ainsi, pour la hauteur la plus basse, cette estimation n'est pas très fiable.

Correction a posteriori des valeurs obtenues par l'application du théorème de l'équipartition A partir de l'estimation de $\langle x^2 \rangle_{Brownien}$, on peut de nouveau appliquer le théorème de l'équipartition pour recalculer la constante de raideur associée au mouvement brownien sans bruit. Ces résultats sont superposés sur ceux de la figure 4.15, et apparaissent en triangles verts sur la figure 4.17. Comme attendu, cela permet de réhausser les valeurs des raideurs au niveau de celles obtenues par la réponse à un échelon de position et l'analyse de la densité spectrale de puissance.

Correction a posteriori des valeurs obtenues par l'inférence bayésienne Enfin, concernant les résultats obtenus par inférence bayésienne, il est également possible de vérifier que les écarts obtenus avec les autres méthodes sont bien dus au bruit basse fréquence. Pour cela, on simule une trajectoire comprenant le mouvement brownien et un bruit basse fréquence, avec un spectre similaire à celui observé expérimentalement, et on compare la valeur de raideur inférée par le programme et la valeur réelle entrée dans la simulation. Il faut donc tenir compte de l'amplitude et du spectre du bruit. Cette étude est réalisée par l'équipe d'Antigoni Alexandrou à ce jour.

Les résultats préliminaires indiquent qu'en présence de bruit, le programme d'inférence bayésienne sous-estime la raideur du piège, ce qui est cohérent avec les résultats de la figure 4.15. Cependant, ces valeurs corrigées restent qualitatives pour le moment et un travail de simulation est en cours pour obtenir des résultats quantitatifs.

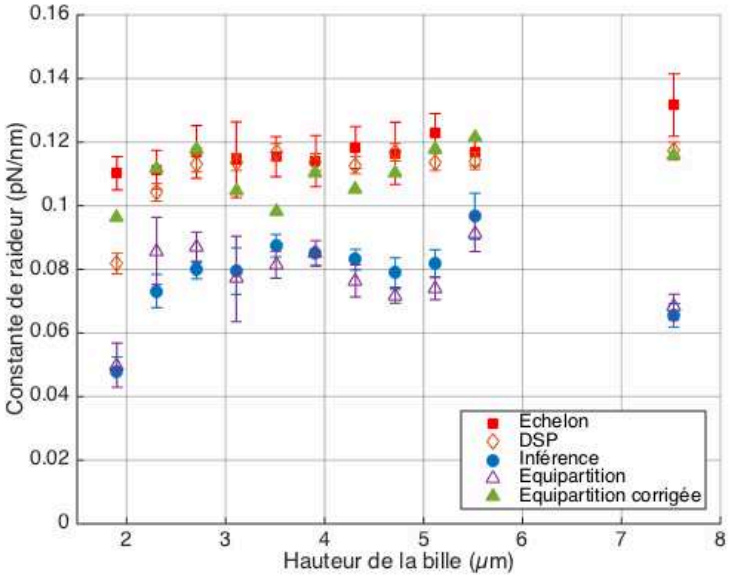


FIGURE 4.17 – Correction des résultats obtenus à partir de l'application du théorème de l'équipartition en soustrayant a posteriori la variance du bruit basse fréquence de celle de la trajectoire totale. Les résultats corrigés apparaissent en triangle vert et sont superposés aux résultats présentés sur la figure 4.15.

Conclusion Les quatre méthodes mises en œuvre permettent de calibrer la raideur du piège et fournissent des résultats du même ordre de grandeur. Cependant, les trajectoires du mouvement brownien de la bille sont perturbées par la présence d'un bruit basse fréquence qui génère une sous-estimation de la constante de raideur. Il est possible de s'affranchir de ce bruit parasite dans le traitement par l'analyse de la densité spectrale de puissance en restreignant l'ajustement à des fréquences plus élevées. Ceci permet d'obtenir des résultats en très bon accord avec ceux fournis par la réponse de la bille à un échelon de position, qui ne souffre pas de la présence de bruit basse fréquence car les signaux sont acquis sur une période de temps plus faible. En revanche, ce bruit parasite ne peut être pris en compte directement lors du traitement par l'application du théorème de l'équipartition ou l'inférence bayésienne. Des études a posteriori dépendant de l'évaluation de la proportion de bruit sur chacune des trajectoires permettent de vérifier ce bruit est à l'origine des écarts entre les résultats.

4.3.3 Comparaison des quatre méthodes pour une calibration en fonction de la puissance

Pour comparer les résultats des méthodes de calibration de la raideur en fonction de la puissance du laser, les signaux ont été acquis pour différentes puissances en maintenant une hauteur de bille fixe (2.7 µm), selon la même méthodologie que décrite dans la partie précédente. Les résultats sont présentés sur la figure 4.18. Les résultats sont du même ordre de grandeur et quelle que soit la méthode de calibration, la raideur obtenue est proportionnelle à la puissance comme attendu. La calibration de la raideur dans la direction y a également été évaluée par les

différentes méthodes (cf. annexe D). Pour la méthode de l'échelon et de la densité spectrale de puissance, les résultats obtenus sont similaires à ceux dans la direction x avec des coefficients de proportionnalité comparables (0.53 et 0.50 pN/nm/W respectivement dans la direction y contre 0.55 et 0.51 pN/nm/W dans la direction x). Ceci indique que le piège est bien symétrique, en accord avec les raideurs obtenues en fonction de la hauteur (cf. figure 4.13 et annexe D).

Cependant, comme dans le cas de la mesure en fonction de la hauteur, sur la figure 4.18 on distingue les deux familles : la réponse à un échelon de position et l'analyse de la densité spectrale de puissance d'une part, et l'inférence bayésienne et l'application du théorème de l'équipartition d'autre part. Ces écarts proviennent également de la présence de bruit basse fréquence comme nous allons le montrer à partir de la quantification de la proportion de bruit à partir des spectres de puissance qui sont représentés sur la figure 4.19.

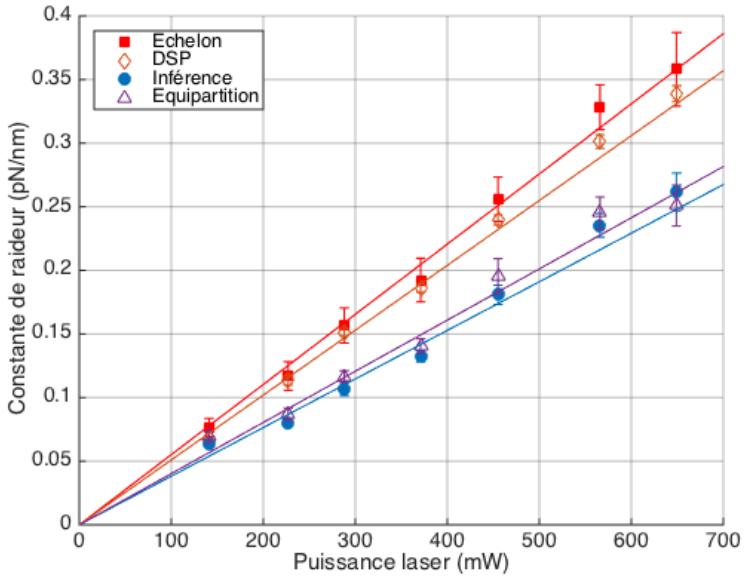


FIGURE 4.18 – Comparaison des mesures de raideur en fonction de la puissance du laser en entrée d'objectif pour les quatre méthodes de calibration. La hauteur de la bille vaut 2.7 µm. Les coefficients directeurs de l'ajustement linéaire pour chacune des méthodes valent respectivement dans l'ordre de la légende : 0.55, 0.51, 0.38 et 0.40 pN/nm/W.

En observant les différents spectres de la figure 4.19, on remarque qu'il est d'autant plus facile de s'affranchir du bruit basse fréquence en ajustant les courbes à partir de 200 Hz, que la puissance du laser est importante. En effet, d'après la relation $k = 2\pi\,\gamma(h)\,f_c$ (cf. expression 4.7), la constante de raideur est proportionnelle à la fréquence de coupure. Comme la raideur augmente linéairement avec la puissance du laser, il en est de même pour la fréquence de coupure f_c. Ainsi, plus la puissance du laser augmente, plus la fréquence de coupure s'écarte des fréquences maximales du bruit basse fréquence et donc plus il est facile d'ajuster le spectre en s'affranchissant du bruit.

Comme précédemment, la proportion de bruit présente sur chacun des signaux de mouvement brownien acquis est calculée pour chacune des puissances (cf. annexe D). Le bruit

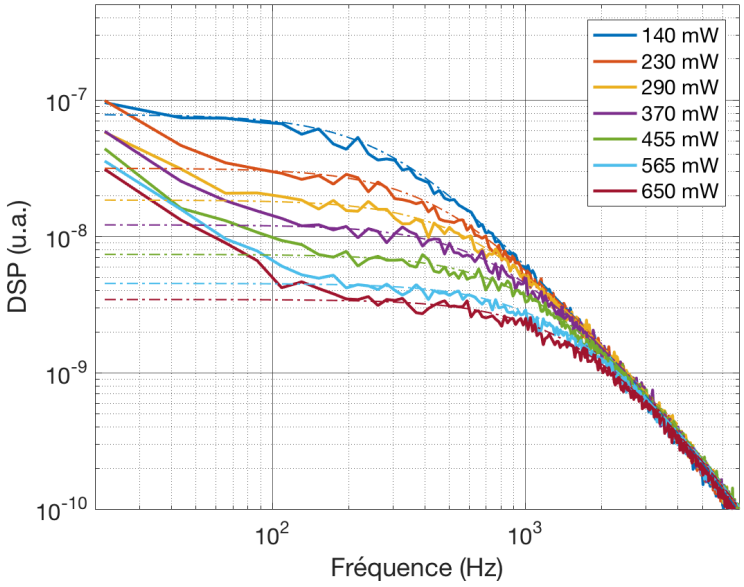


FIGURE 4.19 – Densité spectrale de puissance et ajustement pour les différentes puissances du laser. Les fréquences de coupure du piège sont dans l'ordre de la légende : 290, 470, 630, 770, 1010, 1280 et 1460 Hz. Les données exploitées correspondent à celles de la figure 4.18.

représente seulement 7% du signal pour la puissance la plus faible, et entre 20 et 30% (avec une moyenne à 25%) pour les autres. La quasi absence de bruit est bien visible sur le spectre de la densité spectrale de puissance du mouvement brownien de la bille pour une puissance de 141 mW (cf. figure 4.19 courbe bleue). Ceci se traduit par des résultats très voisins pour toutes les méthodes à cette puissance là (cf. premier point de mesure sur la figure 4.18).

Les estimations de la fraction de bruit dans les trajectoires permettent de corriger les valeurs de raideur obtenues à partir de l'application du théorème de l'équipartition. Les valeurs corrigées sont représentées sur la figure 4.20. Ces valeurs corrigées du bruit sont tout à fait en accord avec celles issues de la réponse à un échelon de position et de l'analyse de la densité spectrale de puissance. De fait, les dépendances de la raideur en fonction de la puissance sont très similaires : le coefficient de proportionnalité vaut 0.55 pN/nm/W pour la méthode de l'échelon et du théorème de l'équipartition avec correction du bruit, et 0.51 pN/nm/W pour la densité spectrale de puissance.

On peut noter que, hormis pour la puissance la plus faible, la fraction de bruit est quasi constante pour toutes les puissances. Ceci explique que les valeurs de raideur obtenues par inférence bayésienne et application du théorème de l'équipartition soient proportionnelles à la puissance, ce qui en présence de bruit n'était pas évident, celui-ci variant d'une mesure à l'autre. De plus, cette proportion constante de bruit alors que la variance du mouvement brownien diminue indique que l'amplitude du bruit diminue quand la puissance augmente, ce qui n'est a priori pas évident. L'origine de ce bruit reste à ce jour indéterminée.

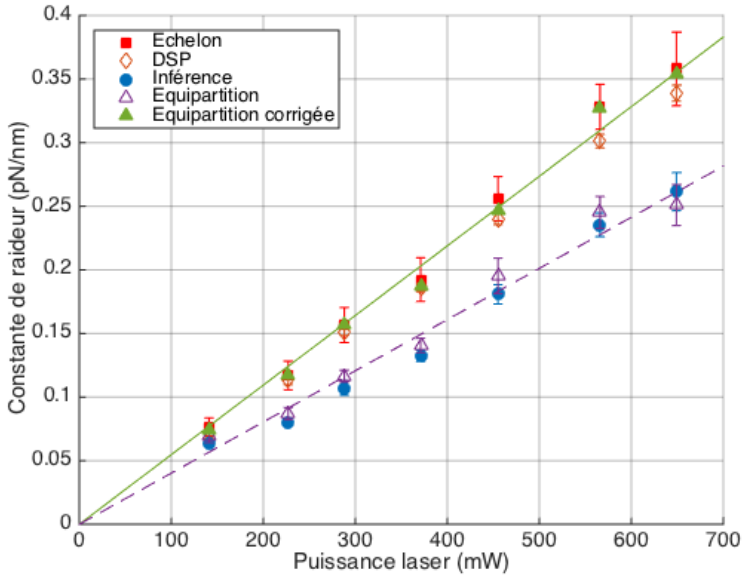


FIGURE 4.20 – Correction des résultats obtenus à partir de l'application du théorème de l'équipartition en s'affranchissant de l'impact du bruit basse fréquence sur la variance de la trajectoire. Les résultats corrigés apparaissent en triangles verts et sont superposés aux résultats présentés sur la figure 4.18. Seuls les ajustement linéaires des mesures par l'application du théorème de l'équipartition sont représentés. La correction des résultats réhausse le coefficient directeur de l'ajustement linéaire de 0.40 à 0.55 pN/nm/W.

4.4 Comment calibrer le dispositif lors des expériences avec les cellules ?

Travailler de façon quantitative avec les cellules suppose de calibrer rapidement le dispositif de piégeage optique afin de minimiser l'impact du faisceau laser sur les cellules. Quatre méthodes de calibration présentant des avantages différents ont été mises en œuvre dans ce chapitre. Dans l'hypothèse où les problèmes de bruit parasite ont été résolus, je proposerais différentes méthodes de calibration du dispositif en fonction du temps accordé à celle-ci.

Tout d'abord, il est nécessaire de connaître le facteur de conversion permettant d'obtenir les données en unité métrique. Dans la mesure où la bille piégée est calibrée à hauteur des cellules, la calibration du détecteur par la réponse à un échelon de position peut être effectuée en absence de cellule. En effet, j'ai montré que jusqu'à environ 4 µm, épaisseur moyenne des cellules, la sensibilité du détecteur pouvait être supposée constante, les variations observées localement étant négligeables devant celles des mesures sur les cellules. Il n'est donc pas nécessaire de la refaire à chaque fois lors des expériences avec les cellules.

Pour mesurer la raideur, je choisirais d'acquérir la trajectoire du mouvement brownien et de la traiter par analyse de la densité spectrale de puissance. Cette méthode est robuste, facile à mettre en œuvre grâce au programme publié dans [Hansen 2006] et permet de s'assurer de l'absence de bruit basse fréquence. Cependant, la bille se trouvant proche de la lamelle, il est nécessaire de mesurer précisément sa hauteur afin de calculer la viscosité locale pour déterminer la constante de raideur à partir de la fréquence de coupure du piège. Pour cela, une image du signal détecté sera acquise, permettant ensuite un ajustement du profil de l'interférogramme à partir du programme développé dans le chapitre 3.

Dans des conditions où le temps est un facteur très limitant et donc où l'acquisition d'une trajectoire de quelques secondes n'est pas envisageable, je préfèrerais alors le traitement par inférence bayésienne à partir d'une trajectoire du mouvement brownien d'une seconde. L'avantage de cette méthode est qu'elle nécessite moins de données pour extraire la constante de raideur et surtout aucune connaissance de la viscosité locale. Néanmoins, la calibration préalable du détecteur sera utile pour convertir les données acquises.

Enfin, il est envisageable de ne pas du tout calibrer la raideur en présence des cellules. En effet, la raideur peut être déterminée en fonction de la puissance dans les mêmes conditions expérimentales que celles réunies pour les mesures sur les cellules (température, milieu de culture, etc), pour une hauteur inférieures à 4 µm, l'aberration sphérique n'affectant pas la forme du piège à hauteur de cellules. La puissance du laser de piégeage étant connue lors des expériences sur les cellules, il sera possible de connaître la raideur avec une précision suffisante pour étudier la réponse des cellules de façon quantitative. Dans ce cas-là, je choisirais de calibrer le dispositif entier, détecteur et raideur du piège, par la réponse à un échelon de position. Si les conditions le permettent, il serait néanmoins intéressant d'acquérir une image du signal détecté lorsque la bille est collée sur la cellule. Ceci permettrait de vérifier l'impact de la cellule sur le signal détecté. D'autre part, cette image pourrait être utilisée pour déterminer la hauteur et donc le facteur de conversion des données avec une plus grande précision si cela est nécessaire pour l'expérience, dans la mesure où la calibration du détecteur a préalablement été réalisée en fonction de la hauteur.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai développé un instrument de pince optique dédié à l'étude des propriétés mécaniques des cellules, et notamment des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins, impliquées dans le développement de l'athérosclérose. Ce dispositif combine le piégeage optique avec la microscopie à contraste de phase permettant d'imager les cellules avec un bon contraste tout en exerçant une force. Cette combinaison est rendue possible grâce à l'utilisation d'un même objectif pour imager les cellules et piéger une bille. Dans la plupart des montages de pince optique pour la biologie, la mesure de force s'effectue en détectant le faisceau transmis par la bille piégée. Or, cela ne permet pas un accès facile à l'échantillon. En outre, cette détection en transmission est rendue plus compliquée par la mise en œuvre du contraste de phase qui impose de placer une ouverture annulaire dans le plan focal arrière du condenseur. Pour contourner ce problème, nous avons décidé de développer une détection en réflexion, en collectant les photons rétro-diffusés par la bille grâce à l'objectif.

Dans les montages de pince optique avec détection en transmission, le détecteur, une photodiode à quatre quadrants, peut être placé dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur. Cette configuration permet de mesurer la position relative de la bille par rapport au centre du piège en s'affranchissant de toute dérive du piège. Nous avons adapté cette stratégie sur notre montage en réflexion, en plaçant le détecteur dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Cependant, le signal détecté est plus complexe qu'en transmission : il s'agit d'une figure d'interférence présentant des anneaux concentriques bien contrastés. Ce sytème d'interférence est généré par deux faiceaux réfléchis, l'un par la bille et l'autre par la lamelle de microscope. Cette figure d'interférence a été comprise et expliquée en détail. J'ai notamment proposé un modèle tenant compte de la courbure de la bille et de la diffraction permettant de reproduire fidèlement les interférogrammes observés expérimentalement, et en particulier la position des anneaux en fonction de la hauteur de la bille. J'ai également étudié l'évolution de la figure d'interférence quand la bille n'est pas au centre du piège, donnant lieu à un modèle simple des effets observés. J'ai ensuite combiné ces deux modèles afin de prédire la sensibilité du détecteur, se trouvant en bon accord avec les mesures expérimentales.

Avec un objectif à contraste de phase, le signal détecté est encore un peu plus compliqué. Comme le détecteur est dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, le signal est la superposition de l'image de l'anneau de phase et de la figure d'interférence composée d'anneaux concentriques. Ainsi, une partie de la figure d'interférence est masquée par l'anneau de phase. Lorsque la bille est décalée par rapport au centre du piège, la portion masquée varie. Cet effet conduit à une sensibilité différente selon l'allure de l'interférogramme, et donc de la hauteur de la bille. En revanche, sans anneau de phase, les variations de sensibilité sont atténuées d'un facteur trois, et se situent dans une gamme parfaitement compatible avec le degré de précision requis pour les expériences sur les cellules. Ces résultats ont été expliqués par le modèle du

système d'interférence que nous avons développé. Suite à ces travaux, nous avons décidé de ne plus utiliser d'objectif à contraste de phase et de déporter l'anneau dans le bras d'imagerie, dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif.

La présence du système d'interférence constitute un véritable atout quant à la mesure de la hauteur de piégeage de la bille. En effet, cette donnée est en général difficilement mesurable et est nécessaire dès lors qu'il s'agit de calibrer le dispositif via la mesure de la viscosité locale, qui varie très fortement à quelques microns de la lamelle, et donc à hauteur des cellules. Le modèle développé reproduit fidèlement la position des anneaux et permet de déterminer très précisément la hauteur de la bille en ajustant les interférogrammes. Cette donnée a été utilisée pour mesurer la raideur du piège par la réponse de la bille à un échelon de position du piège, la méthode développée au sein de l'équipe, qui nécessite justement la mesure de la viscosité locale. Cette mesure a d'abord permis de vérifier que le piège est bien symétrique, puis en faisant varier la hauteur, qu'il n'est pas dégradé par l'aberration sphérique, la raideur étant quasi constante à la hauteur des cellules. Enfin, la constante de raideur est bien proportionnelle à la puissance du laser de piégeage.

J'ai ensuite évalué les performances en terme de mesure de force de notre détection en reflexion dans le plan focal arrière en comparant différentes méthodes de calibration de la raideur du piège. J'ai mis en œuvre les deux méthodes développées au cours des dernières années dans l'équipe : la réponse de la bille à un échelon de position du piège et l'inférence bayésienne. A celles-ci s'ajoutent l'analyse de la densité spectrale de puissance du mouvement brownien de la bille, qui peut être considérée comme la méthode de référence dans le cas d'une détection en transmission, et l'application du théorème d'équipartition. J'ai effectué différentes mesures de raideur en faisant varier d'une part la hauteur de piégeage, et d'autre part la puissance du laser. Les résultats trouvés avec chacune des quatre méthodes sont compatibles entre eux. Quelle que soit la technique d'analyse, les raideurs sont proportionnelles à la puissance du laser, et indépendantes de la hauteur dans la gamme explorée. Ce second point renforce la confiance que nous pouvons avoir en la mesure de la hauteur de la bille grâce à la figure d'interférence. En effet, seules les méthodes de réponse à un échelon et d'analyse de la densité spectrale supposent de connaitre la viscosité locale, et donc la hauteur de la bille.

Il existe cependant une différence de l'ordre de 25% entre les résultats obtenus par la réponse à un échelon et l'analyse de la densité spectrale de puissance d'une part, et ceux obtenus par inférence bayésienne et équipartition d'autre part. Ces deux dernières méthodes souffrent en effet de la présence d'un bruit basse fréquence sur la trajectoire du mouvement brownien acquise. Les deux autres techniques reposent sur l'analyse du mouvement de la bille sur des temps caractéristiques plus courts et ne sont donc pas entachées de cette erreur. L'origine de ce bruit reste aujourd'hui indéterminée et il serait intéressant de l'étudier plus en profondeur. Une première idée serait d'isoler correctement le montage d'un point de vue mécanique et acoustique. Ensuite, l'influence de la puissance laser pourrait être étudiée en travaillant pour une puissance laser constante délivrée par l'appareil dont l'amplitude au niveau de l'échantillon serait modulée en aval, notamment grâce à l'amplitude du signal envoyé aux déflecteurs acousto-optiques.

Sous réserve de parvenir à supprimer ce bruit basse fréquence, chaque technique donne des résultats précis et compatibles avec les autres, et présente des avantages différents. La réponse à un échelon permet non seulement de calibrer le piège mais aussi le détecteur. Ceci

est également le cas de l'analyse de la densité spectrale, sans qu'on ait besoin de déplacer le piège rapidement, mais avec une moins bonne précision sur la calibration du détecteur. Le théorème de l'équipartition est très simple à mettre en œuvre, mais est très sensible à toute source de bruit. L'inférence bayesienne, sur des signaux non bruités, permet une calibration avec une trajectoire de la bille très courte, ce qui peut être particulièrement intéressant quand on travaille sur des cellules et que la durée de l'expérience est un paramètre déterminant.

Finalement, nous avons effectué des tests préliminaires sur des cellules endothéliales. Nous avons vérifié qu'il était possible d'imager une cellule, puis de piéger une bille et, après calibration du dispositif, de l'amener au contact de la cellule pour qu'elle s'y fixe. Nous avons pour cela fonctionnalisé des billes avec le peptide RGD connu pour interagir avec les intégrines de la membrane cellulaire. Nous avons ensuite exercé une force contrôlée en direction et en amplitude via la bille sur la membrane de la cellule. A la lumière de toute l'étude sur le signal détecté, il serait intéressant de vérifier que la présence de la cellule ne perturbe pas significativement la figure d'interférence et donc permet de mesurer effectivement la réponse de la cellule a une contrainte oscillante, en vue de déterminer les propriétés visco-élastiques de la cellule. D'autre part, grâce à la culture des cellules sur des substrats micro-structurés, il sera possible de comparer le comportement d'une cellule ayant un réseau d'actine désorganisé à une cellule ayant un réseau préférentiellement orienté dans la direction allongée de la cellule. Nous pourrons ainsi vérifier si ces dernières présentent un comportement anisotrope.

Il est aussi possible de combiner des mesures de microscopie de fluorescence avec notre montage. Nous avons effectué quelques tests sur des cellules transfectées avec un rapporteur permettant de suivre, via l'évolution d'un signal de transfert de fluorescence de type Förster, la transmission du signal mécanique exercé par la pince au sein de la cellule. Cependant, pour mener à bien ce projet, il est nécessaire de développer un rapporteur de la transmission de la force qui soit suffisamment sensible dans les cellules cultivées.

Enfin, l'imagerie en trois dimensions de la cellule par tomographie par cohérence optique plein champ a été testée, mais n'a pas été suffisamment convaincante pour être combinée au dispositif. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir imager en 3D la cellule et notamment le noyau et les fibres de stress lorsque la bille est liée à la membrane et lorsqu'une force est exercée. La combinaison avec un montage de microscopie avec illumination structurée est envisagé dans ce cadre-là. Cette technique serait parfaitement adaptable au dispositif que nous avons développé.

Ainsi, le système de pince optique que j'ai développé offre une grande versatilité et peut être combiné à de nombreuses techniques d'imagerie (contraste de phase, fluorescence, super-résolution) afin de caractériser au mieux la mécano-transduction dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins. La manipulation d'échantillons biologiques est facilitée grâce à un accès libéré par le haut. Ce confort n'impacte pas la qualité des mesures de forces, qui est similaire aux montages usuels avec détection du signal transmis par la bille. Au contraire, la détection par réflexion permet en outre de mesurer précisément la hauteur de la bille piégée, ce qui est un atout pour l'étude des cellules endothéliales.

Annexe A

Protocole de fonctionnalisation des billes avec RGD

Ce protocole permet de fonctionnalisaer avec RGD (le trypeptide (Arg-Gly-Asp) des billes de polystyrène de 3 µm de diamètre avec une terminaison COOH. Il est basé sur un kit commercial "Protein Coupling Kit" de chez Polysciences.

Etape 1 : Rinçage des billes

- Prélever 235 µL de solution de billes du stock.
- Effectuer les opérations suivantes 2 fois :
  1. Passer au bain à ultrasons 5 min la solution pour casser les agrégats.
  2. Centrifuger 5 min à 200 g.
  3. Retirer le surnageant.
  4. Ajouter 100 µL de Polylink Coupling Buffer à la solution de billes restante.
- Renouveler une dernière fois les opérations 1 à 3, puis ajouter seulement 85 µL de Polylink Coupling Buffer.
- Agiter avec un vortex pour mélanger.

Etape 2 : Activation de la surface des billes

- Mélanger à la solution de bille 20 µL de la solution commerciale d'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride).
- Mélanger avec un vortex.
- Soniquer 5 min.
- Laisser incuber 30 min à température ambiante.

Etape 3 : Fixation du RGD

- Ajouter 100 à 250 µg de protéine
- Laisser incuber toute la nuit à 4 °C.

Etape 4 : Rinçage

- Effectuer les opérations suivantes 2 fois :
  1. Centrifuger 5 min à 200 g.
  2. Retirer le surnageant.

3. Ajouter 100 µL de Storage Buffer à la solution de billes restante.

- Renouveler une dernière fois les opérations 1 et 2, puis resuspendre dans 235 µL de Storage Buffer auquel on a ajouté de la BSA fraîche à 1g/L.
- Conserver la solution sous agitation permanente à 4 ° C.

Cette solution a théoriquement la même concentration en billes que la solution initiale.

Annexe B

Protocole de microstructuration du substrat

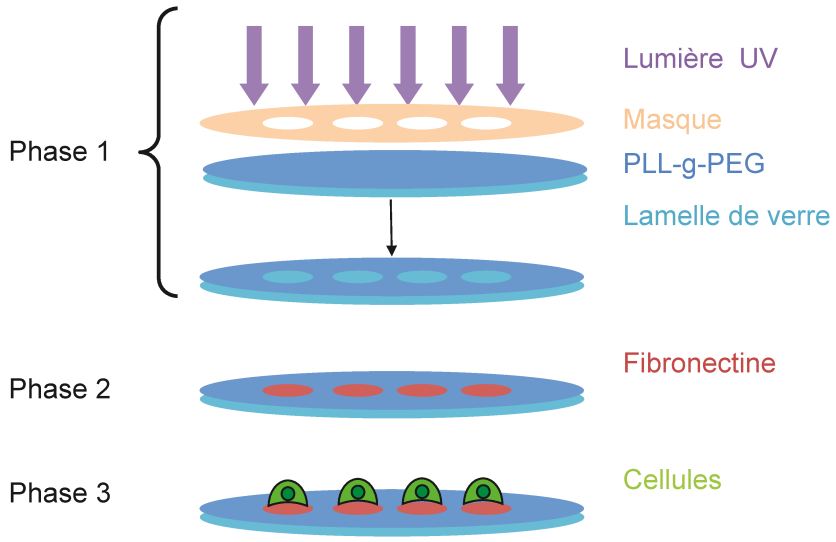


Figure B.1 – Principales étapes du protocole de microstructuration du substrat.

Pour miscrostructurer le substrat sur lequel adhèrent les cellules, le protocole suivant a été développé par Julie Lafaurie-Janvorre. Toutes les quantités sont données ici pour des lamelles de verre de 170 µm d'épaisseur et 2.5 cm de diamètre. En général plusieurs lamelles sont préparées en même temps.

Etape 1 : Dépôt de pLL-PEG sur les lamelles de verre.

Le poly-L-lysine-g-poly (éthylène glycol) (notée PEG dans la suite) est une poudre suspendue dans un tampon d'Hépès à 10 mM (pH=7.3), pour former une solution de concentration 0.1 mg/mL.

- Passer les lamelles de verre au plasma-cleaner.
- Déposer une goutte de 100 µL de PEG sur chaque lamelle.
- Laisser incuber pendant 45 min en protégeant avec une boîte les lamelles.
- Retirer l'excédent de PEG avec un papier absorbant et rincer à l'eau la lamelle.
- Laisser sécher les lamelles.

Etape 2 : Illumination des lamelles avec la lampe UV (première phase sur la figure B.1).

Cette étape permet de retirer une partie de la couche de PEG des lamelles selon un motif défini. Pour cela, un masque en chrome en combinaison avec une lampe ultra-violette (UV) est utilisé. En effet, le chrome réfléchit les rayons UV. Ainsi, en absence de chrome selon le motif choisi, les rayons UV sont transmis par le masque. En plaçant les lamelles sous le masque, les rayons UV vont atteindre le PEG, casser les liaisons, créant ainsi "un trou" dans la couche de PEG. Pour ce faire :

- Sur le masque déposer 2.8 µL d'eau distillée pour chaque chaque lamelle à traiter, de façon à ce que les lamelles se "collent" par capillarité au masque.
- Placer le masque de façon à ce qu'il se trouve entre la lampe et les lamelles.
- Illuminer les lamelles pendant 3 min.
- "Décoller" les lamelles avec un excédent d'eau, puis laisser sécher les lamelles.

Les lamelles sont à conserver au frigo séparément.

Etape 3 : Dépôt de la fibronectine (deuxième phase sur la figure B.1).

Le dépôt de fibronectine va permettre aux cellules de n'adhérer que sur les motifs. En effet, le PEG est une solution hydrophobe sur laquelle la fibronectine ne peut pas se déposer et les cellules ne pourront donc pas adhérer. Pour ce faire, une solution de fibronectine à 50 µg/mL diluée dans une solution tampon de NaHCO3 (pH = 8.6) est utilisée, comme il suit :

- Sur du parafilm collé à la table déposer autant de goutte de 100 µL de fibronectine que de lamelles à traiter.
- Déposer les lamelles sur chaque goutte, face PEG sur le parafilm.
- Laisser incuber 1h.
- Retirer l'excédent de fibronectine avec un papier absorbant.
- Placer chaque lamelle dans un puits contenant une solution de PBS.
- Rincer avec 25 mL de PBS en aspirant la solution de PBS usagée contenue dans le puits, tout en ajoutant la nouvelle solution au goutte à goutte en veillant de ne pas démouiller la lamelle.
- Rincer de même avec 8 mL de milieu de culture prélablement chauffé à 37 ° C.

Etape 4 : Adhésion des cellules sur les motifs (troisième phase sur la figure B.1). Les cellules n'ont plus qu'à être ajoutées délicatement avec la même technique d'aspiration et de dépôt goutte à goutte en répartissant sur toute la surface de la lamelle. Les cellules peuvent être utilisées après 3h d'incubation à 37 ° C (avec une régulation de 5% en CO_2) pour les expériences.

Annexe C

Etude de la fonction d'ajustement dans la méthode de la réponse à un échelon de position

D'après [Le Gall 2010], les courbes expérimentales de réponse de la bille à un échelon de position du piège doivent être ajustées avec la fonction :

$$f_{th}(t) = X_0 \alpha e^{-t/t_b} + X_0(1-\alpha)\frac{t_b}{t_b - t_d}\left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d}\right) \tag{C.1}$$

A partir de cet ajustement, les paramètres t_b et X_0 calculés donnent accès à la constante de raideur du piège et au facteur de conversion des données acquises par le détecteur. Il est donc important de les déterminer précisément. Or, dans cette fonction, les paramètres α et t_d liés au détecteur ne sont pas connus a priori. Ceci est problématique car X_0 et α ne sont pas découplés ce qui conduit à une indétermination numérique.

L'objet de cette étude est d'évaluer la fiabilité de la fonction d'ajustement C.1. Pour cela, des courbes de réponse à un échelon de position sont simulées à partir de cette même expression, puis elles sont ajustées avec cette fonction. L'écart entre les paramètres de sortie, issus de l'ajustement, et les paramètres d'entrée, permettant de générer la courbe simulée, témoigne de la fiabilité de l'ajustement par cette fonction. Afin de déterminer l'apport et la pertinence du paramètre α, une seconde fonction d'ajustement est considérée. Dans cette fonction, le paramètre α est supposé nul. La fonction s'écrit alors :

$$f_{\alpha=0}(t) = X_0\frac{t_b}{t_b - t_d}\left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d}\right) \tag{C.2}$$

Dans cette étude, je vais d'abord indiquer comment les courbes de réponse à un échelon de position sont générées, puis je présenterai le programme permettant d'ajuster les courbes selon les deux fonctions C.1 et C.2. Enfin, les résultats de la fiabilité des ajustements selon les deux fonctions seront comparées, donnant lieu au choix de celle qui est la plus appropriée dans nos conditions expérimentales.

C.1 Simulation des courbes de réponse à un échelon de position

Les courbes de réponse à un échelon de position sont générées à partir d'un jeu de paramètres (X_0, α, t_b et t_d) et de la fonction théorique C.1. Pour se placer dans des conditions proches de l'expérience, ces paramètres ont été estimés à partir des données de la courbe expérimentale de la figure C.1. On obtient alors : $X_0 = 0.1$ ΔV/V, $t_b = 300$ µs et $t_d = 30$ µs. La valeur de α est estimée à environ 5% (cf. partie 4.1.1.2).

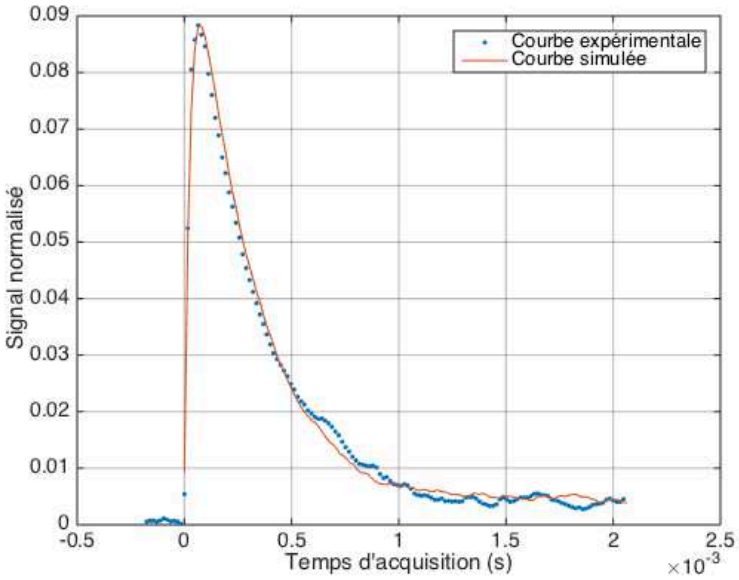


FIGURE C.1 – Superposition d'une courbe expérimentale et d'une courbe simulée. La courbe expérimentale correspond à la réponse à un échelon de position montrée en figure 4.2. La courbe simulée est générée à partir d'une estimation des paramètres de la courbe expérimentale et de la fonction d'ajustement C.1. On a alors $X_0 = 0.11$ ΔV/V, $t_b = 280$ µs et $t_d = 30$ µs, $\alpha = 5\%$ et l'amplitude du bruit prise à 5%. Il est à noter que l'axe des abscisses a volontairement été translaté afin que le premier point coïncide avec le temps $t = 0$ pour faciliter l'appréciation des échelles de temps.

Afin de reproduire fidèlement les données expérimentales, il est nécessaire d'ajouter du bruit sur la courbe. Pour cela, une analyse fréquentielle du bruit obtenu sur les données expérimentales lorsque la bille est au centre du piège a été réalisée. Même après moyennage de 30 allers-retours, les résidus du mouvement brownien représentent le bruit prépondérant. En effet, le spectre a une allure de filtre passe-bas dont la fréquence de coupure est la même que celle du piège. Ce bruit est donc modélisé par un filtre passe-bas du premier ordre dont l'amplitude est ajustable.

Ce bruit est intimement lié aux conditions expérimentales et notamment au nombre d'allers-retours moyennés. Il est donc variable. Pour rester dans des conditions proches de l'expérience, dans les simulations, l'amplitude du bruit varie entre 0 et 10%. Il est d'ailleurs intéressant de vérifier la fiabilité des résultats de l'ajustement selon l'amplitude du bruit, prouvant ainsi la robustesse de la fonction d'ajustement. A titre d'exemple sur la figure C.1, la courbe simulée à partir des paramètres évalués et pour une amplitude de bruit de 5% a été superposée à la courbe expérimentale sur la figure 4.2.

Ainsi, pour générer une courbe simulée, pour chaque paramètres d'entrée (X_0, α, t_b, t_d et α), la valeur du paramètre considéré est tirée dans un intervalle centré autour d'une valeur moyenne donnée, avec une distribution gaussienne et un écart de 10% [1]. Les valeurs moyennes pour chaque paramètre correspondent aux valeurs indiquées précédemment : $X_0 = 0.1$ ΔV/V, $t_b = 300$ µs et $t_d = 30$ µs et $\alpha = 5\%$. A la courbe ainsi générée est ajouté un bruit dont l'amplitude varie. Cette amplitude prend différentes valeurs : 0 pour référence, 2.5% (valeur intermédiaire), 5% (le plus proche des conditions expérimentales des résultats présentés dans du chapitre 4), et 10% (estimation haute du bruit présent sur des données expérimentales).

C.2 Programme permettant l'ajustement

Afin d'ajuster les courbes simulées, un programme a été mis au point. Dans un premier temps, il permet d'estimer les paramètres t_b, X_0 et t_d, qui servent ensuite de points de départ pour l'ajustement. Cela rend le programme totalement autonome à l'intervention de l'utilisateur qui n'a à rentrer aucun point de départ des paramètres. Ensuite, l'ajustement de la courbe est effectué soit avec la fonction C.2, soit avec la fonction C.1. Les étapes du programme sont les suivantes :

1. Estimation de t_b et X_0. Celle-ci repose sur le fait que le temps t_b contribue majoritairement à la décroissance exponentielle située après le maximum de la courbe qui peut être approximé à l'amplitude X_0. Ainsi, cette partie de la courbe est ajustée par une exponentielle décroissante de la forme $A\ e^{-t/t_b}$. Cela donne une estimation des valeurs de t_b et de X_0, prises comme point de départ.
2. Estimation de t_d. Le temps t_d de décroissance exponentielle est beaucoup plus court que le temps t_b et contribue majoritairement au tout début de la courbe. Il est estimé par le coefficient directeur de la droite formée par les deux premiers points de la courbe.
3. Ajustement de toute la courbe en considérant que $\alpha = 0$ selon la fonction C.2 à partir de la fonction suivante :
$$f(t) = A' \left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d} \right) \tag{C.3}$$

1. Nous avons vérifié que quel que soit l'écart, cela ne modifiait pas significativement les résultats.

Les valeurs de A', t_b et t_d permettent de déduire X_0 puisque $A' = X_0 \frac{t_b}{t_b - t_d}$.

4. Ajustement avec le paramètre α selon la fonction C.1, à partir de la fonction :

$$f(t) = A''(1-\alpha)\left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d}\right) + B''\alpha e^{-t/t_b} \tag{C.4}$$

réécrite de façon à limiter le nombre de paramètres. Il vient alors :

$$\begin{cases} A'' &= X_0(1-\alpha)\frac{t_b}{t_b - t_d} \\ B'' &= X_0\ \alpha \end{cases} \tag{C.5}$$

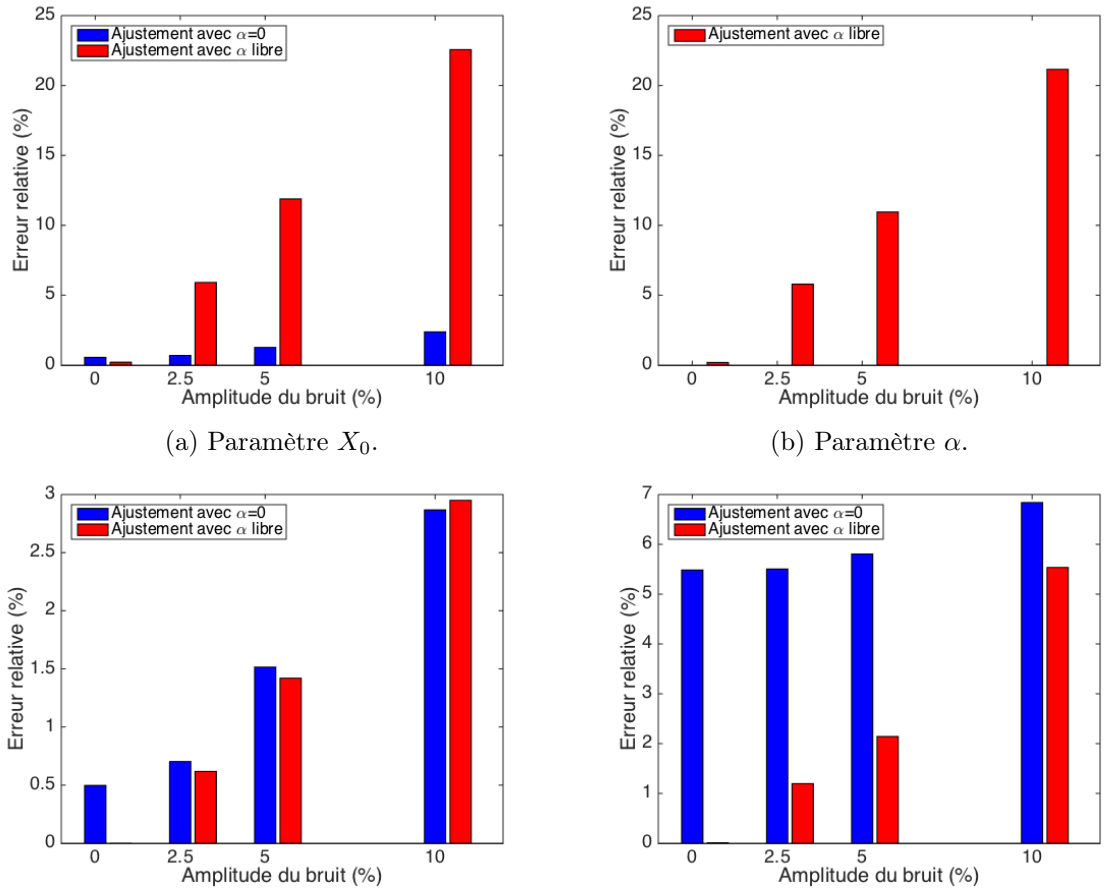
qui permettent de déduire les valeurs de X_0 et α à partir de la détermination de t_b et t_d.

C.3 Comparaison de la fiabilité et de la robustesse des deux fonctions d'ajustement

Afin de comparer la fiabilité et la robustesse des deux fonctions d'ajustement, 100 courbes sont simulées à partir de 100 jeux de paramètres différents pour chacune des amplitudes de bruit. Chaque courbe est ajustée grâce au programme décrit ci-dessus. Ce programme fournit alors les paramètres ajustés selon chacune des deux fonctions C.1 et C.2, pour chaque réalisation. A partir des 100 résultats obtenus pour chaque amplitude de bruit, la moyenne de la valeur absolue des erreurs relatives entre les paramètres de sortie et les paramètres d'entrée est calculée, et cela pour chaque paramètre. Les résultats sont présentés sur la figure C.2 sous forme de diagramme bâton indiquant la valeur moyenne de la valeur absolue de l'écart relatif entre les valeurs de sortie et d'entrée, pour les deux fonctions d'ajustement.

Dans le cas où il n'y a aucun bruit, l'ajustement avec le paramètre α fournit par construction des résultats sans aucune erreur alors que l'ajustement simplifié ($\alpha = 0$) donne quelques pourcents d'erreur pour les paramètres X_0 et t_b et environ 5% pour t_d. En revanche, lorsque le bruit augmente, l'ajustement avec α conduit à des erreurs relatives très importantes pour X_0 ce qui induirait des erreurs équivalentes sur la calibration du détecteur. A contrario l'ajustement simplifié fournit des erreurs nettement inférieures ($<5\%$) et quasiment indépendantes du bruit pour les deux paramètres d'intérêt X_0 et t_b.

Sur la figure C.3, pour chaque paramètre la valeur de sortie est représentée par rapport à la valeur d'entrée pour les 100 tirages pour un bruit de 5% avec chacune des deux fonctions d'ajustement. C'est à partir de ces valeurs que les valeurs moyennes de l'erreur présentées sur la figure C.2 sont estimées. Sur les figures C.3a, C.3b, C.3d, et C.3e, on constate que pour tous les paramètres estimés à partir de l'ajustement simplifié, les valeurs étant de part et d'autre de la droite idéale, il n'y a pas de tendance à la sur ou à la sous-estimation. Le paramètre X_0 est effectivement très mal estimé dans le cas de l'ajustement faisant intervenir le paramètre α à cause du produit $X_0 * \alpha$ qui intervient dans la formule. Cela se retrouve sur la figure C.3c représentant le produit $X_0 * \alpha$ qui, bien qu'il ne suive pas exactement une courbe linéaire comme on aurait pu s'y attendre, montre néanmoins une dépendance entre X_0 et α.



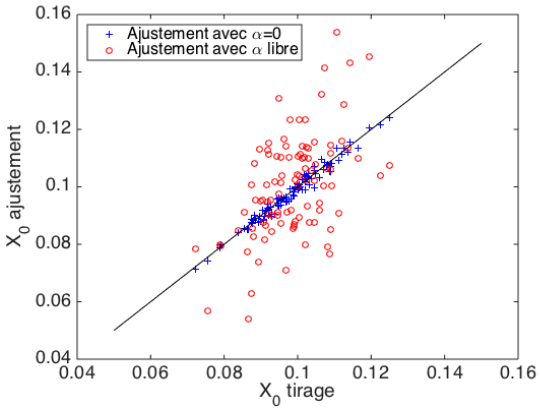
(a) Paramètre X_0.

(b) Paramètre α.

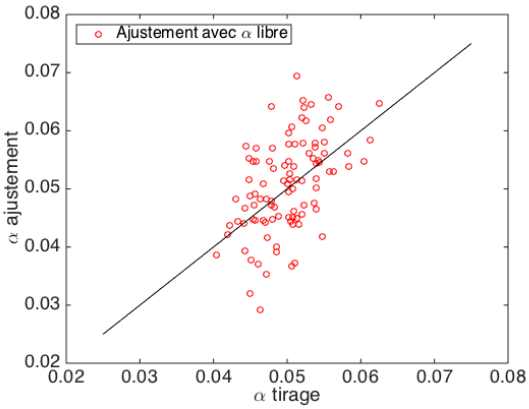
(c) Paramètre t_b.

(d) Paramètre t_d.

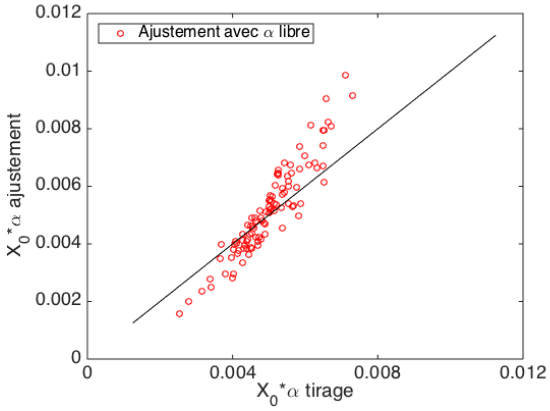
FIGURE C.2 – Résultats des simulations donnant la valeur moyenne des erreurs faites pour chacune des fonctions d'ajustement avec le paramètre α (en rouge) ou sans (en bleu) pour des valeurs d'entrée tirées autour de $X_0 = 0.1\Delta V/V$, $t_b = 300\mu s$ et $t_d = 30\mu s$, $\alpha = 5\%$ pour différentes amplitudes de bruit : 0, 2,5%, 5% et 10%.



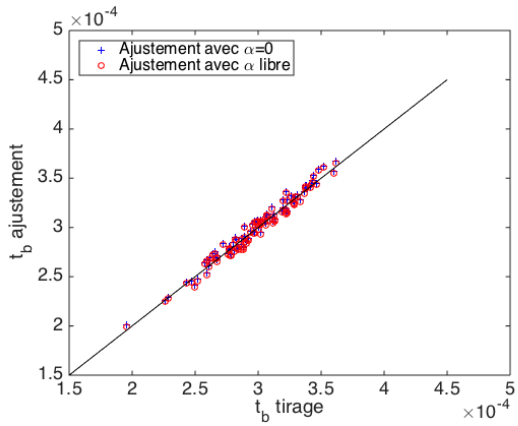
(a) Paramètre X_0.



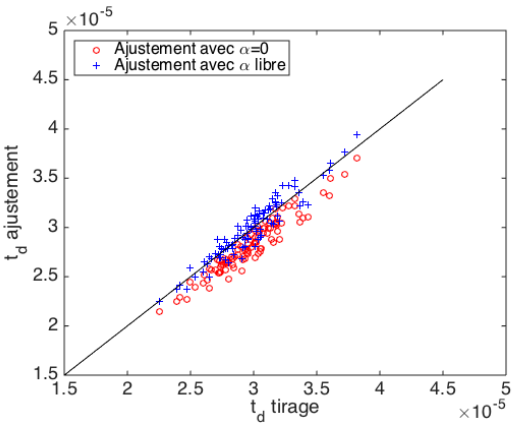
(b) Paramètre α.



(c) Produit $X_0 * \alpha$.



(d) Paramètre t_b.



(e) Paramètre t_d.

FIGURE C.3 – Résultats des simulations donnant la valeur de sortie après ajustement avec α (en rouge) et sans (en bleu) en fonction de la valeur d'entrée pour chaque paramètre X_0, α, t_b et t_d pour des valeurs d'entrée tirées autour de $X_0 = 0.1\Delta V/V$, $t_b = 300\mu s$ et $t_d = 30\mu s$, $\alpha = 5\%$ et une amplitude de bruit de 5%. La figure C.3c montre la dépendance des paramètres X_0 et α.

C.4 Conclusion sur l'étude de l'ajustement

Ainsi, l'ajustement suivant la formule théorique C.1 faisant intervenir le paramètre α semble beaucoup trop sensible à la présence de bruit qui existe forcément sur des courbes expérimentales. Même sur des courbes simulées à partir de cette expression, le programme peine à retrouver les paramètres d'entrée et en particulier à déterminer numériquement les paramètres X_0 et α de façon indépendante. Le paramètre X_0 étant indispensable pour déterminer la calibration du détecteur, il est important d'en avoir une estimation fiable. En ce qui concerne le paramètre t_b, qui lui permet de déterminer ensuite la constante de raideur du piège, les deux méthodes fournissent des erreurs comparables et totalement acceptables. Nous avons cependant moins d'exigence vis-à-vis du retard t_d qui présente une valeur estimée avec environ 10% d'erreur quelle que soit la fonction d'ajustement. Etant donné que ce temps est lié à la partie croissante de la courbe décrite par seulement quelques points de mesure, il n'est pas étonnant d'avoir une erreur plus importante.

En conclusion, pour ajuster les courbes expérimentales nous conserverons l'expression considérant que le paramètre α est nul. Cette étude permet également d'estimer nos erreurs numériques de l'ordre de quelques pourcents pour nos deux paramètres d'intérêts X_0 et t_b et d'environ 10% pour le retard t_d.

Annexe D

Comparaison des mesures de raideur dans les directions x et y

Dans cette annexe sont regroupés les résultats de mesure de raideur du piège dans les directions x et y, obtenus à partir des quatre méthodes de calibration : la réponse à un échelon de position, l'analyse de la densité spectrale de puissance, l'inférence bayésienne et l'application du théorème de l'équipartition. Les résultats présentés sont représentés sur les figures D.1 et D.2 et correspondent respectivement aux mesures de la raideur en fonction de la hauteur et de la puissance, en lien avec les parties 4.3.2 et 4.3.3. Ces résultats sont présentés dans deux sections distinctes.

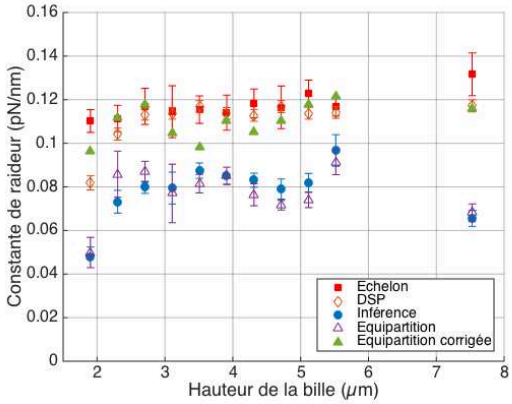
N.B. Les résultats présentés dans cette annexe dans la direction x sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre 4.

D.1 Mesures en fonction de la hauteur

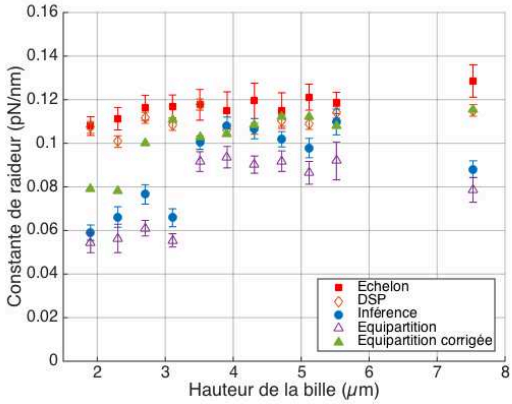
Premièrement, la comparaison des résultats dans les directions x et y à partir des figures D.1a et b indiquent que la raideur déterminée à partir des différentes méthodes est du même ordre de grandeur, notamment pour les valeurs obtenues à partir de la réponse à un échelon de position et de l'analyse de la densité spectrale de puissance. Ceci indique que le piège est bien symétrique.

De plus, comme mentionné dans la partie 4.3.2, on distingue deux familles de résultats : ceux fournis par les deux méthodes citées ci-dessus d'un côté et ceux fournis par l'inférence bayesienne et l'application du théorème de l'équipartition de l'autre. Ces écarts sont attribués à la présence de bruit basse fréquence dans les deux directions. En effet, l'estimation de la proportion de bruit conduit à corriger les valeurs de raideur obtenues par l'application du théorème de l'équipartition. Dans la majorité des cas les valeurs corrigées sont réhaussées au niveau de celles fournies par la réponse à un échelon de position et par la densité spectrale de puissance.

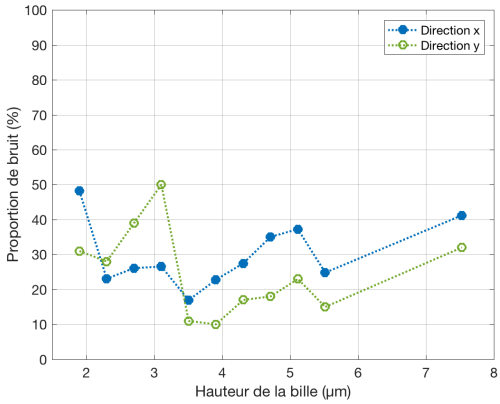
La figure D.1c représente la proportion de bruit, telle que définie dans le chapitre 4, présente dans chaque acquisition du mouvement brownien en fonction de la hauteur, dans les directions x et y. Les proportions de bruit dans la direction x sont généralement supérieures à celles sur y de 10%. Dans les deux directions, une transition rapide de la proportion de bruit est observée : dans la direction x entre la hauteur la plus faible (1.9 µm) et la suivante (2.3 µm), et dans la direction y entre les hauteurs 3.1 et 3.5 µm. Afin de comprendre plus en détail le comportement du bruit, nous allons nous appuyer sur la densité spectrale de puissance du mouvement brownien acquis pour chaque hauteur dans les deux directions. Elles sont représentées en agrandissant sur les basses fréquences sur les figures D.1d et e respectivement.



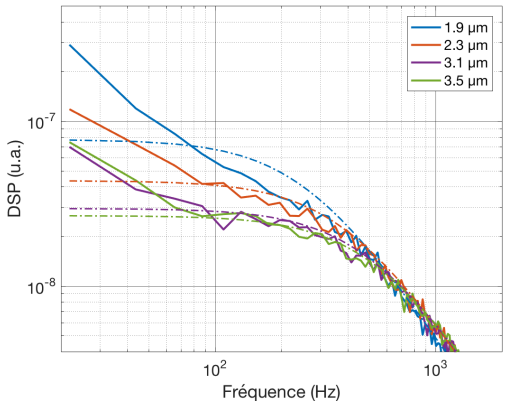
(a) Constantes de raideur dans la direction x.



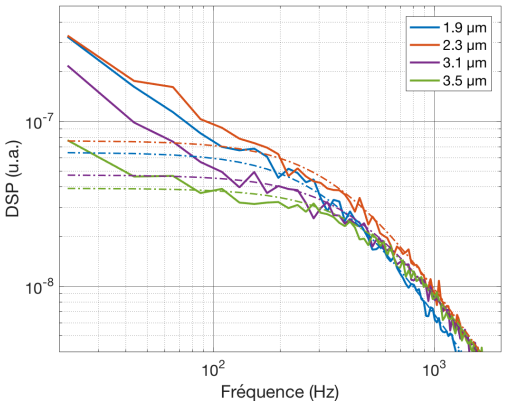
(b) Constantes de raideur dans la direction y.



(c) Proportions de bruit dans les deux directions.



(d) Densités spectrales de puissance dans la direction x.



(e) Densités spectrales de puissance dans la direction y.

FIGURE D.1 – Comparaison des mesures de raideur en fonction de la hauteur de la bille à partir des quatre méthodes de calibration dans les directions x et y (figures (a) et(b) respectivement). (c) Proportion de bruit pour chaque trajectoire de mouvement brownien acquise, dans les direction x et y. (d) et (e) Densités spectrales de puissances du mouvement brownien acquis pour quelques hauteurs particulières, dans les directions x et y respectivement. La puissance du laser vaut 230 mW.

Dans la direction x (cf. partie 4.3.2), nous avons vu que pour la hauteur la plus faible, la séparation fréquentielle entre le bruit et la fréquence de coupure du piège n'était pas suffisante pour ajuster correctement le spectre de puissance en s'affranchissant du bruit (cf. figure D.1d). Ceci conduit alors à une quantification du bruit peu fiable et sous-estimée. Cet effet se traduit par un accord moindre entre la valeur de la raideur déterminée par la réponse à un échelon de position et celle obtenue par l'analyse de la densité spectrale de puissance ou l'application du théorème de l'équipartititon à partir de la variance corrigée (cf. figure D.1a). A partir de la hauteur à 2.3 µm, les fréquences sont suffisamment bien séparées pour ajuster correctement les courbes et donc la quantification du bruit est plus fiable et les valeurs corrigées pour l'application du théorème de l'équipartition correspondent à celles obtenues par la réponse à un échelon de position.

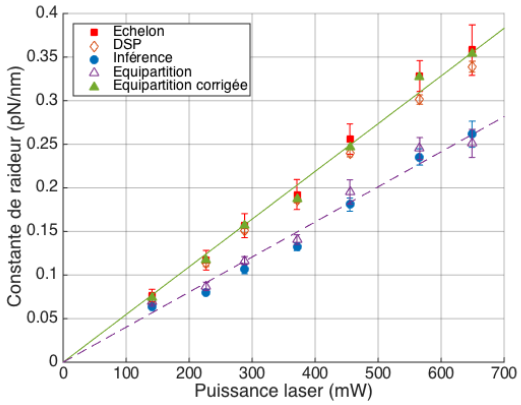
Dans la direction y, le même problème de séparation des domaines fréquentiels est observé pour la hauteur la plus faible, induisant les mêmes conséquences que dans la direction x (cf. D.1e). Pour le signal acquis à 2.3 µm, le bruit s'étend sur des fréquences un peu plus élevées conduisant également à une séparation difficile des domaines fréquentiel du bruit et de la fréquence de coupure, d'où un ajustement du spectre peu fiable et des accords entre les mesures de raideurs moindre que dans la direction x pour cette même hauteur (cf. figure D.1b). A partir de la hauteur à 2.7 µm, la séparation est plus facile et l'accord entre les valeurs corrigées obtenues à partir l'application du théorème de l'équipartition et celles obtenues par les deux autres méthodes est bien meilleur, ce qui traduit une fiabilité de l'estimation de bruit bien meilleure. De fait, le saut de niveau de bruit sur la voie y entre les hauteurs 3.1 et 3.5 µm, observé sur la figure D.1c, ne peut pas être attribué à une mauvaise estimation du bruit due à un recouvrement des domaines fréquentiels. Il s'agit donc bien d'un changement de bruit sur l'expérience. A ce jour, son origine reste indéterminée.

D.2 Mesures en fonction de la puissance

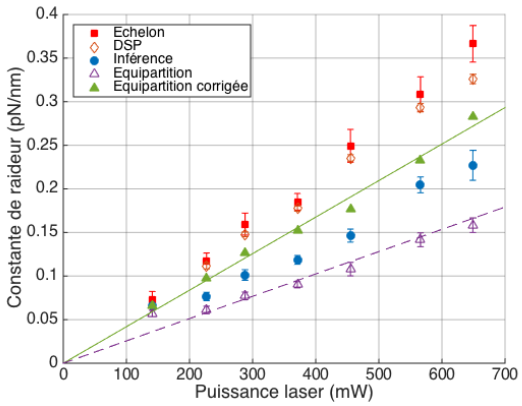
D'après les figures D.2a et b, dans les deux directions x et y, les raideurs sont du même ordre de grandeur et présentent un comportement linéaire avec la puissance comme attendu. Notamment, pour la méthode de la réponse à un échelon de position, les pentes dans les directions x et y sont respectivement de 0.55 et 0.53 pN/nm/W, témoignant d'un piège symétrique.

On peut remarquer qu'en fonction de la puissance, mis à part pour la puissance la plus faible, la proportion de bruit est quasi constante (cf. figure D.2c). Ceci explique la dépendance linéaire dans les directions x et y pour les raideurs obtenues à partir de l'inférence bayesienne et l'équipartititon malgré la présence de bruit (cf. figure D.2a et b). Cette quasi constance traduit le fait que l'amplitude du bruit diminue quand la puissance du laser augmente, ce qui est assez contre-intuitif. Enfin, on peut également noter que le bruit dans la direction x est plus faible que dans la direction y (25% contre 40% en moyenne).

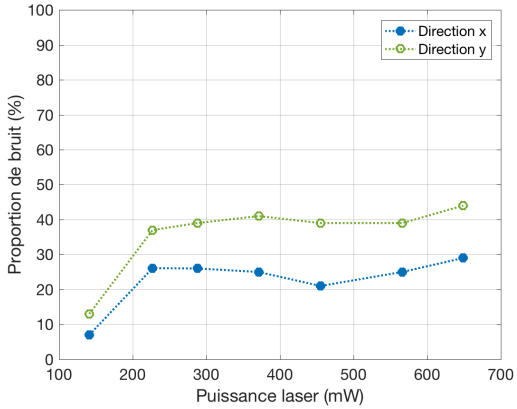
Comme mentionné dans la partie 4.3.3, on distingue deux familles de résultats : ceux fournis par les deux méthodes citées ci-dessus d'un côté et ceux fournis par l'inférence bayesienne et l'application du théorème de l'équipartition de l'autre. Comme expliqué dans le chapitre 4, dans la direction x ces écarts sont attribués à la présence de bruit basse fréquence, comme en témoigne le très bon accord des valeurs obtenues après correction de la variance par l'application du théorème de l'équipartition (cf. figure D.2a).



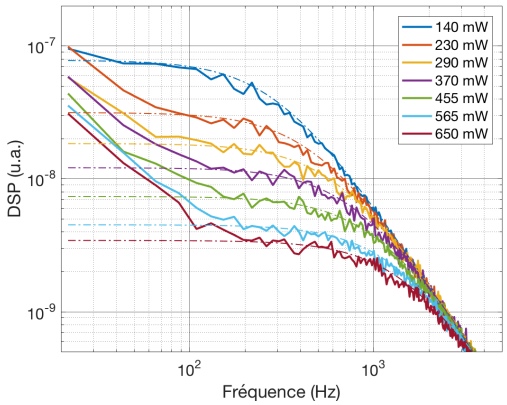
(a) Constantes de raideur dans la direction x.



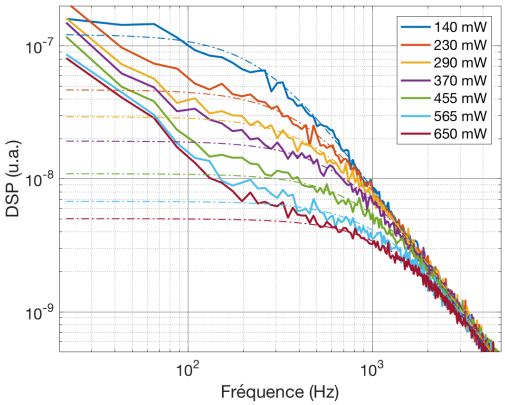
(b) Constantes de raideur dans la direction y.



(c) Proportions de bruit dans les deux directions.



(d) Densités spectrales de puissance dans la direction x.



(e) Densités spectrales de puissance dans la direction y.

FIGURE D.2 – Comparaison des mesures de raideur en fonction de la puissance du laser à partir des quatre méthodes de calibration dans les directions x et y (figures (a) et(b) respectivement). (c) Proportion de bruit pour chaque trajectoire de mouvement brownien acquise, dans les direction x et y. (d) et (e) Densités spectrales de puissances du mouvement brownien acquis chaque puissance, dans les directions x et y respectivement. La bille est piégée à une hauteur de 2.7 µm.

En revanche, dans la direction y, même après correction des valeurs de variances, les valeurs déduites par l'application du théorème de l'équipartition sont toujours inférieures à celles obtenues par la réponse à un échelon de position ou par l'analyse de la densité spectrale de puissance. Bien que l'ajustement des spectres de puissance semble correct (cf. figure D.2e), ces résultats amènent à penser que la séparation fréquentielle entre le bruit et la fréquence de coupure du piège n'est pas totalement valable ici. En effet, une comparaison des domaines fréquentiels du bruit dans les directions x et y montre que le bruit atteint des fréquences plus élevées dans la direction y que dans la direction x. Cette mauvaise séparation des domaines fréquentiels induit alors une sous-estimation de la proportion de bruit.

Conclusion Les mesures de raideur en fonction de la hauteur et de la puissance dans les directions x et y, obtenues par la réponse à un échelon de position et l'analyse de la densité spectrale de puissance, témoignent d'un piège symétrique. Le signal du mouvement brownien acquis indique un comportement différent selon les directions x et y se traduisant sur les valeurs déduites par l'inférence bayesienne et l'application du théorème de l'équipartititon. Cette différence est visible sur les densités spectrales de puissance. En effet, pour une même trajectoire, l'amplitude et le spectre du bruit peuvent être différents dans les deux directions, et varient d'une trajectoire à l'autre, et parfois même de façon très abrupte. Il serait donc nécessaire de mener une étude plus approfondie pour déterminer l'origine de ce bruit afin de pouvoir l'éliminer.

Bibliographie

[Ashkin 1970] Arthur Ashkin. *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure.* Physical review letters, vol. 24, no. 4, page 156, 1970. (Cité en page 29.)

[Ashkin 1986] Arthur Ashkin, JM Dziedzic, JE Bjorkholm et Steven Chu. *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles.* Optics letters, vol. 11, no. 5, pages 288–290, 1986. (Cité en pages 30 et 35.)

[Ashkin 1992] Arthur Ashkin. *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.* Biophysical journal, vol. 61, no. 2, page 569, 1992. (Cité en page 33.)

[Ayala 2016] Yareni A Ayala, Bruno Pontes, Diney S Ether, Luis B Pires, Glauber R Araujo, Susana Frases, Luciana F Romão, Marcos Farina, Vivaldo Moura-Neto, Nathan B Viana*et al.* *Rheological properties of cells measured by optical tweezers.* BMC biophysics, vol. 9, no. 1, page 5, 2016. (Cité en page 24.)

[Balland 2005] Martial Balland, Alain Richert et François Gallet. *The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts.* European Biophysics Journal, vol. 34, no. 3, pages 255–261, 2005. (Cité en page 22.)

[Balland 2006] Martial Balland, Nicolas Desprat, Delphine Icard, Sophie Féréol, Atef Asnacios, Julien Browaeys, Sylvie Hénon et François Gallet. *Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling.* Physical Review E, vol. 74, no. 2, page 021911, 2006. (Cité en pages 22 et 23.)

[Barakat 2013] Abdul I Barakat. *Blood flow and arterial endothelial dysfunction : mechanisms and implications.* Comptes Rendus Physique, vol. 14, no. 6, pages 479–496, 2013. (Cité en pages 5, 6, 9 et 10.)

[Beaurepaire 1998] E Beaurepaire, A Claude Boccara, M Lebec, L Blanchot et H Saint-Jalmes. *Full-field optical coherence microscopy.* Optics letters, vol. 23, no. 4, pages 244–246, 1998. (Cité en page 28.)

[Berg-Sørensen 2003] Kirstine Berg-Sørensen, Lene Oddershede, Ernst-Ludwig Florin et Henrik Flyvbjerg. *Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers.* Journal of applied physics, vol. 93, no. 6, pages 3167–3176, 2003. (Cité en pages 48 et 52.)

[Berg-Sørensen 2004] Kirstine Berg-Sørensen et Henrik Flyvbjerg. *Power spectrum analysis for optical tweezers.* Review of Scientific Instruments, vol. 75, no. 3, pages 594–612, 2004. (Cité en pages 45, 46 et 47.)

[Bormuth 2008] Volker Bormuth, Anita Jannasch, Marcel Ander, Carlos M van Kats, Alfons van Blaaderen, Jonathon Howard et Erik Schäffer. *Optical trapping of coated microspheres.* Optics express, vol. 16, no. 18, pages 13831–13844, 2008. (Cité en pages 69 et 70.)

[Chien 2007] Shu Chien. *Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis : the wisdom of the cell.* American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, vol. 292, no. 3, pages H1209–H1224, 2007. (Cité en pages 10 et 12.)

[Davies 1994] Peter F Davies, Andre Robotewskyj et Melvin L Griem. *Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces.* Journal of Clinical Investigation, vol. 93, no. 5, page 2031, 1994. (Cité en page 10.)

[Davies 1995] Peter F Davies. *Flow-mediated endothelial mechanotransduction.* Physiological reviews, vol. 75, no. 3, pages 519–560, 1995. (Cité en pages 10, 14 et 58.)

[Davies 2009] Peter F Davies. *Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology.* Nature clinical practice Cardiovascular medicine, vol. 6, no. 1, pages 16–26, 2009. (Cité en pages 11 et 13.)

[Deguchi 2006] Shinji Deguchi, Toshiro Ohashi et Masaaki Sato. *Tensile properties of single stress fibers isolated from cultured vascular smooth muscle cells.* Journal of biomechanics, vol. 39, no. 14, pages 2603–2610, 2006. (Cité en page 10.)

[Dubois 2002] Arnaud Dubois, Laurent Vabre, Albert-Claude Boccara et Emmanuel Beaurepaire. *High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope.* Applied optics, vol. 41, no. 4, pages 805–812, 2002. (Cité en page 28.)

[Fällman 2003] Erik Fällman et Ove Axner. *Influence of a glass-water interface on the on-axis trapping of micrometer-sized spherical objects by optical tweezers.* Applied optics, vol. 42, no. 19, pages 3915–3926, 2003. (Cité en pages 63, 66 et 156.)

[Felsenfeld 1999] Dan P Felsenfeld, Pamela L Schwartzberg, Ana Venegas, Richard Tse et Michael P Sheetz. *Selective regulation of integrin–cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src.* Nature Cell Biology, vol. 1, no. 4, pages 200–206, 1999. (Cité en page 15.)

[Galbraith 1998] CG Galbraith, R Skalak et S Chien. *Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton.* Cell motility and the cytoskeleton, vol. 40, no. 4, pages 317–330, 1998. (Cité en page 10.)

[Gittes 1998] Frederick Gittes et Christoph F Schmidt. *Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers.* Optics letters, vol. 23, no. 1, pages 7–9, 1998. (Cité en page 37.)

[Gouget 2016] Cecile LM Gouget, Yongyun Hwang et Abdul I Barakat. *Model of cellular mechanotransduction via actin stress fibers.* Biomechanics and modeling in mechanobiology, vol. 15, no. 2, pages 331–344, 2016. (Cité en page 19.)

[Hahn 2009] Cornelia Hahn et Martin A Schwartz. *Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 10, no. 1, pages 53–62, 2009. (Cité en pages 5, 6, 7, 9 et 10.)

[Hansen 2006] Poul Martin Hansen, Iva Marija Tolić-Nørrelykke, Henrik Flyvbjerg et Kirstine Berg-Sørensen. *tweezercalib 2.0 : Faster version of MatLab package for precise calibration of optical tweezers.* Computer physics communications, vol. 174, no. 6, pages 518–520, 2006. (Cité en pages 48, 141, 159 et 168.)

[Hu 2003] Shaohua Hu, Jianxin Chen, Ben Fabry, Yasushi Numaguchi, Andrew Gouldstone, Donald E Ingber, Jeffrey J Fredberg, James P Butler et Ning Wang. *Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 285, no. 5, pages C1082–C1090, 2003. (Cité en pages 14, 15, 58 et 70.)

[Hu 2004] Shaohua Hu, Luc Eberhard, Jianxin Chen, J Christopher Love, James P Butler, Jeffrey J Fredberg, George M Whitesides et Ning Wang. *Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 287, no. 5, pages C1184–C1191, 2004. (Cité en pages 14, 15, 16, 21, 27, 58 et 70.)

[Hu 2005] Shaohua Hu, Jianxin Chen, James P Butler et Ning Wang. *Prestress mediates force propagation into the nucleus.* Biochemical and biophysical research communications, vol. 329, no. 2, pages 423–428, 2005. (Cité en pages 14, 15, 21, 58 et 70.)

[Huang 1991] David Huang, Eric A Swanson, Charles P Lin, Joel S Schuman, William G Stinson, Warren Chang, Michael R Hee, Thomas Flotte, Kenton Gregory, Carmen A Puliafito*et al. Optical coherence tomography.* Science (New York, NY), vol. 254, no. 5035, page 1178, 1991. (Cité en page 28.)

[Huhle 2015] Alexander Huhle, Daniel Klaue, Hergen Brutzer, Peter Daldrop, Sihwa Joo, Oliver Otto, Ulrich F Keyser et Ralf Seidel. *Camera-based three-dimensional real-time particle tracking at kHz rates and Ångström accuracy.* Nature communications, vol. 6, 2015. (Cité en page 79.)

[Huisstede 2005] J Huisstede, K van der Werf, M Bennink et V Subramaniam. *Force detection in optical tweezers using backscattered light.* Optics express, vol. 13, no. 4, pages 1113–1123, 2005. (Cité en pages 42, 43 et 85.)

[Hwang 2012a] Yongyun Hwang et Abdul I Barakat. *Dynamics of mechanical signal transmission through prestressed stress fibers.* PloS one, vol. 7, no. 4, page e35343, 2012. (Cité en page 19.)

[Hwang 2012b] Yongyun Hwang, Cecile LM Gouget et Abdul I Barakat. *Mechanisms of cytoskeleton-mediated mechanical signal transmission in cells.* Communicative & integrative biology, vol. 5, no. 6, pages 538–542, 2012. (Cité en pages 19 et 20.)

[Kumar 2006] Sanjay Kumar, Iva Z Maxwell, Alexander Heisterkamp, Thomas R Polte, Tanmay P Lele, Matthew Salanga, Eric Mazur et Donald E Ingber. *Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics.* Biophysical journal, vol. 90, no. 10, pages 3762–3773, 2006. (Cité en page 10.)

[Le Gall 2010] Antoine Le Gall, Karen Perronet, David Dulin, André Villing, Philippe Bouyer, Koen Visscher et Nathalie Westbrook. *Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response.* Optics express, vol. 18, no. 25, pages 26469–26474, 2010. (Cité en pages 38, 44, 50, 52, 53, 137, 138 et 177.)

[Libby 2002] Peter Libby, Paul M Ridker et Attilio Maseri. *Inflammation and atherosclerosis.* Circulation, vol. 105, no. 9, pages 1135–1143, 2002. (Cité en pages 6 et 8.)

[Lum 2000] R.M. Lum, L.M. Wiley et A.I. Barakat. *Influence of different forms of fluid shear stress on vascular endothelial TGF-ßl mRNA expression.* International Journal of molecular Medicine, vol. 5, pages 635–641, 2000. (Cité en page 11.)

[Mahamdeh 2011] Mohammed Mahamdeh, Citlali Pérez Campos et Erik Schäffer. *Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers.* Optics express, vol. 19, no. 12, pages 11759–11768, 2011. (Cité en pages 64, 65 et 66.)

[Mahmoudi 2010] Ali Mahmoudi et S Nader S Reihani. *Phase contrast optical tweezers*. Optics express, vol. 18, no. 17, pages 17983–17996, 2010. (Cité en pages 40 et 56.)

[Maniotis 1997] Andrew J Maniotis, Christopher S Chen et Donald E Ingber. *Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 94, no. 3, pages 849–854, 1997. (Cité en page 14.)

[Masson 2009] J-B Masson, Didier Casanova, Silvan Türkcan, Guillaume Voisinne, Michel-Robert Popoff, Massimo Vergassola et Antigoni Alexandrou. *Inferring maps of forces inside cell membrane microdomains*. Physical review letters, vol. 102, no. 4, page 048103, 2009. (Cité en page 49.)

[Misawa 1991] Hiroaki Misawa, Masanori Koshioka, Keiji Sasaki, Noboru Kitamura et Hiroshi Masuhara. *Three-dimensional optical trapping and laser ablation of a single polymer latex particle in water*. Journal of applied physics, vol. 70, no. 7, pages 3829–3836, 1991. (Cité en page 65.)

[Mofrad 2006] Mohammad RK Mofrad et Roger D Kamm. Cytoskeletal mechanics : models and measurements in cell mechanics. Cambridge University Press, 2006. (Cité en page 10.)

[Na 2008] Sungsoo Na, Olivier Collin, Farhan Chowdhury, Bernard Tay, Mingxing Ouyang, Yingxiao Wang et Ning Wang. *Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105, no. 18, pages 6626–6631, 2008. (Cité en pages 13, 14, 18, 19, 21, 58 et 70.)

[Neuman 1999] Keir C Neuman, Edmund H Chadd, Grace F Liou, Keren Bergman et Steven M Block. *Characterization of photodamage to Escherichia coli in optical traps*. Biophysical journal, vol. 77, no. 5, pages 2856–2863, 1999. (Cité en page 66.)

[Neuman 2004] Keir C Neuman et Steven M Block. *Optical trapping*. Review of scientific instruments, vol. 75, no. 9, pages 2787–2809, 2004. (Cité en pages 44, 60, 61 et 66.)

[Ogien 2016] Jonas Ogien et Arnaud Dubois. *High-resolution full-field optical coherence microscopy using a broadband light-emitting diode*. Optics express, vol. 24, no. 9, pages 9922–9931, 2016. (Cité en page 29.)

[Orr 2006] A Wayne Orr, Brian P Helmke, Brett R Blackman et Martin A Schwartz. *Mechanisms of mechanotransduction*. Developmental cell, vol. 10, no. 1, pages 11–20, 2006. (Cité en page 14.)

[Ouyang 2008] Mingxing Ouyang, Jie Sun, Shu Chien et Yingxiao Wang. *Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105, no. 38, pages 14353–14358, 2008. (Cité en page 90.)

[Peterman 2003] Erwin JG Peterman, Frederick Gittes et Christoph F Schmidt. *Laser-induced heating in optical traps*. Biophysical journal, vol. 84, no. 2, pages 1308–1316, 2003. (Cité en page 147.)

[Reihani 2007] S Nader S Reihani et Lene B Oddershede. *Optimizing immersion media refractive index improves optical trapping by compensating spherical aberrations*. Optics letters, vol. 32, no. 14, pages 1998–2000, 2007. (Cité en pages 61, 64 et 65.)

[Richly 2013] Maximilian U Richly, Silvan Türkcan, Antoine Le Gall, Nicolas Fiszman, Jean-Baptiste Masson, Nathalie Westbrook, Karen Perronet et Antigoni Alexandrou. *Calibrating optical tweezers with Bayesian inference.* Optics express, vol. 21, no. 25, pages 31578–31590, 2013. (Cité en pages 47, 49, 50 et 51.)

[Rohrbach 2002] Alexander Rohrbach et Ernst HK Stelzer. *Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations.* Applied optics, vol. 41, no. 13, pages 2494–2507, 2002. (Cité en pages 63 et 156.)

[Ross 1976] Russell Ross et John A Glomset. *The pathogenesis of atherosclerosis.* New England Journal of Medicine, vol. 295, no. 7, pages 369–425, 1976. (Cité en page 8.)

[Samadi 2010] Akbar Samadi et Nader S Reihani. *Optimal beam diameter for optical tweezers.* Optics letters, vol. 35, no. 10, pages 1494–1496, 2010. (Cité en page 66.)

[Schwartz 1962] CJ Schwartz et JR Mitchell. *Observations on localization of arterial plaques.* Circulation research, vol. 11, pages 63–73, 1962. (Cité en page 8.)

[Schwartz 1991] Martin Alexander Schwartz, Claude Lechene et Donald E Ingber. *Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 88, no. 17, pages 7849–7853, 1991. (Cité en pages 14 et 70.)

[Silberberg 2008] Yaron R Silberberg, Andrew E Pelling, Gleb E Yakubov, William R Crum, David J Hawkes et Mike A Horton. *Mitochondrial displacements in response to nanomechanical forces.* Journal of Molecular Recognition, vol. 21, no. 1, pages 30–36, 2008. (Cité en page 14.)

[St Clair 1985] RW St Clair. *Pathogenesis of the atherosclerotic lesion : current concepts of cellular and biochemical events.* Progress in clinical and biological research, vol. 219, pages 1–29, 1985. (Cité en page 8.)

[Svoboda 1994] Karel Svoboda et Steven M Block. *Biological applications of optical forces.* Annual review of biophysics and biomolecular structure, vol. 23, no. 1, pages 247–285, 1994. (Cité en pages 31 et 60.)

[Tanaka 1998] Yosuke Tanaka, Yoshimitsu Kanai, Yasushi Okada, Shigenori Nonaka, Sen Takeda, Akihiro Harada et Nobutaka Hirokawa. *Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria.* Cell, vol. 93, no. 7, pages 1147–1158, 1998. (Cité en page 14.)

[Türkcan 2012a] Silvan Türkcan, Antigoni Alexandrou et Jean-Baptiste Masson. *A Bayesian inference scheme to extract diffusivity and potential fields from confined single-molecule trajectories.* Biophysical journal, vol. 102, no. 10, pages 2288–2298, 2012. (Cité en pages 49 et 50.)

[Türkcan 2012b] Silvan Türkcan, Jean-Baptiste Masson, Didier Casanova, Geneviève Mialon, Thierry Gacoin, Jean-Pierre Boilot, Michel R Popoff et Antigoni Alexandrou. *Observing the confinement potential of bacterial pore-forming toxin receptors inside rafts with nonblinking Eu 3+-doped oxide nanoparticles.* Biophysical journal, vol. 102, no. 10, pages 2299–2308, 2012. (Cité en page 49.)

[Türkcan 2013] Silvan Türkcan, Maximilian U Richly, Antigoni Alexandrou et Jean-Baptiste Masson. *Probing membrane protein interactions with their lipid raft environment using*

single-molecule tracking and Bayesian inference analysis. PloS one, vol. 8, no. 1, page e53073, 2013. (Cité en page 49.)

[Vabre 2002] Laurent Vabre, Arnaud Dubois et A Claude Boccara. *Thermal-light full-field optical coherence tomography.* Optics letters, vol. 27, no. 7, pages 530–532, 2002. (Cité en page 28.)

[Vermeulen 2006] Karen C Vermeulen, Gijs JL Wuite, Ger JM Stienen et Christoph F Schmidt. *Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations.* Applied optics, vol. 45, no. 8, pages 1812–1819, 2006. (Cité en pages 62, 63, 64, 69 et 156.)

[Viana 2002] Nathan Bessa Viana, ON Mesquita et Alexander Mazolli. *In situ measurement of laser power at the focus of a high numerical aperture objective using a microbolometer.* Applied physics letters, vol. 81, no. 10, pages 1765–1767, 2002. (Cité en page 66.)

[Viana 2006] NB Viana, MS Rocha, ON Mesquita, A Mazolli et PA Maia Neto. *Characterization of objective transmittance for optical tweezers.* Applied optics, vol. 45, no. 18, pages 4263–4269, 2006. (Cité en pages 65 et 66.)

[Viana 2007] NB Viana, MS Rocha, ON Mesquita, A Mazolli, PA Maia Neto et HM Nussenzveig. *Towards absolute calibration of optical tweezers.* Physical Review E, vol. 75, no. 2, page 021914, 2007. (Cité en pages 31, 35, 36, 69 et 70.)

[Vicente-Manzanares 2009] Miguel Vicente-Manzanares, Xuefei Ma, Robert S Adelstein et Alan Rick Horwitz. *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 10, no. 11, pages 778–790, 2009. (Cité en page 9.)

[Visscher 1996] Koen Visscher, Steven P Gross et Steven M Block. *Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing.* IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, vol. 2, no. 4, pages 1066–1076, 1996. (Cité en page 37.)

[Vogel 2006] Viola Vogel et Michael Sheetz. *Local force and geometry sensing regulate cell functions.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 7, no. 4, pages 265–275, 2006. (Cité en pages 13 et 14.)

[Wang 1993] Ning Wang, James P Butler, Donald E Ingber*et al. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.* Science, vol. 260, no. 5111, pages 1124–1127, 1993. (Cité en page 14.)

[Wang 2001] Ning Wang, Keiji Naruse, Dimitrije Stamenović, Jeffrey J Fredberg, Srboljub M Mijailovich, Iva Marija Tolić-Nørrelykke, Thomas Polte, Robert Mannix et Donald E Ingber. *Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 98, no. 14, pages 7765–7770, 2001. (Cité en page 14.)

[Wang 2005] Yingxiao Wang, Elliot L Botvinick, Yihua Zhao, Michael W Berns, Shunichi Usami, Roger Y Tsien et Shu Chien. *Visualizing the mechanical activation of Src.* Nature, vol. 434, no. 7036, pages 1040–1045, 2005. (Cité en pages 14, 15, 17, 19, 22, 23, 26, 58, 61, 70 et 90.)

[Wang 2009] Ning Wang, Jessica D Tytell et Donald E Ingber. *Mechanotransduction at a distance : mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 10, no. 1, pages 75–82, 2009. (Cité en pages 5 et 19.)

[Wei 2008] Ming-Tzo Wei, Angela Zaorski, Huseyin C Yalcin, Jing Wang, Melissa Hallow, Samir N Ghadiali, Arthur Chiou et H Daniel Ou-Yang. *A comparative study of living cell micromechanical properties by oscillatory optical tweezers.* Optics express, vol. 16, no. 12, pages 8594–8603, 2008. (Cité en page 22.)

[Wottawah 2005] Falk Wottawah, Stefan Schinkinger, Bryan Lincoln, Revathi Ananthakrishnan, Maren Romeyke, Jochen Guck et Josef Käs. *Optical rheology of biological cells.* Physical review letters, vol. 94, no. 9, page 098103, 2005. (Cité en page 22.)

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Ondes et Matière (EDOM)

Titre : Pince optique et microscopie à contraste de phase pour l'étude de la mécanique cellulaire : développement, modélisation et calibration en réflexion.

Mots clés : pince optique, détection en réflexion, microscopie, contraste de phase, mécanique cellulaire.

Résumé : Ce manuscrit détaille le développement d'un montage de pince optique permettant d'étudier les propriétés mécaniques des cellules endothéliales, impliquées dans le développement de l'athérosclérose. Le but est de déterminer les propriétés viscoélastiques des cellules, et de suivre la propagation d'une contrainte mécanique au sein de la cellule. Cette contrainte mécanique est appliquée via une bille liée à la membrane de la cellule et soumise à un piège optique. Le dispositif réalisé combine le piégeage optique et la microscopie à contraste de phase, permettant d'exercer une force tout en imageant les cellules via le même objectif de microscope. L'originalité du montage de pince optique repose sur la détection du signal rétrodiffusé par la bille piégée, dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, afin de mesurer la position relative de la bille par rapport au piège. Une part importante de ce travail a consisté à comprendre l'allure du signal détecté présentant un système d'interférences en anneaux, et à l'expliquer par un modèle simple. Ce modèle a permis de comprendre la présence d'artefacts de mesure de position dus à la superposition de l'anneau de phase sur la figure d'interférence. Pour y remédier, l'anneau de phase est déporté dans un plan conjugué intervenant uniquement dans l'imagerie de l'échantillon. La figure d'interférence présente un atout majeur : elle donne accès à la hauteur précise de la bille piégée, généralement difficile à mesurer. Cette information est nécessaire pour calibrer la constante de raideur du piège optique à la hauteur des cellules, que ce soit par l'analyse de la densité spectrale de puissance du mouvement brownien de la bille piégée ou par sa réponse à un échelon de position du piège. Ces deux méthodes de calibration, ainsi que l'application du théorème d'équipartition et l'analyse par inférence bayésienne, ont été mises en œuvre. Tous les résultats s'avèrent en bon accord. La calibration complète du dispositif en fait un outil prêt à l'emploi pour exercer des forces locales contrôlées en direction et en amplitude sur les cellules.

Title : Optical tweezers and phase contrast microscopy for the study of cell mechanics: experimental setup, modeling and calibration using backscattered light.

Keywords : optical tweezers, backscattered light detection, microscopy, phase contrast, cells mechanics.

Abstract : This manuscript details the development of an optical tweezer setup to study the mechanical properties of endothelial cells, involved in the development of atherosclerosis. The goal is to determine the viscoelastic properties of the cells, and to follow the propagation of the mechanical constraint inside the cell. This mechanical constraint is applied via a bead attached to the cell membrane and subjected to an optical trap. The setup built combines optical trapping with phase contrast microscopy, to apply a force while imaging the cells with the same microscope objective. The originality of the optical tweezer setup relies on the detection of the signal backscattered by the trapped bead, in a plane conjugate to the back focal plane of the objective, in order to measure the relative position of the bead with respect to the center of the trap. An important part of this work was dedicated to the understanding of the detected signal presenting an interference pattern with rings, explained by a simple model. This model provides an explanation for the position measurement artifacts arising from the superposition of the phase ring and the interference pattern. To solve the problem, the phase ring was moved in a conjugate plane involved only in the imaging path of the sample. The interference pattern has the main advantage of giving access to the precise height of the trapped bead, usually difficult to measure. This information is necessary to calibrate the optical trap stiffness at the height of the cells, either by the power spectrum analysis of the Brownian motion of the trapped bead, or by its response to a step motion of the trap. These two calibration methods, along with the application of the equipartition theorem and Bayesian inference analysis, were implemented and their results compared, showing a good agreement. The complete calibration of the setup makes it a ready-to-use tool to exert local forces controlled in direction and amplitude on cells.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin,
France