

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



Département de métallurgie

Mémoire de projet de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie des matériaux

Analyse de l'effet de l'angle d'inclinaison
entre la surface d'un substrat et un indenteur
sur le module élastique évalué par
microscopie à force atomique

Réalisé par : AHMINE Nassim Anis

Sous la direction de

Mme	Sophie FEREOL	INSERM U955 - IMRB
Mr	Redouane FODIL	INSERM U955 - IMRB

Sous la co-direction de

Mr	Fatah HELLAL	ENP
----	--------------	-----

Présenté et soutenu publiquement le 16 Septembre 2019

Composition du Jury :

Président	Mr Mohamed CHITROUB	Professeur	ENP
Promoteur	Mr Fatah HELLAL	Professeur	ENP
Examineur	Mr Abdelmadjid KASSER	Maître de conférences	ENP

ENP 2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



Département de métallurgie

Mémoire de projet de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie des matériaux

Analyse de l'effet de l'angle d'inclinaison
entre la surface d'un substrat et un indenteur
sur le module élastique évalué par
microscopie à force atomique

Réalisé par : AHMINE Nassim Anis

Sous la direction de

Mme	Sophie FEREOLE	INSERM U955 - IMRB
Mr	Redouane FODIL	INSERM U955 - IMRB

Sous la co-direction de

Mr	Fatah HELLAL	ENP
----	--------------	-----

Présenté et soutenu publiquement le 16 Septembre 2019

Composition du Jury :

Président	Mr Mohamed CHITROUB	Professeur	ENP
Promoteur	Mr Fatah HELLAL	Professeur	ENP
Examineur	Mr Abdelmadjid KASSER	Maître de conférences	ENP

ENP 2019

Dédicace

A mes chers parents

Vous avez toujours été présents à mes côtés pour m'enseigner le sens des responsabilités, de l'honnêteté, de l'optimisme, de la confiance en soi face aux difficultés de la vie et surtout du dévouement dans le travail.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et de ma profonde estime.

Papa, maman, c'est grâce à vous que je suis ce que je suis.

A ma très chère sœur Sonia

Tu n'as jamais cessé de me soutenir tout au long de mes années d'études, si ce n'est pas dire depuis ma naissance. Sache que tu as tout le temps été un exemple pour moi, même si je ne l'ai jamais dit, tu es une vraie battante. Ta présence a forgé ma personnalité. Tu m'as toujours accompagné dans mes moments de stress et de solitude. Que dieu te garde ton mari Ali, avec lequel j'espère que tu seras épanouie, ainsi que tes deux petites princesses que j'aime tellement fort

et surtout que te dieu te garde pour moi ma sœur.

Ma chère grand-mère maternelle et mon grand-père paternel

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A la mémoire de mes grands-parents

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Je pense que vous auriez été fiers de moi aujourd'hui.

Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A tous mes amis

Je cite en particulier Souad, Maya, Hichem, Sidali, Ghanou, Nadjib, Yasmine qui ont été à mes côtés dans mes moments de joie et de détresse et plus particulièrement à Hind qui l'a été tout au long de ma 5^{ème} année passée loin de chez moi.

A mes chers enseignants

Pour vos enseignements, votre soutien moral, vos précieux conseils ainsi que votre accompagnement durant l'ensemble de mon parcours académique.

A ma grande famille. A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur ainsi qu'à ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

A mon Algérie qui traverse un moment historique et qui est loin des yeux mais près du cœur.

Anis

Remerciements

Ce stage effectué au sein de l'équipe 6 de l'IMRB a été très bénéfique à ma formation en regard des compétences théoriques et pratiques acquises durant ces 4 mois de travail. Je tiens, dans ce cadre-là, à adresser mes plus sincères remerciements à mes encadrants Mme Sophie FEREOLE et Mr Redouane FODIL pour toute l'aide si précieuse qu'ils m'ont apportée ainsi que pour leur accompagnement tout au long de ce stage.

Je remercie également Mme Sylvie DUFOUR pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour ses informations indispensables en biologie. Je tiens également à remercier Mr Jean-Loup DUBAND pour son accueil si chaleureux et sa bonne humeur, ce fut très agréable de travailler à ses côtés.

Un grand remerciement aussi à mon tuteur académique et très cher professeur Mr Fatah HELLAL pour son écoute, son soutien, ses directives ainsi que ses précieux conseils qui ont réussi à m'ont conduit à me surpasser et à donner le meilleur de moi-même, en Algérie comme en France.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mon travail ainsi qu'à mes professeurs qui m'ont formé tout au long de mon cursus académique.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis qui ont été à mes côtés durant toute cette année, ainsi que toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce stage, à la bonne ambiance et à l'accomplissement de ce précieux travail.

ملخص

اليوم، المجهر ذو القوة الذرية (AFM) هو تقنية مختارة لتقييم الخصائص الميكانيكية المحلية للعينة. يعتمد تحليل المنحنيات التجريبية من AFM في اختبار المسافة البادئة على قانون هرتز. تنص إحدى فرضيات هذا النموذج على أن التلامس الميكانيكي بين البادئة وسطح العينة يجب أن يكون سطحياً. هذه الفرضية الأخيرة غير صالحة للعينات البيولوجية، مثل الخلية، أو الخاملة مثل الهيدروجيل. ومن ثم، فإن الهدف من هذا العمل هو اقتراح تصحيح لقانون هرتز يأخذ في الاعتبار أثر زاوية الميل بين السند والركيزة. ولتحقيق ذلك، تم تنفيذ ثلاثة نهج نظرية ورقمية وتجريبية باستخدام برنامج النظام المتكامل في نفس الوقت. وقد أجريت التجارب على جليد متعدد الأكريلاميد مع نوعين من الأطراف، أحدهما كروي والآخر هرمي. ويقترح هذا العمل تصحيحاً لقانون هرتز الذي يعد إقراره، من خلال الاختبارات العددية والاختبارات التجريبية، مشجعاً.

الكلمات المفتاحية: قانون هرتز، المجهر ذو القوة الذرية (AFM)، تحليل العناصر المتناهية، هلام البولي أكريلاميد.

Abstract

Nowadays, Atomic Force Microscopy (AFM) is a technique of choice for evaluating the local mechanical properties of a sample. The analysis of experimental curves provided by the AFM during an indentation test is based on the well-known Hertz's law. One of the main hypotheses of this law states that the sample must be totally planar without any tilt angle. However, this hypothesis is mostly not valid in case of biological samples such as cells, or inert such as hydrogels. Thus, the objective of this work is to propose a modification to the Hertz law that takes into account the effect of the tilt angle between the indenter and the sample. To that end, three different approaches were achieved in parallel, theoretical, numerical using finite element analysis and experimental. The experiments were carried out on polyacrylamide gels with two shape of probes, spherical and the pyramidal. The present work proposes a modification for the Hertz' law whose validation, by the numerical tests and the experimental tests, is encouraging.

Keywords: Hertz law, Atomic Force Microscopy (AFM), Finite Elements Analysis (FEA), Polyacrylamide gels.

Résumé

Aujourd'hui, la Microscopie à Force Atomique (AFM) est une technique de choix pour évaluer les propriétés mécaniques locales d'un échantillon. L'analyse des courbes expérimentales issues de l'AFM lors d'un essai d'indentation, est basée sur la loi de Hertz. Une des hypothèses de ce modèle stipule que le contact mécanique entre l'indenteur et la surface de l'échantillon doit être plan. Or, cette dernière hypothèse n'est pas valide lorsqu'il s'agit d'échantillons biologiques, comme une cellule, ou inerte comme un hydrogel. Ainsi, l'objectif de ce travail est de proposer une modification à la loi de Hertz qui prenne en compte l'effet de l'angle d'inclinaison entre l'indenteur et le substrat. Pour ce faire, trois approches théorique, numérique à l'aide du logiciel ANSYS et expérimentale, ont été menées en parallèle. Les expériences ont été réalisées sur des gels de polyacrylamide avec deux types de pointes, une sphérique et l'autre pyramidale. Ce travail propose une modification de la loi de Hertz dont la validation, par les tests numériques et les essais expérimentaux, est encourageante.

Mots clés : Loi de Hertz, Microscopie à Force Atomique (AFM), Analyse par Eléments Finis, Gel de polyacrylamide.

Table des matières

Table des figures

1. Présentation du laboratoire	9
2. Introduction.....	11
1. Définition de la biomécanique cellulaire.....	11
2. Objectifs du stage	12
3. Présentation de la microscopie à force atomique (AFM)	14
1. Principe de l'AFM.....	14
2. Méthode de spectroscopie de force en mode contact	15
3. Modèles d'analyses de la courbe force-hauteur	17
3.1 Cas d'un indenteur conique.....	18
3.2 Cas d'un indenteur sphérique.....	19
4. Matériels et Méthodes	22
1. Simulation par éléments finis	22
2. Mesures expérimentales	23
2.1 Protocole de fabrication des gels de polyacrylamide.....	23
2.2 Fabrication des supports pour les gels de polyacrylamide.....	24
2.3 Acquisition et analyse des courbes force-hauteur en AFM	26
5. Résultats et discussions.....	33
1. Approche théorique	33
1.1 Cas d'un indenteur sphérique.....	33
1.2 Cas d'un indenteur conique.....	35
2. Approche par simulation numérique	38
2.1 Cas d'un indenteur sphérique.....	39
2.2 Cas d'un indenteur conique.....	41
3. Approche expérimentale	44
3.1 Cas d'un indenteur sphérique.....	45
3.2 Cas d'un indenteur conique (ou pyramidale).....	45
6. Conclusions et perspectives	47
Bibliographie.....	48

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes techniques de micromanipulation utilisées pour tester les cellules vivantes isolées et/ou organisées en tapis cellulaire, ou en suspension (Bao et al, 2003).....	12
Figure 2 : Représentation du principe de mesure de l'AFM. Un laser est réfléchi à l'extrémité du levier au niveau de la pointe et est détecté via quatre quadrants composés de photodiodes. Un feedback est effectué par le logiciel pour ajuster la hauteur de la pointe [33].....	15
Figure 3 : Schéma illustrant les différentes étapes pour l'acquisition d'une courbe déflexion – hauteur du levier : de (a) à (c) phase d'approche et de (d) à (f) phase de retrait. B) Exemple d'une courbe déflexion-hauteur du levier [37].	15
Figure 4 : Schéma de principe et enregistrement de la courbe hauteur-déflexion.....	16
Figure 5 : Schéma d'un indenteur conique pénétrant dans le demi-espace d'un matériau élastique (librement adapté de [38]).....	17
Figure 6 : Schéma d'un indenteur sphérique pénétrant dans le demi-espace d'un matériau élastique plan.....	19
Figure 7 : Interface du logiciel ANSYS Mechanical, Inc.....	22
Figure 8 : Conditions aux limites utilisées pour la simulation numérique.	22
Figure 9 : Exemples de résultats obtenus par simulation numérique.....	23
Figure 10 : Exemple de conception du support du gel avec une inclinaison de 15°.	25
Figure 11 : Ensemble des supports imprimés en 3D.	25
Figure 12 : Microscope à Force Atomique "Nanowizard® 4" de chez Bruker-JPK installé au collège de France.....	26
Figure 13 : Pointe CSC38 vue en microscopie électronique à balayage. A- vue de face ; B- vue de côté ; C- vue de dessus et D- vue en perspective.....	27
Figure 14 : Préparation pour le collage des microbilles de polystyrène sur une lame porte-objet de 76x26mm.....	27
Figure 15 : Positionnement du bras de levier au-dessus d'une microbille isolée.....	28
Figure 16 : Vue latérale en contraste de phase de l'ensemble bras de levier TL1 + microbille de polystyrène de 15µm.....	28
Figure 17 : Interface graphique développée sous Matlab au laboratoire permettant l'analyse des courbes force-hauteur obtenues en AFM. A- Courbe expérimentale en rouge et son ajustement par la courbe de Hertz en noir. B- Position des points de mesure. C- Courbe Module de Young-Indentation.	30
Figure 18 : Topographie de la surface du gel de polyacrylamide reconstruite à partir des points de contact des 100 points de mesure. A- Vue \perp à la direction « slow scan » de l'AFM. B- Vue \perp à la direction « fast scan » de l'AFM. C- Vue de haut donnant la topographie de l'échantillon en code couleur. D- Vue de haut avec ordre d'acquisition des points de mesure.	31
Figure 19 : Schéma représentant l'indentation δ d'une demi sphère de rayon Rt dans un échantillon incliné d'un angle β par rapport à l'horizontale. La ligne courbe noire montre la déformation de la surface de l'échantillon due à l'indentation de la sphère. La force mesurée par l'AFM est notée $Fy\beta$. La force appliquée, portée par l'axe (aa') perpendiculaire à la surface du plan incliné est notée $F\beta$. L'indentation de la demi-sphère dans le matériau incliné portée par l'axe (aa') est notée δ'	33
Figure 20 : Courbe théorique obtenue pour la sphère en calculant le rapport de la force d'indentation pour un plan incliné notée $Fy\beta$ sur la force d'indentation nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane et horizontale notée F en fonction de l'angle d'inclinaison β	35

Table des figures

Figure 21 : Surface d'intersection entre un cône d'angle de demi-ouverture α et un plan incliné avec un angle β . A- $\beta = 0$ plan horizontal et perpendiculaire à l'axe du cône, la surface d'intersection a la forme d'un cercle de rayon a . B- $\beta < \alpha$, la surface d'intersection a la forme d'une ellipse de demi-petit axe a et de demi-grand axe b . Le point noir indique la position du sommet de la pointe. C- $\beta > \alpha$ la surface d'intersection a la forme d'une ellipse de demi-petit axe a et de demi-grand axe b . La partie grisée correspond à la pointe.	36
Figure 22 : Cône de demi angle α indentant une surface plane inclinée par rapport à l'horizontale d'un angle β	36
Figure 23 : Courbe théorique obtenue pour le cône en calculant le rapport de la force d'indentation pour un plan incliné notée $F_y\beta$ sur la force d'indentation nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane et horizontale notée F en fonction de l'angle d'inclinaison β pour $\alpha=22^\circ$	38
Figure 24 : Exemple d'indentation d'une sphère sur un matériau élastique par le logiciel ANSYS Mechanical. Le code couleur représente les déformations.	39
Figure 25 : Courbes de comparaison entre la force théorique et la force résultante de la simulation pour un indenteur sphérique. A- Courbe de force issue de la simulation numérique en fonction de la force théorique. B- Courbes de force issue de la simulation numérique (Orange) et la force théorique (Bleu) en fonction de l'indentation.	40
Figure 26 : Comparaison entre les courbes de rapport F_y-b/F_y-00 pour différentes indentations dans le cas d'un indenteur de géométrie sphérique.	40
Figure 27 : Comparaison entre la courbe théorique et la simulation pour un indenteur de géométrie sphérique.	41
Figure 28 : Exemple d'indentation d'un cône sur un matériau élastique par le logiciel ANSYS Mechanical. Le code couleur représente le déplacement totale.	42
Figure 29 : Courbes de comparaison entre la force théorique et la force résultante de la simulation pour un indenteur conique. A- Courbe de Force issue de la simulation numérique en fonction de la force théorique. B- Courbes de la force issue de la simulation numérique (Orange) et la force théorique (Bleu) en fonction de l'indentation.	42
Figure 30 : Comparaison entre les courbes de rapport F_y-b/F_y-00 pour différentes indentations dans le cas d'un indenteur de géométrie sphérique.	43
Figure 31 : Comparaison entre la courbe théorique et la simulation pour un indenteur de géométrie conique.	44
Figure 32 : Comparaison entre les approches théorique, numérique et expérimentale pour un indenteur de géométrie sphérique.	45
Figure 33 : Comparaison entre les approches théorique, numérique et expérimentale pour un indenteur de géométrie conique.	46

Chapitre 1

Présentation du laboratoire

1. Présentation du laboratoire

Ce stage de 4 mois s'est déroulé au sein de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) situé à la faculté de médecine de l'hôpital Henri Mondor. Cet institut fait partie du pôle de santé et de recherche clinique qui regroupe les hôpitaux Henri Mondor, Albert Chenevier, Émile Roux, Joffre Dupuytren et Georges Clémenceau, l'unité de thérapie cellulaire de l'Établissement Français du Sang (EFS), l'école Vétérinaire d'Alfort, un centre d'investigation clinique généraliste labellisé en biothérapie, un centre de ressource biologique, ainsi que sept autres centres de références de maladies rares. De renommée nationale et internationale, l'IMRB est un élément majeur du Collégium Galilée aux côtés l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) et collabore étroitement avec plus de 149 laboratoires internationaux, principalement européens et américains. L'IMRB comporte 500 personnes, dont plus de 25 chercheurs et 80 doctorants formant 17 équipes réparties en 3 départements : « Virus, Immunité, Cancer » (VIC, 5 équipes) ; « Neurosciences et Psychiatrie » (ESPRY, 4 équipes) ; et « Physiopathologie des maladies cardiovasculaires et respiratoires, développement et sénescence » (PHYDES, 8 équipes).

Plus précisément, j'ai réalisé mon stage au sein de l'équipe 6 « Morphogenèse et Génétique Moléculaire » dirigée par Mme Sylvie Dufour du département PHYDES. Cette équipe étudie principalement la biologie cellulaire, la génétique moléculaire, la génétique fonctionnelle ainsi que la mécano-biologie des Cellules de la Crête Neurale (CCN) au cours du développement. Les CCN sont des cellules souches à l'origine de différents types cellulaires, comme ceux constitutifs de l'os de la tête, de l'appareil cardiovasculaire et des systèmes nerveux périphérique et entérique. Les études sont réalisées sur des modèles animaux de poulets ou de cailles et les principales techniques utilisées sont l'électroporation *in ovo*, la culture d'embryons et d'explants, la vidéo-microscopie, la microscopie confocale, l'imagerie cellulaire 3D, la Microscopie à Force de Traction (Traction Force Microscopy, TFM) ainsi que la Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscopy, AFM) dans les milieux liquides afin d'évaluer les propriétés structurales, mécaniques et adhésives des cellules.

Chapitre 2

Introduction

2. Introduction

1. Définition de la biomécanique cellulaire

Depuis l'Antiquité, de nombreux savants, philosophes, physiologistes, biologistes, physiciens, mécaniciens de renom ont tenté d'appliquer les connaissances scientifiques et/ou techniques à l'étude des processus biologiques. Citons l'exemple d'Aristote qui a été presque l'un des premiers à établir un lien étroit entre la physiologie, la théorie du mouvement animal, l'étude des facultés psychiques de désir et de connaissance et l'analyse de la conduite [1]. Puis, Galilée, grâce à ses travaux sur la chute des corps et le centre d'inertie, fera de la mécanique un domaine de la science à part entière. Bien d'autres physiciens encore tels que Newton, Hooke, Helmholtz, Fick, ou encore physiologistes tels que Harvey, Hales, Vivian Hill ont contribué, en développant les bases, à l'émergence d'un nouveau champ disciplinaire : La biomécanique.

La biomécanique, qui n'a réellement vu le jour qu'au cours du 20^{ème} siècle, est donc une discipline moderne avec des racines très anciennes [2-4] Elle est définie comme un sous domaine de la mécanique qui repose sur le développement, l'extension et l'application des lois et concepts mécaniques au monde du vivant dans le but de comprendre les structures, les propriétés ainsi que les fonctions des êtres vivants [5].

Plus récemment, il a été montré que les forces mécaniques jouaient un rôle crucial dans la formation, l'organisation et le fonctionnement des tissus et cellules, ce qui a inauguré un nouveau domaine de recherche : la biomécanique cellulaire [6-9]. Ainsi depuis près de 20 ans, un nombre croissant d'études tentent de réinterpréter la biochimie cellulaire dans le cadre d'interactions physiques afin de combiner les différents aspects tels que la biologie moléculaire, la génétique et la mécanique, pour expliquer la grande diversité des formes des systèmes biologiques aux échelles tissulaires et cellulaires. De ces études, il a pu être montré qu'il existe un lien étroit entre la structure du cytosquelette de la cellule, sa forme, sa fonction, et ses propriétés mécaniques. Ces travaux utilisent différentes techniques de micromanipulation qui permettent d'évaluer les propriétés mécaniques des cellules dans des microenvironnements différents. Ces techniques permettent d'étudier le comportement du milieu intracellulaire avec des sondes de tailles et de formes différentes et pour des types de contraintes ayant des ordres de grandeurs différents. Deux sous familles de techniques peuvent être distinguées. La première regroupe les techniques utilisant une sonde locale ($\sim 5\mu\text{m}$) qui génère localement la force et permet de recueillir la déformation telles que la microscopie à force atomique (voir Figure 1-a)[10-12], la magnétocytométrie (Figure 1-b) [13-18], les pinces magnétiques (voir Figure 1-b) [19, 20], les pinces optiques (voir Figure 1-d) [21-24]. La seconde regroupe les techniques générant des forces sur l'ensemble de la cellule et mesurant la déformation induite. Il s'agit notamment de l'aspiration (à pression contrôlée) de cellules dans une micropipette (voir Figure 1-c) [25, 26], de l'écoulement de cisaillement [27] (voir Figure 1-e) et de l'étirement ou de la compression d'une cellule adhérente entre deux microplaques (voir Figure 1-f) [28, 29]

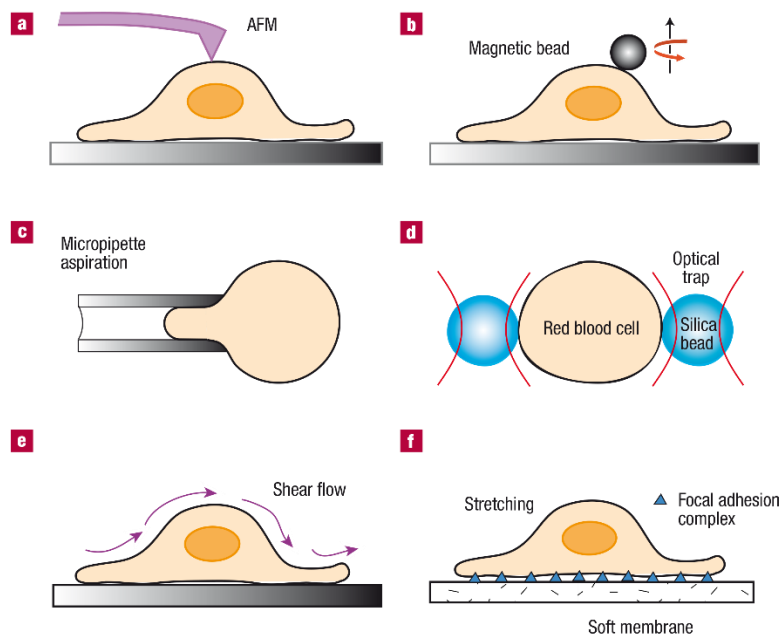


Figure 1 : Représentation schématique des différentes techniques de micromanipulation utilisées pour tester les cellules vivantes isolées et/ou organisées en tapis cellulaire, ou en suspension (Bao et al, 2003).

Bien que différentes, ces techniques ont en commun la détermination de la relation entre la contrainte mécanique appliquée et la déformation résultante, seule façon d'accéder au comportement mécanique de la cellule ainsi qu'à ses propriétés mécaniques telles que les modules d'élasticité et de friction, les constantes de temps et la plasticité.

2. Objectifs du stage

Parmi les différentes techniques de micromanipulation énoncées précédemment, le laboratoire d'accueil est spécialisé dans l'utilisation de la Microscopie à Force Atomique pour évaluer les propriétés mécaniques des cellules, telles que le module d'Young E . L'analyse de la courbe force-hauteur issue d'une mesure AFM est réalisée en utilisant la loi de Hertz [30] qui repose sur plusieurs hypothèses. L'une d'entre-elles impose que la surface de l'échantillon doit être plane et horizontale par rapport à la sonde, ce qui n'est généralement pas le cas pour des cellules vivantes et adhérentes en culture.

Ainsi, le sujet du stage a consisté à étudier l'effet de l'angle d'inclinaison, entre la sonde de l'AFM et le substrat, sur la mesure du module d'élasticité évalué par AFM. Cette étude a le double objectif 1/ de déterminer dans quelle mesure cet effet impacte les résultats mécaniques évalués par AFM et 2/ de proposer une modification à la loi de Hertz qui prenne en compte cet effet.

Le travail s'est articulé autour de trois approches complémentaires : Une première approche théorique basée sur des considérations purement géométriques de l'indenteur et de la surface inclinée, une approche numérique qui a consisté à simuler l'indentation d'un matériau incliné par une sonde et une troisième approche expérimentale en vue de valider les résultats théoriques et expérimentaux.

Chapitre 3

Présentation de la

microscopie à force atomique

(AFM)

3. Présentation de la microscopie à force atomique (AFM)

1. Principe de l'AFM

Le Microscope à Force Atomique ou AFM (Atomic Force Microscope) est un microscope à champ proche inventé en 1986 [31] qui utilise une sonde locale pour parcourir l'échantillon afin d'en déduire certaines de ses propriétés de surface à une résolution atomique. Contrairement à son précurseur le Microscope à Effet Tunnel découvert en 1981 [32] qui n'est sensible qu'au courant électrique entre la sonde et l'échantillon, l'AFM n'est sensible qu'aux forces résultantes de l'interaction entre la sonde et l'échantillon. Cette spécificité lui permet de caractériser les propriétés de surface des matériaux isolants. C'est grâce à leur haute précision et résolution qui a permis de contrôler la matière atome par atome que ces deux microscopes ont donné lieu à l'émergence de la nanotechnologie, prédite bien avant par le physicien Richard Feynman dans sa fameuse conférence intitulée « There is Plenty of Room at the Bottom ».

Le principe de mesure de l'AFM est présenté sur la Figure 2. Brièvement, l'AFM est constitué d'un bras de levier (cantilever) flexible assimilé à un ressort, de rigidité allant généralement de 0,01 N/m à 1 N/m, à l'extrémité duquel on trouve une pointe (généralement en silicone ou en nitrure de silicium) de géométrie variable de type sphérique, conique, pyramidale à quatre faces, cylindrique voire même de type plus complexe (ex : OBL de Bruker). Le mouvement de la sonde est contrôlé par des moteurs piézoélectriques. À l'approche de la surface de l'échantillon, les forces d'interactions régies par le couple pointe-échantillon provoquent une déflexion du cantilever détectée optiquement via un faisceau laser. En absence de déflexion, ce dernier, émis par une diode de façon permanente, est réfléchi sur l'extrémité du cantilever en direction du centre de quatre quadrants composés de photodiodes. Dès que le cantilever se défléchit, le faisceau laser est dévié du centre des 4 quadrants. Cette déviation est donc proportionnelle à l'intensité des forces mises en jeu entre la sonde et la surface de l'échantillon. Ainsi, le changement de coordonnées X, Y, Z du faisceau laser sur les 4 quadrants, mesuré en convertissant le signal photonique en signal électrique puis en nouvelles coordonnées, permet d'évaluer les forces d'interaction sonde-échantillon (Figure 2)[33] :

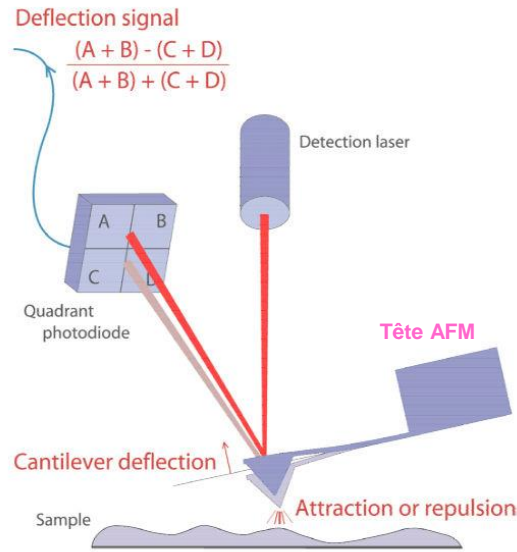


Figure 2 : Représentation du principe de mesure de l'AFM. Un laser est réfléchi à l'extrémité du levier au niveau de la pointe et est détecté via quatre quadrants composés de photodiodes. Un feedback est effectué par le logiciel pour ajuster la hauteur de la pointe [33].

2. Méthode de spectroscopie de force en mode contact

L'AFM est un outil puissant qui permet non seulement d'imager la topographie de surface d'un échantillon mais également de cartographier à l'échelle nanométrique ses propriétés mécaniques, ou encore ses propriétés physiques du fait de la diversité dans la nature et la portée des forces d'interaction sonde-échantillon (comme les forces de Van Der Waals, les forces électrostatiques et les forces magnétiques de longue portée (10 nm - 100 nm), ou bien encore la répulsion des nuages électroniques ou les forces d'adhésion de courte portée [34 , 35]). Ainsi, il existe différents modes d'utilisation de l'AFM tels que les modes contact, contact intermittents et non-contact qui dépendent à la fois du type d'échantillon et de l'information souhaitée [36]. Dans ce travail, qui se focalise spécifiquement sur l'étude des propriétés mécaniques d'échantillons biologiques en milieu liquide, nous expliciterons uniquement la méthode de spectroscopie de force obtenue en mode contact.

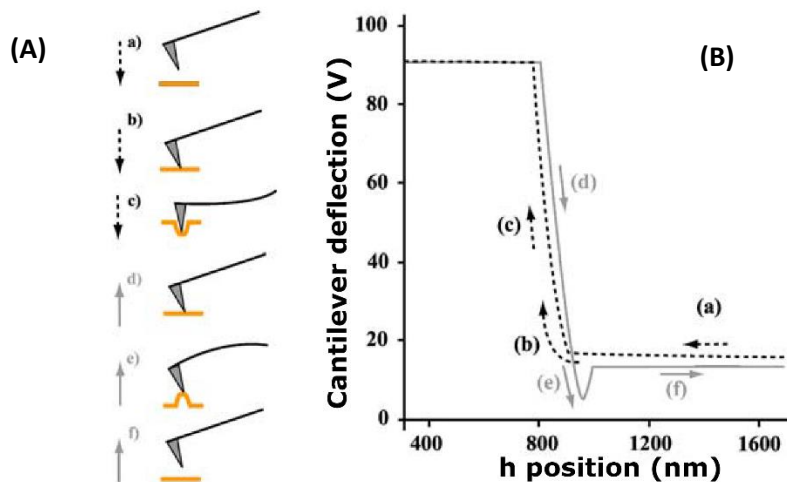


Figure 3 : Schéma illustrant les différentes étapes pour l'acquisition d'une courbe déflexion – hauteur du levier : de (a) à (c) phase d'approche et de (d) à (f) phase de retrait. B) Exemple d'une courbe déflexion-hauteur du levier [37].

Cette méthode consiste, en chaque point testé, à mesurer la déflexion du levier due aux forces d'interaction entre la pointe et la sonde au cours d'une phase d'approche et de retrait de la pointe, et d'enregistrer la position verticale h de la sonde, en suivant les différentes étapes décrites sur la Figure 3-A. Au début de la phase d'approche (Figure 3-a), la pointe est suffisamment loin de la surface de l'échantillon pour qu'aucune interaction sonde-échantillon, et donc de déflexion du levier, n'ait lieu. La pointe est ensuite approchée de la surface de l'échantillon via les moteurs piézoélectriques (Figure 3-b). À partir du contact, plus la pointe pénètre dans l'échantillon plus les forces exercées sur la pointe sont grandes (Figure 3-c). Arrivée à un point de force maximale définie par l'utilisateur, la pointe commence à se retirer et les forces de répulsions diminuent (Figure 3-d). Au cours de cette rétraction, la courbe montre souvent une hystérésis à cause des forces de viscosité et d'adhérence qui empêchent la pointe de se détacher de l'échantillon (Figure 3-e). Finalement, la pointe se décolle totalement de l'échantillon et les forces redeviennent nulles (Figure 3-f).

Ainsi, une courbe représentant la déflexion en fonction de la position h du levier peut être tracée (Figure 3-B).

En considérant que le levier est assimilé à un ressort de constante de raideur k , la loi de Hooke propose une relation entre la force mesurée et la déflexion du levier :

$$F = k \cdot d \tag{1}$$

En utilisant cette relation, il est facile de transcrire la courbe déflexion-position du levier en une courbe montrant l'évolution de la force en fonction de la position du levier.

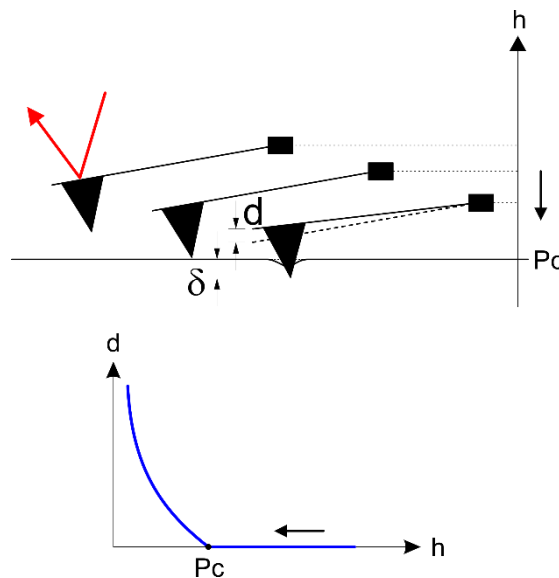


Figure 4 : Schéma de principe et enregistrement de la courbe hauteur-déflexion.

Pour déduire de cette courbe force-hauteur les propriétés mécaniques locales de l'échantillon, un modèle théorique dépendant de la forme géométrique de l'indenteur (explicité dans le paragraphe ci-dessous) est ajusté à la courbe expérimentale en considérant qu'à partir du point de contact, P_c , la relation suivante est vérifiée :

$$P_c - h = \delta + d \tag{2}$$

Où d est la déflexion, h la position du bras de levier contrôlé par les moteurs piézoélectriques (Figure 4).

3. Modèles d'analyses de la courbe force-hauteur

Comme nous l'avons décrit précédemment, les tests AFM consistent à appliquer, dans des conditions déterminées, une charge à la surface d'un matériau, à l'aide d'un indenteur ou pénétrateur. Dans ces essais, la force de compression F est appliquée via un pénétrateur sur une petite zone de contact de la surface du matériau d'aire notée A_c , sur laquelle le déplacement local de la surface (δ), est mesuré comme indiqué sur la Figure 5. Habituellement, l'indenteur est constitué d'un matériau beaucoup plus rigide que la surface indentée, de sorte que la déformation du pénétrateur soit négligeable [38]. Pour un indenteur de symétrie axiale, Sneddon a montré que la rigidité superficielle du matériau s'écrit :

$$S = dF/d\delta \quad (3)$$

Cette rigidité dépend de E et du rayon r_c de la surface de contact entre le pénétrateur et le matériau considérée circulaire [39].

$$r_c = \sqrt{A_c/\pi} \quad (4)$$

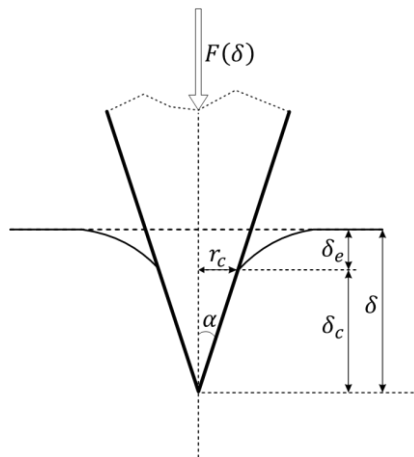


Figure 5 : Schéma d'un indenteur conique pénétrant dans le demi-espace d'un matériau élastique (librement adapté de [38]).

Ainsi :

$$\frac{dF}{d\delta} = 2 \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot r_c \quad (5)$$

Où ν est le coefficient de Poisson du matériau. Rappelons que ce paramètre décrit l'effet de déformation du matériau dans la direction perpendiculaire à la direction de la contrainte appliquée. Pour des matériaux incompressibles, cette déformation transversale tend à conserver un volume constant pour le matériau. Ainsi, la dimension transversale d'un corps élastique augmente à la suite d'un chargement en compression et diminue lorsque celui-ci est soumis à un allongement. La variation relative du volume résultante de la déformation peut donc s'écrire :

$$dV/V = (1 - 2\nu)\varepsilon \quad (6)$$

avec $\varepsilon = dl/l$, la déformation suivant l'axe du chargement et l la dimension suivant cet axe. De cette dernière relation, pour des matériaux incompressibles, comme le sont généralement considérées les cellules vivantes, $\nu = 0.5$, conduit à $dV/V = 0$ [38].

On notera que si l'indentation est réalisée avec un indenteur plat, c'est-à-dire que le rayon r_c reste constant indépendamment de δ et égal au rayon de l'indenteur R_t , il s'en suit après intégration de l'équation (5) que la force appliquée varie linéairement avec l'indentation suivant la relation :

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \cdot 2 \cdot R_t \cdot \delta \quad (7)$$

Lorsque les indentations sont réalisées avec des sondes sphériques, pyramidales ou coniques (qui sont les formes habituelles utilisées en AFM), la relation entre F et δ devient beaucoup plus complexe. Ceci est dû à la variation continue du rayon de contact pendant l'indentation [38]. La Figure 5 et la Figure 6 illustrent la relation entre r_c et δ pour des pénétrateurs conique et sphérique respectivement.

Selon l'approche théorique d'Oliver et Pharr [40] concernant l'indentation de matériaux élastiques par des sondes axisymétriques, l'indentation peut se décomposer en deux termes comme suit et illustrés sur la Figure 5 et la Figure 6 :

$$\delta = \delta_c + \delta_e \quad (8)$$

Où δ_c correspond à la partie du déplacement verticale de l'indenteur qui reste en contact avec le matériau, et δ_e au déplacement de la surface du matériau au niveau de la ligne de contact avec le pénétrateur. δ_e est considéré comme une fraction constante, χ , du déplacement total du pénétrateur :

$$\delta_e = \chi \cdot \delta \quad (9)$$

Selon la théorie de Sneddon [39, 41], $\chi = 1/2$ pour les indenteurs sphériques et $(1 - 2/\pi)$ pour les indenteurs coniques. Ainsi, la profondeur à la ligne de contact devient :

$$\delta_c = \delta - \delta_e = (1 - \chi) \cdot \delta \quad (10)$$

Connaissant la géométrie de l'indenteur et ses paramètres, la relation (10) nous permet de trouver la relation qui lie δ au rayon de contact r_c .

Ainsi, distinguons les deux géométries d'indenteurs que nous avons testées au cours de cette étude :

3.1 Cas d'un indenteur conique

La géométrie de la sonde conique ne peut être déterminée qu'en fonction de la profondeur de l'indentation. En effet, si l'indentation δ est de l'ordre de grandeur du rayon de courbure R_t de l'extrémité de la sonde conique, la géométrie de la sonde à considérer sera celle du sommet du pénétrateur à savoir paraboloidal ou sphérique. En revanche, si l'indentation δ est profonde, à savoir bien supérieure au rayon de courbure R_t de l'extrémité de la sonde conique, alors la géométrie du pénétrateur à considérer devra être conique. Lors d'une expérience AFM sur cellules vivantes, l'indentation est généralement profonde, nous considérerons donc que la géométrie à considérer est conique pour un indenteur conique [38].

Comme montré sur la Figure 5, nous pouvons écrire que le rayon r_c est relié à l'indentation δ par la relation suivante :

$$r_c = (1 - \chi) \cdot \delta \cdot \tan(\alpha) = \frac{2\delta}{\pi} \tan(\alpha) \quad (11)$$

où α est le demi angle d'ouverture de la sonde conique.

Ainsi, pour une indentation profondes ($\delta \gg R_t$) et une adhésion négligeable entre l'indenteur et l'échantillon, l'équation (11) peut être utilisée dans l'équation (5) pour déterminer la relation entre la force F et l'indentation δ :

$$F = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad (12)$$

On notera que la même théorie peut être appliquée aux indenteurs pyramidaux comme ceux qu'on a utilisé lors de nos essais AFM moyennant l'introduction de modifications mineures relatives à la géométrie de l'indenteur [42] [43]. L'expression de la relation de la force F en fonction de l'indentation δ d'une pointe pyramidale devient d'après Bilodeau 1992 et Alcaraz 2003 ([10, 42]):

$$F = \frac{3}{4} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad (13)$$

Le passage d'un indenteur conique à un indenteur pyramidale est justifié par l'inexistence de pointes AFM coniques sur le marché.

3.2 Cas d'un indenteur sphérique

De la même façon que pour un indenteur conique, nous chercherons à écrire une relation entre le rayon de contact r_c et l'indentation δ via des considérations géométriques à partir de la Figure 6 :

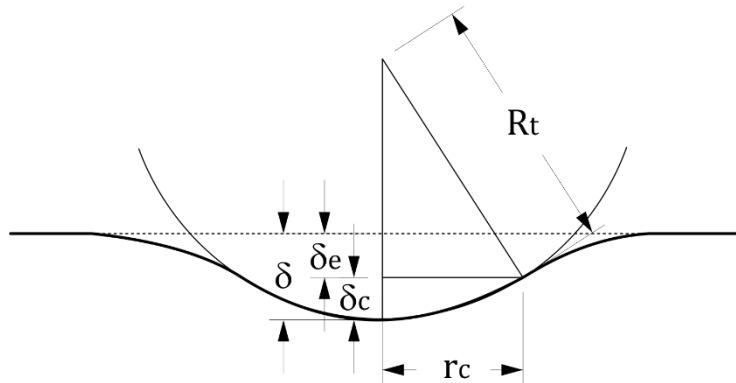


Figure 6 : Schéma d'un indenteur sphérique pénétrant dans le demi-espace d'un matériau élastique plan.

$$R_t^2 = (R_t - \delta_c)^2 + r_c^2 \quad (14)$$

Où d'après Sneddon $\delta_c = \frac{\delta}{2}$ dans le cas d'un indenteur sphérique et R_t le rayon de courbure du pénétrateur R_t s'écrit donc :

$$R_t^2 = \left(R_t - \frac{\delta}{2}\right)^2 + r_c^2 \quad (15)$$

En considérant la solution positive de r_c :

$$r_c = \sqrt{R_t \cdot \delta - \frac{\delta^2}{4}} \quad (16)$$

En négligeant $\frac{\delta^2}{4}$ devant $R_t \cdot \delta$, on trouve :

$$r_c = \sqrt{R_t \cdot \delta} \quad (17)$$

Ainsi à partir de l'équation (17), la dépendance entre F et δ pour les sondes sphériques s'écrit :

$$F = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \quad (18)$$

En conclusion, les équations (13) et (18) sont classiquement utilisées pour l'analyse des courbes force-hauteur obtenues lors du test d'indentation AFM de cellules vivantes dépendante de la géométrie de l'indenteur. Cependant, ces équations doivent être utilisées avec prudence. En effet, elles ne sont valables que si on considère que l'adhérence sonde-cellule est négligeable. De plus pour les indenteurs coniques, l'équation (13) n'est valable que dans l'approximation $\delta \gg R_t$, et pour les indenteurs sphériques l'équation (18) n'est valable que dans l'approximation $\delta < R_t$.

Chapitre 4

Matériels et Méthodes

4. Matériels et Méthodes

1. Simulation par éléments finis

Dans le but de proposer une approche par simulation numérique, nous avons utilisé le logiciel ANSYS Mechanical, Inc. Ce logiciel permet d'effectuer des simulations mécaniques en calcul de structures. Il donne lieu à plusieurs types d'analyse, statique, modale, harmonique et temporelle. Son interface est montrée ci-dessous :

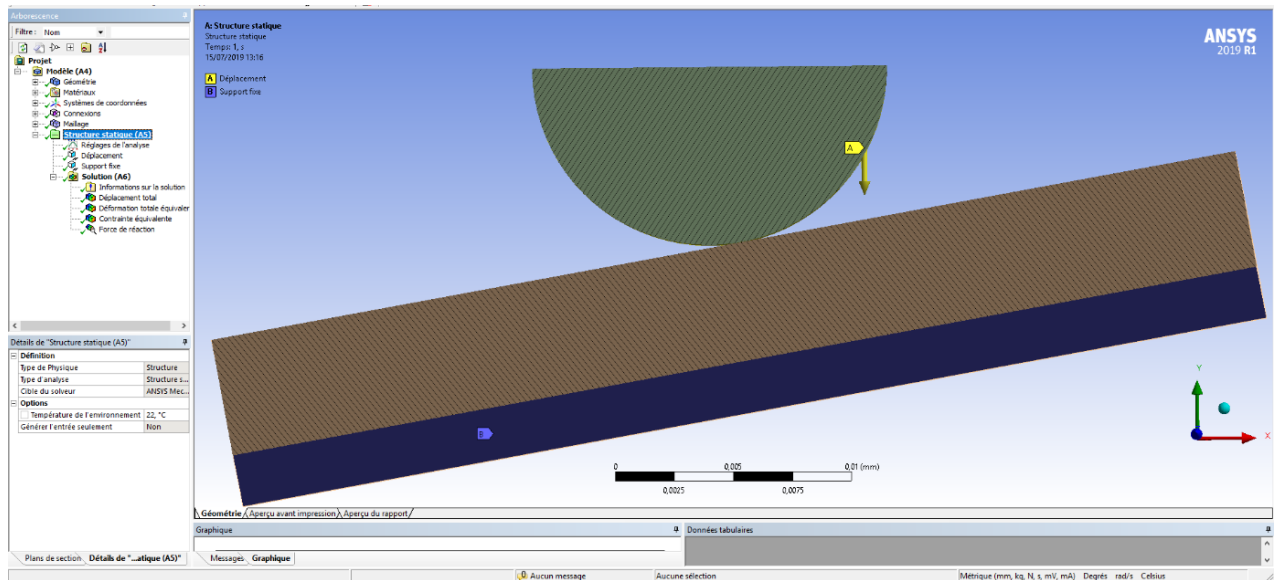


Figure 7 : Interface du logiciel ANSYS Mechanical, Inc.

Le logiciel ANSYS Mechanical est basé sur l'analyse par méthode des éléments finis (MEF). Cette dernière permet de résoudre des équations aux dérivées partielles dans le but de représenter le comportement dynamique d'un système physique. Ce système est discrétisé, ou découpé, pour former un maillage sur lequel ces équations aux dérivées partielles sont calculées. Le maillage utilisé ici est un maillage tétraédrique comme l'indique la Figure 8.

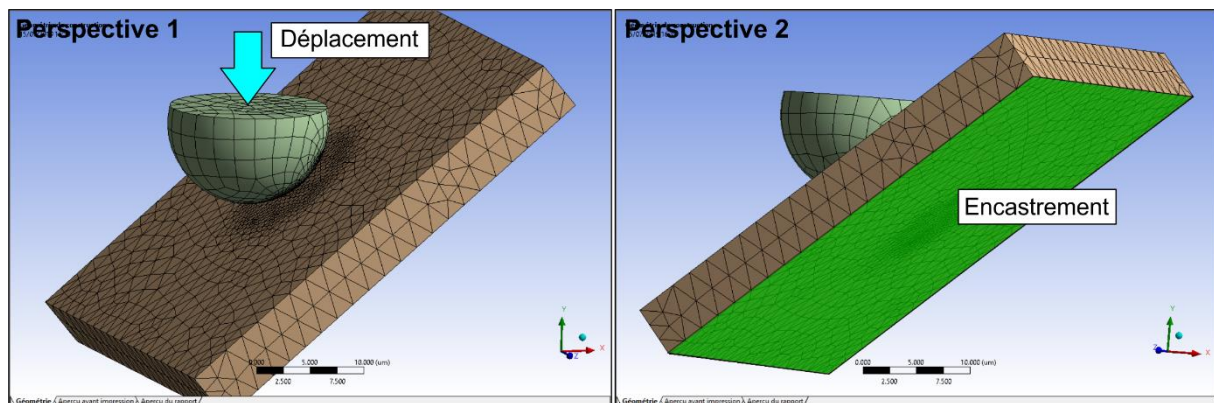


Figure 8 : Conditions aux limites utilisées pour la simulation numérique.

Afin d'être résolues, ces équations aux dérivées partielles doivent avoir des conditions aux limites. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 8, la base du substrat est encastree, le maillage est affiné autour de la zone de contact pointe-substrat, les dimensions du substrat sont

prises assez grandes afin d'éviter toute inclinaison sur les bords et un déplacement vertical, plutôt qu'une force, est imposé au lieu pour indenter le substrat. Ainsi, nous avons pu extraire plusieurs paramètres après exécution du logiciel, tels que les forces de réaction du substrat, les contraintes et les déformations (déplacements) (Voir Figure 9).

Le coefficient de poisson ν a été pris égale à 0.4, le module de Young de la pointe à 250kPa et le module de Young du substrat égale à 1kPa.

Notons que dans le but de simplifier la théorie et la simulation, nous avons considéré les pointes pyramidales comme étant coniques.

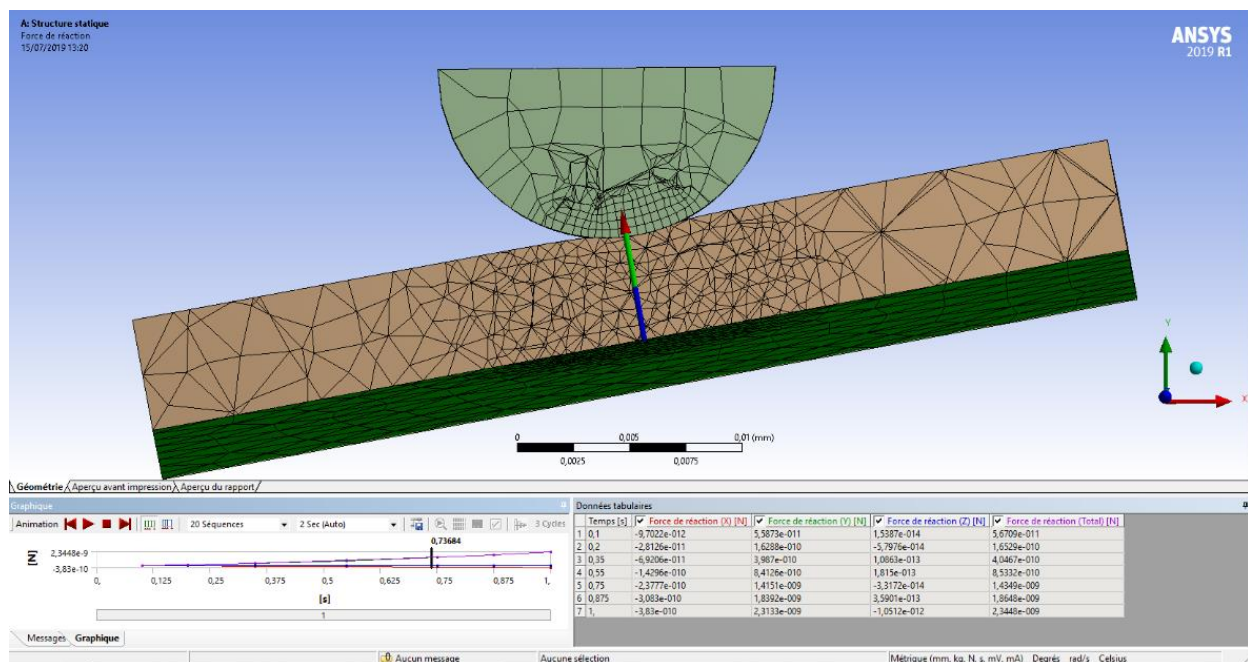


Figure 9 : Exemples de résultats obtenus par simulation numérique.

2. Mesures expérimentales

2.1 Protocole de fabrication des gels de polyacrylamide

Pour les mesures expérimentales réalisées en AFM, nous avons choisi comme substrat modèle les gels de polyacrylamide. En effet, en plus d'avoir été largement utilisés dans la littérature depuis 1997 soit pour mesurer les forces développées par les cellules sur leur substrat [44, 45], soit pour étudier l'influence des propriétés mécaniques du substrat sur les fonctions cellulaires telles que la migration, l'adhésion, la phagocytose [6, 46-50], ils présentent plusieurs avantages : il est aisé de les fabriquer, de contrôler leur rigidité en choisissant un rapport concentration d'acrylamide/bis acrylamide adapté [51], et leurs propriétés mécaniques obtenues par différentes techniques expérimentales (AFM, micropipette, viscosimétrie) ont fait l'objet de nombreuses études [52]. On notera que l'utilisation des gels de polyacrylamide en biologie cellulaire a permis d'ouvrir un nouveau champ disciplinaire : la mécanobiologie. En effet, ces gels d'élasticité modulable et utilisés comme substrat d'adhérence des cellules ont permis

d'étudier le comportement cellulaire dans un contexte dont les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire étaient plus physiologiques que le verre ou le plastique classiquement utilisés en culture cellulaire [6].

Pour cette présente étude, nous avons choisi de travailler avec un gel de polyacrylamide de module d'élasticité attendu de 13kPa et dont le protocole de fabrication est décrit dans Elosegui et al [51]. Brièvement, la fabrication de ce gel se décline en trois principales étapes détaillées ci-dessous : (i) le traitement de la surface des lamelles de verre qui servent de supports aux gels, (ii) le traitement de la surface des lamelles de verre qui servent de moules afin de faciliter leur décollement après polymérisation du gel, et enfin (iii) la polymérisation des gels. Ce travail a été réalisé avec des lamelles-support de 14mm de diamètre et des lamelles-moule de 10mm de diamètre.

2.1.1 Traitement des lamelles-support :

La première étape consiste à fonctionnaliser les lamelles de verre qui servent de support aux gels en les maintenant pendant 3 minutes dans une solution contenant de l'acide acétique 10%, de l'éthanol ainsi que du Bind-Silane (Life Sciences). Ce traitement de surface permet de lier par covalence les gels de polyacrylamide à la surface du verre. Par la suite, les lamelles sont rincées à l'éthanol puis laissées séchées à l'air pendant 45 min.

2.1.2 Traitement des lamelles-moule :

En parallèle, les lamelles de verre qui servent de moules sont baignées dans une solution de Repel-Silane ES non diluée (Sigma Aldrich) afin d'empêcher l'adhésion du gel sur les lamelles-moule. On notera que la réaction est quasi-instantanée et que la solution de Repel-Silane est réutilisable. Puis, les lamelles sont laissées séchées à l'air pendant 45 min.

2.1.3 Polymérisation du gel de polyacrylamide :

Pendant le temps de séchage des lamelles, une solution à base d'eau, d'Acrylamide (solution stock 40%, Sigma Aldrich) et de Bis-Acrylamide (solution stock 2%, Biorad) est préparée. Le Bis-Acrylamide étant un agent réticulant, il permet de créer le réseau 3D de polyacrylamide au lieu d'avoir des chaînes linéaires. La polymérisation du gel débute dès que le N, N, N', N'-Tetraméthylènediamine (TEMED, Sigma Aldrich) et l'Ammonium Persulfate 10% (APS) sont ajoutés à la solution. Immédiatement après ajout des catalyseurs, une goutte de cette solution est déposée sur la lamelle-support et est recouverte par la lamelle-moule. Le gel se polymérise en 30 min. Ensuite, la lamelle-moule est enlevée délicatement à l'aide d'une pince. Ainsi, nous obtenons un gel de polyacrylamide de 10mm de diamètre adhérant sur la lamelle moule de 14mm de diamètre. Le gel est conservé à 4°C dans du Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffer Saline, PBS, Sigma Aldrich) avant d'être testé en AFM.

2.2 Fabrication des supports pour les gels de polyacrylamide

Comme énoncé plus haut, l'objectif de ce stage est d'étudier l'effet de l'angle d'inclinaison entre un substrat et un pénétrateur. Les gels de polyacrylamide préparés suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent sont supposés plans et horizontaux. Ainsi, pour incliner les gels nous avons opté pour la fabrication de supports, d'inclinaison imposée allant de 0°, 5°, 10°,

15°, à 20°. Les plans de ces pièces supports ont été réalisés avec le logiciel SpaceClaim® d'ANSYS, Inc (Figure 10).

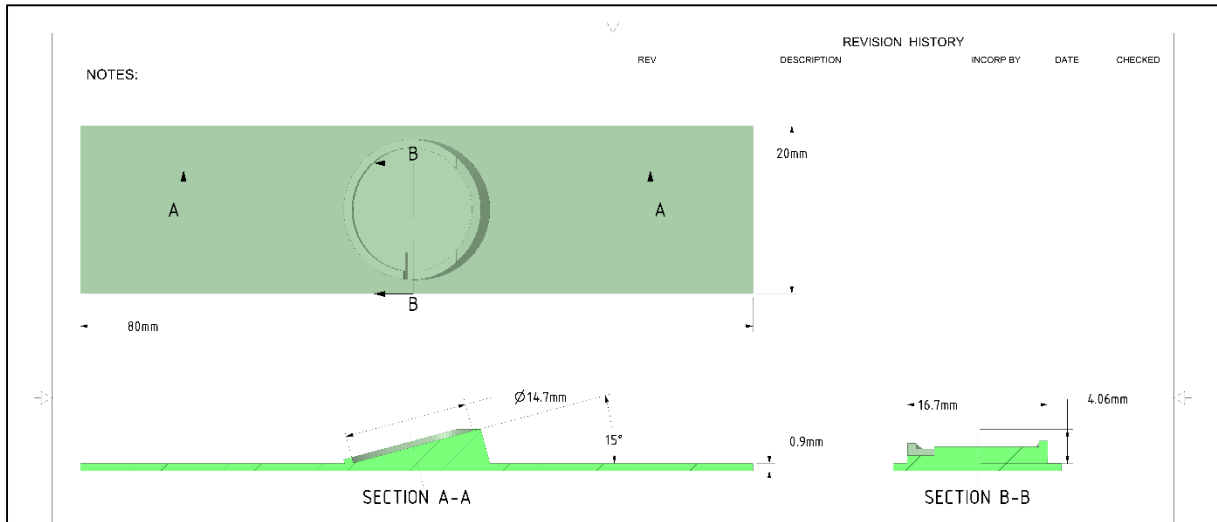


Figure 10 : Exemple de conception du support du gel avec une inclinaison de 15°.

Ces plans ont ensuite été convertis en format STL lisibles par les imprimantes 3D afin de les imprimer. Les modèles de supports sont montrés sur la figure ci-dessous :

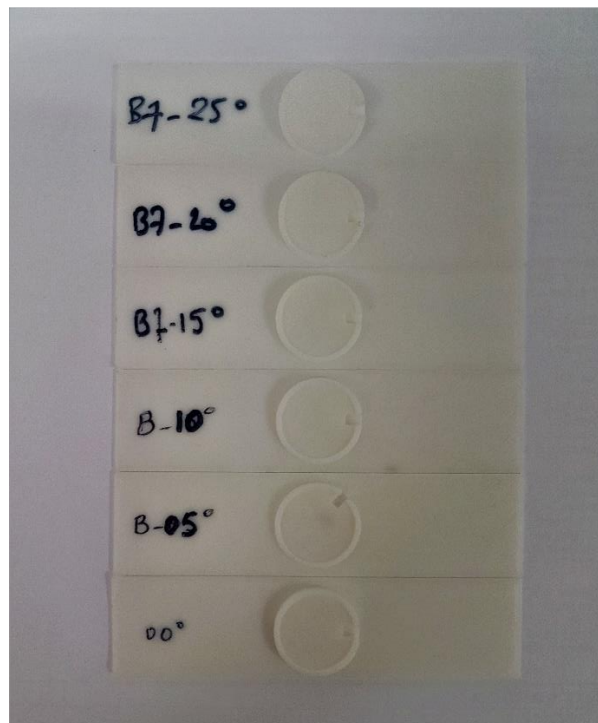


Figure 11 : Ensemble des supports imprimés en 3D.

Il est à noter que les dimensions des pièces ont été choisies afin qu'elles s'adaptent (i) à l'encombrement disponible sous la tête AFM, et (ii) aux dimensions des lamelles support des gels de polyacrylamide de 14mm de diamètre.

2.3 Acquisition et analyse des courbes force-hauteur en AFM

Le banc AFM que nous avons utilisé au cours de ce stage est le « Nanowizard® 4 » de chez Bruker-JPK (Berlin, Allemagne) disponible au niveau de la plateforme d'imagerie du collège de France (Figure 12).

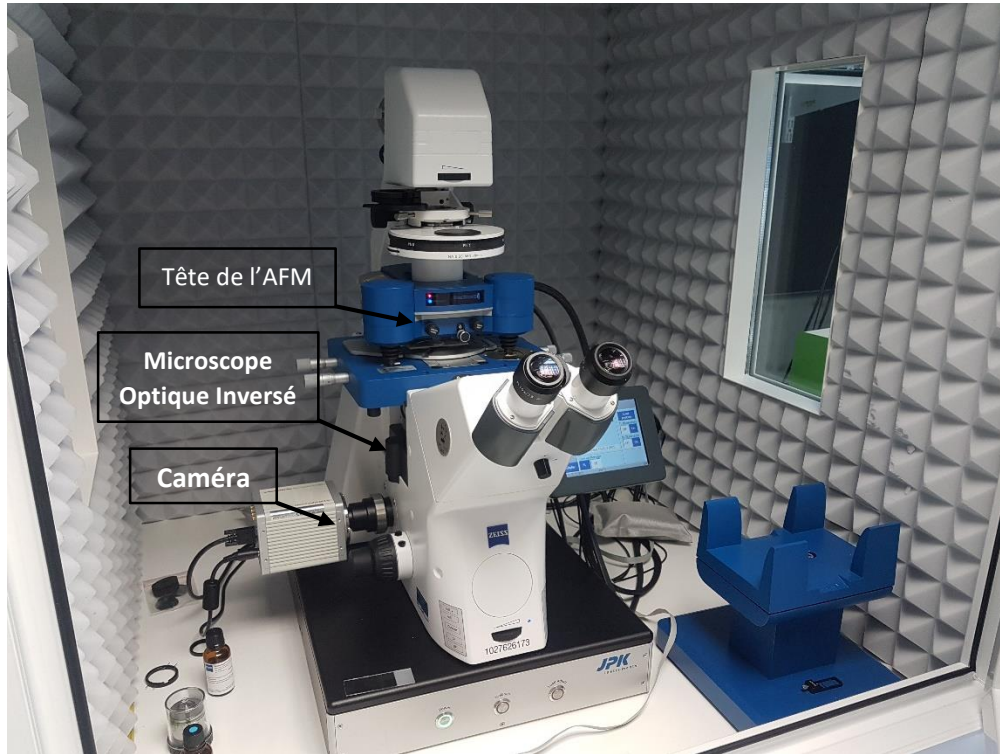


Figure 12 : Microscope à Force Atomique "Nanowizard® 4" de chez Bruker-JPK installé au collège de France.

Il nous a permis de réaliser les courbes force-distance sur le gel de polyacrylamide avec deux types de pointes, une pyramidale et l'autre sphérique :

2.3.1 Pointe pyramidale :

Nous avons utilisé des pointes pyramidales faites à base de Silicium dopé de type N non revêtus (CSC38) fournis par MikroMasch® (Sofia, Bulgarie). La hauteur de la pointe est de $15\mu\text{m} \pm 3$, son rayon de courbure à son extrémité est égal à 8 nm et son demi-angle d'ouverture est de 20° [53]. La longueur totale du bras de levier est de $350\mu\text{m}$. La géométrie de la pointe a été observée par microscope électronique à balayage (voir Figure 13).

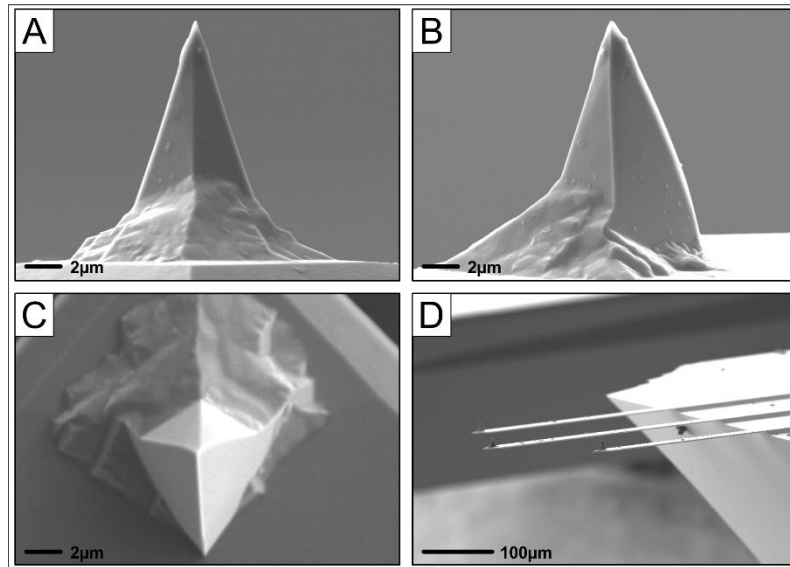


Figure 13 : Pointe CSC38 vue en microscopie électronique à balayage. A- vue de face ; B- vue de côté ; C- vue de dessus et D- vue en perspective.

2.3.2 Pointes sphériques :

Pour des raisons de coût, nous avons choisi de coller nous-mêmes les sphères à l'extrémité des cantilevers. Pour ce faire, nous avons utilisé des cantilevers sans pointes Arrow™ TL1 de chez NanoWorld Neuchâtel Suisse [54] sur lesquels des microbilles sphériques en polystyrène de 15μm de diamètre [55] ont été collées avec de la colle « Loctite ». Concrètement, la solution de microbilles a été diluée dans de l'eau distillée. Une goutte de cette solution a été déposée sur une lamelle de verre à proximité d'une goutte de colle comme indiqué sur la Figure 14.

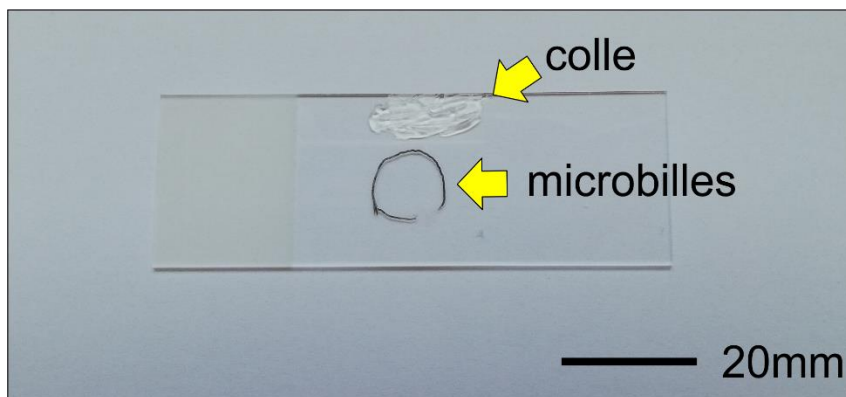


Figure 14 : Préparation pour le collage des microbilles de polystyrène sur une lame porte-objet de 76x26mm.

Le cantilever sans pointe est ensuite monté sur la tête AFM. Grâce à l'observation via le microscope optique inversé, l'extrémité du cantilever est ramené au-dessus du bord de la goutte de colle en utilisant les vises micrométriques et les moteurs piézoélectriques de l'AFM. Nous effectuons ensuite une approche fine de façon à plonger l'extrémité du cantilever dans la colle puis on le remonte. Le cantilever est déplacé au-dessus de la goutte contenant les microbilles (voir Figure 15). Après avoir identifié une microbille isolée, l'extrémité du cantilever est mise en contact avec cette dernière grâce au mouvement de la tête AFM. Une légère force de pression (~ 0.8 volts) est maintenue pendant 5mn pour permettre le collage de la microbille sur le cantilever (l'unité de pression ici est le volt, puisqu'elle est mesurée par l'inflexion de la poutre

lors du contact pointe-échantillon et qui provoque l'augmentation de l'intensité électrique sur les photodiodes, le laser n'étant plus au milieu de celles-ci). L'ensemble bras de levier-microbille est retiré de la tête AFM et conservé pour consolidation de la colle pendant 24h.

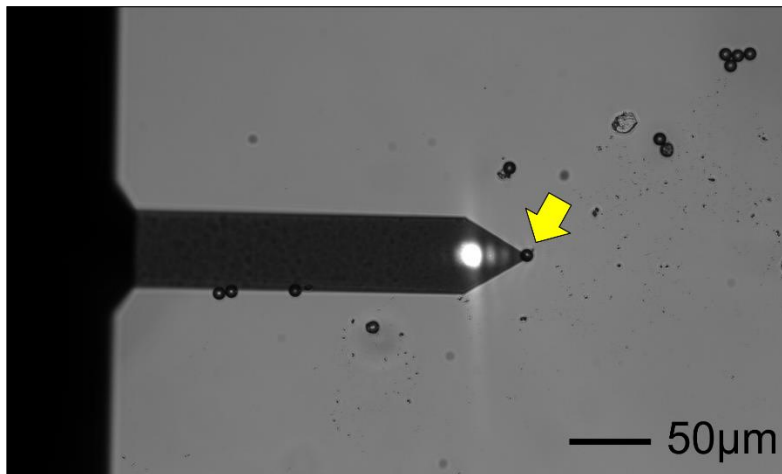


Figure 15 : Positionnement du bras de levier au-dessus d'une microbille isolée.

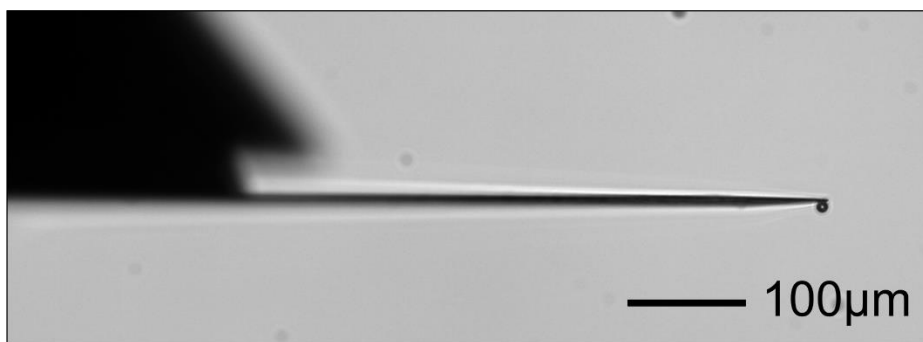


Figure 16 : Vue latérale en contraste de phase de l'ensemble bras de levier TL1 + microbille de polystyrène de 15µm.

2.3.3 Calibration des bras de levier :

Une procédure d'étalonnage a été systématiquement effectuée pour calculer la constante de raideur nominale, k , des différents cantilevers utilisés. Cette calibration est basée sur la méthode dite de fluctuations thermiques décrite par Hutter [56]. Elle consiste à mesurer les fluctuations du cantilever dues à l'énergie thermique de son environnement (température ambiante) et à en déduire la constante de raideur via la relation suivante :

$$\frac{1}{2}k_bT = \frac{1}{2}kd^2 \quad (19)$$

Où d est déflexion du cantilever, k_b la constante de Boltzmann, T la température, et k la constante de raideur du cantilever.

La constante de raideur des cantilevers avec la pointe pyramidale CSC38 est de $\sim 0.025\text{N/m}$ et celle des LT1 avec la microbille est de $\sim 0.03\text{N/m}$.

2.3.4 Analyse des courbes force-hauteur

Les mesures AFM ont été réalisées en considérant une grille de points de mesure de 100 points (10×10) sur une surface de $18\mu\text{m} \times 18\mu\text{m}$. Pour chaque échantillon, quatre zones de mesure

différentes à la surface du gel ont été choisies de manière aléatoire. Le délai entre chaque point de mesure est de 0,5s pour permettre au bras de levier de se positionner correctement sur les coordonnées du point suivant. La vitesse de descente verticale (indentation) est imposée à 4µm/s. Seule la courbe d'approche est prise en compte dans l'analyse. Ces courbes expérimentales sont par la suite ajustées à l'aide de loi théorique décrite précédemment à savoir l'équation (13) ou (18) en fonction de la géométrie de l'indenteur.

- Pour un indenteur pyramidal :

La fonction d'ajustement permettant de calculer P_c et E est obtenue en combinant les équations (2) et (13).

Soit,

$$\frac{3}{4} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \left(P_c - h - \frac{F}{k} \right)^2 \cdot \tan(\alpha) - F = 0 \quad (20)$$

Où F est la force, k la constante de raideur du cantilever, h la position du cantilever contrôlée par les moteurs piézoélectriques, P_c le point de contact, E le module de Young, ν coefficient de poisson et α demi angle d'ouverture de la pointe.

- Pour un indenteur sphérique :

La fonction d'ajustement permettant de calculer P_c et E est obtenue en combinant les équations (2) et (18).

Soit,

$$\frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot \left(P_c - h - \frac{F}{k} \right)^{\frac{3}{2}} - F = 0 \quad (21)$$

Avec R_t rayon de la sphère.

Notons que nous avons considéré que le coefficient de Poisson est égal à 0,4 correspondant à la valeur moyenne des valeurs rapportées pour le gel de polyacrylamide dans la littérature [57, 58]

Afin d'automatiser l'analyse des courbes force-hauteur une interface graphique a été développée au laboratoire sous Matlab (voir Figure 17).

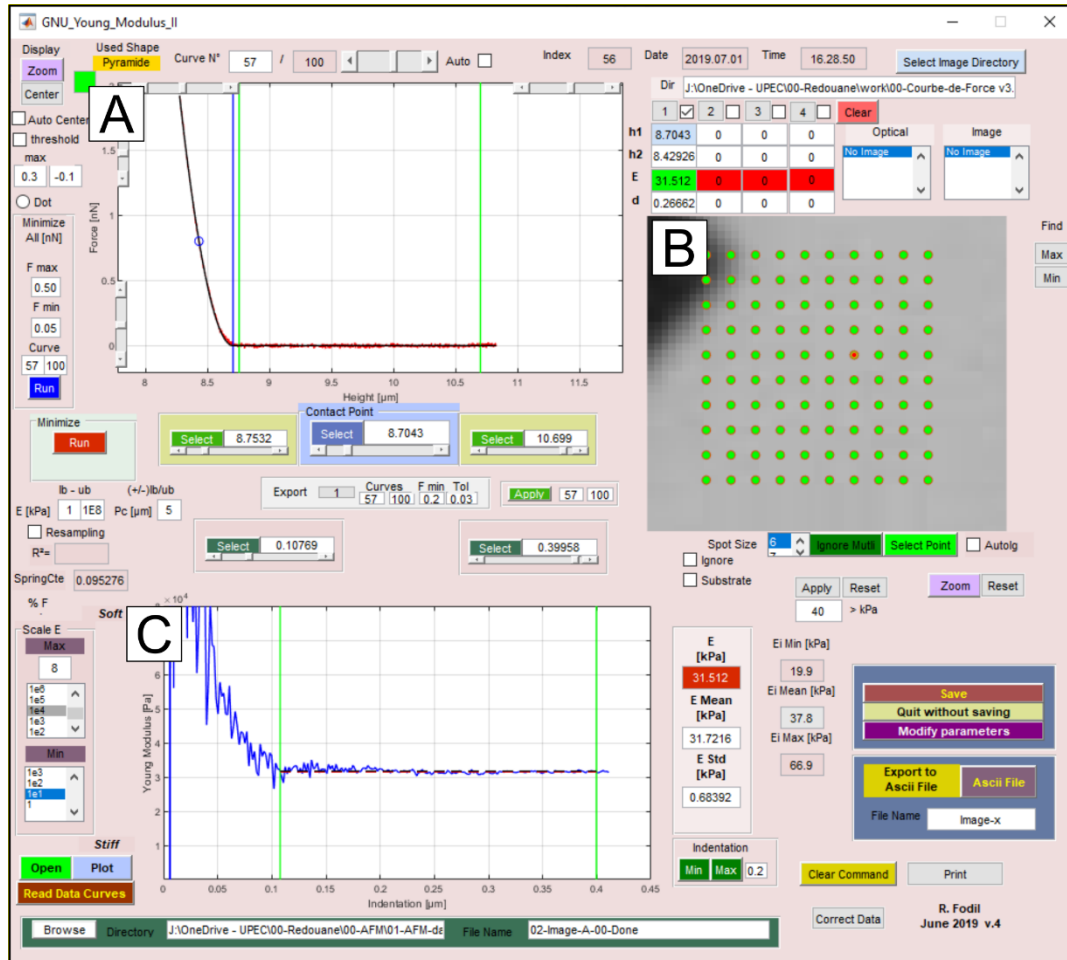


Figure 17 : Interface graphique développée sous Matlab au laboratoire permettant l'analyse des courbes force-hauteur obtenues en AFM. A- Courbe expérimentale en rouge et son ajustement par la courbe de Hertz en noir. B- Position des points de mesure. C- Courbe Module de Young-Indentation.

Cette interface est divisée en 3 parties (Figure 17). La Figure 17-A, présente la courbe d'approche force-hauteur expérimentale en rouge et la courbe d'ajustement en noir dépendante de la géométrie de l'indenteur (voir paragraphe III.2). L'ajustement de la courbe expérimentale par la courbe théorique se fait de manière automatique par le programme.

Par ailleurs, l'interface graphique permet d'afficher l'évolution du module de Young en fonction de l'indentation (Figure 17-C). En effet, comme il a été décrit dans Féréol et al [59], nous veillons à ce que le module de Young reste sensiblement constant en fonction de l'indentation pour valider l'hypothèse d'un gel de polyacrylamide assimilable à un matériau élastique linéaire.

Nous avons également reconstruit la topographie de l'échantillon à l'aide des points de contact P_c déterminés à partir de chaque courbe force-hauteur acquise en AFM. En effet, pour chacun d'entre eux, nous avons calculé l'angle d'inclinaison local du gel en considérant les points de contacts avoisinants. Puis, une estimation de l'inclinaison moyenne du gel est calculée en faisant la moyenne des angles des 100 points de mesure (voir Figure 18).

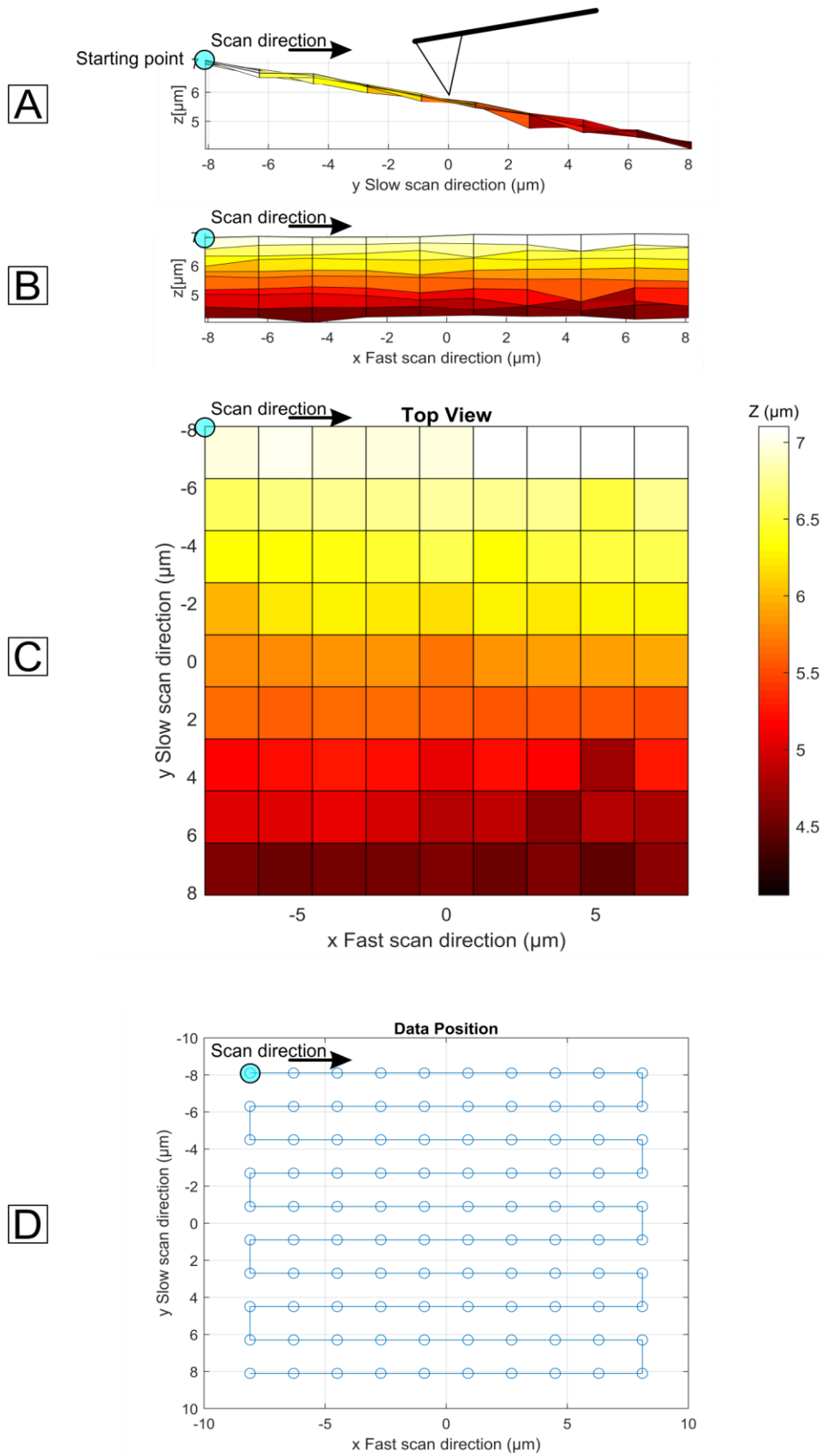


Figure 18 : Topographie de la surface du gel de polyacrylamide reconstruite à partir des points de contact des 100 points de mesure. A- Vue \perp à la direction « slow scan » de l'AFM. B- Vue \perp à la direction « fast scan » de l'AFM. C- Vue de haut donnant la topographie de l'échantillon en code couleur. D- Vue de haut avec ordre d'acquisition des points de mesure.

Chapitre 5

Résultats et discussions

5. Résultats et discussions

Dans le but d'étudier l'effet de l'angle entre le substrat et l'indenteur de l'AFM nous avons suivi trois approches différentes en parallèle : une approche théorique à partir de l'équation de Sneddon, une approche par simulation numérique et une approche par mesure expérimentale. L'objectif de ces trois approches consistent à évaluer l'impact de l'angle d'inclinaison entre le substrat et l'indenteur sur la mesure de la force appliquée et du module de Young calculé au cours d'une expérience AFM. Les résultats obtenus au cours de ce stage seront donc présentés en trois parties distinctes :

1. Approche théorique

1.1 Cas d'un indenteur sphérique

Considérons un indenteur sphérique de rayon R_t qui pénètre un matériau élastique plan (dans notre cas le gel de polyacrylamide) dont la surface est inclinée par rapport à l'horizontale d'un angle β comme illustré sur la Figure 19. L'indenteur représente une pointe AFM sphérique qui se déplace vers le bas suivant l'axe vertical. L'indentation verticale résultante δ mesurée par l'AFM est décrite par la relation (2). Posons que la force mesurée par l'AFM est notée $F_{y\beta}$, que la force appliquée portée par l'axe (aa') perpendiculaire à la surface du plan incliné est notée F_β et que l'indentation de la demi-sphère dans le matériau incliné portée par l'axe (aa') est notée δ' .

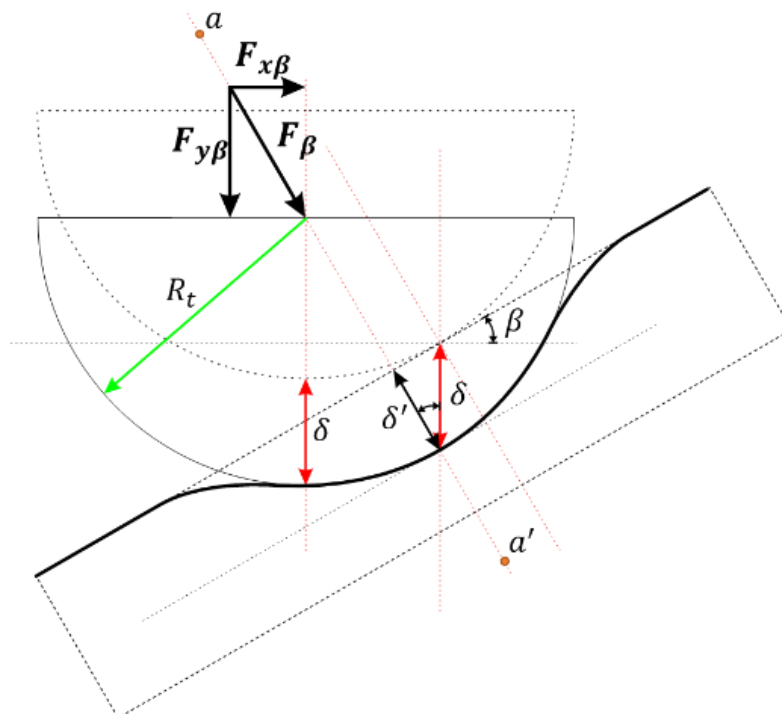


Figure 19 : Schéma représentant l'indentation δ d'une demi sphère de rayon R_t dans un échantillon incliné d'un angle β par rapport à l'horizontale. La ligne courbe noire montre la déformation de la surface de l'échantillon due à l'indentation de la sphère. La force mesurée par l'AFM est notée $F_{y\beta}$. La force appliquée, portée par l'axe (aa') perpendiculaire à la surface du plan incliné est notée F_β . L'indentation de la demi-sphère dans le matériau incliné portée par l'axe (aa') est notée δ' .

Par analogie avec la loi de Hertz définie pour une force appliquée perpendiculairement à la surface du matériau (voir équation 5), nous faisons l'hypothèse que F_β suit cette même loi en posant que l'indentation δ' est définie en fonction de l'indentation δ par la relation ci-dessous:

$$\delta' = \delta \cdot \cos(\beta) \quad (22)$$

Ainsi, nous pouvons écrire que :

$$F_\beta = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot (\delta')^{\frac{3}{2}} \quad (23)$$

De la même façon, pour des raisons géométrique, une relation peut être donnée entre la force $F_{y\beta}$ appliquée par l'AFM via le déplacement vertical h de la tête AFM et la force F_β (voir Figure 19) :

$$F_{y\beta} = F_\beta \cdot \cos(\beta) \quad (24)$$

Ainsi à partir des équations (7) et (8) on obtient :

$$F_{y\beta} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \cdot \cos \beta \quad (25)$$

$$F_{y\beta} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \cdot \cos \beta^{\frac{5}{2}} \quad (26)$$

On pourra remarquer que lorsque l'angle $\beta = 0$, on retrouve l'équation (6), c'est-à-dire l'équation de Hertz classique.

Afin de montrer l'importance de l'effet de l'angle d'inclinaison sur la force d'indentation, nous proposons de comparer cette dernière relation (26) avec la force nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane en calculant le rapport de ces deux forces :

$$\frac{F_{y\beta}}{F} = \cos(\beta)^{\frac{5}{2}} \quad (27)$$

où β est l'angle d'inclinaison.

La variation du rapport $F_{y\beta}/F$ en fonction de β est présentée sur la Figure 20, F étant la force prédite par la loi de Hertz.

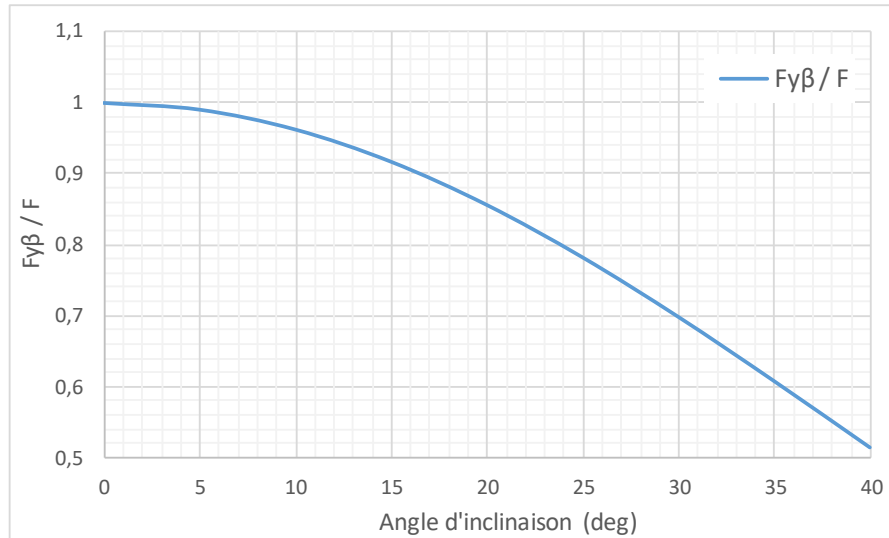


Figure 20 : Courbe théorique obtenue pour la sphère en calculant le rapport de la force d'indentation pour un plan incliné notée $F_{y\beta}$ sur la force d'indentation nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane et horizontale notée F en fonction de l'angle d'inclinaison β .

La Figure 20 met en évidence que plus l'angle d'inclinaison β augmente plus le rapport $F_{y\beta}/F$ diminue jusqu'à atteindre une valeur voisine de 50 % pour un angle d'inclinaison de 40°. Autrement dit, la théorie prévoit que l'effet de l'angle d'inclinaison sur la mesure de la force ne peut pas être négligé.

De cette observation, nous pouvons en déduire que, dans le cas d'un plan incliné et compte tenu de la proportionnalité qui existe entre F et E , le module de Young calculé via l'équation (18) est un module apparent. Nous proposons de le corriger pour déterminer un module d'Young réel en appliquant une modification qui prendrait en considération l'inclinaison du plan :

$$E_{réel} = E_{apparent} \cdot \cos(\beta)^{\frac{2}{5}} \quad (28)$$

1.2 Cas d'un indenteur conique

En ce qui concerne la géométrie conique, nous considérons un cône avec un demi angle d'ouverture α , un substrat présentant une inclinaison d'un angle de valeur β et une indentation δ suivant l'axe verticale (Figure 21 et Figure 22).

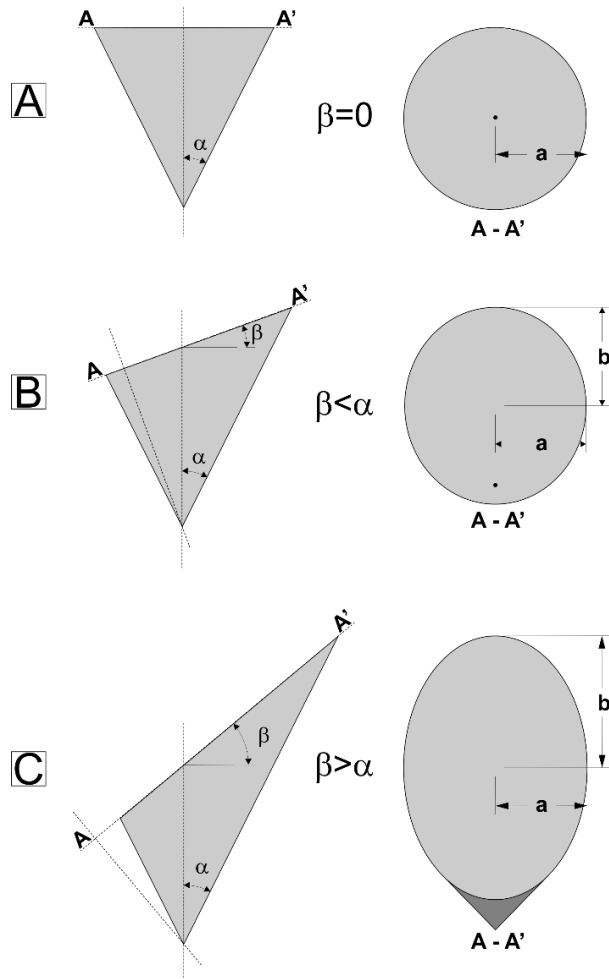


Figure 21 : Surface d'intersection entre un cône d'angle de demi-ouverture α et un plan incliné avec un angle β . A- $\beta = 0$ plan horizontal et perpendiculaire à l'axe du cône, la surface d'intersection a la forme d'un cercle de rayon a . B- $\beta < \alpha$, la surface d'intersection a la forme d'une ellipse de demi-petit axe a et de demi-grand axe b . Le point noir indique la position du sommet de la pointe. C- $\beta > \alpha$ la surface d'intersection a la forme d'une ellipse de demi-petit axe a et de demi-grand axe b . La partie grisée correspond à la pointe.

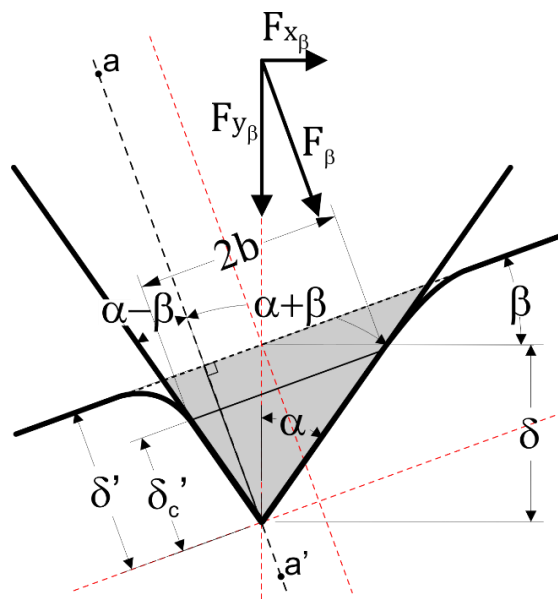


Figure 22 : Cône de demi angle α indentant une surface plane inclinée par rapport à l'horizontale d'un angle β .

Tout comme dans le cas de la sphère, la force mesurée par l'AFM est la force verticale $F_{y\beta}$ qui est liée à la force F_β perpendiculaire au substrat par la relation (24).

L'indentation verticale est liée à l'indentation perpendiculaire au substrat par la relation : $\delta' = \delta \cdot \cos(\beta)$.

Notons que la surface de contact entre la pointe AFM et l'échantillon incliné d'un angle β , n'a plus la forme d'un cercle mais d'une ellipse (voir Figure 21 B et C).

De la relation (5), en considérant l'axe a-a' on peut écrire :

$$\frac{dF_\beta}{d\delta'} = 2 \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot r_c \quad (29)$$

En considérant que la relation (29) reste valable pour une géométrie elliptique, on se propose de définir le rayon de contact r_c comme suit :

$$r_c = \sqrt{\frac{A_e}{\pi}} = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{a \cdot b \cdot \pi} = \sqrt{a \cdot b} \quad (30)$$

Avec A_e surface de l'ellipse, a demi-petit axe de l'ellipse, b demi-grand axe de l'ellipse.

Par analogie à l'équation (10) et en considérant que χ défini par Sneddon pour le cône reste valable :

$$\delta'_c = \delta' - \delta'_e = (1 - \chi) \cdot \delta' = \frac{2}{\pi} \delta' \quad (31)$$

Ainsi pour le demi-petit axe de l'ellipse nous avons :

$$a = \tan(\alpha) \cdot \delta'_c \quad (32)$$

Et pour le demi-grand axe de l'ellipse :

$$b = \frac{1}{2} \cdot [\tan(\alpha + \beta) \cdot \delta'_c + \tan(\alpha - \beta) \cdot \delta'_c] \quad (33)$$

D'où à partir des équations (30), (32) et (33) :

$$r_c = \sqrt{\tan(\alpha) \cdot \delta'_c \cdot \frac{1}{2} \cdot [\tan(\alpha + \beta) \cdot \delta'_c + \tan(\alpha - \beta) \cdot \delta'_c]} \quad (34)$$

$$r_c = \sqrt{\tan(\alpha) \cdot \delta' \cdot \frac{2}{\pi} \cdot \frac{1}{2} \cdot \left[\tan(\alpha + \beta) \cdot \delta' \cdot \frac{2}{\pi} + \tan(\alpha - \beta) \cdot \delta' \cdot \frac{2}{\pi} \right]} \quad (35)$$

$$r_c = \frac{\sqrt{2}}{\pi} \cdot \delta' \cdot \sqrt{\tan(\alpha)} \sqrt{\tan(\alpha + \beta) + \tan(\alpha - \beta)} \quad (36)$$

Ainsi, à partir de l'équation (29) et (36), nous obtenons après intégration l'équation suivante :

$$F_\beta = \frac{\sqrt{2}}{\pi} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \delta'^2 \cdot \sqrt{\tan(\alpha)} \cdot \sqrt{\tan(\alpha + \beta) + \tan(\alpha - \beta)} \quad (37)$$

Avec l'AFM la force mesurée, est suivant l'axe vertical à savoir :

$$F_{y\beta} = F_\beta \cdot \cos(\beta) \quad (38)$$

En remplaçant δ' par δ suivant l'équation (22) et en utilisant l'équation (38) nous obtenons :

$$F_{y\beta} = \frac{\sqrt{2}}{\pi} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \delta^2 \cdot \cos(\beta)^3 \cdot \sqrt{\tan(\alpha)} \cdot \sqrt{\tan(\alpha + \beta) + \tan(\alpha - \beta)} \quad (39)$$

On remarque que si on remplace β par 0° , c'est-à-dire le cas du plan horizontal, on retrouve l'équation (12).

En comparant, la force nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane horizontale, on obtient le rapport suivant :

$$\frac{F_{y\beta}}{F} = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \cos(\beta)^3 \cdot \frac{[\sqrt{\tan(\alpha+\beta)+\tan(\alpha-\beta)}]}{\sqrt{\tan(\alpha)}} \quad (40)$$

Notons que la variation du rapport $F_{y\beta}/F$ dépend non seulement de l'angle d'inclinaison β , mais également du demi-angle d'ouverture α .

La Figure 23 présente l'allure de la courbe issue de l'équation (40).

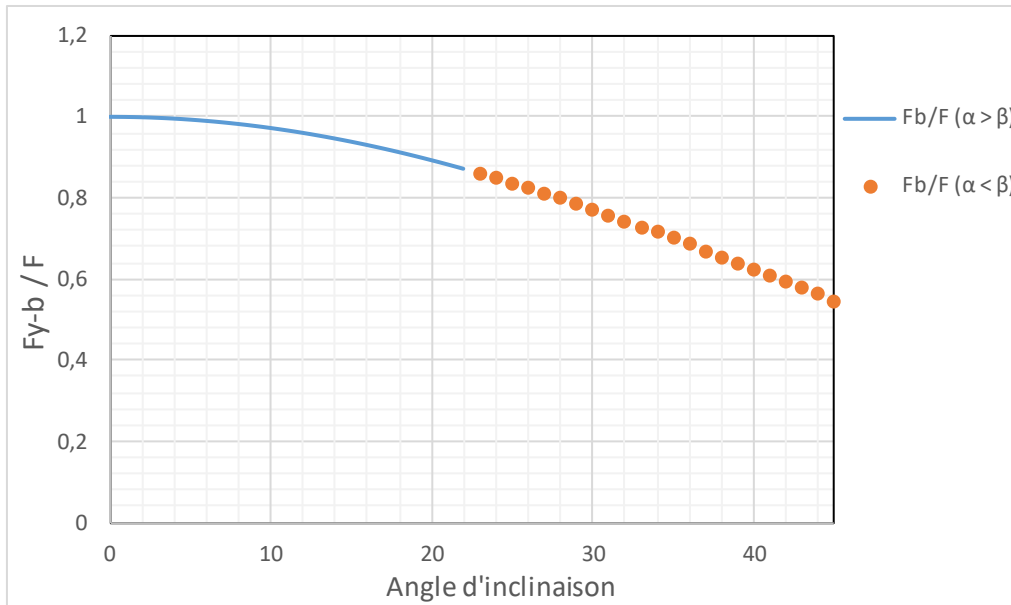


Figure 23 : Courbe théorique obtenue pour le cône en calculant le rapport de la force d'indentation pour un plan incliné notée $F_{y\beta}$ sur la force d'indentation nécessaire pour obtenir la même indentation dans le cas d'une surface plane et horizontale notée F en fonction de l'angle d'inclinaison β pour $\alpha=22^\circ$.

NB : De même que pour le cas de la sphère, le module de Young que mesure l'AFM est :

$$E_{R\acute{e}el} = E_{Apparent} \cdot \sqrt{2} \cdot \cos(\beta)^{\frac{1}{3}} \cdot \frac{\sqrt{\tan(\alpha)}}{[\sqrt{\tan(\alpha+\beta)+\tan(\alpha-\beta)}]} \quad (41)$$

2. Approche par simulation numérique

Les simulations numériques, que nous avons réalisées avec ANSYS, consistent à modéliser une expérience d'indentation AFM avec deux types de pointes, une sphérique et une conique, dans un matériau élastique linéaire lorsque l'échantillon est incliné d'un angle variant de 0° à 40° par rapport à l'horizontal. Afin de comparer les résultats numériques aux résultats théoriques et expérimentaux, les géométries des indenteurs utilisées dans les simulations numériques sont basées sur des géométries se rapprochant des indenteurs utilisés lors des expériences AFM.

Les forces calculées sont les résultantes des forces de réactions sur le support encastré (voir Figure 24) notamment $F_{y\beta}$ suivant l'axe vertical.

Nous présentons les résultats séparément en fonction de la géométrie de l'indenteur.

2.1 Cas d'un indenteur sphérique

Nous considérons ici l'indentation d'une sphère de rayon $15\mu\text{m}$ dans un matériau élastique linéaire de rigidité égale à 1kPa et de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur (Voir Figure 24).

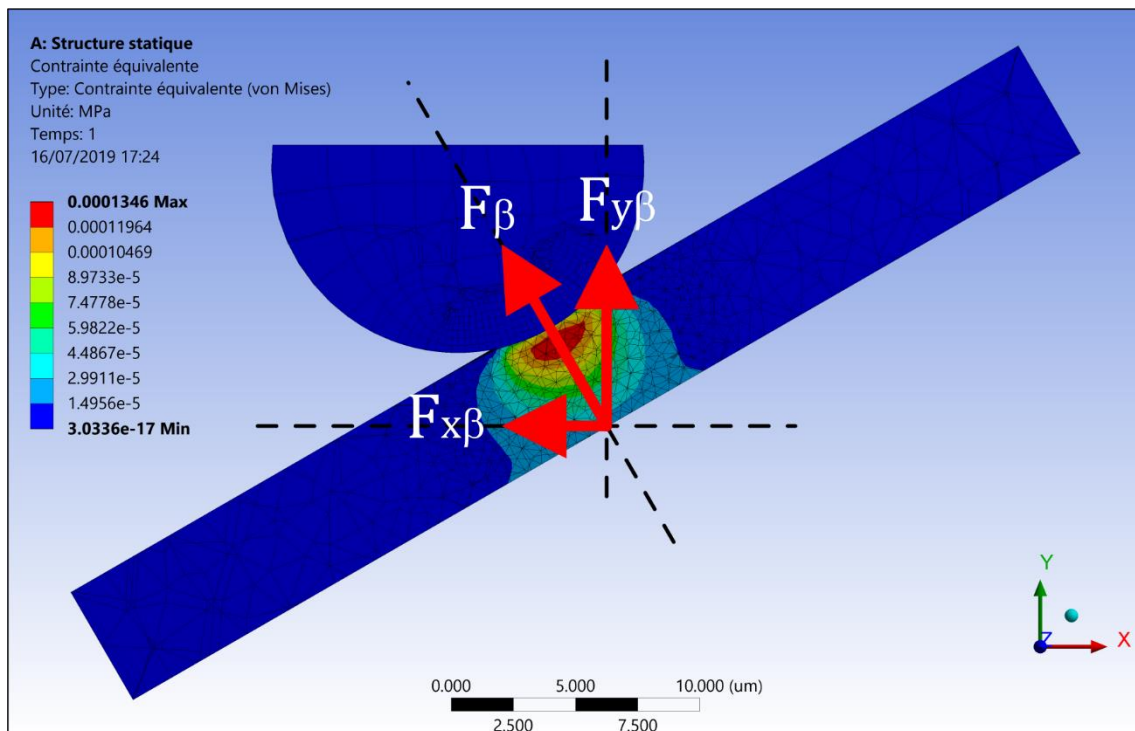


Figure 24 : Exemple d'indentation d'une sphère sur un matériau élastique par le logiciel ANSYS Mechanical. Le code couleur représente les déformations.

Nous avons effectué des simulations d'indentation sur des substrats inclinés de : 0° , 5° , 10° , 15° , 20° , 25° , 30° , 35° , 40° , et ceci pour différentes valeurs d'indentation allant de $0,5\mu\text{m}$ à $2\mu\text{m}$ par pas de $0,5\mu\text{m}$. De ces simulations, les composantes de la force selon les 3 directions x, y, z, la force totale de réaction du substrat, ainsi d'autres paramètres tels que les déformations et les contraintes équivalentes peuvent être extraites.

Afin de vérifier la validité des résultats numériques, nous avons comparé la force calculée via la loi de Hertz (théorique) et la force obtenue par la simulation numérique quand l'angle d'inclinaison est nul, notée F_{y-00} (Voir Figure 25).

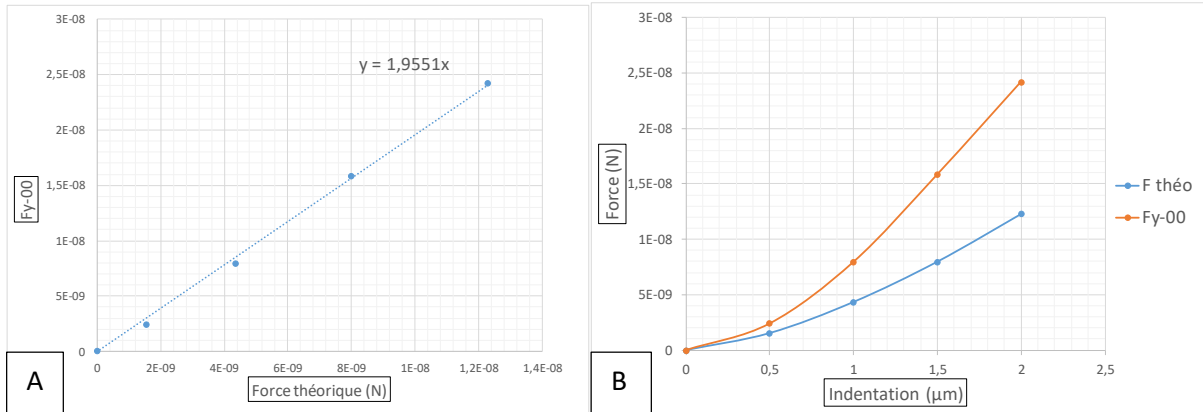


Figure 25 : Courbes de comparaison entre la force théorique et la force résultante de la simulation pour un indenteur sphérique. A- Courbe de force issue de la simulation numérique en fonction de la force théorique. B- Courbes de force issue de la simulation numérique (Orange) et la force théorique (Bleu) en fonction de l'indentation.

La Figure 25-A met en évidence que le rapport $\frac{F_{y-00}}{F_{théo}}$ reste constant et égal à 1,95. La Figure 25-B montre que plus l'indentation augmente, plus les courbes divergent en raison de la relation en puissance entre F et δ . En conclusion, nous pouvons considérer que les résultats des simulations numériques sont fiables à un facteur près.

Dans un second temps, nous avons cherché à étudier l'effet de l'indentation sur le rapport $\frac{F_{y-\beta}}{F_{y-00}}$ (voir Figure 26)

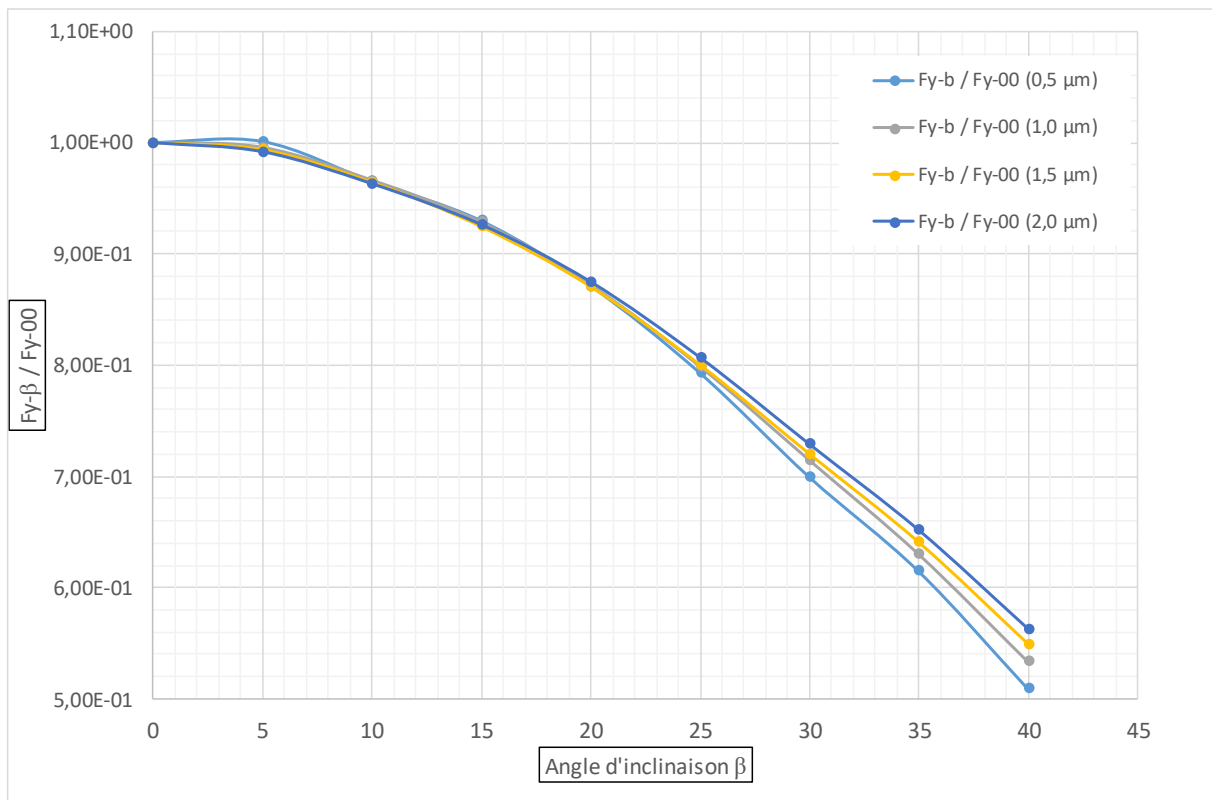


Figure 26 : Comparaison entre les courbes de rapport $F_{y-\beta}/F_{y-00}$ pour différentes indentations dans le cas d'un indenteur de géométrie sphérique.

Nous remarquons que les indentations de $0,5 \mu\text{m}$ à $2 \mu\text{m}$ que nous avons imposées, influent peu sur le rapport $\frac{F_{y-\beta}}{F_{y-00}}$, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un matériau élastique linéaire.

L'effet de l'indentation étant très faible, nous avons fait une moyenne des courbes des différentes indentations en fonction de l'angle d'inclinaison, et nous l'avons comparée avec la courbe issue de la théorie. Cette comparaison est présentée sur le graphe ci-dessous :

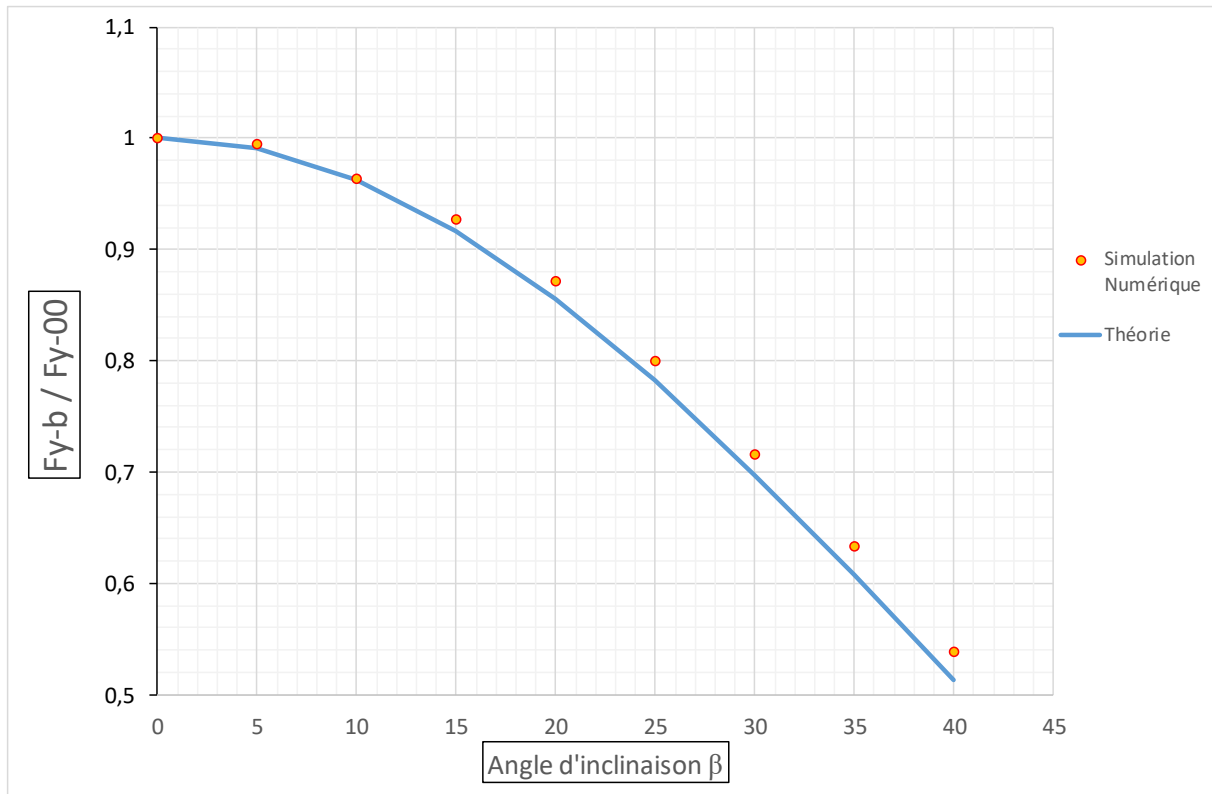


Figure 27 : Comparaison entre la courbe théorique et la simulation pour un indenteur de géométrie sphérique.

La Figure 27 met en évidence que les courbes issues de la simulation numériques et celle donnée par l'approche théorique sont en accord puisqu'elles montrent que l'évolution du rapport $\frac{F_{y-\beta}}{F_{y-00}}$ issu de la simulation, en fonction de l'angle d'inclinaison, suit la même évolution en $\cos(\beta)^{\frac{5}{2}}$.

2.2 Cas d'un indenteur conique

Dans ce cas, nous avons simulé un pénétrateur conique d'un demi-angle d'ouverture de 22° . Ce pénétrateur indente un matériau élastique linéaire de volume $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \times 0.7\mu\text{m}$ (Voir Figure 28).

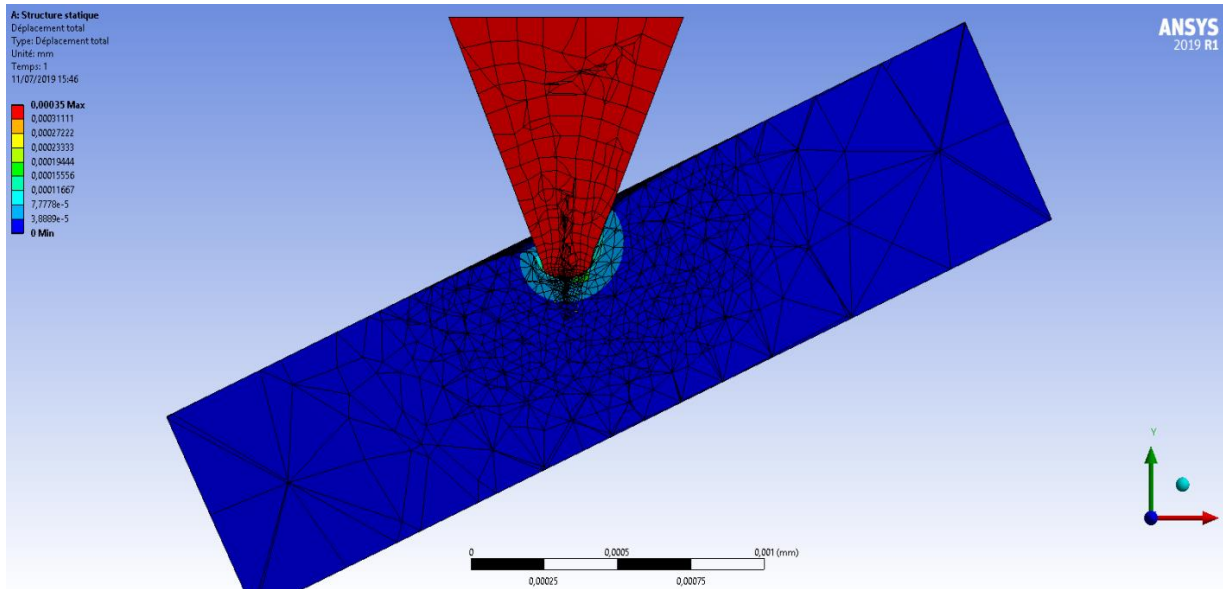


Figure 28 : Exemple d'indentation d'un cône sur un matériau élastique par le logiciel ANSYS Mechanical. Le code couleur représente le déplacement totale.

Afin de vérifier la validité des résultats numériques, nous avons comparé la force calculée via la loi de Hertz (théorique) et la force obtenue par la simulation numérique quand l'angle d'inclinaison est nul (voir Figure 29 ci-dessous).

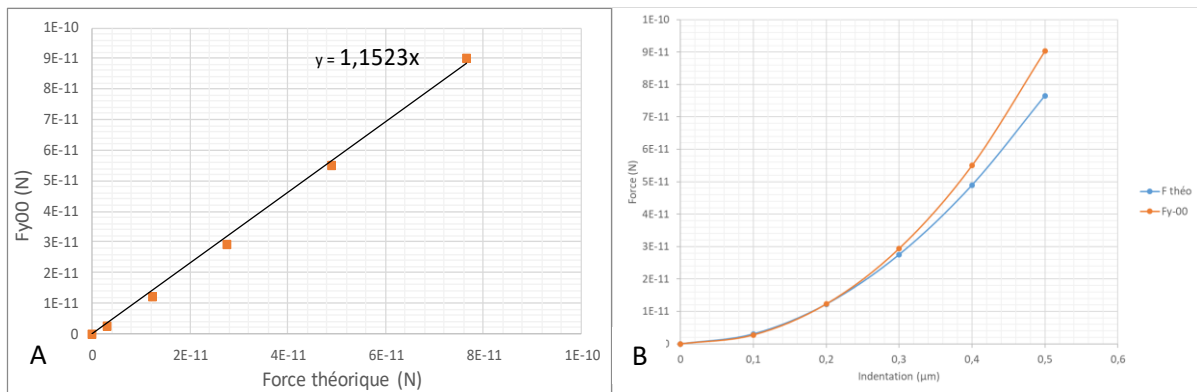


Figure 29 : Courbes de comparaison entre la force théorique et la force résultante de la simulation pour un indenteur conique. A- Courbe de Force issue de la simulation numérique en fonction de la force théorique. B- Courbes de la force issue de la simulation numérique (Orange) et la force théorique (Bleu) en fonction de l'indentation.

La Figure 29-A met en évidence que le rapport $\frac{F_{y-00}}{F_{théo}}$ reste constant et égal à 1,15. La Figure 29-B montre que plus l'indentation augmente, plus les courbes divergent légèrement en raison de la relation quadratique entre F et δ . En conclusion, nous pouvons considérer que les résultats des simulations numériques sont également fiables à un facteur près, comme vu précédemment pour le cas d'une sphère.

Dans un second temps, nous avons cherché à étudier l'effet de l'indentation sur le rapport $\frac{F_{y-\beta}}{F_{y-00}}$ (voir Figure 30)

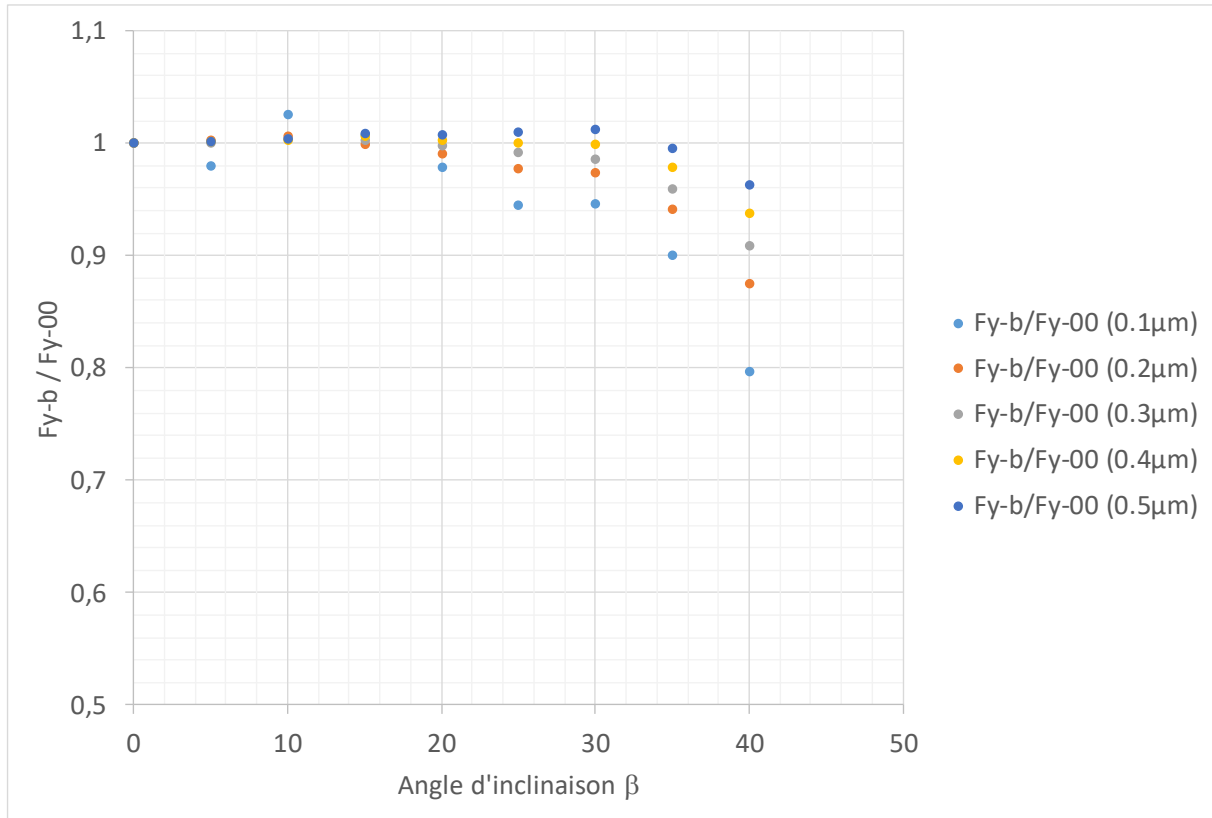


Figure 30 : Comparaison entre les courbes de rapport F_{y-b}/F_{y-00} pour différentes indentations dans le cas d'un indenteur de géométrie sphérique.

Nous constatons que le rapport $\frac{F_{y-\beta}}{F_{y-00}}$ est plus sensible à l'indentation, en effet plus l'indentation est importante plus la géométrie de l'indenteur conique traverse les mailles du domaine « substrat » voir Figure 28, et laisse supposer une plus grande erreur sur les résultats obtenus. On notera que nous n'observons pas ce phénomène numérique dans le cas de la sonde sphérique. Conscient que ces simulations numériques restent à améliorer, nous avons néanmoins comparé la moyenne des courbes numériques à ceux de la proposition théorique décrite précédemment (équation 39 et 40) voir Figure 31.

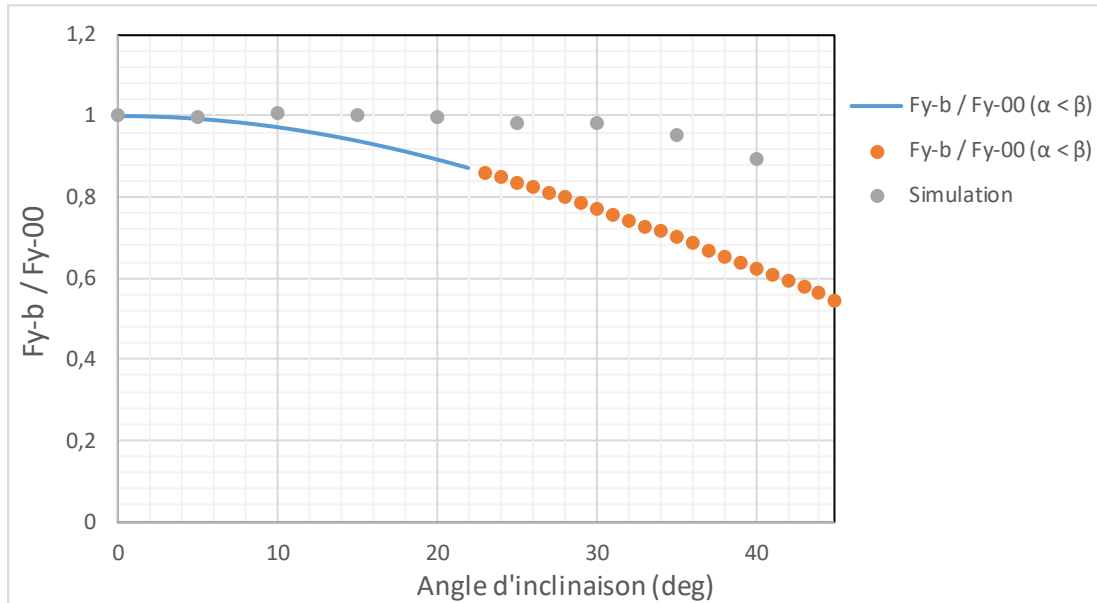


Figure 31 : Comparaison entre la courbe théorique et la simulation pour un indenteur de géométrie conique.

Contrairement au cas de la sonde sphérique, les résultats théoriques dans le cas du cône ne se superposent pas aux résultats numériques. Nous pensons que la divergence des résultats est principalement due à des problèmes de simulation. En effet, la modélisation d'une sonde conique conduit à un phénomène de concentration de contraintes à son extrémité (phénomène connu) ce qui rend le calcul numérique plus difficile à réaliser. Une façon de réduire ces erreurs numériques serait de trouver ultérieurement un paramétrage plus adapté et de tester un nombre de maille plus important pour le domaine de calcul.

3. Approche expérimentale

Dans le but de conforter nos résultats théoriques et numériques, nous avons effectué des mesures d'élasticité sur des gels de polyacrylamide à l'aide des deux géométries de pointes, à savoir, pyramidale et sphérique. Les lamelles avec gels de polyacrylamide ont été déposées sur les supports inclinés comme indiqué dans la partie IV.2.2. Afin de minimiser les problèmes de variabilité entre les gels, nous avons évalué le même gel sur l'ensemble des supports inclinés.

L'analyse des courbes force-hauteur ont été réalisés conformément à la méthode décrite à la partie IV.2.1. Dans le but d'avoir des résultats représentatifs, nous avons effectué 4x100 points de mesure par support.

Notons que nous avons vérifié que la tête AFM était parfaitement horizontale, en procédant à une calibration des moteurs pas à pas.

On rappelle que pour chaque point de mesure, nous avons calculé un angle local qui résulte de l'inclinaison locale du gel et de celle imposée par le support.

Nous avons utilisé pour notre comparaison (i) pour la partie théorique le rapport $\frac{F_{y\beta}}{F}$ voir les équations (27) et (40), (ii) pour la partie simulation le rapport $\frac{F_{y\beta}}{F_{y-00}}$, F_{y-00} étant la force obtenue par la simulation numérique quand l'angle d'inclinaison est nul et (iii) pour la partie

expérimentale le rapport $\frac{E_\beta}{E_0}$, où E_β est le module de Young calculé par les relations (13) ou (18) en fonction de la forme de la sonde, moyenné sur un intervalle d'angle β de 5 degrés et E_0 étant la moyenne du module de Young du gel de polyacrylamide pour un angle autour de zéro degré.

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

3.1 Cas d'un indenteur sphérique

Dans le but de comparer les résultats expérimentaux aux résultats théoriques et de simulation, nous avons tracé les courbes des 3 approches sur un seul graphique :

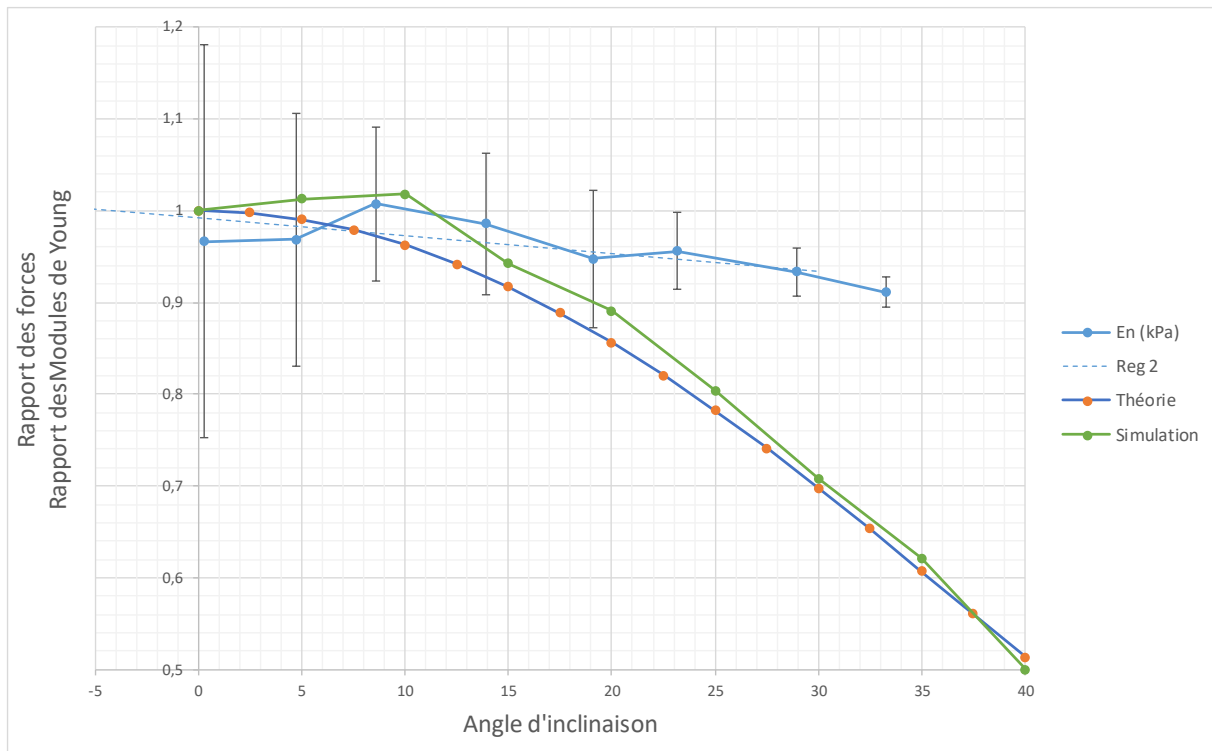


Figure 32 : Comparaison entre les approches théorique, numérique et expérimentale pour un indenteur de géométrie sphérique.

Sur cette courbe, nous remarquons qu'il y a un accord entre les courbes expérimentale, numérique et théorique jusqu'à 20°, avec toutefois des écarts-types sur les valeurs expérimentales élevés. Au-delà de cet angle, on note une divergence des résultats expérimentaux des résultats théoriques et numériques.

Ces résultats expérimentaux préliminaires suggèrent la nécessité d'augmenter le nombre de gels de polyacrylamide à évaluer par AFM avec une sonde sphérique. En effet, nous avons été limité par le temps restreint du stage et par la panne de l'AFM au collège de France à la fin du stage.

3.2 Cas d'un indenteur conique (ou pyramidale)

Comme pour la sonde sphérique les résultats théoriques, numériques et expérimentaux pour les sondes conique et pyramidale sont présentés sur la Figure 33.

Par ailleurs, les formules (12) et (13) étant semblables au coefficient près, la géométrie de la pyramide peut être assimilée à celle d'un cône :

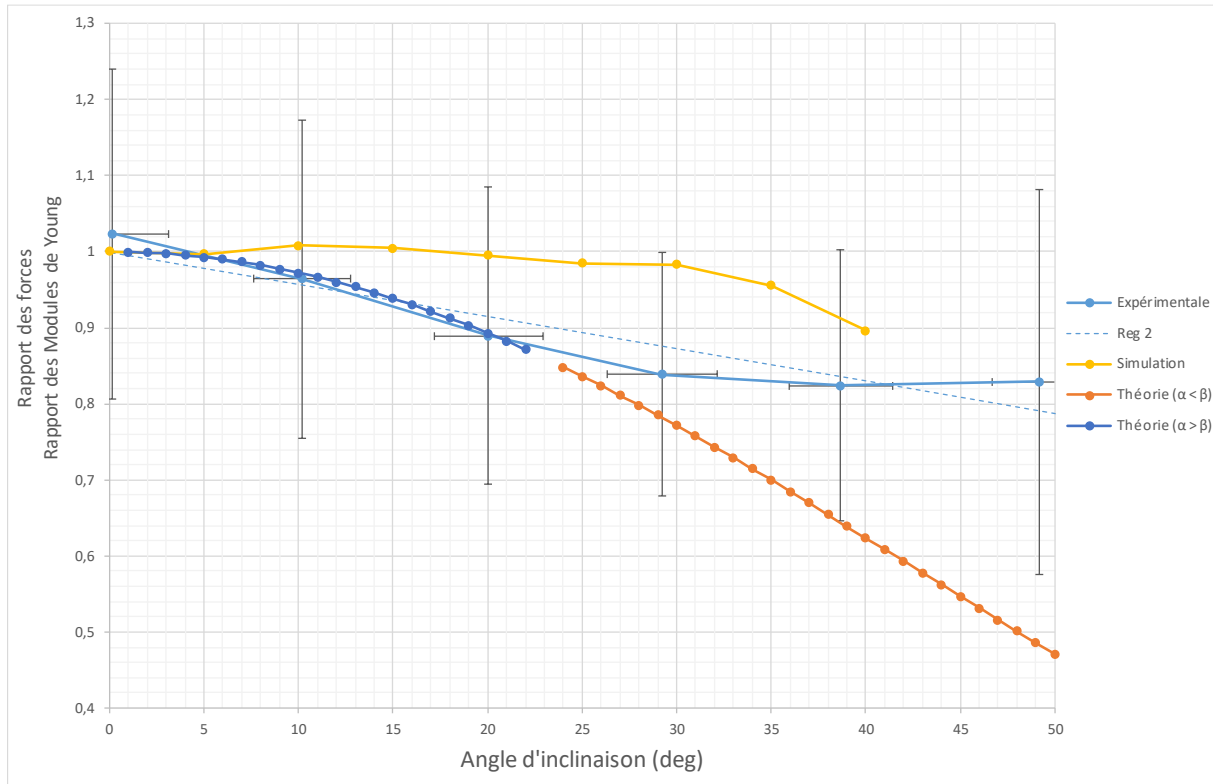


Figure 33 : Comparaison entre les approches théorique, numérique et expérimentale pour un indenteur de géométrie conique.

Nous remarquons que les résultats de l'expérience concordent avec ceux de la théorie jusqu'à un angle à peu près égale à 35° . Au-delà de cette angle, la courbe expérimentale commence à diverger et un plateau est observé. Nous pensons que ceci est dû à la géométrie de la sonde. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 33, au-delà d'un angle $\beta = 35^\circ$, il est probable que le contact ne se fasse plus exclusivement avec la pointe mais concerne également l'extrémité du bras de levier.

6. Conclusions et perspectives

Durant ce stage, nous avons essayé de montrer l'impact des angles d'inclinaison des échantillons sur les mesures d'élasticité évaluées par AFM. Cet impact s'est trouvé être non négligeable au vue des résultats théoriques, numériques et expérimentaux obtenus. En effet, l'écart des valeurs des modules de Young pour une inclinaison de 40° peut atteindre 25% pour les résultats expérimentaux et plus de 40% pour les forces en ce qui concerne la théorie et la simulation, et ceci pour les deux géométries d'indenteurs évaluées, à savoir la sonde sphérique et la sonde conique.

Les matériaux biologiques, tels que les cellules, sont connus pour avoir des surfaces complexes. Dans ce travail, nous avons tenté de proposer des modifications pour la loi de Hertz qui permettraient de prendre en compte l'effet de l'angle local lors de l'évaluation des modules de Young mesurés par AFM. La confrontation de ces modifications théoriques avec les données issues de la simulation numérique et de l'expérience, montre des résultats encourageants bien qu'à conforter.

Il conviendra de consolider ces résultats préliminaires. Il apparaît à la suite de ce travail qu'il est nécessaire de faire d'une part, d'autres mesures AFM sur les gels de polyacrylamide avec la sonde sphérique, et d'autre part, de modifier les paramètres de la simulation numérique afin d'améliorer les résultats, notamment pour réduire la pénétration du maillage de l'indenteur conique dans celui du substrat.

Bibliographie

- [1] P.-M. Morel, "Le mouvement des animaux" ; suivi de "La locomotion des animaux" / Aristote, Flammarion2013.
- [2] Y.-c. Fung, Biomechanics: mechanical properties of living tissues, Springer Science & Business Media2013.
- [3] W. Ogle, Aristotle: on the parts of animals, K. Paul, French & Company1882.
- [4] A.J.J.o.b. Ascenzi, Biomechanics and galileo galilei, 26(2) (1993) 95-100.
- [5] J.D. Humphrey, S.L. O'Rourke, An Introduction to Biomechanics: Solids and Fluids, Analysis and Design, An Introduction to Biomechanics: Solids and Fluids, Analysis and Design, Springer New York, New York, NY, 2015, pp. 3-44.
- [6] D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, Science 310(5751) (2005) 1139-43.
- [7] E. Farge, Mechanotransduction in development, Current topics in developmental biology, Elsevier2011, pp. 243-265.
- [8] T. Lecuit, L. Le Goff, Orchestrating size and shape during morphogenesis, Nature 450(7167) (2007) 189-92.
- [9] D.J.J.S. Montell, Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties, 322(5907) (2008) 1502-1505.
- [10] J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepast, B. Fabry, R. Farré, D.J.B.j. Navajas, Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy, 84(3) (2003) 2071-2079.
- [11] C. Rotsch, F. Braet, E. Wisse, M.J.C.b.i. Radmacher, AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages, 21(11) (1997) 685-696.
- [12] M. Sato, K. Nagayama, N. Kataoka, M. Sasaki, K.J.J.o.b. Hane, Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress, 33(1) (2000) 127-135.
- [13] B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, J.J. Fredberg, Scaling the microrheology of living cells, Physical review letters 87(14) (2001) 148102.
- [14] B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N.A. Taback, E.J. Millet, J.J. Fredberg, Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells, Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 68(4 Pt 1) (2003) 041914.
- [15] V.M. Laurent, R. Fodil, P. Canadas, S. Féréol, B. Louis, E. Planus, D. Isabey, Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting, Ann Biomed Eng 31(10) (2003) 1263-78.
- [16] G.N. Maksym, B. Fabry, J.P. Butler, D. Navajas, D.J. Tschumperlin, J.D. Laporte, J.J.J.J.o.A.P. Fredberg, Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz, 89(4) (2000) 1619-1632.

- [17] P.A.J.S. Valberg, Magnetometry of ingested particles in pulmonary macrophages, 224(4648) (1984) 513-516.
- [18] N. Wang, J.P. Butler, D.E. Ingber, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [see comments], *Science* 260(5111) (1993) 1124-1127.
- [19] A.R. Bausch, W. Möller, E.J.B.j. Sackmann, Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers, 76(1) (1999) 573-579.
- [20] C. Wilhelm, A. Cebers, J.-C. Bacri, F.J.E.B.J. Gazeau, Deformation of intracellular endosomes under a magnetic field, 32(7) (2003) 655-660.
- [21] M. Balland, A. Richert, F.J.E.B.J. Gallet, The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts, 34(3) (2005) 255-261.
- [22] V.M. Laurent, S. Hénon, E. Planus, R. Fodil, M. Balland, D. Isabey, F. Gallet, Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers, *Journal of biomechanical engineering* 124(4) (2002) 408-421.
- [23] M.P. Sheetz, *Laser tweezers in cell biology*, Academic Press 1998.
- [24] K. Svoboda, S.M.J.A.r.o.b. Block, b. structure, Biological applications of optical forces, 23(1) (1994) 247-285.
- [25] E. Evans, A.J.B.j. Yeung, Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration, 56(1) (1989) 151-160.
- [26] M. Sato, N. Ohshima, R.J.J.o.b. Nerem, Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress, 29(4) (1996) 461-467.
- [27] K.A. Barbee, P.F. Davies, R.J.C.r. Lal, Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy, 74(1) (1994) 163-171.
- [28] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, A.J.B.j. Asnacios, Creep function of a single living cell, 88(3) (2005) 2224-2233.
- [29] O. Thoumine, A.J.J.o.c.s. Ott, Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation, 110(17) (1997) 2109-2116.
- [30] H.R. HERTZ, Über die Berührung fester elastischer Körper und über die Harte, *Journal für die reine und angewandte Mathematik* 92 (1881) 156-171.
- [31] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Physical review letters* 56(9) (1986) 930-933.
- [32] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Surface Studies By Scanning Tunneling Microscopy, *Physical review letters* 49(1) (1982) 57-61.
- [33] J.I. AG, „The NanoWizard® AFM Handbook 2.2 a,“ Berlin, 2005.
- [34] F.J. Giessibl, Advances in atomic force microscopy, *Reviews of Modern Physics* 75(3) (2003) 949-983.

- [35] D. Rugar, P. Hansma, Atomic Force Microscopy, *Physics Today* 43(10) (1990) 23-30.
- [36] Z. WANG, Developpement d'un microscope a force atomique multifonctionnel associe a un microscope electronique a balayage, Reims, 1997.
- [37] T. Ludwig, R. Kirmse, K. Poole, U.S. Schwarz, Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 456(1) (2008) 29-49.
- [38] L.J.M.s. Sirghi, technology. Applications, F. Education, Badajoz, Atomic force microscopy indentation of living cells, (2010) 433-440.
- [39] I.N.J.I.j.o.e.s. Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, 3(1) (1965) 47-57.
- [40] W.C. Oliver, G.M. Pharr, an improved technique for determining hardness and elastic-modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mater. Res.* 7(6) (1992) 1564-1583.
- [41] I.N. Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, *J International journal of engineering science* 3(1) (1965) 47-57.
- [42] G.G. Bilodeau, Regular Pyramid Punch Problem, *J. Appl. Mech.-Trans. Asme* 59(3) (1992) 519-523.
- [43] L. Sirghi, J. Ponti, F. Broggi, F. Rossi, Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 37(6) (2008) 935-945.
- [44] M. Dembo, Y.L. Wang, Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts, *Biophysical Journal* 76(4) (1999) 2307-2316.
- [45] R.J. Pelham, Y.L. Wang, Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25) (1997) 13661-13665.
- [46] K.A. Beningo, C.M. Lo, Y.L. Wang, Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions, *Methods in Cell-Matrix Adhesion* 69 (2002) 325-339.
- [47] S. Fereol, R. Fodil, B. Labat, S. Galiacy, V.M. Laurent, B. Louis, D. Isabey, E. Planus, Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties, *Cell motility and the cytoskeleton* 63(6) (2006) 321-40.
- [48] L.A. Flanagan, Y.E. Ju, B. Marg, M. Osterfield, P.A. Janmey, Neurite branching on deformable substrates, *Neuroreport* 13(18) (2002) 2411-5.
- [49] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo, Y.L. Wang, Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys J* 79(1) (2000) 144-52.
- [50] T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P.A. Janmey, Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, *Cell motility and the cytoskeleton* 60(1) (2005) 24-34.

- [51] A. Elosegui-Artola, E. Bazellieres, M.D. Allen, I. Andreu, R. Oria, R. Sunyer, J.J. Gomm, J.F. Marshall, J.L. Jones, X. Trepat, P. Roca-Cusachs, Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types, *Nat Mater* 13(6) (2014) 631-7.
- [52] A.K. Denisin, B.L. Pruitt, Tuning the Range of Polyacrylamide Gel Stiffness for Mechanobiology Applications, *ACS applied materials & interfaces* 8(34) (2016) 21893-902.
- [53] MikroMasch, Probe : HQ:CSC38/NO AL. <https://www.spmtips.com/afm-tip-hq-csc38-no-al>.
- [54] N.I. Technologies, Probe Type: Arrow™ TL1. <https://www.nanoworld.com/tipless-afm-tip-arrow-tl1>.
- [55] MERCK, Micro particles based on polystyrene. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/74964?lang=fr®ion=FR>.
- [56] J.L. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips (VOL 64, PG 1868, 1993), *Review of Scientific Instruments* 64(11) (1993) 3342-3342.
- [57] W. Gross, H. Kress, Simultaneous measurement of the Young's modulus and the Poisson ratio of thin elastic layers, *Soft matter* 13(5) (2017) 1048-1055.
- [58] Y. Li, Z.B. Hu, C.F. Li, New Method For Measuring Poisson Ratio In Polymer Gels, *Journal of Applied Polymer Science* 50(6) (1993) 1107-1111.
- [59] S. Féréol, R.J.R.d.C.e.d.M.A. Fodil, Effet de la déplétion du cholestérol sur les propriétés viscoélastiques des cellules épithéliales alvéolaires évaluées par microscopie à force atomique en grandes déformations, 27(1-2) (2017) 57.