

Amplification de la fluorescence par diffusion multiple: une étude exploratoire vers des conditions biocompatibles

Sylvain Bonnefond

► To cite this version:

Sylvain Bonnefond. Amplification de la fluorescence par diffusion multiple : une étude exploratoire vers des conditions biocompatibles. Physique [physics]. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4080 . tel-02864775

HAL Id: tel-02864775 https://theses.hal.science/tel-02864775

Submitted on 11 Jun2020

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.



SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

ÉCOLE DOCTORALE

THÈSE DE DOCTORAT

Amplification de la fluorescence par diffusion multiple : une étude exploratoire vers des conditions biocompatibles

Sylvain BONNEFOND

Institut de Physique de Nice

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Physique **de l'**Université Côte d'Azur

Dirigée par : Gian-Luca Lippi **Co-encadrée par** : Frédéric Brau **Soutenue le** : 03 décembre 2019 Devant le jury, composé de : Nathalie Westbrook-Vantenkiste, Professeur, Institut d'Optique, ParisTech Ellen van Obberghen-Schilling, Docteur INSERM, Institut de Biologie de Valrose, UCA Antoine Delon, Professeur, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Université Grenoble Alpes Martin Oheim, Docteur, Ecole de Neurosciences, Université Paris Descartes

Gian-Luca Lippi, Professeur, Institut de Physique de Nice, UCA

Frédéric Brau, Ingénieur de recherche, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UCA











Amplification de la fluorescence par diffusion multiple : une étude exploratoire vers des conditions biocompatibles

Composition du jury :

Rapporteurs :

- Antoine Delon, Professeur, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Université de Grenoble Alpes
- Martin Oheim, Docteur, Ecole de Neurosciences, Université Paris Descartes

Examinateurs :

- Nathalie Westbrook-Vantenkiste, Professeur, Institut d'Optique, ParisTech
- Ellen van Obberghen-Shilling, Docteur INSERM, Institut de Biologie de Valrose, Université de Côte d'Azur

Directeur de thèse

• Gian-Luca Lippi, Professeur, Institut de Physique de Nice, Université de Côte d'Azur

Co-Encadrant de thèse

• Frédéric Brau, Ingénieur de Recherche, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Côte d'Azur

Amplification de la fluorescence par diffusion multiple : une étude exploratoire vers des conditions biocompatibles

Résumé

L'objet de cette thèse a consisté à mettre au point une méthode d'amplification de la fluorescence en utilisant la diffusion multiple (introduction de nanoparticules diélectriques, élastiques et passives) qui sera applicable sur des échantillons biologiques. Cela a nécessité de faire le lien entre le concept de laser biologique et de laser aléatoire pour une utilisation dans un régime amplifié, qui précède le régime laser, applicable aux marquages cellulaires et tissulaires. La génération d'une amplification passe par l'utilisation de diffuseurs (nanoparticules de dioxyde de titane dans ce travail) répartis de façon homogène. Il a fallu mettre au point des conditions de stabilisation colloïdale par adsorption de protéine (BSA) pour éviter l'agrégation des nanoparticules en tampons et milieux biologiques. Un montage optique a été mis au point pour exciter les fluorophores de façon reproductible, en évaluant précisément l'énergie de pompe et la réponse impulsionnelle de fluorescence, tout en optimisant la fenêtre d'observation pour limiter le photoblanchiment des fluorophores et la phototoxicité des cellules. Une première amplification stimulée a été montrée et validée avec une dispersion colloïdale dans une solution aqueuse homogène de FITC à une concentration $C_F = 200 \ \mu M$. Cette expérience a prouvé qu'il est possible d'atteindre un gain de fluorescence jusqu'à 40 associé à une diminution de la largeur spectrale jusqu'à 5 nm, et une réduction globale de la durée de vie. La présence du processus d'émission stimulée dans l'amplification est confirmée par la corrélation entre la fluorescence et la concentration des nanoparticules ou l'énergie de pompe. Cette première démarche a été étendue à des concentrations $C_F = 2$ et 20 μ M pour lesquelles une saturation rapide du gain (respectivement \sim 10 et 20) a été constatée. Enfin une amplification a été montrée et validée sur des cellules en suspension marquées par la CFSE ou exprimant la GFP dans leur milieu de culture. Dans ces conditions une diminution du gain par rapport aux conditions précédentes a été constatée (jusqu'à 6 - 10 fois). L'explication de ce gain moindre a été explorée en testant les modifications des milieux sur l'amplification, et la présence d'une couche de BSA entourant les nanoparticules semble en être la cause car elle diminue probablement l'indice de réfraction effectif de la nanoparticule conduisant à une faible diffusion.

Mots clés : Fluorescence, diffusion multiple, émission stimulée, las er aléatoire, dispersion colloïdal, nanoparticles de TiO₂, biocompatibilité

Fluorescence amplification by multiple scattering : an exploratory study towards biocompatible conditions

Abstract

The purpose of this PhD has been to develop a method of amplification of the fluorescence by using the multiple scattering (introduction of dielectric, elastic and passive nanoparticles) that will be applicable to biological samples. This required to do the link between the biological laser and random laser concept for an use in an amplified regime, which precedes the laser regime, applicable to cell and tissue labelling. The generation of an amplification passes by the use of scatterers (nanoparticles of titanium dioxide in this work) homogeneously distributed. It required to develop conditions of the colloidal stabilization to avoid the aggregation of nanoparticles into biological media and buffers by the adsorption of proteins (BSA). An optical setup has been developed to excite the fluorescence, by accurately evaluating the pump energy and the pulse response of fluorescence, while optimizing the observation window to limit photobleaching of fluorophores and cell toxicity. A first stimulated amplification was shown and validated with a colloidal suspension in a homogeneous aqueous solution of FITC at a concentration of $C_F = 200 \ \mu M$. This experiment has shown that it is possible to achieve a fluorescence gain up to 40 associated with a decrease in spectral width up to 5 nm, and an overall reduction in lifetime. The presence of the stimulated emission process in amplification is confirmed by the correlation between fluorescence and nanoparticle concentration or pump energy. This first step was extended to concentrations $C_F = 2$ and 20 μ M for which a rapid saturation of the gain (respectively 10 and 20) was observed. Finally, amplification has been shown and validated on CFSE-labeled or GFP-expressing suspension cells in their culture medium. In these conditions, a decreasing of the gain compared with the previous conditions has been observed (up to 6-10 times). The explanation of this lower gain has been explored by testing the changes of media on amplification, and the presence of a layer of BSA surrounding the nanoparticles seems to be the cause because the protein decrease probably the refractive index of the nanoparticle leading a weak scattering.

 $\mathbf{Keywords}$: Fluorescence, multiple scattering, stimulated emission, random laser, colloidal dispersion, TiO₂ nanoparticles, biocompatibility

Table des matières

1	Les	différe	entes stratégies de détection des molécules en biologie	5
	1.1	Sonde	er le vivant	5
		1.1.1	La radioactivité	5
		1.1.2	Les marquages colorimétriques	6
		1.1.3	La fluorescence	7
	1.2	Propr	iétés de la fluorescence	8
		1.2.1	Rendement quantique, intensité et durée de vie	8
		1.2.2	Photostabilité et photoblanchiment	10
		1.2.3	Etalement spectral et applications biologiques	11
	1.3	Les flu	uorochromes pour étudier le vivant	12
		1.3.1	Petites molécules organiques	13
		1.3.2	Les protéines fluorescentes : une ouverture vers les observa-	
			tions dynamiques	14
		1.3.3	Les "quantum dots" : des fluorochromes inorganiques photo-	
			stables	15
		1.3.4	Des artifices de marquage pour amplifier la fluorescence	16
	1.4	1.4 Exciter et détecter la fluorescence : instrumentation		17
		1.4.1	Objectifs	18
		1.4.2	Détecteurs	19
	1.5	Ampli	ification avec des cavités pour des applications biologiques	20
		1.5.1	Mécanismes des sources amplificatrices et lasers	20
		1.5.2	Amplificateurs incohérents	21
		1.5.3	Cavités naturelles	22
		1.5.4	Optofluidique : résonateurs interférentiels et cristaux photo-	
			niques diélectriques	23
		1.5.5	Optofluidique : plasmonique	24
		1.5.6	Gouttelettes et Cavités internes	$\begin{array}{c} 6 \\ 7 \\ 8 \\ 8 \\ 10 \\ 11 \\ 12 \\ 13 \\ 14 \\ 15 \\ 16 \\ 17 \\ 18 \\ 19 \\ 20 \\ 20 \\ 21 \\ 22 \\ 23 \\ 24 \\ 26 \\ 27 \\ 28 \\ 29 \\ 29 \\ 29 \\ 33 \\ 33 \\ 34 \\ 35 \\ 36 \end{array}$
	1.6	Les su	spensions colloïdales dans un milieu actif	27
		1.6.1	Catégories de nanoparticules	28
		1.6.2	Accordabilité et Adaptabilité	29
	1.7	Objec	tifs de la thèse	29
2	Asp	ects tl	héoriques des lasers aléatoires	33
	2.1	Diffus	ion de la lumière dans un milieu désordonné	33
		2.1.1	La diffusion : un problème complexe	33
		2.1.2	Grandeurs pertinentes	34
		2.1.3	La loi de Beer-Lambert	35
		2.1.4	Les régimes de transport	36

	2.2	Les la	sers aléatoires	38
		2.2.1	La bombe photonique	38
		2.2.2	Régime incohérent et cohérent	40
2	Cor	nnorto	mont des nononantiques de TiO, dans les milieux ioniques	12
3	2 1		ment des hanoparticules de 110_2 dans les innieux loniques	43
	3.1		Terres enternes	44
		3.1.1	Forces externes	44
		3.1.2		49
	~ ~	3.1.3	Critère de stabilité des suspensions colloidales	53
	3.2	Protec	ction et stabilisation électrostérique par un polymère ou une	
		protei		55
		3.2.1	Stabilisation sterique	55
		3.2.2	Adsorption des proteines	56
		3.2.3	Interactions des nanoparticules avec le vivant : cytotoxicité .	58
	3.3	Techn	iques instrumentales	60
		3.3.1	Distribution des rayons hydrodynamiques par DLS	60
		3.3.2	Détermination du point isoélectrique et du potentiel ζ	61
		3.3.3	Cinétique de sédimentation par spectrométrie d'absorption .	63
4	Cho	oix exp	périmentaux, matériels, méthodes et mesures préliminaires	65
	4.1	Choix	expérimentaux	66
		4.1.1	Fluorophore	66
		4.1.2	Diffuseurs	66
		4.1.3	Pompe optique pour exciter les fluorophores	66
	4.2	Prépa	ration des échantillons	67
		421	Milieu aqueux ultra-purs	67
		4 2 2	Tampons et milieux de culture	67
		423		67
		4.2.0 4.2.4	Modèles cellulaires : la lignée Jurkat	68
		4.2.4 195	Marquage cellulaire à la Carboyy-Fluoresceine Succinimidul	00
		4.2.0	Ester (CESE)	69
		426	Prénaration des échantillons fluorescents	69
		427	Spectrofluorimétrie de contrôle des Jurkat CESE	70
	43	Monta	age evnérimental	71
	4.0	/ 3 1	Banc optique	71
		4.3.1 1.2.0	Superconjugation	72
		4.3.4	Montage des échantillans	70
		4.3.3		13
		4.3.4		13
	4.4			74 75
	4.5	Evalu	ation des parametres des signaux d'amplification	(5 77
	4.6	Evalu	ation de la dispersion des TiO_2 -NPs en solution	77
	4.7	Evalu	ation de la cytotoxicité des Ti O_2 -NPs \ldots \ldots \ldots	78
5	Rés	ultats	1: Stabilisation et biocompatibilité des TiO ₂ -NPs	81
	5.1	Carac	térisation des TiO ₂ -NPs dans l' H_2OmQ	81
	5.2	Stabil	isation des TiO ₂ -NPs en tampon PBS \ldots \ldots \ldots \ldots	83
		5.2.1	Influence du pH d'incubation	84
		5.2.2	Influence de la durée d'incubation	85
		5.2.3	Test avec une forte concentration de TiO2 et FITC	85

	5.3	Stabili	sation des TiO ₂ -NPs dans des Tampons et milieux de culture	
		cellula	ire	86
		5.3.1	Influence de la quantité de BSA	86
		5.3.2	Influence du temps d'incubation	88
	5.4	Evalua	ation de la biocompatibilité des TiO_2 -NP $\dots \dots \dots \dots \dots$	88
6	Rés	ultats	2 : Amplification de la fluorescence	91
	6.1	Ampli	fication dans une solution homogène de FITC	92
		6.1.1	Caractérisation du photoblanchiment	92
		6.1.2	Amplification de la fluorescence : FITC à $C_F=200~\mu{ m M}$	93
		6.1.3	Influence de la concentration de FITC sur le gain optique	98
		6.1.4	Influence du rapport massique BSA/TiO_2 et du milieu	99
	6.2	Ampli	fication de la fluorescence de cellules marquées	103
		6.2.1	Caractérisation du photoblanchiment	103
		6.2.2	Amplification de la fluorescence de cellules marquées au CFSE	
			ou exprimant la GFP	104
			•	

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
BSA	Bovin Serum Albumin
CCD	Charge Coupled Device
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMethylSulfOxyde
DO	Densité Optique
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EMCCD	Electron Multiplying CCD
FBS	Foetal Bovin Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
GFP	Green Fluorescent Protein
hPGK	human PhosphoGlycerate Kinase
HSA	Human Serum Albumin
IHC	ImmunoHistoChimie
MTT	bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
Nd :YAG	Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet
NPs	NanoParticules
OPO	Oscillateur Paramétrique Optique
PALM	Photo-Activated Localization Microscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
NEP	Noise Equivalent Power
RPMI	Roswell Park Memorium Institute medium
sCMOS	scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor
\mathbf{SNR}	Signal to Noise Ratio
STED	STimulated Emission Depletion microscopy
STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy
SVF	Sérum de veau foetal
TiO_2 -NPs	NanoParticules de Dioxide de Titane
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence microscopy

Liste des publications, séminaires et conférences

Publications

 S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, A. Reynaud, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Multiple scattering-assisted fluorescence amplification : toward biological applications", arXiv :1908.10199 [physics.bio-ph], soumis le 27 Août 2019.

Présentation Séminaires

- S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Fluorescence amplification by multiple-scattering in living tissues", Colloque des Doctorants de 2^{me} année, Nice, 02 Juin 2017.
- S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Fluorescence amplification by multiple-scattering in living tissues", Instituto di Biofisica, Gênes, 18 Décembre 2017.

Présentation Posters

- S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Fluorescence amplification by multiple-scattering in living tissues", Journée Doctorales de la Physique Niçoise, Barcelonnette, 13 Mars 2017.
- S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Fluorescence amplification by multiple-scattering in living tissues", Ecole thématique CNRS (Microscopie Fonctionnelle en Biologie), Seignossele-pennon, 10 Octobre 2018.
- S. Bonnefond, J. Cazareth, S. Abélanet, M. Vassalli, F. Brau and G.-L. Lippi, "Fluorescence amplification by multiple-scattering in living tissues", UCA conference (Complex Day), Nice, 25 Mars 2019.

Introduction

La fluorescence s'est imposée progressivement comme une technique de choix pour détecter, imager et quantifier les biomolécules ou les structures subcellulaires dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire, de la biochimie, et de la santé. Elle a contribué au développement de l'immunocytochimie, l'immunohistochimie (IHC) ou l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). Cette progression s'explique par les progrès réalisés à la fois dans le domaine des sondes fluorescentes [Michalet et al., 2005] et des capteurs [Lambert and Waters, 2014].

Afin de détecter des biomolécules, les techniques de marquages fluorescents ont progressivement remplacé les marquages colorimétriques et les isotopes radioactifs. Les stratégies actuelles se sont focalisées sur le développement de nouvelles sondes photostables (protéines fluorescentes, "quantum dots") avec un meilleur rendement de fluorescence, ou d'artifices de marquages (TSA, RNAscope) multipliant les sondes sur les cibles à détecter. L'objectif étant d'amplifier le signal émis par les molécules endogènes (protéines, séquences d'acides nucléiques) peu représentées tout en essayant de limiter le photoblanchiment.

Autour de la fluorescence, le développement des instruments optiques s'est plutôt concentré sur une amélioration du rendement quantique des capteurs ou sur l'évolution des technologies allant des caméras CCD ("Charge-Coupled Devices") à l'EMCCD ("Electron Multiplying CCD") et au sCMOS ("scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor") pour la biologie cellulaire.

De nouvelles études ont été proposées pour améliorer le rendement de la fluorescence en réalisant des pièges optiques et des lasers biologiques. Ces découvertes combinent le processus d'émission stimulée qui entraîne une amélioration du rendement quantique de fluorescence, et l'intérêt des pièges optiques (cavité, nanoparticules, gouttelettes, etc.) améliorant ce processus de stimulation par une meilleure exploitation des photons (pompe et fluorescence).

Ces lasers biologiques ont permis l'émergence de l'optofluidique (mariage entre optique et microfluidique) où les résonateurs optiques sont exploités pour donner aux fluorophores des propriétés lasers cohérentes. On assiste ainsi à une véritable course au développement des résonateurs pour exalter les marqueurs fluorescents en une source amplificatrice ou une source laser aux échelles nanométriques et micrométriques [Chen et al., 2010] ouvrant la voie à une nouvelle classe de biocapteurs avec puces intégrées ("lab-on-chip") pour une plateforme microfluidique miniaturisée et fonctionnelle [Méance et al., 2012].

Cependant, ces résonateurs ont généralement des géométries bien définies et des architectures complexes dont le moindre défaut peut diminuer drastiquement leurs performances. Une autre manière de concevoir un amplificateur ou un laser est d'introduire des diffuseurs directement dans un milieu à gain. Basés sur la diffusion multiple de la lumière, ces lasers aléatoires ont été découverts dans les années 1960 [Letokhov, 1968]. La diffusion de la fluorescence dans un matériau actif fournit une rétroaction optique et génèrent une émission stimulée [Cao et al., 1999, Cerdán et al., 2012].

Ce concept est encore peu exploité dans le développement de nouvelles méthodologies pour la fluorescence, et reste étudié dans des conditions physiques peu compatibles avec le vivant. Ce projet consiste à faire le lien entre le concept de laser biologique et de laser aléatoire pour une utilisation dans une région d'amplification, précèdant le régime laser, où le gain reste encore important, laissant ainsi une marge suffisante pour adapter cette amplification à des conditions biocompatibles aux marquages cellulaires et tissulaires. La démarche est donc basée sur l'amplification de la fluorescence par émission stimulée en utilisant des diffuseurs diélectriques (nanoparticules) passifs *in situ* qui jouent le rôle de piège optique. La thèse se décompose de la façon suivante :

- Le chapitre 1 résume les différentes stratégies actuelles pour détecter des biomolécules dans un échantillion biologique et, entre autres, les techniques de fluorescence. Ce chapitre présente aussi les différents lasers biologiques issus de l'optofluidique avant de s'intéresser aux lasers aléatoires (diffusion multiple) menant à la compréhension des objectifs de cette thèse.
- Le chapitre 2 présente les aspects théoriques de la diffusion multiple et les conditions physiques nécessaires pour une amplification par émission stimulée. Il permet de justifier les choix expérimentaux sur les diffuseurs (Chap. 4) et comprendre les résultats d'amplification (Chap. 6).
- Le chapitre 3 présente les aspects théoriques sur le comportement des nanoparticules dans une solution ionique et les conditions de stabilité colloïdale. Il permet de justifier les choix expérimentaux et la méthodologie employée (Chap. 4) et comprendre les résultats sur la stabilisation colloïdale (Chap. 5).
- Le chapitre 4 résume les choix expérimentaux, le matériel, les méthodes et les mesures préliminaires qui ont permis d'obtenir les résultats des chapitres 5 et 6.
- Le chapitre 5 présente et analyse les résultats sur la stabilité colloïdale des nanoparticules dans des conditions proches des conditions physiologiques.
- Le chapitre 6 présente et analyse les résultats sur l'amplification de la fluorescence dans un milieu actif homogène et dans un milieu cellulaire.

Chapitre 1

Les différentes stratégies de détection des molécules en biologie

1.1 Sonder le vivant

Disséquer le vivant à une échelle tissulaire et cellulaire consiste à comprendre son architecture fonctionnelle à ces échelles. Ceci sous-entend la détection, la caractérisation et la localisation de cellules et molécules d'intérêt (protéines, acides nucléiques, co-facteurs, ions, etc.). D'un point de vue pratique, les principales approches utilisées consistent soit à fractionner l'échantillon (par la densité dans un tube, la taille sur un gel ou une membrane, etc.) puis à doser *in vitro* ou à révéler la molécule d'intérêt ; soit à la détecter directement *in situ* sur des coupes histologiques. Ces dosages et ces détections ont longtemps utilisé des méthodes de révélation radiochimiques ou colorimétriques (méthodes par absorbance) dont certaines ont été abandonnées au profit de la détection par émission de lumière (luminescence, bioluminescence ou fluorescence). Dans ce chapitre, nous donnerons un aperçu de ces différentes approches et des possibilités offertes au regard des développements actuels des lasers biologiques.

1.1.1 La radioactivité

Découverte en 1934, la radioactivité artificielle a permis de créer de nombreux isotopes radioactifs [Guerra et al., 2012] qui ont révolutionné les sciences du vivant et la médecine.

Aujourd'hui, dans le domaine médical, les traceurs radioactifs les plus courants sont le Technétium-99 (⁹⁹Tc), l'Iode-123 (¹²³I), le Gadolinium-67 (⁶⁷Gd) et le Fluor-18 (¹⁸F) qui sont utilisés en imagerie fonctionnelle : scintigraphie et Tomographie à Emission de Positrons (TEP). Après injection au patient, ces traceurs radioactifs sont métabolisés par les cellules et vont donner une image du métabolisme de l'organe ciblé. Que ce soient les os, la thyroïde (glande accumulant naturellement ¹²³I), les tumeurs, le coeur, la prostate, les organes génitaux ou l'étude de la fonction rénale, l'examen TEP au FDG (Fluoro Deoxy Glucose) est une technique diagnostique très performante pour la mise en évidence de pathologies tumorales. Cela consiste à administrer par voie intraveineuse une infime quantité de glucose marqué avec du ¹⁸F. Ce glucose est préférentiellement capté par les cellules cancéreuses qui vont le stocker. La caméra TEP permet ensuite de visualiser les foyers où ce glucose est stocké, et révéler des foyers tumoraux. En imagerie fonctionnelle, cette approche permet d'obtenir, par exemple, des cartes d'activité cérébrale (zones de forte activité où la consommation de glucose est plus importante). Le traceur radioactif doit être localisé dans le corps à une dose la plus faible possible. C'est pourquoi les émetteurs sont choisis pour avoir des rayons γ , peu absorbés par l'organisme, qui émettent une énergie dans la gamme (80 – 400) keV c'est-à-dire (15 – 65) femtojoule. Il suffit alors de quantités infinitésimales, quelques milliardièmes de gramme, pour obtenir un diagnostic précis et localisé.

En biochimie, biologie cellulaire et tissulaire, la radioactivité a été très utilisée jusqu'à la fin du XXème siècle. Les isotopes les plus courants étaient le Soufre-35 (35 S), l'Iode-125 (125 I), l'Hydrogène-3 (3 H), le Phosphore-32 (32 P) et le Phosphore-33 (33 P) [Meisenhelder and Semba, 1998]. En marquant des peptides et des protéines (Méthionine et Cystéine au 35 S, 125 I) ou des nucléotides (35 S, 3 H, 32 P) il a été possible d'étudier : les processus de synthèse des protéines (translation *in vitro* avec 35 S), la croissance cellulaire (incorporation de ³H Thymidine), les interactions entre les récepteurs cellulaires et leurs ligands marqués (125 I) et leur processus d'internalisation, les mécanismes de phosphorylation (32 P), la localisation *in situ* de protéines ou de séquences d'ADN ou ARN dans un tissu (35 S, 32 P) par autoradiographie, l'étude des séquences d'acides nucléiques (Northern et Southern blots), etc.

Malgré leur sensibilité inégalée, les traceurs radioactifs sont des rayonnements ionisants cancérigènes, ce qui rend leur manipulation, stockage et élimination fastidieuse [Servent and Boulay, 2006]. Pour l'ensemble de ces raisons, des alternatives de luminescence "froides" ont été recherchées à la fin du XXème siècle. Parmi ces alternatives, la fluorescence s'est largement imposée dans les laboratoires de biologie.

1.1.2 Les marquages colorimétriques

Les marquages colorimétriques restent très employés pour les dosages et les mesures d'activités enzymatiques (dosages de protéines par la méthode de Bradford, méthode de Lowry, test fonctionnel au MTT - bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium - utilisé dans cette étude, test Elisa, etc.) ou la révélation de molécules sur des supports, membranes (western blot, Elispot, etc.). Dans le cas de détections *in situ*, les méthodes histologiques varient selon la cible moléculaire à étudier et les objectifs (diagnostic histopathologique ou protocole de recherche). Joseph von Gerlach est le premier en 1858 à avoir utilisé une coloration différentielle du noyau et des granules nucléaires comparativement au cytoplasme et aux espaces intercellulaires en incubant un tissu cérébral dans une solution de carmin dilué [Hooke, 1845]. Ces techniques sont encore très employées dans le milieu médical en anatomopathologie pour analyser et diagnostiquer des biopsies afin de détecter des cellules tumorales.

Les méthodes histochimiques sont basées sur des réactions biochimiques qui utilisent couramment des colorants acides (éosine, acide pricrique, érythrosine) ou basiques (bleu de méthylène, carmin, safranine, thionine) pour marquer, identifier et localiser des gènes, leurs ARN-messagers (Acide RiboNucléique) et leurs protéines, mais aussi pour décrire la morphologie et les structures subcellulaires issues de coupes ou de tissus vivants ou fixés. Parmi tous les colorants, on peut citer quelques exemples courants : (1) le bleu trypan pour évaluer la viabilité cellulaire; (2) le trichrome Hématéine-Eosine-Safran (HES) colorant respectivement les noyaux en violet, le cytoplasme en rose et les fibres de collagène en jaune. Après avoir subi une déshydratation, les coupes de tissus fixés et colorés sont montées entre lame et lamelle dans un milieu dont l'indice de réfraction accentue les contrastes et facilite l'observation en microscopie photonique à transmission.

1.1.3 La fluorescence

La description des propriétés fluorescentes du sulfate de quinine par John Herschel [Herschel, 1845] en 1845 est considérée comme la première caractérisation de la fluorescence, ainsi que l'ouvrage de George Stokes [Stokes, 1852] (1852) décrivant de nombreuses substances fluorescentes (du sulfate de quinine au vin de Porto). Adolf von Bayer a synthétisé en 1871 le premier colorant fluorescent, la fluorescéine. Paul Ehrlich a utilisé un sel de sodium de la fluorescéine en 1882 pour déterminer la voie de sécrétion de l'humeur aqueuse dans l'œil - représentant la première utilisation d'un colorant fluorescent en physiologie animale [Hooke, 1845].

En 1941, l'association de la fluorescéine, modifiée en fluorescéine-iso-cyanate pour pouvoir être greffée sur des protéines et des anticorps, a ouvert le champ des techniques immunohistochimiques en fluorescence [Coons et al., 1941]. La fluorescence s'est imposée progressivement comme une technique de choix pour détecter, imager et quantifier les biomolécules ou les structures subcellulaires dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire, de la biochimie, et de la santé. Elle a contribué au développement de l'immunocytochimie, l'immunohistochimie (IHC) ou l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). La popularité de la détection de fluorescence est due : (i) aux avancées dans le domaine des sondes pour obtenir de meilleures brillances et photostabilités (Sec. 1.3); (ii) à l'amélioration du rendement quantique des capteurs, ainsi qu'à l'évolution des technologies allant des caméras CCD ("Charge-Coupled Devices") à l'EMCCD ("Electron Multiplying CCD") et au sCMOS ("scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor") [Lambert and Waters, 2014] pour la biologie cellulaire (Sec. 1.4). La fluorescence a ainsi permis de remplacer progressivement de nombreux marqueurs radioactifs. L'exemple le plus marquant est la substitution du ³²P dans les méthodes de séquençage de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ou le développement de la PCR ("Polymerase Chain Reaction") quantitative avec des sondes TaqMan (6-carboxyfluorescéine : FAM, tétrachlorofluorescéine : TET et désactivateurs : tétraméthylrhodamine : TAMRA) sont utilisables. On peut également citer l'étude structure-fonctions des ARNs [Ying et al., 2007] par un fluorophore infrarouge (IR) remplaçant le ³²P.

Le choix d'un fluorochrome en biologie doit permettre d'obtenir un signal photostable, de rendement quantique suffisant pour être détecté et ayant une signature spectrale spécifique de la molécule étudiée. Si un fluorochrome est utilisé dans une cellule vivante, il ne doit pas modifier la fonction de la cible étudiée,

Fluorophores	$\epsilon ~(L/mol/cm)$	ϕ_F	Brillance	$ au_T$ (ns)
Fluorescéine	80 000	0,90	72 000	4,0
Rhodamine 6G	30 500	0,95	28 975	4,0
Alexa Fluo 488	65 000	0,92	59 800	4,0
Cyanine 5	250 000	0,35	90 000	1,0
EYFP	84 000	0,61	51 000	3,0
B-phycoérythrine	2 410 000	0,98	2 360 000	2,7
Tryptophane	6 000	0,10	600	2,8

TABLE 1.1 – Caractéristiques de différents fluorophores d'après [Valeur, 2003, Lakowicz, 2013, Spence and Johnson, 2010, Magde et al., 2002]

et, *a fortiori*, le fonctionnement cellulaire [Blancafior et al., 2001]. Le marquage cellulaire permet d'accéder à des informations fonctionnelles et structurales [Brown et al., 2004, Haseloff, 2003].

1.2 Propriétés de la fluorescence

L'objectif de cette section n'est pas de faire une revue exhaustive sur la fluorescence mais d'évoquer les propriétés et les utilisations en biologie permettant de comprendre le projet et son potentiel. Cette section se base sur la bibliographie suivante : [Valeur, 2003, Lakowicz, 2013, Spence and Johnson, 2010]

1.2.1 Rendement quantique, intensité et durée de vie

La fluorescence est en compétition avec les phénomènes de désexcitation nonradiative, de transfert d'énergie, de "quenching" par collisions, des interactions moléculaires, etc. Le rendement quantique ϕ_F caractérise alors l'efficacité du processus de fluorescence ($\phi_F \leq 1$), et ainsi la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 (Fig. 1.1) en émettant un photon :

$$\phi_F = rac{ ext{Nombre de photons \acute{e}mis}}{ ext{Nombre de photons absorb\acute{e}s}}$$
. (1.1)

Intensité

Le coefficient d'absorption molaire ϵ reflète la probabilité du fluorophore à absorber un photon. Le produit des deux paramètres précédents ($\epsilon \times \phi_F$) permet d'obtenir la brillance intrinsèque d'un fluorophore qui sera un indice de son intensité de fluorescence émise. Le tableau 1.1 illustre les différentes caractéristiques de quelques fluorophores utilisés en biologie cellulaire et moléculaire.

Outre ces paramètres intrinsèques, l'intensité de fluorescence émise par un fluorophore excité par une source se calcule à partir de l'absorbance A ou densité optique définie par le rapport entre les intensités incidente I_0 et transmise I_T de la source d'excitation :

$$A = -\log T = -\log \frac{I_T}{I_0} \,. \tag{1.2}$$

Cette absorbance A est aussi reliée à la loi de Beer-Lambert quand le faisceau traverse une épaisseur l d'une cuve contenant une concentration C de fluorophores de coefficient d'absorption molaire ϵ :

$$A = \epsilon C l \,. \tag{1.3}$$

La fluorescence I_F s'exprime comme la différence entre fraction incidente et transmise :

$$I_F = I_0 - I_T = I_0 (1 - 10^{-\epsilon Cl}).$$
(1.4)

Si le fluorophore est suffisament dilué (C << 0,02M), alors l'intensité I_F se simplifie par la relation linéaire suivante :

$$I_F = 2, 3\phi_F I_0 \epsilon C l \,. \tag{1.5}$$

Dans ce cas, l'intensité de fluorescence I_F dépend de la brillance $(\phi_F \times \epsilon)$, de la concentration C du fluorophore et de l'intensité I_0 de la source.

Durée de vie de fluorescence

La durée de vie τ_T est représentée sur le diagramme de Jablonski de la Fig. 1.1. Les taux de désexcitation radiative (fluorescence) k_r et non-radiative k_{nr} du fluorophore représentent le taux de dépeuplement des électrons de l'état excité à ces processus. Le rendement quantique ϕ_F peut alors être formulé par ces constantes k_r et k_{nr} via la relation suivante :

$$\phi_F = rac{k_r}{k_r + k_{nr}} \,.$$

Le rendement quantique ϕ_F peut être proche de l'unité si le taux k_{nr} est beaucoup plus petit que le taux $k_r : k_{nr} \ll k_r$. La durée de vie τ_T est définie par le temps moyen que la molécule passe de son état excité S_1 avant de revenir à son état fondamental S_0 . Elle vaut :

$$\tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \,. \tag{1.7}$$

Par exemple, l'éosine et l'érythrosine B ont essentiellement le même coefficient d'absorption molaire ϵ , le même taux de désexcitation radiative k_r mais des durées de vie τ_T différentes dues à des taux de désexcitation non-radiative k_{nr} différentes [Lakowicz, 2013].

L'émission de fluorescence est un processus aléatoire et peu de molécules émettent leurs photons à $t = \tau_T$. La durée de vie τ_T est donc une valeur moyenne de la probabilité exponentielle d'émission. 63% des molécules se sont désexcitées avant $t = \tau_T$ et 37% se désexcitent à $t > \tau_T$. En l'absence de processus non-radiatifs, la durée de vie τ_T est alors appelée durée de vie intrinsèque ou naturelle τ_r donnée par la relation suivante :

$$au_r = rac{1}{k_r}$$
 (1.8)

La durée de vie τ_T est donc définie par le rendement quantique ϕ_F de fluorescence et la durée de vie τ_r correspondante à une émission effective de photons de fluorescence :

$$\tau_F = \phi_F \tau_r \ . \tag{1.9}$$

De nombreux fluorochromes possèdent une durée de vie τ_T de l'ordre de la nanoseconde [Lakowicz, 2013, Magde et al., 2002, Spence and Johnson, 2010]. Une durée τ_r courte a pour conséquence :

- de rendre disponible le fluorochrome plus rapidement pour un nouveau cycle de fluorescence et d'améliorer ce rendement, c'est-à-dire le nombre de cycles par unité de temps car le fluorophore repassera plus rapidement dans son état fondamental S_0 ,
- de diminuer la durée τ_T et d'augmenter ainsi le rendement quantique ϕ_F si le taux k_{nr} reste constant.



FIGURE 1.1 - Cinétique des phénomènes d'après [Lichtman and Conchello, 2005]

1.2.2 Photostabilité et photoblanchiment

Le photoblanchiment est un processus physico-chimique qui se traduit par une perte progressive et généralement exponentielle de la fluorescence du fluorochrome [Song et al., 1995]. Ce phénomène qui a une temporalité 10^6 plus grande que la durée de vie τ_T de fluorescence (Fig. 1.2), est la conséquence d'une réaction photochimique (oxydation) du fluorophore à l'état excité empêchant son retour à un état excitable.

La photostabilité est le nombre maximal de cycles de fluorescence que va subir un fluorophore avant sa dégradation. Pour détecter son signal du bruit de fond, un fluorochrome doit être excité plusieurs centaines de fois (quelques millisecondes) par une source (quelques milliwatts) ce qui augmente sa probabilité de photoblanchir.



FIGURE 1.2 – Diagramme illustrant la durée de vie et le photoblanchiment d'après [Song et al., 1995].

1.2.3 Etalement spectral et applications biologiques

En physique moléculaire, la structure électronique est composée par un ensemble continu de sous-niveaux vibratoires (\sim 0,1 eV) et rotationnels (\sim 0,001 eV) dans chaque état électronique (\sim 1 eV). La largeur de la bande spectrale (absorption et émission) d'un fluorophore situé dans un environnement particulier résulte de deux effets : un élargissement homogène et inhomogène (Fig. 1.3). La première est due à la structure électronique même du fluorophore tandis que la deuxième est causée par les collision et la couche de solvatation entourant le fluorophore conduisant à une redistribution statistique des transitions électroniques [Nemkovich et al., 2002]. Quand un matériau homogène est excité par une source qui résonne avec une transition électronique, tous les oscillateurs optiques absorbent ce rayonnement et émettent une émission spontanée. Le spectre de fluorescence correspond donc à la somme des spectres individuels tous identiques à la même position énergétique. La raie "homogène" résultante possède alors le même profil que chacune prise individuellement : seule l'intensité résulte proportionnellement au nombre d'oscillateurs excités. Quand un matériau inhomogène est excité par une source, seuls certains oscillateurs optiques absorbent puis émettent de la lumière.

En biologie, pouvoir détecter plusieurs molécules d'intérêt dans un même échantillon permet de préciser les localisations, identifier des interactions entre partenaires marqués ou effectuer des études statistiques sur de grandes populations cellulaires. Ceci nécessite une multiplication du nombre de fluorophores différents sur le même échantillon en imagerie, spectrométrie ou cytométrie en flux.

L'étendue du spectre UV proche-visible-proche IR n'étant pas extensible et les spectres des molécules organiques employées étant assez larges (100 nm minimum en moyenne), le nombre de "couleurs" possibles est contraint (Fig 1.4). La tendance étant à une surenchère du nombre de marqueurs, en particulier en cytométrie en flux, il a fallu trouver des parades au chevauchement des spectres d'émission pour discriminer les molécules ciblées. L'introduction des "quantum dots"



FIGURE 1.3 – Etalement spectral pour un matériau homogène et inhomogène.

([Lacoste et al., 2000], Sec. 1.3.3) avec des spectres d'émission plus étroits a permis partiellement de solutionner ce problème. L'autre approche a consisté à utiliser des détecteurs spectraux (microscopie confocale : [Donaldson et al., 2010] et cytométrie en flux : [Idziorek et al., 2018]) et à utiliser des algorithmes de décomposition linéaire des spectres pour en extraire les composantes monomarquées.



FIGURE 1.4 – Spectres d'émission des sondes commerciales Alexa Fluor dans le visible et proche IR *d'après* [Spence and Johnson, 2010].

1.3 Les fluorochromes pour étudier le vivant

De nombreuses molécules du vivant sont naturellement fluorescentes comme les acides aminés aromatiques (Tyr, Trp, Phe), les groupements prosthétiques (vitamines, etc.), les coenzymes mitochondriales (NADH). Ces fluorophores sont dits intrinsèques et permettent par exemple d'effectuer des mesures d'interactions entre des protéines et leurs ligands ou des tests d'activité mitochondriale. Ils peuvent également être source d'autofluorescences parasites dans le cas de marquages extrinsèques. Dans cette section, nous aborderons les différentes classes chimiques de fluorophores extrinsèques utilisés en biologie pour marquer les molécules d'intérêt. D'un point de vue fonctionnel, ces sondes peuvent révéler les molécules d'intérêt de trois façon différentes : • coloration par affinité ou passive : dans ce cas, les sondes vont être associées aux molécules d'intérêt en s'intercalant (marqueurs de l'ADN, marqueurs de membranes lipophiles), ou en pénétrant dans un compartiment cellulaire en suivant un gradient de charges ("Cell trackers" comme le Carboxy-Fluorescéine Succinimidyl Ester (CFSE); marqueurs de potentiel mitochondrial comme TetraMethylRhodamine ethyl Ester (TMRE)).

• par liaison covalente avec des réactifs chimiques comportant des groupes fonctionnels comme les groupes amino ou sulfhydryles. Cette liaison peut être directe sur la molécule à étudier ou indirecte dans le cas du greffage d'anticorps spécifiques ou de séquences d'ADN complémentaire de la cible à étudier ou de toxines associées à des fluorophores (phaloidine-Alexa Fluor par exemple). Ces approches sont plutôt utilisées sur des échantillons fixés.

• par génie génétique, dans le cas de protéines, en construisant une protéine chimère associant la séquence protéique à étudier, et une séquence de protéine fluorescente.

1.3.1 Petites molécules organiques

Ces molécules sont principalement des hétérocycles dérivés du xanthène ou de la coumarine. On peut citer la fluorescéine, la 7-amino-coumarine, la rhodamine, la pyronine, les cynanines, le DAPI (Diamidino-4['],6-phénylindol-2 dichlorhydrate) et leurs dérivés comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).



FIGURE 1.5 – Structure chimique de la Fluorescéine

L'absorption de la lumière et la fluorescence dans le domaine du visible émanent directement de la structure chimique et de la délocalisation électronique sur les orbitales moléculaires. En effet, les cycles benzéniques et les hétérocycles, qui les constituent en général, présentent une forte délocalisation. En conséquence la quantum d'énergie nécessaire à l'excitation électronique pourra être apportée par des radiations dans le domaine visible.

Les premières molécules souffraient d'une photostabilité limitée. La mise sur le marché de nouvelles sondes comme les Alexa Fluor a permis de balayer toute la plage du visible à l'infrarouge (450 à 800 nm) avec des brillances et des photostabilités plus grandes que les sondes de première génération (Fig 1.6). Ces sondes sont aussi moins sensibles aux modifications de pH (pH4 à pH10) du milieu cellulaire. A titre d'exemple, l'Alexa Fluor 488 avec un rendement quantique de 0,92 photoblanchit beaucoup plus lentement (Fig 1.6) par rapport à la Fluorescéine (40% de pertes au

bout de 2 ms a 25 mW).



FIGURE 1.6 – Comparaison des fluorochromes Alexa Fluor 488 et FITC : (a) Photostabilité (b) Sensibilité du pH d'après [Spence and Johnson, 2010].

1.3.2 Les protéines fluorescentes : une ouverture vers les observations dynamiques

Les protéines fluorescentes ont constitué un progrès majeur pour les études in situ des protéines dans les cellules vivantes et les tissus via la découverte de la "Green Fluorescent Protein" (GFP) [Chalfie et al., 1994] et de ses dérivées analogues améliorant son rendement quantique par mutation comme la Enhanced GFP (EGFP). Cette dernière a rapidement entraîné de nombreuses applications comme gène rapporteur puis fusionnée avec des protéines cibles puis introduites dans différents modèles cellulaires ou animaux. Les premières mutagénèses ont également permis de décliner différentes couleurs pour une imagerie multicouleurs (ECyanFP, EBlueFP, EYellowFP) (Fig 1.7).



FIGURE 1.7 – Structure de la GFP et des analogues obtenus par mutagénèse d'après [Shaner et al., 2007].

Le fluorophore émerge de la proximité de résidus hétérocycliques qui vont générer une délocalisation électronique propice à l'absorption de la lumière et la fluorescence. Dans le cas de la GFP, le chromophore est constitué de l'association Ser65-dehydroTyr-Gly67 par cyclisation et oxydation, au centre de la structure en tonneau de la protéine (Fig 1.7). La déclinaison des variants colorés a été obtenue par modification de la délocalisation électronique en changeant les acides aminés de ce chromophore par mutagénèse. Ainsi, l'équipe de Tsien [Shaner et al., 2004] a proposé en 2004 une palette de couleurs étendues du jaune au rouge.

Ces protéines ont contribué à la conception de biocapteurs et au progrès des techniques de microscopie de super-résolution. Les applications en microscopie de fluorescence sont extrêmement nombreuses [Yuste, 2005]. Elles permettent non seulement la détection de gènes marqués mais également de disséquer la signalisation ou les fonctions cellulaires. Des modèles animaux (Ex : souris brainbow [Livet, 2007]) exprimant ces différentes protéines en lien avec des populations cellulaires spécifiques ont été développés de façon concomitante avec l'évolution des techniques d'imagerie *in vivo*, en particulier la microscopie multiphotonique. Celle-ci a émergé en neurosciences dans les années 1990 [Denk and Svoboda, 1997], puis ces dernières années, elle a connu un essor important en immunologie pour étudier les processus dynamiques de la réponse immunitaire [Germain et al., 2006]. Il devient alors possible de suivre la dynamique de cellules ou de protéines *in vivo*.

1.3.3 Les "quantum dots" : des fluorochromes inorganiques photostables

Depuis les années 2000 les nanoparticules semiconductrices de CdTe ou CdSe ou "Quantum Dots" (QD) complètent la gamme des fluorophores organiques pour les marquages biologiques. Depuis les premières synthèses en 1993 [Murray et al., 1993], ces sondes ont présenté des propriétés optiques flexibles et intéressantes (Fig. 1.8) [Alivisatos, 1996] :

- leur longueur d'onde d'émission augmente avec leur taille : de 10 à 20 nm,
- elles présentent des spectres d'absorption larges et des spectres d'émission fins avec un décalage de Stokes important,
- \bullet elles sont aussi brillantes (rendements quantiques \sim 0,90 0,95) que les fluorophores organiques,
- et très robustes au photoblanchiment.

Ces nanoparticules étant naturellement cytotoxiques et hydrophobes [Murray et al., 1993], il fallu les fonctionnaliser pour les rendres hydrophiles et biocompatibles en les recouvrant de couches de biomolécules [Dubertret et al., 2002, Wu et al., 2003, Jaiswal et al., 2003]. Cette fonctionalisation a permis de les associer, comme les fluorophores organiques, à des molécules cibles ou à des ligands, des anticorps, etc. L'ensemble des propriétés mentionnées ci-dessus (stabilité, taille, etc.) rend possible des observations avec des localisations précises pendant plusieurs minutes. Ainsi ces fluorophores sont très utilisés en microscopie pour le suivi de particule unique.



FIGURE 1.8 – Spectres d'excitation et d'émission des "Quantum dots" commerciaux (QD525, 565, 605, 655, 705, 800) d'après [Zhang et al., 2008]

1.3.4 Des artifices de marquage pour amplifier la fluorescence

Malgré les progrès continus des sondes mentionnées dans les sections précédentes, les fluorophores émettent une puissance qui reste relativement faible (de l'ordre du picowatt) de façon isotrope, et le signal peut rester noyé dans le bruit des détecteurs (Sec.1.4). Dans certains cas, les cibles à repérer sont peu représentées dans les cellules ou les tissus et se perdent dans l'autofluorescence. Deux méthodologies récentes, développées pour l'immunomarquage et l'hybridation *in situ*, se sont popularisées par leur efficacité malgré leur coût.

La "Tyramide Signal Amplification" (TSA)

La TSA [Faget and Hnasko, 2015] relie plusieurs fluorophores avec des anticorps secondaires conjugués eux-même avec un anticorps primaire dirigés contre la biomolécule d'intérêt, créant une arborescence imposante et complexe (Fig. 1.9). Ces marquages TSA amplifient le signal par un facteur 50 par rapport à des marquages standards avec des anticorps secondaires mais ils demandent néanmoins plusieurs étapes de préparation. Ceci complexifie la technique et augmente les erreurs potentielles liées à la préparation. On peut aussi ajouter que sa grande taille dégrade non seulement la résolution spatiale des images quand les fluorophores sont proches les uns des autres mais elle perturbe aussi localement son microenvironnement. La TSA est plutôt utilisée quand la biomolécule ciblée est relativement peu abondante dans la cellule comme les récepteurs endogènes.

Le "RNAscope"

Le RNAscope [Wang et al., 2012] est une technique d'hybridation *in situ* basée sur une architecture arborescente (branches de "préamplificateur" et "amplificateur" attachées à une structure en double Z) qui se fixe sur une séquence complémentaire d'ARN de la biomolécule ciblée (Fig. 1.10). Ce marquage permet une amplification de la fluorescence d'une molécule en multipliant le nombre de fluorophores (jusqu'à 8 000) fixés sur la structure. Cette technique possède les mêmes limites que la TSA :



FIGURE 1.9 – Amplification de la fluorescence par l'approche TSA.

des protocoles plus complexes, une dégradation de la résolution spatiale des images quand les fluorophores sont proches, une perturbation locale de son microenvironnement.



FIGURE 1.10 – Architecture du marquage RNAscope d'après [Wang et al., 2012].

1.4 Exciter et détecter la fluorescence : instrumentation

Depuis sa découverte, la fluorescence a permis un développement rapide des instruments optiques autour du mécanisme : microscopie, spectrométrie et cytométrie. On peut citer de nombreuses techniques gravitant autour de la fluorescence comme la microscopie à champ large, confocale, à 2 photons, à balayage qui ont mené à une panoplie de systèmes sous divers acronymes comme le TIRF ("Total Internal Reflection Fluorescence"), STED ("STimulated Emission Depletion"), PALM ("Photo-Activated Localization Microscopy"), STORM ("STochastic Optical Reconstruction Microscopy"), etc [Stephens and Allan, 2003, Leung and Chou, 2011]. Néanmoins, leur principal objectif était toujours de recueillir des informations en-dessous de la limite de diffraction du système optique, avec une grande résolution spatio-temporelle. Dans le même temps, l'optimisation de la détection a été une préocupation constante qui a également permit de faire émerger ces techniques en gagnant en contraste. On peut citer l'apparition de photodiodes à avalanche, de photomultiplicateurs avec des photocathodes en GaAsP ou des technologies EMCCD ou sCMOS [Lambert and Waters, 2014]. Plus récemment, de nouvelles approches ont été proposées comme la compensation des fronts d'onde par optique adaptative [Rueckel et al., 2006, Kobat et al., 2009] avec un modulateur spatial de lumière ou l'imagerie différentielle [Leray et al., 2008].

En supposant qu'une sonde fluorescente ($\lambda \approx 500 \text{ nm}$) émet environ quelques picowatts dans toutes les directions, il est alors nécessaire de minimiser les pertes de la fluorescence sur le trajet optique (Fig. 1.11).



FIGURE 1.11 – Dispositif de microscope à épifluorescence.

1.4.1 Objectifs

La majorité des instruments optiques emploient un objectif avec une grande ouverture numérique (0,50 - 1,45) pour tenter de collecter une quantité maximale de lumière émise d'une sonde localisée à un point de l'espace. Cette quantité est limitée par un angle solide Ω de l'objectif défini par un angle θ et un indice de réfraction n du milieu environnant. Un objectif est principalement caractérisé par son ouverture numérique ON:

$$ON = n\sin\theta$$
, (1.10)

$$\Omega = 2\pi (1 - \cos \theta) = 2\pi (1 - \sqrt{1 - \frac{ON^2}{n^2}}). \qquad (1.11)$$

On suppose ici n = 1. Un objectif collecte alors une fraction P de la puissance totale P_{tot} dans un cône défini par cet angle solide Ω :

$$P = \Omega \frac{P_{tot}}{4\pi} \,. \tag{1.12}$$

On remarque que la puissance diminue d'un facteur 8 quand l'ouverture numérique varie de 1 à 0,5.

1.4.2 Détecteurs

Dans cette section, on suppose un échantillon homogène de fluorophores avec un rendement quantique égale à 1, aucune perte des optiques et un détecteur intégrant le signal sur 1 seconde. Un détecteur est principalement caractérisé par sa sensibilité S_{λ} à une longueur d'onde λ (unité : A/W) définie par la puissance optique P_{opt} du rayonnement et le courant électrique I_{ph} généré par la photodiode :

$$S_{\lambda} = rac{I_{ph}}{P_{opt}} = rac{\lambda(nm)}{124} QE(\%) \,,$$
 (1.13)

où λ représente la longueur d'onde du rayonnement et QE le rendement quantique du détecteur. Cette grandeur QE est intrinsèque aux propriétés du matériau du capteur. Par exemple, le silicium détecte bien les rayonnements dans le domaine du visible (350 - 1100 nm) tandis que les matériaux InGaAs et GaP détectent respectivement ces rayonnements dans l'infrarouge (800 - 1700 nm) et l'ultraviolet (150 - 550 nm). Aujourd'hui, les caméras et les spectromètres offrent une excellente sensibilité maximale sur une large gamme de fréquences. On peut citer les caméras sCMOS (Flash4 - Hamamatsu) ou EMCCD (ImagEM X2 - Hamamatsu) qui offrent un rendement quantique supérieur à 70% entre 400 et 750 nm.

Un détecteur génère plusieurs bruits dont le bruit noir est le plus contraignant. Le bruit définit la puissance minimum résolue par un détecteur : le signal est ensuite perdu et noyé dans le bruit en-dessous de cette valeur. Elle est caractérisée par la puissance équivalente au bruit NEP ("Noise Equivalent Power", unité : W/\sqrt{Hz}) et elle dépend de la sensibilité S_{λ} :

$$NEP_{\lambda} = NEP_{min}rac{S_{max}}{S_{\lambda}}\,,$$
 (1.14)

où la grandeur NEP_{min} est donnée par la sensibilité maximum S_{max} à la longueur d'onde correspondante. Ces trois grandeurs sont imposées par les données du constructeur. La puissance minimum P_{min} est le produit entre la NEP_{λ} et la bande de fréquence BW du détecteur :

$$P_{min} = NEP_{\lambda} \times \sqrt{BW} \,, \tag{1.15}$$

Le bruit noir est causé par une agitation thermique des atomes constituant le capteur : un électron est arraché de sa couche de valence sous l'effet de la température ambiante. Ce bruit diminue en fonction de la température. Aujourd'hui, les détecteurs sont refroidis pour diminuer le bruit noir. Les caméras détectent ainsi une puissance minimale entre 1 pW $\leq P_{min} \leq 1$ nW dans une configuration optimale.

Si un objectif (ON = 1,0) collecte 2 picowatts de la sonde alors il faudrait entre 1 et 500 sondes pour extraire et détecter un signal (SNR = 1) dans le champ du détecteur. Pour une bonne mesure (un bon contraste), on vise un SNR >> 1:

- SNR = 10: il faut entre 10 et 5 000 sondes
- SNR = 20: il faut entre 20 et 10 000 sondes



https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/concepts/ccdsnr/

FIGURE 1.12 - Augmentation du contraste de fluorescence par SNR d'après https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/concepts/ccdsnr/

En conclusion, si les molécules endogènes ciblées sont peu représentées, réparties de façon hétérogène et excitées sur quelques millisecondes, alors le signal de fluorescence est facilement noyé dans le bruit du détecteur.

1.5 Amplification avec des cavités pour des applications biologiques

Dans le monde industriel, la diffusion est toujours considérée néfaste pour la fabrication des lasers standards et conventionnels car elle est une cause importante des pertes radiatives dans le résonateur réduisant ses performances. Cependant les chercheurs savent depuis longtemps que la diffusion peut aussi favoriser la stimulation des photons dans un milieu actif et désordonné. Depuis 1966, Ambartsumyan et ses collaborateurs avaient proposé un premier amplificateur incohérent [Ambartsumyan et al., 1966] où une surface diffusive remplaçait un miroir de la cavité Fabry-Perot. En 1968, Letokhov avait décrit et prédit la *bombe photonique* (Sec. 2.2.1) via la théorie de la diffusion radiative [Letokhov, 1968]. Ces découvertes faisaient directement suite au premier laser cohérent de Maiman en 1960. On rappelle brièvement les différents mécanismes impliqués pour aboutir à une amplification stimulée ou une source laser cohérente.

1.5.1 Mécanismes des sources amplificatrices et lasers

Le laser est un acronyme signifiant une amplification de la lumière par une émission stimulée radiative. Néanmoins cette terminologie oublie son second mécanisme principal : l'oscillation optique. En effet, seule une oscillation permet la résonance de certaines fréquences et certains modes via une rétroaction en phase des ondes favorisant leurs interférences constructives. Cette oscillation optique donne alors au laser ses propriétés exceptionnelles et cohérentes : une statistique de Poisson, une émission directionnelle, une polarisation, certaines raies fines dans son spectre. Cette oscillation est donc une condition *sine qua non* pour créer une émission cohérente dans un laser via une structure résonante comme une cavité Fabry-Perot.

Néanmoins cet acronyme souligne bien plusieurs faits. Premièrement l'émission stimulée est bien le mécanisme à la base d'une amplification lumineuse. Ensuite tous les milieux optiques peuvent stimuler et amplifier leur émission spontanée. Il suffit que le processus de stimulation devienne le mécanisme prépondérant dans le milieu. Autrement dit, il faut trouver un piège pour allonger la durée et le parcours optique des photons dans le milieu actif pour augmenter la probabilité de rencontre avec des molécules fluorescentes excitées et déclencher une avalanche de photons stimulés avant leur fuite en-dehors du système. Cette stimulation présente les propriétés de l'émission spontanée amplifiée : la présence d'un seuil et une diminution de la largeur du spectre (voir Chap. 2 pour une description détaillée des différents mécanismes).

1.5.2 Amplificateurs incohérents

Un simple changement d'indice de réfraction peut parfois suffire pour pièger la lumière dans un milieu actif et la confiner dans une direction préférentielle comme les premières fibres optiques dopées pour amplifier les signaux transcontinentaux dans les réseaux télécoms. En biologie, certains pièges ont été inspirés par les cavités Fabry-Perot ou les miroirs de Bragg. Par exemple, ils ont été utilisés par Gather et son équipe pour stimuler la GFP in vitro ou dans une cellule isolée sur une lame (Fig. 1.13) [Gather and Yun, 2011b]. Ces cavités piègent et imposent aux photons spontanés fluorescents de multiples allers-retours à l'intérieur des échantillons pour les forcer à réagir avec les marqueurs excités. Cela augmente et favorise la probabilité de créer une émission stimulée et un gain lorsque la pompe est proche du seuil laser. En outre, une émission cohérente commence même à apparaître au-delà du seuil laser - lorsque la pompe augmente - observable par les raies fines dans le spectre. Gather, Humar et Yun décrivent les conditions théoriques de résonance pour obtenir une émission cohérente en modélisant la cellule comme une lentille sphérique dans une cavité interférentielle [Humar et al., 2015]. Quelque soit la situation, la fluorescence est stimulée et amplifiée. Elle est facilement collectée par un microscope à épifluorescence.



FIGURE 1.13 – (A) Fluorescence stimulée de la GFP observée via un microscope à épifluorescence. (B) Intensité de fluorescence = $f(E_{pompe})$ – la présence du seuil laser indique une fluorescence stimulée. (C, D) Fluorescence mesurée proche du seuil laser – Début de la présence de raies fines dans le spectre. (E, F) Fluorescence mesurée au-dessus du seuil laser – Raies lasers avec une fluorescence localisée et confinée dans la cellule. [Gather and Yun, 2011b]

1.5.3 Cavités naturelles

Certaines études n'emploient aucune cavité externe pour piéger la fluorescence dans le milieu. Elles exploitent directement des structures naturelles et condensées (partiellement structurées et périodiques) ou complètement désordonnées (dans les milieux). Par exemple, on retrouve des structures périodiques formant des microcavités naturelles dans les ailes des papillons [Wang et al., 2014], celles des drosophiles [Zhang et al., 2012] ou les membranes des bactéries [Gather and Yun, 2011a]. Un colorant est alors injecté pour simuler le milieu à gain.

On peut aussi citer les travaux de Song et ses collaborateurs sur les tissus osseux [Song et al., 2010]. Ces derniers amplifient le signal de la rhodamine 800 via l'architecture des os pour différentes épaisseurs du tissu osseux. Ils obtiennent un seuil laser avec la présence de raies dans le spectre d'émission de la rhodamine 800 (Fig. 1.14). Les structures désordonnées se comportent comme de multiples petites cavités interférentielles provoquant une émission stimulée via la diffusion avec un début de cohérence. Cet exemple met en évidence la dépendance entre la stimulation, les effets cohérents et la densité des diffuseurs dans un milieu actif. Au fur et à mesure que l'épaisseur de l'échantillon augmente, le seuil laser diminue et des raies fines apparaisent dans le spectre.



FIGURE 1.14 – (a) Spectre d'émission d'une solution de rhodamine 800 stabilisé dans l'éthanol sans tissu osseux. (b) Spectre d'émission de la rhodamine 800 avec un tissu osseux d'une épaisseur de 200 µm sous 2 éclairages différents. (c) Spectre d'émission de la rhodamine 800 avec un tissu osseux d'une épaisseur de 5 mm. (d) Intensité de fluorescence = $f(E_{pompe})$ pour un tissu osseux de 5 mm – présence d'un seuil laser. [Song et al., 2010]

La diffusion exploite le contraste entre les indices de réfraction de la cible biologique étudiée avec son milieu environnant. Il est nécessaire que le contraste soit élevé afin que la diffusion allonge la durée du séjour de la fluorescence dans le milieu. Une application potentielle a été décrite par Polson et son équipe [Polson and Vardeny, 2004] puis récemment par Wang et ses collaborateurs [Wang et al., 2017] dans le diagnostic précoce des tissus tumoraux par une analyse spectrale et histologique des tissus. Les cancers modifient les propriétés tissulaires : le tissu devient rigide et son indice optique augmentent au fur et à mesure du développement tumoral. Cela crée donc une multitude de diffuseurs dans la cellule cancéreuse. Ces deux équipes ont montré que les tissus tumoraux présentaient bien une forte émission amplifiée avec une multitude de raies lasers dans le spectre tandis que le seuil laser diminuait graduellement en fonction du développement du cancer (Fig. 1.15). En conclusion, ils ont obtenu une signature spectrale différente entre les tissus sains et tumoraux. Ces signatures pourraient alors conduire à une technique de diagnostic pour séparer les tissus sains des tissus tumoraux mais aussi détecter un cancer précoce.



FIGURE 1.15 – Evolution spectrale selon le stade du cancer – grade croissant du I (tissus sain) au III (tissus tumoraux à un stade avancé) – au-dessus du seuil laser. Encart : Diminution du seuil laser pour un grade III du cancer [Wang et al., 2017]

1.5.4 Optofluidique : résonateurs interférentiels et cristaux photoniques diélectriques

En optofluidique, les résonateurs sont exploités pour donner aux milieux actifs des propriétés lasers cohérentes. Cette technologie (issue du mariage entre l'optique et la microfluidique) permet de manipuler sur une puce des petits volumes liquides (1 femtolitre à 1 picolitre) au sein de canaux micrométriques. Cette puce permet de détecter des quantités de molécules peu abondantes [Psaltis et al., 2006, Méance et al., 2012]. La microfluidique s'inspire principalement des lasers standards à colorant avec différentes structures de cavités [Chen et al., 2010] pour accroître le signal de fluorescence. Ainsi les photons fluorescents sont générés par un petit volume de fluorophores (comme milieu actif) dilués dans un solvant organique pur à l'intérieur du résonateur [Méance et al., 2012].

On assiste à une véritable course au développement des cavités pour transformer un milieu actif en une source amplificatrice ou une source laser aux échelles nanométriques et micrométriques [Chen et al., 2010]. Ces cavités sont utiles pour exalter les marqueurs fluorescents ouvrant la voie à une nouvelle classe de biocapteurs avec puces intégrées ("lab-on-chip") pour une plateforme microfluidique miniaturisée et fonctionnelle [Méance et al., 2012]. Tous ces domaines exploitent les avantages des sources amplificatrices et lasers pour extraire des informations utiles sur les molécules biologiques. Il existe deux types principaux de cavités externes : les cavités interférentielles / cristaux photoniques diélectriques et les métaux nanoplasmoniques. Les premières exploitent les interférences constructives des ondes tandis que les deuxièmes utilisent les propriétés plasmoniques des métaux.

La figure 1.16 donne un exemple de source laser microfluidique avec une cavité interférentielle qui multiplexe deux colorants organiques comme milieux actifs [Aubry et al., 2011]. Les gouttes sont générées par 2 jonctions en T placées en

1.5. AMPLIFICATION AVEC DES CAVITÉS POUR DES APPLICATIONS BIOLOGIQUES

série pour obtenir un flux liquide continu dans lequel alterne la rhodamine 6G (Rh6G) et la rhodamine B (RhB). Ce flux est ensuite dirigé dans la cavité et la zone d'excitation optique pour produire un signal laser à la fréquence optique du colorant. Ici la cavité est formée de 2 fibres optiques coaxiales, clivées, recouvertes par un film doré et intégrées dans un substrat polymérique. Deux émissions lasers cohérentes sont alors observées avec une largeur à mi-hauteur réduite à 0,12 nm. Une autre originalité repose sur la commutation rapide (1,28 kHz) des deux colorants qui génère un laser émettant alternativement à 565 nm et 586 nm. Dans une certaine perspective, cette source laser permettrait une analyse spectrale rapide en flux de différents marqueurs fluorescents.



FIGURE 1.16 – (a) Source laser microfluidique avec cavité constituée par 2 fibres optiques parallèles, métallisées et placées dans une couche polymérique. (b) Spectres alternés des colorants Rh6G et RhB respectivement à 565 nm et 586 nm. La largeur à mi-hauteur vaut 0,12 nm et la cadence du dispositif vaut 1,28 kHz. [Aubry et al., 2011]

1.5.5 Optofluidique : plasmonique

Un signal de fluorescence peut aussi être amplifié en tirant profit des sources lasers basées sur les propriétés plasmoniques des métaux où les échantillons occupent les espaces libres entre les structures périodiques d'un cristal. Un cristal réalisé par le laboratoire de photonique et de nanostructures (LPN) [Cattoni et al., 2011] est formé de nano-antennes en or déposées sur 2 couches : un isolant diélectrique suivi par un miroir métallique. Ce composant exploite habilement le confinement et la stimulation de la fluorescence (via la diffusion multiple des nanoparticules structurées et le miroir) exaltée par des résonances supplémentaires issues du plasmon quand les nano-antennes métalliques sont couplées en un réseau (Fig. 1.17). Une émission laser cohérente a alors été observée sous un excitation optique externe relativement faible. Ces cristaux photoniques sont très sensibles aux variations locales du milieu environnant comme une petite fluctuation de la concentration des marqueurs fluorescents. Cette variation décale alors la fréquence optique des marqueurs fluorescents vers les basses ou les hautes fréquences. Ainsi ce décalage est exploité pour mesurer et quantifier des changements de concentrations pendant une réaction chimique ou biologique.



FIGURE 1.17 – Image du lab-on-chip : (a) Vue avec Microscope Electronique à Transmission (TEM) de la puce (b - c) avec ses nano-antennes en or (carré jaune) sur une couche isolante diélectrique (orange) et une couche métallique (bleue). (d) Décalage fréquentiel en fonction de la concentration du fluorophore. [Cattoni et al., 2011]

Actuellement les publications sont nombreuses sur les sources optiques microfluidiques pour démontrer une émission laser cohérente avec plusieurs configurations de cavités. On peut citer une cavité en anneau dans une résine diélectrique ou un réseau de Bragg du 2^e ordre (Fig. 1.18) [Chen et al., 2010]. Toutes ces cavités deviennent plus sophistiquées via une lithographie devenue bon marché. Cette dernière permet maintenant de structurer ensemble la cavité, les canaux fluidiques pour la circulation du colorant, les guides optiques pour orienter la pompe et la fluorescence à des échelles nanométriques.



FIGURE 1.18 – Différentes cavités interférentielles proposées pour la microfluidique : réseau de Bragg du 2^e ordre (a) et cavité anneau (b) [Chen et al., 2010]

Ces systèmes amplificateurs limitent le photoblanchiment des marqueurs fluorescents par un renouvellement perpétuel du volume liquide dans la zone de pompage mais ils restent cependant confinés au domaine de la microfluidique et nécessitent que les objets à étudier soient en solution, ce qui peut être une contrainte quand il s'agit de cellules vivantes. Tous les modèles cellulaires ne sont pas en suspension et de nombreuses cellules nécessitent un support physique pour se développer (matrices 2D et 3D). Ces systèmes optofluidiques sont actuellement cantonnés aux analyses spectrales en flux [Fan and Yun, 2014] et ne sont pas encore transposables aux études de cellules vivantes sur des supports.
1.5.6 Gouttelettes et Cavités internes

Les exemples précédents ont décrit des systèmes amplificateurs avec des cavités externes. Une autre stratégie est d'implanter des cavités directement dans une cellule. Ces cavités interférentielles sont basés sur le principe du résonateur WGM ("Whispering Gallery Mode"). Dans ce cas, la lumière circule sur la surface interne de la cavité, confinée par la réflexion totale.

Humar et ses collaborateurs ont exploité ce principe WGM pour leurs études [Humar et al., 2015, Humar and Yun, 2017]. Ils ont utilisé deux sortes de cavités internes biocompatibles avec les cellules en produisant des résonances dans le spectre de la fluorescence :

• des gouttelettes formées dans la cellule par une injection d'une gouttelette lipidique (Fig. 1.19). Les gouttelettes possèdent plusieurs avantages. Elles sont souples, ductiles et biocompatibles avec les cellules. La réponse spectrale devient alors sensible à une pression locale causée par un stress mécanique sur la membrane cellulaire mais aussi à la densité cytoplasmique de la cellule. Il est alors facile de différencier les cellules par leur densité cytoplasmique et cartographier la réponse dynamique du cytoplasme pour des stimuli externes à partir de 20 pN.



FIGURE 1.19 – Lasers adipocytaires. (a) Illustration d'un adipocyte contenant une gouttelette lipidique. (b) Adipocytes individuels sous-cutanés de porc. (c) Image confocale d'un adipocyte contenant gouttelette lipidique (orange) avec un marquage nucléaire (bleu). (d) Spectre d'un adipocyte de 45 μ m au-dessus du seuil d'émission, montrant les pics spectraux de WGM. Encart : image de fluorescence de la cellule au-dessus du seuil d'émission. (e) Energie de sortie en fonction de l'énergie de la pompe. Ligne pointillée : adaptation linéaire à la sortie de fluorescence en dessous du seuil laser. [Humar et al., 2015]

• Des résonateurs sphériques (Fig. 1.20) : billes de polystyrènes absorbées par les cellules par endocytose. Ces billes présentent un avantage indéniable : leur réponse spectrale n'évolue pas au cours du temps. Elles sont alors utilisées comme des codes-barres pour suivre simultanément et temporellement plusieurs cellules. Différentes tailles sont alors nécessaires pour différencier les cellules mais Humar a testé plusieurs autres possibilités : il a injecté le colorant de différentes façons dans la cellule. Le colorant se trouvait à l'intérieur, à l'extérieur ou à la surface de la cavité. Toutes ces combinaisons offrent un large choix disponible pour marquer plusieurs cellules.



FIGURE 1.20 – 3 types de microcavité intracellulaire solide. (a) Schéma d'une perle à l'intérieur d'une cellule. (b) Image de fluorescence confocale d'une cellule HeLa contenant une perle de polystyrène (vert), un noyau (bleu) et une membrane plasmique (rouge). (c) Emission laser d'une bille de polystyrène fluorescente à l'intérieur d'une cellule. (d) Spectres d'émission et images d'une perle de polystyrène fluorescente située au-dessous du seuil d'émission laser (supérieur) et au-dessus (inférieure) (3,2 nJ). (e) Sortie laser d'une perle de BaTiO₃ non fluorescente de 8,7 μ m incorporée dans une cellule contenant un colorant CMFDA dans son cytoplasme. (f) Emission spontanée à partir d'une perle de BaTiO₃ de 3,5 μ m revêtue de colorant Alexa 488 en dessous du seuil laser. Barres d'échelle, 10 μ m. [Humar et al., 2015]

Néanmoins ces cavités ont un diamètre compris entre 7 et 20 μ m. Leur dimension devient comparable au noyau de la cellule et ces sondes sont applicables comme des codes-barres [Schubert et al., 2015] seulement pour des grosses cellules (adipocytes et macrophages). Elles ne sont pas utilisables pour suivre des molécules dans la cellule.

1.6 Les suspensions colloïdales dans un milieu actif

Les divers résonateurs et amplificateurs ont généralement des géométries bien définies et des architectures complexes dont le moindre défaut peut diminuer drastiquement leurs performances. Malgré une sensibilité inégalée, ils restent confinés à des applications biologiques restreintes. Il existe une autre manière de concevoir un amplificateur ou un laser, en introduisant les diffuseurs directement dans un milieu à gain. Basé sur la diffusion multiple de la lumière, ces lasers aléatoires ont été découverts dans les années 1960 [Letokhov, 1968]. La diffusion multiple fournit une rétroaction optique et génèrent une émission stimulée [Cao et al., 1999, Cerdán et al., 2012]. La théorie de Mie [Hergert and Wriedt, 2012] démontre que l'efficacité de diffusion est liée au contraste des indices de réfraction entre les diffuseurs et le milieu environnant. De nombreux lasers aléatoires ont été produits en utilisant des diffuseurs passifs ou actifs [Luan et al., 2015].

1.6.1 Catégories de nanoparticules

Il existe trois catégories de nanoparticules aux mécanismes physiques différents : les nanoparticules semiconductrices (physique des semiconducteurs et mécanique quantique), les nanoparticules métalliques (résonance nanoplasmonique) et les nanoparticules diélectriques. Les nanoparticules semiconducteurs sont des sources actives et elles peuvent remplacer les fluorophores dans les échantillons cellulaires (Ex. : "quantum dots", Sec. 1.3.3) tandis que les nanoparticules métalliques et diélectriques sont seulement des diffuseurs passifs. Dans le cas des nanoparticules diélectriques (Ex. : TiO_2 , SiO_2), notre projet permet de travailler loin des résonances internes situées, par exemple, dans l'ultraviolet (350 nm - 400 nm) pour le dioxide de titane.

Nanoparticules semiconductrices

De nombreuses poudres semiconductrices ont été considérées pour développer des lasers aléatoires : ZnO [Cao et al., 1999, Chelnokov et al., 2006, Dominguez et al., 2014, Dominguez, 2015, Nakamura et al., 2011, Yang et al., 2006, Firdaus et al., 2012], ZnSe [Takahashi et al., 2009], ZnS [Bingi et al., 2013], GaAs [Noginov et al., 2004], GaN [Kikuchi et al., 2004], SnO2 [Yang et al., 2009] sous différentes structures (poudres, fils, barreaux, triangles, étoiles) et tailles (50 - 200 nm) dispersées sur un substrat de silicium ou bien suspendues dans un solvant de méthanol. Ces milieux colloïdaux peuvent être dopés par des terres rares pour améliorer l'amplification (Ex. Nd³⁺, [Noginov, 2005, de Oliveira et al., 2011]). Actuellement, les "quantum dots" sont aussi des matériaux à gain attrayants [Chen et al., 2011] pour leurs propriétés physiques évoquées (Sec. 1.3.3).

Nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques ouvrent des perspectives via la résonance plasmonique pour les lasers aléatoires [Dice et al., 2005, Ziegler et al., 2015]. Les nanoparticules métalliques possèdent une grande section efficace de diffusion comparée aux nanoparticules diélectriques et une résonance nanoplasmonique de surface (SPR) confinant spatialement la lumière à proximité de la surface permettant ainsi une amplification locale [Stockman, 2011, de la Chapelle, 2013]. En 2005, Dice a proposé un premier laser aléatoire amélioré [Dice et al., 2005] via la SPR, basé sur une suspension de nanoparticules d'argent avec de la rhodamine 6G diluée dans du méthanol tandis que Ziegler a utilisé des nanoparticules d'or comme diffuseurs plasmoniques pour améliorer les performances du laser aléatoire [Ziegler et al., 2015].

Nanoparticules diélectriques

Plusieurs systèmes diffusifs ont été étudiés en présence de gain (colorant) avec des nanoparticules passives. Par exemple, Lawandy ([Lawandy et al., 1994]) propose un système simple en 1994 qui consiste à immerger des particules diffusantes de TiO_2

dans une solution de rhodamine. Ces nanoparticules permettent de prolonger la durée et le chemin optique de la lumière dans le milieu actif. Si leur concentration était suffisamment importante dans le colorant alors le gain pourrait compenser les pertes. Au final, plusieurs équipes [Yi et al., 2012, Shuzhen et al., 2008, Song et al., 2006, Sha et al., 1994, Shin et al., 2006] ont étudiés les lasers aléatoires constitués du milieu à gain (R640P, R6G, Sulforhodamine B, etc.) à des concentrations ~ 1,0 - 2,5 mM, et de TiO₂-NPs (rutile ou mélange anatase/rutile ou TiO₂/SiO₂ de diamètre ~ 50 - 250 nm) à des concentrations ~ 1 - 100 μ g/ml.

1.6.2 Accordabilité et Adaptabilité

Les suspensions présentent de nombreux avantages car elles permettent une certaine souplesse pour de futures applications biologiques. Ainsi il est possible d'obtenir un laser aléatoire avec des caractéristiques différentes qui dépendent (i) de l'indice de réfraction du milieu modifiant l'absorption des nanoparticules actives [Nakamura et al., 2011, El-Dardiry and Lagendijk, 2011], (ii) de la taille, la forme, la concentration des nanoparticules [Gottardo et al., 2008], (iii) du pompage optique [Leonetti and López, 2013, Bachelard et al., 2014]. Avec des nanopoudres de ZnO/Al₂O₃, par exemple, l'absorption du ZnO est modifiée en changeant la fraction massique de Al₂O₃ [Nakamura et al., 2011].

Dans ce cadre, les suspensions colloïdales présentent l'avantage d'être simple à mettre en oeuvre et de pouvoir s'adapter à l'échantillon. De nombreux travaux ont particulièrement étudiés des lasers aléatoires avec des fortes concentrations (\sim 1 mM) de Rhodamine 6G mélangée aux nanoparticules de TiO₂ dans différents solvants purs (méthanol, éthanol, etc.) [Yi et al., 2012] : ces conditions ne sont pas biocompatibles avec des applications biologiques.

En conclusion, les investigations précédentes ont surtout été étudiées à des conditions expérimentales pour atteindre un régime laser pour des applications physiques comme la création de nouvelles sources lasers [Noginov, 2005], les codesbarres [Luan et al., 2015] ou les écrans d'affichage [Hsu et al., 2014]. Ces études ont mis en avant les caractéristiques des lasers aléatoires sous différentes conditions physico-chimiques (tailles, formes, concentrations, nanoparticules, etc.). Applicable dans un domaine physique, ces lasers aléatoires sont peu compatibles avec le vivant.

1.7 Objectifs de la thèse

L'objet de cette thèse est de détecter rapidement un signal intégré de fluorescence émis par des molécules endogènes (protéines, séquences d'acides nucléiques) peu représentées ou de populations cellulaires rares. Ces signaux ne sont pas exploités pour l'imagerie. Ainsi ce travail consiste à amplifier de manière simple les signaux faibles noyés dans le bruit de fond. L'objectif de cette thèse a consisté à mettre au point une méthode simple d'amplification de la fluorescence par émission stimulée, en utilisant la diffusion multiple (introduction de nanoparticules diélectriques et passives) comme piège optique, qui sera applicable sur des échantillons biologiques. Ce projet se focalise donc sur les avantages du processus d'émission stimulée qui entraîne une amélioration du rendement quantique de fluorescence ϕ_F (Sec. 1.2). En effet, l'émission stimulée provoque :

- une augmentation de la quantité de photons fluorescents (émission d'un deuxième photon par fluorophore excité, Sec. 1.2),
- une diminution des processus non-radiatifs au profit du mécanisme radiatif (probabilité de transition $P \rightarrow 1$, Sec. 1.2.1),
- une amélioration du nombre de cycles de fluorescence par unité de temps (Sec. 1.2.1).

La figure 1.21 illustre le rôle des diffuseurs (points noirs) dans l'amplification stimulée de la fluorescence. L'intérêt de ce piège optique (nanoparticules de TiO_2 dans ce travail) réside dans l'amélioration du processus de stimulation par :

- une meilleure exploitation des photons de pompe (flèches bleues) via un recyclage de ceux-ci vers les fluorophores encore non-excités (points gris) diminuant ainsi la fraction perdue de photons quittant l'échantillon;
- une meilleure exploitation des photons fluorescents (flèches vertes) en augmentant leur parcours dans l'échantillon favorisant ainsi leur rencontre avec des fluorophores excités (points verts) pour les stimuler (doubles flèches vertes).



FIGURE 1.21 – Fluorescence spontanée et fluorescence amplifiée (stimulée) par la diffusion multiple

Ce mécanisme de stimulation est encore peu exploité dans le développement de nouvelles méthodologies pour la fluorescence, et les lasers aléatoires restent étudiés dans des conditions physiques peu compatibles avec le vivant. Ce projet consiste à relier les deux concepts de laser biologique et de laser aléatoire pour une utilisation dans un régime amplifié qui précède le régime laser pour de futures applications biologiques. La démarche est donc basée sur l'amplification de la fluorescence par émission stimulée avec des diffuseurs (nanoparticules) passifs *in situ* jouant le rôle

Paramètres	Conditions	Conditions	Raisons
	physiques (nm)	biologiques	
C_N	${ m TiO_2} > 1~{ m mg/ml}$	+ faible possible	Cytotoxicité
C_F	m R6G>1~mM	+ faible possible	Cytotoxicité
Distribution de C_F	Solution homogène	milieu hétérogène	Marqueurs cellulaires
Tampons / Milieu	Solvants purs	Ionique (7,2 <ph<7,4)< td=""><td>Viabilité cellulaire</td></ph<7,4)<>	Viabilité cellulaire

TABLE 1.2 – Conditions d'établissement des lasers aléatoires et conditions biologiques.[Yi et al., 2012, Shuzhen et al., 2008]

de piège optique (diffusion multiple, Sec 2). Actuellement, les études se concentrent sur l'obtention de lasers aléatoires difficilement biocompatible. Ce travail se focalise sur la région d'amplification où le gain reste encore important laissant une marge suffisante et flexible pour respecter et valider des conditions biocompatibles. Le tableau 1.2 résume les conditions physiques, actuellement étudiées dans les lasers aléatoires, comparées aux conditions biologiques à respecter dans ce projet pour assurer une viabilité cellulaire.

Obtenir cette amplification stimulée dans un milieu vivant nécessite de mettre en adéquation des conditions physiologiques (conditions de pH \sim 7,4 et de milieu), physiques (forte diffusion isotrope) et physico-chimiques (dispersion stable et homogène des nanoparticules). La biocompatibilité va dépendre : (i) de la cytotoxicité potentielle de la sonde, en particulier sa concentration C_F de fluorophore, (ii) de la photoxicité induite par la pompe optique, (iii) de la cytotoxicité potentielle des diffuseurs nanoparticulaires et de leur concentration C_N .

Les principaux objectifs de ce travail ont été de rechercher, valider et optimiser : (i) une méthodologie pour stabiliser les nanoparticules de TiO_2 dans des tampons biologiques ou des milieux de culture cellulaire; (ii) les premiers paramètres (concentration de FITC, concentration de TiO_2 , énergie de pompe) pour obtenir une première amplification stimulée de la fluorescence dans un milieu actif (FITC) homogène avant de transposer et combiner ces deux premiers objectifs dans un troisième : (iii) valider cette amplification sur des cellules marquées en conditions physiologiques.

Chapitre 2

Aspects théoriques des lasers aléatoires

2.1 Diffusion de la lumière dans un milieu désordonné

Bien que les équations de Maxwell restent la meilleure méthode pour décrire une onde électromagnétique dans un milieu, la diffusion lumineuse est néanmoins un problème complexe à décrire : un champ diffusé reste souvent difficile à caractériser dans un système aléatoire et complexe. C'est pourquoi la théorie de la diffusion est souvent préférée en optique pour les problèmes de diffusion de la lumière dans un système aléatoire et désordonné. Elle est simple car elle introduit des grandeurs (moyennes) accessibles par un instrument optique. Toutefois elle ne considère pas tous les phénomènes ondulatoires et interférentiels mais elle décrit plutôt bien le comportement du champ dans un milieu complexe. Cette section introduit quelques grandeurs pertinentes pour décrire le transport de la lumière dans les milieux désordonnés et diffusifs. Les notations et les démonstrations sont sont inspirées du cours de Carminati [Carminati, 2016].

2.1.1 La diffusion : un problème complexe

Cette section va décrire le champ diffusé dans un milieu désordonné. Une onde $\overrightarrow{E_0}$ scalaire (rectilignement polarisée), plane et monochromatique éclaire une particule. La diffusion est considérée élastique : seule la direction de propagation est modifiée tandis que la fréquence reste inchangée. En champ lointain, la diffusion est décomposée par des ondes sphériques via le principe de Huygens-Fresnel. L'onde diffusée $\overrightarrow{E_s}$ est décrite par son amplitude complexe à une position \overrightarrow{r} de la particule, dirigée par un vecteur angulaire $\overrightarrow{u}(\theta, \phi)$ selon un système de coordonnées sphériques :

$$\overrightarrow{E_s}(ec{r},ec{u}) = S(ec{u}) rac{\exp\left\{iec{k_0}\cdotec{r}
ight\}}{r} \overrightarrow{E_0},$$
 (2.1)

où $\overrightarrow{k_0}$ représente la direction de propagation de l'onde incidente $\overrightarrow{E_0}$. La grandeur S représente l'amplitude d'une onde diffusée dans la direction \vec{u} . En général, S est une grandeur complexe et inconnue. Toute la difficulté réside à trouver une expression de cette grandeur S. Excepté les modèles simples, il n'existe aucune solution analytique.

La méthode des éléments finis permet une approximation numérique de la grandeur S mais cette technique reste coûteuse en temps de calculs [Yee, 1966]. Elle se limite donc à des systèmes modérés dans des domaines temporels restreints.

2.1.2 Grandeurs pertinentes

En physique expérimentale, il est nécessaire de pouvoir accéder à des grandeurs pertinentes pour caractériser un système. Ces grandeurs sont déduites à partir d'autres grandeurs mesurables par un instrument optique. La puissance est une des grandeurs accessible par un détecteur.

La section efficace de diffusion σ_s représente la probabilité de diffusion d'une onde avec une particule. Elle est homogène à une surface. L'intensité diffusée est donc égale dans toutes les directions spatiales au produit entre la section efficace de diffusion et l'intensité du champ incident. A ce titre, cette relation respecte la conservation de l'énergie. Cependant, un détecteur est limité par un angle de vue. Il mesure une fraction de la puissance diffusée dans un certain angle solide selon une direction spécifique. Nous introduisons la section efficace différentielle de diffusion $d\sigma_s/d\Omega$ (Fig. ??). Elle représente bien l'anisotropie de la diffusion et décrit le diagramme angulaire du champ diffusé. La puissance diffusée P_s s'exprime dans un élément d'angle solide $d\Omega$ selon une direction \vec{u} :

$$dP_s(ec{r},ec{u}) = |\overrightarrow{E_s}(ec{r},ec{u})|^2 r^2 d\Omega \,.$$

Ainsi la section efficace différentielle de diffusion $d\sigma_s/d\Omega$ est définie :

$$rac{d\sigma_s}{d\Omega} = rac{1}{I_0} rac{dP_s}{d\Omega} = |S(ec{u})|^2 \,,$$
 (2.3)

où I_0 représente l'intensité du champ incident. Evidemment la section efficace de diffusion σ_s s'exprime en fonction de la section efficace différentielle de diffusion $d\sigma_s/d\Omega$ dans toutes les directions :

$$\sigma_s = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \sin heta d heta rac{d\sigma_s}{d\Omega} \,.$$
 (2.4)

Ces 2 paramètres sont directement liés à l'amplitude de diffusion S. Elles sont pertinentes car elles décrivent bien le champ diffusé. Si les particules absorbent une partie de la puissance incidente, alors une section efficace d'absorption σ_a sera aussi définie de la même manière que la section efficace de diffusion σ_s . Les deux termes σ_s et σ_a sont sommés pour donner la section efficace d'extinction σ_e . Un résultat important est le théorème optique [Jackson, 1999]. Il relie la section efficace d'extinction σ_e et la partie imaginaire $\Im m$ de l'amplitude $S(\vec{0})$ du champ diffusé vers l'avant :

$$\sigma_e = \frac{4\pi}{\vec{k}} \Im m \left\{ S(\vec{0}) \right\} \,. \tag{2.5}$$

Ce théorème montre que les pertes sont causées par les interférences entre le champ incident et le champ diffusé vers l'avant. Il suffit de mesurer la puissance en transmission pour déterminer la section efficace d'extinction σ_e . Si les particules n'absorbent pas, alors le champ diffusé et transmis renferment toutes les informations sur la diffusion.

2.1.3 La loi de Beer-Lambert

Quand une onde incidente se propage dans un milieu diffusant, son amplitude décroît après chaque diffusion sur une particule. Nous sommes amenés à séparer la partie balistique (diffusion vers l'avant) et la partie diffusée $\overrightarrow{E_s}$ du champ incident. En vertu du théorème optique (Eq. 2.5), le champ balistique interfère avec le champ incident $\overrightarrow{E_0}$ occasionnant une perte de puissance. L'intensité balistique I_{coh} s'exprime selon la formule de l'intensité pour les interférences :

$$I_{coh} = |\overrightarrow{E_0}|^2 + |\overrightarrow{E_s}|^2 + 2\Re e\left\{\overrightarrow{E_0}\overrightarrow{E_s^*}\right\}.$$
(2.6)

L'atténuation est occasionnée par les interférences entre le champ incident $\overrightarrow{E_0}$ et le champ diffusé dans le milieu. Procédons à un bilan énergétique sur une couche d'épaisseur dz et de surface S:

$$I_{coh}(z+dz)S - I_{coh}(z)S = -
ho S dz \sigma_s I_{coh}(z)$$
. (2.7)



FIGURE 2.1 – Illustration de la loi de Beer-Lambert dans un milieu infini dans la direction transverse et de longueur L. Le milieu est purement diffusant, de section efficace σ_s , avec une densité ρ de diffuseurs [Eloy, 2018].

L'intensité I_{coh} diminue à cause du nombre de diffuseurs ρ dans le volume Sdz (Fig. 2.1). L'intensité est intégrée sur toute la longueur L du milieu :

$$I_{coh}(L) = I_{coh}(0)e^{-\rho\sigma_s L}.$$
(2.8)

L'intensité balistique I_{coh} décroît exponentiellement quand elle se propage dans un milieu diffusant. C'est la loi de Beer-Lambert [Jackson, 1999]. On retrouve la même loi pour des particules absorbantes. Sa longueur caractéristique donne le libre parcours moyen l_s de diffusion. La loi délivre aussi l'épaisseur optique :

$$b = \rho \sigma_s L = \frac{L}{l_s} \,. \tag{2.9}$$

L'épaisseur optique permet de décrire la transparence du milieu vis-à-vis du libre parcours moyen de diffusion.

2.1.4 Les régimes de transport

Nous venons de définir le libre parcours moyen comme une grandeur caractéristique d'un milieu diffusif. Cependant, nous ne l'avons pas encore interprétée. Pour cela, réécrivons le bilan d'énergie en faisant intervenir l_s :

$$I_{coh}(z+dz) = I_{coh}(z) - rac{dz}{l_s} I_{coh}(z) \,.$$
 (2.10)

L'intensité I_{coh} correspond au nombre de photons qui se propagent vers l'avant à la position z. A droite de la relation, le deuxième terme correspond au nombre de photons qui ont été diffusés. Son facteur représente donc la probabilité de diffusion du photon après un parcours sur une longueur dz. Nous déduisons donc la densité de probabilité qu'un photon subisse sa première diffusion après un parcours sur une distance z :

$$P(z) = \frac{1}{l_s} \exp\left(-\frac{z}{l_s}\right) . \qquad (2.11)$$

La longueur moyenne traduit la distance que le photon a parcourue avant de subir sa première diffusion :

$$ar{z}=\int_{0}^{+\infty}zP(z)dz=l_{s}$$
 . (2.12)

Le libre parcours moyen s'interprète aussi comme la distance entre 2 diffusions successives d'un photon. En parallèle, les libres parcours moyens d'absorption et d'extinction ont aussi une expression et une signification similaire à celui de la diffusion. Cette longueur est la longueur caractéristique si la diffusion est soumise au régime de Rayleigh, c'est-à-dire si le rayon des particules est petit devant la longueur d'onde : la diffusion est isotrope et on a une répartition énergétique équiprobable dans toutes les directions spatiales. Mais cette longueur n'est plus valable quand la diffusion est soumise au régime de Mie où la diffusion devient anisotrope. On introduit la fonction de phase $p(\vec{u'}, \vec{u})$ [Jackson, 1999] qui représente la fraction énergétique diffusée dans la direction \vec{u} pour un champ incident arrivant dans la direction $\vec{u'}$. En supposant que le milieu contient des particules identiques, cette fonction de phase est la moyenne volumique des sections efficaces différentielles de diffusion $d\sigma_s/d\Omega$ (Eq 2.3) des particules :

$$p(ec{u'},ec{u})=rac{4\pi}{\sigma_s}rac{d\sigma_s}{d\Omega}=rac{4\pi}{\sigma_s}|S(ec{u})|^2\,.$$
 (2.13)

Quand le milieu est homogène et isotrope, la fonction de phase dépendra seulement du cosinus de l'angle θ entre la direction incidente $\vec{u'}$ et la direction de diffusion $\vec{u} : p(\vec{u'}, \vec{u}) = p(\vec{u'} \cdot \vec{u}) = p(\cos \theta)$. La diffusion est donc anisotrope si la fonction de phase n'est pas constante.Il est possible de mesurer le degré d'anisotropie de la diffusion via le paramètre d'anisotropie g qui est la moyenne du cosinus de l'angle θ :

$$g = \overline{\cos heta} = rac{1}{4\pi} \int_{4\pi} ec{u'} \cdot ec{u} p(ec{u'} \cdot ec{u}) d\Omega \,,$$
 (2.14)

où $\overline{\cos \theta}$ représente la moyenne du cosinus de l'angle de diffusion ainsi que son anisotropie global. $\overline{\cos \theta}$ vaut 0 si la diffusion est isotrope, -1 pour une diffusion vers

l'arrière, 1 pour une diffusion cohérente vers l'avant (longueur infinie).

La longueur de transport l_t caractérise mieux le caractère anisotrope de la diffusion dans le transport radiatif en régime de Mie. Elle quantifie la distance moyenne au bout de laquelle le photon perd la mémoire de sa trajectoire initiale avec un angle θ aléatoire :

$$l_t = \frac{l_s}{1 - g} = \frac{l_s}{1 - \cos \theta} \,. \tag{2.15}$$

Le libre parcours moyen permet de définir les différents régimes de transport de la lumière dans un milieu :

- régime de diffusion simple ou balistique si $L \sim l_s$ ou $b \sim 1$,
- Régime de diffusion multiple si $L >> l_s$ ou b << 1.

Dans un régime balistique, l'onde subit peu la diffusion et sa trajectoire n'est pratiquement pas déviée. C'est un régime que nous voulons éviter car la diffusion multiple est négligeable et il ne remplit plus le rôle de piège pour les photons. Au contraire, le champ est fortement diffusé dans un régime de diffusion multiple : le nombre de diffusion s'accroît et la propagation lumineuse suit une équation de diffusion. Celle-ci suffit à fournir une bonne description de la diffusion multiple et des lasers aléatoires.

Il existe d'autres régimes identifiables. Ceux-ci impliquent un désordre extrême (concentration forte de diffuseurs), une localisation de la lumière et une rétroaction cohérente dans le milieu. La théorie classique de la diffusion n'est plus valable car les interférences doivent être prises en compte. On distingue 2 régimes extrêmes :

- le régime de localisation faible si $L > l_t > \lambda$,
- le régime de localisation forte si $l_t \sim \lambda$.

Ces régimes sont plutôt difficiles à atteindre pour des grands systèmes en 3D. Dans notre cas, ils sont à éviter car une forte concentration peut rendre un milieu réfléchissant et une onde traversera difficilement ce milieu fortement diffusant. Dans cette thèse, nous voulons juste considérer le régime de la diffusion multiple.

Le libre parcours moyen l_s est relié par la concentration volumique ρ des diffuseurs et la section efficace σ_s de diffusion :

$$l_s = \frac{1}{\rho\sigma_s} = \frac{4}{3}\pi R_N^3 \frac{d}{C_m \sigma_s}, \qquad (2.16)$$

où R_N représente le rayon du diffuseur, d sa masse (densité) volumique et C_m sa concentration massique. Par exemple, les diffuseurs sont des nanoparticules de TiO₂ de masse volumique d = 4,23 g/cm³ les différents libres parcours moyens l_s de diffusion sont récapitulés dans le tableau 2.1 selon leur rayon R_N ou leur concentration C_m . Les valeurs de σ_s dépendent du rayon R_N et elles sont données par le logiciel MiePlot [Laven, 2011].

R_N (nm)	$\sigma_s ~({ m cm}^2)$	$C_m \ (mg/ml)$	$l_s~(\mu m)$	
10	10^{-15}	0,1	1770	
10	10^{-15}	1	177	
10	10^{-15}	10	17.7	
100	10^{-9}	0,1	1.77	
100	10^{-9}	1	0.177	
100	10 ⁻⁹	10	0.0177	

TABLE 2.1 – Libre parcours moyen de diffusion l_s selon le rayon R_N ou la concentration massique C_m des nanoparticules de TiO₂.

En supposant un échantillon avec une épaisseur L = 1 cm, on constate que le régime de diffusion multiple est facilement atteint pour une concentration $C_m \leq 10$ mg/ml ($0,1 \leq C_m \leq 1$ mg/ml) de nanoparticules de TiO₂ avec un rayon $R_N = 10$ nm ($R_N = 100$ nm). Dans ces conditions, il est possible de montrer que la propagation du champ diffusé suit une équation de la diffusion. Nous décrirons ce régime de diffusion multiple avec un milieu actif et désordonnées : les lasers aléatoires.

2.2 Les lasers aléatoires

2.2.1 La bombe photonique

En 1968, Letokhov étudie la diffusion multiple dans un milieu actif désordonné par la théorie de la diffusion [Letokhov, 1968]. Dans un milieu désordonné, les pertes sont proportionnelles au flux de photons à la surface du milieu tandis que le gain amplificateur est proportionnel au volume du milieu. Letokhov démontre ainsi une taille critique du milieu où le gain compense les pertes. Nous allons établir ce seuil par un raisonnement intuitif simple et l'équation de diffusion.

Raisonnement intuitif

En régime de diffusion multiple, le transport radiatif (densité énergétique) peut être interprété comme une marche aléatoire régie par un libre parcours moyen l_s et une vitesse v_t de transport. Aux grandes échelles devant le libre parcours moyen, la densité énergétique U suit la loi de la diffusion. Dans le milieu, les photons séjournent pendant une durée $t = L^2/D$ sur une distance L du milieu. La grandeur D représente le coefficient de diffusion dans un régime instationnaire :

$$D = \frac{v_t l_s}{3}.$$
 (2.17)

Par exemple, la lumière parcourt 1 cm dans un milieu avec un indice de réfraction égal 1 pendant 10 ns avec un libre parcours moyen $l_s = 100$ mm, tandis qu'elle aurait parcouru 1 cm en 300 ps en propagation libre. La diffusion multiple tend à piéger la lumière en augmentant la durée de séjour des photons dans le milieu.

Le milieu actif absorbe : un libre parcours moyen l_a est introduit pour décrire la distance moyenne parcourue par la lumière avant d'être absorbée. En diffusion multiple, on a toujours la condition suivante : $l_a >> l_s$. Avant absorption, le photon séjourne pendant une durée l_a/v_t dans le milieu.

Dans un milieu amplificateur, le gain doit compenser les pertes par absorption. Il faut que le photon stimule une molécule avant son absorption sur une distance en-dessous du libre parcours moyen d'absorption. Le gain se décrit comme une absorption négative. Sa longueur de gain vaut $l_g = -l_a$ et son temps caractéristique vaut l_g/v_t .

Dans un milieu diffusant, un seuil laser est observé lorsque le gain compense les pertes par diffusion où celles-ci sont proportionnelles au flux de photons à la surface du milieu. Un photon est donc stimulé dans le milieu et il séjourne pendant une durée L^2/D . Le seuil s'obtient quand la durée du séjour est équivalente au temps caractéristique de gain :

$$\frac{L^2}{D} = \frac{l_g}{v_t} \,. \tag{2.18}$$

La longueur critique est :

$$L_C^2 = \frac{l_g l_s}{3} \,. \tag{2.19}$$

Ce modèle simple s'apparente à celui d'un réacteur nucléaire qui s'emballe lorsque la densité neutronique atteint une valeur critique. Il est parfois appelé modèle de la *bombe photonique*. Il donne une bonne idée générale du concept d'un laser aléatoire, même si la réalité est plus subtile, car le gain n'est pas uniforme dans le milieu et le pompage a souvent lieu en régime impulsionnel.

Equation de diffusion

En présence de gain dans un système désordonné, la lumière peut être amplifiée au fur et à mesure de sa diffusion : il existe un seuil qui déclenche la *bombe photonique*. Ce concept a été introduit par Letokhov [Letokhov, 1968] en 1968. En présence de gain, le transport de la densité énergétique U s'exprime par l'équation de diffusion suivante :

$$rac{\partial U(ec{r},t)}{\partial t} = D
abla^2 U(ec{r},t) + rac{v_t}{l_g} U(ec{r},t) \,, \qquad (2.20)$$

où $\partial/\partial t$ est la dérivée temporelle et ∇^2 est l'opérateur laplacien Une solution générale de cette équation 2.20 est proposée par [Letokhov, 1968] :

$$U(\vec{r},t) = \sum_{n} a_{n} \psi_{n}(\vec{r}) e^{-(DB_{n}^{2} - \frac{v_{t}}{l_{g}})t}$$
(2.21)

où les coefficients a_n dépendent des conditions initiales et des conditions limites du milieu. Les valeurs propres B_n et les fonctions propres $\psi_n(\vec{r})$ proviennent de l'équation de Helmholtz :

$$abla^2 \psi_n(\vec{r}) + B_n^2 \psi_n(\vec{r}) = 0.$$
 (2.22)

La durée de vie τ_n du mode n est donnée par la relation suivante :

$$\tau_n = \frac{1}{DB_n^2 - v_t/l_g} \,. \tag{2.23}$$

Trouver une expression du seuil de la *bombe photonique* revient à connaître la condition où l'argument de l'exponentielle dans la solution 2.21 change de signe passant d'une exponentielle décroissante à une exponentielle croissante :

$$DB_n^2 - \frac{v_t}{l_g} = 0. (2.24)$$

Dans le système, la densité énergétique peut ainsi croître jusqu'à la saturation du gain. Une condition de seuil est obtenue en considérant le mode associé à la plus petite valeur B_n correspondant à n = 1. On peut montrer, que pour un milieu sphérique de rayon R, $B_1 = \pi/R^2$. En connaissant l'expression du coefficient de diffusion D (Eq. 2.18), la taille critique R_C du milieu vaut la relation suivante :

$$R_C = \pi \sqrt{\frac{l_g l_s}{3}} \,. \tag{2.25}$$

Au-delà de cette taille critique R_C du milieu, la densité énergétique U augmente rapidement : c'est la *bombe photonique*.

2.2.2 Régime incohérent et cohérent

Un laser aléatoire peut posséder un régime incohérent ou cohérent. Dans un milieu désordonné et diffusif, les ondes peuvent interférer entre elles pour créer une onde dont son intensité I diminue ou augmente selon les amplitudes E_i des champs incidents :

$$I = |E_1|^2 + |E_2|^2 + 2Re[E_1E_2^*] = I_1 + I_2 + 2\Re e\{E_1E_2^*\}.$$
(2.26)

La partie réelle \Re contient le déphasage entre les amplitudes des champs. Ce déphasage varie de manière imprévisible quand les champs interfèrent indépendamment les uns des autres avec des trajectoires aléatoires et désordonnées. La moyenne des déphasages est donc nulle. Le régime est incohérent et l'intensité dépend juste de la somme des intensités identiques (NI_0) des N champs.

A contrario, le régime devient cohérent si les champs sont corrélés entre eux avec des trajectoires coordonnées : les champs interfèrent avec le même déphasage. L'intensité ne dépend plus de la somme des intensités mais elle dépend aussi du déphasage entre les champs. Ce déphasage diminue ou augmente l'intensité. Il faut que les ondes interfèrent en phase ($\Delta \phi \mod[2\pi]$) pour maximiser l'intensité.

Finalement, une rétroaction positive (boucle ou cavité fermée) permet de favoriser les interférences constructives (N^2I_0) entre les N champs. Un effet connu est le cône de rétrodiffusion cohérente dans un régime de localisation faible [Labeyrie et al., 1999]. C'est une interférence entre deux ondes parcourant une boucle ouverte de diffusion dans le sens inverse l'une de l'autre. Dans le plan P de la Fig 2.2, le parcours présente une différence de marche non nulle quand l'angle θ n'est pas nul formant une figure sinusoïdale d'interférences. En réalité, il existe plutôt une multitude de chemins de rétrodiffusion conduisant en moyenne à un brouillage des interférences. Néanmoins, les interférences entre ces divers chemins demeurent toujours constructives autour de $\theta \approx 0$. On y observe ainsi un pic de sur-intensité appelé cône de rétrodiffusion cohérente. Sa largeur à mi-hauteur $\Delta \theta$ est reliée par la longueur de transport l_t et le module k de la direction de propagation :

$$\Delta \theta = \frac{1}{kl_t} \,. \tag{2.27}$$



FIGURE 2.2 – Un chemin de diffusion est parcouru dans les deux sens de propagation par deux ondes partielles entrant respectivement avec un vecteur d'onde $\vec{k_{in}}$ et $\vec{k_{in}}$ et sortant avec un vecteur d'onde $\vec{k_{out}}$ et $\vec{k_{out}}$. Le plan P est le plan d'observation en champ lointain [Labeyrie et al., 1999]

Les régimes cohérent et incohérent permettent respectivement un gain N^2 et N en intensité. C'est pourquoi la rétroaction cohérente porte sur le champ tandis que la rétroaction incohérente concerne seulement l'intensité ou l'énergie [Cao 2003, Cao 2005].

En conséquence, le régime incohérent dépendra de la durée globale du photon dans le milieu tandis que le régime cohérent dépendra de la durée τ de la résonance (facteur de qualité $Q = 2\pi\nu\tau$ avec ν la fréquence de la résonance) dans la cavité. Dans le premier cas, il faut juste que le photon reste longtemps dans le milieu pour favoriser l'émission stimulée malgré des trajectoires (cavités) aléatoires et désordonnées (faibles facteurs Q). Dans le deuxième cas, le photon doit rester longtemps dans une cavité (bon facteur Q) pour favoriser l'émission stimulée et les interférences constructives en supposant le système figé.

Ainsi la rétroaction cohérente correspond aux oscillations résonantes des modes ou des fréquences dans un système : les photons stimulés parcourent une boucle fermée. Ce mécanisme est la base fondamentale des lasers avec une cavité traditionnelle. Elle se réalise si les conditions suivantes sont respectées :

- le chemin optique est un multiple de 2π (interférences constructives),
- le gain est supérieur aux pertes de la cavité et du milieu (bon facteur de qualité Q de la cavité).

La rétroaction cohérente se retrouve majoritairement dans les milieux fortement désordonnés (localisation faible ou forte) où les modes peuvent être localisés. Ces modes agissent comme des petites cavités fermées (bons facteurs Q) dont les tailles sont variables. Des cavités différentes suggèrent donc plusieurs fréquences résonantes : le rayonnement est multimode et isotrope. Chaque mode est monochromatique. Dans les systèmes avec des particules semiconductrices, les spectres émis présentent différents pics étroits qui semblent valider cette hypothèse [Cao et al., 1999].

Le laser aléatoire incohérent correspond à une amplification de l'émission spontanée : les photons spontanés parcours suffisamment le milieu actif pour stimuler les photons. Ce mécanisme est la base fondamentale des amplificateurs. Elle permet aussi le démarrage du laser : son seuil est adouci. Elle se réalise si une condition est respectée : le gain est supérieur aux pertes du milieu (absorption et diffusion). Les interférences sont peu nombreuses mais elles sont désordonnées. Ainsi un laser aléatoire possède une multitude de résonances dont chaque facteur Q a une qualité assez faible. Les spectres sont étendus et ils se chevauchent pour former un spectre continu. L'absence de rétroaction cohérente implique que le spectre émis reste continu : aucune fréquence n'est sélectionnée de manière résonante. La rétroaction incohérente est majoritaire dans les régimes diffusifs (diffusion multiple) [Cao et al., 1999, Wiersma, 2008].

Hui Cao et ses collaborateurs ont observé la transition entre un laser aléatoire incohérent à cohérent. Ils ont augmenté la concentration des diffuseurs dans le système. Cela augmente ainsi la probabilité que la lumière forme des boucles fermées au cours de sa propagation [Cao et al., 1999].

Entre ces 2 régimes, la différence majeure vient des interférences. En régime incohérent, ces dernières sont négligées quand un photon diffusé suit une marche aléatoire dans un milieu désordonné. La description est basée sur un modèle diffusif de l'intensité lumineuse conduisant au critère de Letokhov. En régime cohérent, les interférences nécessitent l'étude du champ électrique au lieu de l'intensité. On utilise donc les équations de Maxwell. Une étude avancée a permis une discussion sur la prise en compte des interférences dans le développement des modes émis d'un laser aléatoire [Andreasen et al., 2011].

En conclusion, un laser aléatoire est défini entre ces 2 régimes. On peut connaître le rôle des interférences ou le degré de cohérence temporelle pour un laser aléatoire quelconque dans un régime diffusif : il suffit de corréler l'intensité à 2 instants différents.

Chapitre 3

Comportement des nanoparticules de TiO_2 dans les milieux ioniques

La diffusion de la lumière dépendant entre autres de la taille des diffuseurs (Chap. 2), il est nécessaire d'obtenir une suspension stable de TiO₂-NPs avec un diamètre inférieur à la longueur d'onde du rayonnement lumineux dans un milieu aqueux ($\lambda \approx 500$ nm à $n_{H_2O} = 1,33$: toutes les longueurs d'onde sont spécifiées dans le vide dans cette thèse mais leur valeur dans un milieu doit être divisée par l'indice de réfraction du milieu). En effet, la formation d'agrégats peut présenter plusieurs inconvénients susceptibles d'empêcher une amplification efficace de la fluorescence. Les agrégats, de taille supérieure à $\lambda/n_{H_2O} \approx 376$ nm, entraînent (i) une réduction globale de l'amplitude de diffusion [Nastishin and Dudok, 2013], (ii) une diminution de la densité volumique des diffuseurs réduisant leur nombre dans le milieu pour un rayonnement lumineux, (iii) une augmentation de la masse des diffuseurs précipitant rapidement la suspension de TiO_2 -NPs vers le fond de l'échantillon [Allouni et al., 2009]. Le dernier point est particulièrement important pour les TiO₂-NPs à cause de sa grande densité massique $(4,23 \times 10^3 \text{ kg/m}^3)$. Il faut donc veiller à obtenir une solution stable sans agrégats pour obtenir une amplification efficace de la fluorescence dans les meilleures conditions.

Ce chapitre a pour but de décrire d'un point de vue théorique le comportement des nanoparticules de TiO_2 en milieu aqueux, en présence d'ions nécessaires aux équilibres biologiques. Il décrit les principales causes de la formation des agrégats, depuis les propriétés intrinsèques des nanoparticules jusqu'aux interactions possibles qu'elles peuvent avoir dans un solvant aqueux ionique. La première section 3.1 évoquera les différentes forces appliquées aux nanoparticules et présentes dans un fluide ionique. Il existe deux classes de forces :

- externes, responsables du mouvement des nanoparticules (Sec. 3.1.1 : sédimentation, mouvement Brownien, pression radiative),
- et les forces interparticulaires (Sec. 3.1.2 : attractives et répulsives).

Les premières forces permettent de déterminer quelles sont celles prédominantes dans le mouvement des nanoparticules tandis que les secondes forces permettent de décrire la stabilité des nanoparticules dans un fluide ionique selon la théorie DLVO (Sec. 3.1.2). La deuxième section 3.2 présente les moyens mis en oeuvre pour protéger les nanoparticules dans un milieu ionique.

Tout au long de la discussion, les nanoparticules seront considérées sphériques sans porosité, au repos, de rayon R_N variable. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas réaliste pour les agrégats, dont la forme est inconnue et variable, mais elle permet d'obtenir des expressions analytiques pour évaluer des ordres de grandeurs et des informations utiles des phénomènes attendus, même si le résultat peut être imprécis quantitativement.

3.1 Bilan des forces dans les milieux ioniques

3.1.1 Forces externes

La sédimentation

Au repos, tout corps plongé dans un fluide subit une force verticale dirigée vers le haut et opposée au poids du volume du fluide déplacé. Pour estimer la vitesse de sédimentation des nanoparticules, il faut trouver la gravité réduite par la poussée du liquide sur les nanoparticules. Les nanoparticules sont de rayon R_N , de masse m_N , de masse volumique ρ_N dans une solution de masse m_S , de viscosité dynamique η_S , de masse volumique ρ_S . Selon le principe fondamental de la dynamique Newtonienne, la gravité "résiduelle" F_r est alors composée de la gravité terrestre F_g appliquée à la nanoparticule entraînée par une accélération du champ de pesanteur g, réduite par la poussée du liquide F_l sur la nanoparticule :

$$F_r = F_g - F_l = (m_N - m_S)g$$
, (3.1)

$$F_r = \frac{4}{3}\pi(\rho_N - \rho_S)gR_N^3 \,. \tag{3.2}$$

Dans un régime permanent, la gravité "résiduelle" F_r est opposée à la force visqueuse F_{η} du liquide, caractérisée par la vitesse v de la nanoparticule et son coefficient de friction γ :

$$F_{\eta} = -\gamma v = -F_r \,. \tag{3.3}$$

Ce coefficient de friction γ est lui-même relié par le rayon R_N de la nanoparticule sphérique et la viscosité dynamique η_S de la solution selon la loi de Stokes :

$$\gamma = 6\pi \eta_S R_N \,. \tag{3.4}$$

En combinant les Eqs. (3.2 - 3.4), la vitesse de sédimentation v_g des nanoparticules est obtenue dans une solution liquide :

$$v_g = rac{2}{9} rac{g}{\eta_S} (
ho_N -
ho_S) R_N^2 \,.$$
 (3.5)

La vitesse de sédimentation v_g dépend de R_N^2 mais aussi de ρ_N . Lorsque R_N varie d'un facteur 10, la vitesse v_g est alors multipliée par un facteur 100. En conclusion, un agrégat (assimilable à une nanoparticule de $R_N \ge 1 \ \mu m$) de TiO₂ ($\rho_N = 4,23 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$) sédimentera rapidement ($v_g \ge 7 \ \mu m/s$) au fond de la solution.

La diffusion thermique

Dans une suspension, toutes les nanoparticules sont animées par un mouvement aléatoire Brownien : un processus stochastique dont le déplacement moyen est nul. La nanoparticule n'est soumise à aucune autre interaction que les chocs causés par les molécules du milieu environnant. Ce mouvement permet de décrire avec succès le comportement de la diffusion des nanoparticules dans un fluide. En 1905, Einstein a montré que ces mouvements résultent des impulsions transmises à la nanoparticule par les molécules du milieu soumises à une agitation thermique. Il a montré que le déplacement quadratique moyen Δx^2 était formulé dans une direction x donnée pour une nanoparticule sphérique de rayon R_N par une relation quantitative [Einstein, 1906, Furth and Cowper, 1956] :

$$\Delta x^2 = rac{RT}{3\pi N_A \eta_S R_N} au \ , \qquad (3.6)$$

où R représente la constante des gaz parfaits, T et η_S respectivement la température et la viscosité dynamique du milieu, N_A la constante d'Avogadro, et τ la durée du déplacement Δx^2 . Le mouvement Brownien est aussi appelé agitation thermique car l'énergie cinétique communiquée à une nanoparticule par ce processus est directement liée à la température T du milieu.

Le point de départ est le théorème d'équipartition [Einstein, 1906, Furth and Cowper, 1956] de l'énergie cinétique entre les divers degrés de liberté d'un système en équilibre thermodynamique. Ce théorème exige que la nanoparticule dans une suspension possède une énergie cinétique moyenne $\frac{RT}{2N_A}$ égale à celle d'une molécule gazeuse quelconque à la même température. Si $v = \frac{dx}{dt}$ est la vitesse à un instant t de la nanoparticule dans la direction x, une estimation de la vitesse quadratique moyenne $\langle v^2 \rangle$ est alors obtenue dans un espace à d dimensions, si la moyenne est étendue à un grand nombre de nanoparticules identiques de masse m_N avec le théorème d'équipartition :

$$m_N < v^2 > = rac{dRT}{N_A} = dk_b T \,,$$
 (3.7)

où k_b est la constante de Boltzmann. Le principe fondamental de la dynamique Newtonienne conduit à l'équation stochastique de Langevin [Langevin, 1908], équation fondamentale de la dynamique des fluides :

$$m_N rac{d^2 x}{dt^2} = -\gamma rac{dx}{dt} + F(t), \qquad (3.8)$$

où, en plus de la relaxation visqueuse $(F_{\eta} = -\gamma \frac{dx}{dt})$, une force complémentaire F est introduite et maintient en permanence l'agitation de la nanoparticule (chocs avec les molécules du milieu). Cette force F est représentée comme un bruit blanc Gaussien. Le produit scalaire de cette Eq. 3.8 avec la position x(t) puis sa moyenne sur toutes les réalisations possibles du bruit blanc Gaussien, conduit à l'expression suivante :

$$m_N x \cdot rac{d^2 x}{dt^2} = -\gamma x \cdot rac{dx}{dt} + x \cdot F(t) \,.$$
 (3.9)

D'une part, la dérivée temporelle seconde d^2/dt^2 est formulée selon la relation suivante :

$$rac{d^2x^2}{dt^2} = rac{d}{dt}\left(rac{dx^2}{dt}
ight) = rac{d}{dt}\left(2xrac{dx}{dt}
ight)\,.$$
(3.10)

Cette formule aboutit à l'expression suivante :

$$rac{d^2x^2}{dt^2} = 2\left(rac{dx}{dt}
ight)^2 + 2xrac{d^2x}{dt^2} = 2v + 2xrac{d^2x}{dt^2}\,.$$
(3.11)

En substituant les expressions 3.10 et 3.11 dans l'équation 3.9, une nouvelle expression est obtenue :

$$m_N rac{d^2 x^2}{dt^2} = -\gamma rac{dx^2}{dt} + 2m_N v^2 + 2x \cdot F \,.$$
 (3.12)

Ensuite, une moyenne de l'équation 3.12 est effectuée sur toutes les réalisations possibles du bruit blanc Gaussien :

$$m_N < rac{d^2 x^2}{dt^2} > = -\gamma < rac{dx^2}{dt} > + 2m_N < v^2 > + 2 < x \cdot F > \;.$$
 (3.13)

La valeur moyenne du terme $\langle x \cdot F \rangle$ est supposée nulle. En outre, la moyenne $\langle \cdots \rangle$ sur le bruit commute avec la dérivé temporelle première d/dt et seconde d^2/dt^2 . Cela conduit à l'expression suivante :

$$m_N rac{d^2}{dt^2} < x^2 > = -\gamma rac{d}{dt} < x^2 > + 2m_N < v^2 > \;.$$
 (3.14)

Avec le théorème d'équipartition (Eq. 3.7) dans Eq. 3.14, on obtient une équation différentielle linéaire du premier ordre à coefficients constants avec un second membre par substitution du terme $u(t) = \frac{1}{2} \frac{d}{dt} < x^2 > :$

$$m_N rac{du}{dt} = -\gamma u + dk_b T \,.$$
 (3.15)

Cette equation 3.15 admet la solution exacte :

$$u(t)=rac{dk_bT}{\gamma}+Ae^{-t/ au}$$
, (3.16)

où A et $\tau = \frac{m_N}{\gamma}$ représentent respectivement une constante et une caractéristique de relaxation de la solution u. Dans les conditions expérimentales usuelles, on observe à un régime $t >> \tau$:

$$u(t)\sim rac{dk_bT}{\gamma}=rac{dk_bT}{6\pi\eta_S R_N}\,.$$

Cela donne la loi de la diffusion classique par intégration de Eq. 3.17 par rapport à t:

$$< x^2 > \sim rac{2 d k_b T}{6 \pi \eta_S R_N} t = 2 d D t \,,$$
 (3.18)

où D est le coefficient de diffusion de la nanoparticule (unité : m²/s). Selon Eq 3.18, il est relié au rayon R_N de la nanoparticule par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi \eta_s R_N} \,. \tag{3.19}$$

La pression radiative

Les impulsions lasers (Sec. 4.1.3) induisent un déplacement des nanoparticules dans la direction de propagation \vec{k} du faisceau, causé par une pression radiative. Il s'agit d'un transfert de la quantité de mouvement des photons à la nanoparticule. Un photon incident avec une quantité de mouvement $\vec{p} = \hbar \vec{k}$ est réfléchi et renvoyé par la nanoparticule avec une nouvelle quantité de mouvement $\vec{p'} = -\hbar \vec{k}$ tandis que la nanoparticule acquiert une quantité de mouvement $\vec{p_N}$. La conservation des quantités de mouvement impose la relation suivante :

$$\vec{p_N} = \vec{p} - \vec{p'} = 2\hbar \vec{k}$$
 (3.20)

On suppose un système fermé avec aucune perte énergétique. Initiallement au repos, la nanoparticule sphérique de rayon R_N , de masse m_N acquiert une vitesse $\vec{v_N}$ après son interaction avec un photon incident :

$$ec{v_N} = rac{ec{p_N}}{m_N} = 2\hbar rac{ec{k}}{m_N} \,.$$
 (3.21)

Comme la force radiative $\overrightarrow{F_R}$ est une variation temporelle de la quantité de mouvement, on peut estimer cette force agissant sur une nanoparticule sous la forme d'un flux de photons $\phi_{h\nu}$ (nombre de photons par unité de temps $\phi_{h\nu} = dN_{h\nu}/dt$) où chaque photon va transférer sa quantité de mouvement $\overrightarrow{p_N}$ à la nanoparticule :

$$\overrightarrow{F_R} = rac{dec{p}}{dt} = ec{p_N} \phi_{h
u} \,.$$
 (3.22)

Le flux de photons $\phi_{h\nu}$ peut être exprimé par la puissance radiative P de l'impulsion et sa fréquence angulaire $\omega = |\vec{k}|c/n_N$ avec la célérité c de la lumière dans le vide et l'indice de réfraction n_N de la nanoparticule :

$$\phi_{h\nu} = \frac{P}{\hbar\omega} \,. \tag{3.23}$$

La force radiative $\vec{F_R}$ est obtenue :

$$\overrightarrow{F_R} = 2n_N \frac{P}{c} \frac{\overrightarrow{k}}{|\overrightarrow{k}|} \,.$$
 (3.24)

Dans la réalité, il faut aussi considérer une réflexion partielle du faisceau sur la nanoparticule et les coefficients de Fresnel issus des conditions de continuité du champ électromagnétique à la surface de la nanoparticule. Afin de simplifier les expressions analytiques, cette réflexion est supposée totale. Il faut aussi considérer la fraction du faisceau ayant un impact sur la nanoparticule et ainsi insérer un rapport entre la surface du faisceau laser S_b et la surface effective de la nanoparticule S_e vue

TABLE 3.1 – Comparaison des ordres de grandeur (distance) entre la diffusion thermique, la sédimentation et la pression radiative.

$R_N (\mu m)$	Diffusion thermique (mm)	Sédimentation (mm)	Pression radiative (mm)
0,01	$3,3 imes 10^{-1}$	$6,8 imes10^{-5}$	$5 imes 10^{-7}$
0,1	$3,7 imes 10^{-2}$	$8.7 imes10^{-4}$	$5 imes 10^{-8}$
1	$7,4 imes 10^{-3}$	$3,5 imes10^{-2}$	$5 imes 10^{-9}$
10	$2,2 imes 10^{-3}$	$3,1 imes 10^{0}$	$5 imes 10^{-10}$

par le faisceau laser. Dans cette situation, la force radiative $\overrightarrow{F}_R^{\rightarrow}$ s'exprime à travers un coefficient de réflexion r et le rapport S_e/S_b :

$$\vec{F_R} = 2n_N r \frac{P}{c} \frac{S_e}{S_b} \vec{k} \,. \tag{3.25}$$

A l'équilibre, la pression radiative $\overrightarrow{F_R}$ est égale avec la force visqueuse $\overrightarrow{F_v}$:

$$|\overrightarrow{F_R}| = |\overrightarrow{F_v}|,$$
 (3.26)

$$2n_N r \frac{P}{c} \frac{S_e}{S_b} = \gamma v_R = 6\pi \eta_S R_N v_R \,. \tag{3.27}$$

Les impulsions lasers sont supposées avoir une énergie $E_P = P\tau_P$ (cela dépend, en réalité, du profil temporel des impulsions) avec τ_P sa largeur temporelle à mihauteur, la vitesse radiative v_R vaut :

$$v_R = 2n_N r \frac{E_P}{6\pi\eta_S c\tau_P R_N} \frac{S_e}{S_b} \,. \tag{3.28}$$

En conséquence, la vitesse radiative v_R est inversement proportionnelle au rayon R_N de la nanoparticule et proportionnelle à l'énergie E_P des impulsions lasers.

Bilan des forces externes

Le tableau 3.1 donne les distances parcourues des nanoparticules de TiO₂ rutile $(n_N = 2,9)$ dues à la sédimentation, la diffusion thermique ou la pression radiative via les Eqs 3.5, 3.18 et 3.28 selon différents rayons R_N dans un milieu aqueux H₂O pour une durée de 1 seconde. La masse volumique de TiO₂ vaut 4,23 × 10³ kg/m³, celle de H₂O vaut 1 × 10³ kg/m³, sa viscosité 0,001 kg/m/s et l'accélération du champ de pesanteur 9,81 m/s². Les calculs sont effectés avec la fraction $S_e/S_b = 1$, une énergie des impulsions lasers $E_P = 1$ mJ d'une durée $\tau_P = 5$ ns, et une réflexion totale r = 1.

Les résultats montrent que (i) le mouvement des nanoparticules est dirigé par la diffusion thermique pour un diamètre inférieur à 100 nm, (ii) la diffusion thermique est responsable du transport des nanoparticules sur des distances de 1 à 40 µm. Au-delà de 100 nm, la nanoparticule (assimilable à un agrégat) sédimente à cause de sa forte densité massique. Enfin, la pression radiative n'a aucun impact sur le déplacement des nanoparticules à cause de sa forte densité massique.

3.1.2 Forces interparticulaires

La nature physique des nanoparticules

Les propriétés des particules diffèrent en fonction de leur taille. A une échelle macroscopique, une particule contient un nombre important d'atomes dans son volume par rapport à sa surface : elle est alors considérée comme un milieu continu et ses propriétés découlent principalement des caractéristiques macroscopiques du matériau composant la particule. A une échelle nanométrique, les atomes se trouvent essentiellement à la surface de la nanoparticule : son activité physico-chimique se retrouve principalement à sa surface. La figure 3.1 montre l'évolution de deux facteurs – le rapport surface/volume (S/V) de la particule et la proportion d'atomes à sa surface – en fonction de son diamètre. Les deux facteurs augmentent significativement quand le diamètre diminue. De 50 nm à 5 nm, cette diminution entraîne environ une augmentation de 5% à 55% des atomes à la surface de la particule (Fig. 3.1) tandis que le rapport S/V est inversement proportionnel à son diamètre. Cette abondance des électrons entraîne un accroissement du potentiel chimique à la surface des nanoparticules. Elle favorise ainsi les réactions chimiques et catalytiques tandis que sa surface devient le site des interactions physiques entre les nanoparticules.



FIGURE 3.1 – Rapport entre surface/volume (bleu) et fraction des atomes à la surface de la particule (rouge) en fonction du diamètre d'une particule sphérique avec une structure dense composée d'atomes sphériques de diamètre 0,5 nm [Witschger and Fabriès, 2005].

Forces attractives de van der Waals

Les forces attractives de van der Waals sont issues des interactions dipolaires instantanées de faible intensité entre les atomes situés à la surface des nanoparticules. Ces forces regroupent toutes les interactions dipolaires attractives comme les forces de London ou les interactions de Keesom. La démarche de Hamaker est [Hamaker, 1937] fréquemment utilisée pour les calculer entre deux nanoparticules sphériques à courte distance. Elle se base sur deux hypothèses simplificatrices : les forces ne sont pas retardées (leur vitesse de propagation est infinie) et additives. Elle consiste à sommer tous les potentiels des interactions dipolaires instantanées relatives aux paires constituées par un atome dans chaque nanoparticule. Le potentiel attractif total V_A est calculé pour deux nanoparticules sphériques de rayon R_N immergées dans un fluide ionique et séparées par une distance centre à centre r selon la relation suivante [Stumm and Morgan, 2012] :

$$V_A = -rac{A}{6}\left(rac{2R_N^2}{r^2-4R_N^2}+rac{2R_N^2}{r^2}+\lnrac{r^2-4R_N^2}{r^2}
ight)\,,$$
 (3.29)

où A représente la constante de Hamaker relative à la nature de la nanoparticule plongée dans un fluide ionique. Elle dépend des caractéristiques des atomes (polarisabilité, énergie d'ionisation, concentration) ou bien des permittivités diélectriques relatives à la nanoparticule et au fluide. En général, la valeur de A est comprise entre 10^{-19} et 10^{-21} J. Les forces attractives de van der Waals sont significatives pour la formation des agrégats si la distance interparticulaire $d = r - 2R_N$ est inférieure au rayon R_N de la nanoparticule. Une bonne approximation est obtenue pour $d << R_N$:

$$V_A = -\frac{AR_N}{12d} \,. \tag{3.30}$$

Ce potentiel négatif V_A engendre un puit de potentiel dont la profondeur dépend de la constante de Hamaker A et du rayon R_N des nanoparticules.

Forces répulsives de la double couche électrostatique

Dans un fluide ionique, les nanoparticules possèdent une charge électrostatique à leur surface de potentiel ϕ_0 . La nanoparticule sera alors entourée par une première couche ionique (couche de Stern) immobile de potentiel électrostatique ϕ_d [Stern, 1924]. Au-delà, une deuxième couche mobile et diffuse (couche de Gouy-Chapman) est caractérisée par un potentiel électrostatique ϕ en fonction de la distance x entre un point de la solution et la surface (supposée plane) de la nanoparticule [Gouy, 1910, Chapman, 1913] :

$$\phi(x) = \phi_0 e^{-\kappa x} \,. \tag{3.31}$$

Comme le potentiel électrostatique décroît au fur et à mesure de la formation des différentes couches depuis la surface de la nanoparticule, cela conduit à l'inégalité de potentiel :

$$|\phi_0| > |\phi_d| > |\phi(x)|$$
 . (3.32)

La longueur caractéristique de Debye $1/\kappa$ détermine l'épaisseur de la double couche électrostatique et sera le paramètre clef de la stabilité des nanoparticules par répulsion électrostatique dans un fluide ionique (Sec. 3.1.3) :

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_b T}{2N_A e^2 F_i}},$$
(3.33)

où k_b représente la constante de Boltzmann, T la température du milieu, ϵ_0 et ϵ_r la permittivité diélectrique du vide et celle relative du milieu, N_A la constante d'Avogadro et e la charge de l'électron. La longueur de Debye $1/\kappa$ est introduite par le terme $k_bT \sim m_N < v^2 > (\text{Eq. 3.7})$ faisant intervenir la vitesse (énergie cinétique)

du mouvement Brownien de la nanoparticule. Elle dépend entre autres de la "force" ionique F_i (unité : mol/L) du milieu qui représente le nombre total de charges des ions composant le solvant, déterminée par la somme des produits entre la concentration c_i des ions du milieu et leur nombre de charges q_i (négatives et positives) au carré :

$$F_i = rac{1}{2} \sum_i c_i q_i^2 \,.$$
 (3.34)

Le potentiel répulsif total V_R est obtenu par la somme de toutes les charges électriques ρ_q distribuées entre deux nanoparticules sphériques de rayon R_N séparées par une distance centre à centre r [Israelachvili, 1991] :

$$V_{R} = \int_{-\infty}^{r} \int_{0}^{\phi(r/2)}
ho_{q} d\phi' dr'$$
 (3.35)

Quand le potentiel surfacique ϕ_0 est constant, le potentiel répulsif V_R est égal à la relation suivante :

$$V_{R} = 2\pi\epsilon_{r}\epsilon_{0}R_{N}\left(\frac{4k_{b}T\beta}{ze}\right)^{2}e^{-\kappa(r-2R_{N})}, \qquad (3.36)$$

$$eta = anh rac{z e \phi_0}{4 k_b T}$$
 , (3.37)

où z représente le nombre de charges des ions de la solution. Quand le potentiel ϕ_0 est suffisamment faible, le potentiel répulsif V_R retrouve une expression simplifiée :

$$V_R = 2\pi\epsilon_r\epsilon_0 R_N \phi_0^2 e^{-\kappa(r-2R_N)} \,. \tag{3.38}$$

Cette expression 3.38 résulte aussi de cette hypothèse où les surfaces des nanoparticules sont considérées planes. Le potentiel répulsif V_R engendre une barrière de potentiel dont la hauteur dépend de la force ionique F_i , de la permittivité diélectrique ϵ_r du milieu, de la charge surfacique ϕ_0 et du rayon R_N de la nanoparticule.

La théorie DLVO statique et barrière de potentiel

Dans un milieu ionique, la stabilité des nanoparticules est déterminée par la théorie statique de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) [Derjaguin, 1941, Verwey et al., 1948] qui décrit l'évolution du potentiel électrique en fonction de la distance interparticulaire $d = r - 2R_N$ entre deux nanoparticules sphériques au repos. Cette énergie potentielle provient de la somme des différentes énergies issues des diverses forces interparticulaires appliquées aux nanoparticules. Toutes ces forces interparticulaires \vec{F} dérivent du potentiel électrique V :

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}V. \tag{3.39}$$

Selon la théorie DLVO, seules deux forces dominent les interactions entre les particules : les forces attractives de van der Waals et les forces électrostatiques de la double couche. Ainsi on considère le potentiel total V_T comme la somme du potentiel attractif V_A de van der Waals (Eq. 3.30) et répulsif V_R de la double couche électrostatique (Eq. 3.38) :

$$V_T(d) = V_A(d) + V_R(d) = -rac{AR_N}{12d} + 2\pi\epsilon_r\epsilon_0 R_N \phi_0^2 e^{-\kappa d} \,.$$
 (3.40)

Cette équation 3.40 peut être réécrite sous une forme adimensionnée :

$$\frac{12V_T(d)}{A\kappa R_N} = -\frac{1}{\kappa d} + Be^{-\kappa d}, \qquad (3.41)$$

où la constante B regroupe toutes les caractéristiques de la nanoparticule immergée dans une solution ionique :

$$B=rac{24\pi\epsilon_r\epsilon_0\phi_0^2}{A\kappa}\,.$$

La stabilité des nanoparticules est alors conditionnée par la fonction $V_T(d)$ où les forces attractives (/répulsives) seront prédominantes à courte (/longue) distance d. Ces deux termes font aussi intervenir la grandeur $1/\kappa$ (Eq. 3.33) reliée par la "force" ionique F_i du milieu et la vitesse (énergie cinétique $\sim k_b T$) du mouvement Brownien de la nanoparticule. Le profil énergétique $V_T(d)$ (Fig. 3.2) fait alors apparaître un premier minimum (puit profond de potentiel) aux courtes distances d et un deuxième minimum (pas toujours présent) peu profond aux longues distances d. Les deux minima sont engendrés par le potentiel attractif V_A et séparés par une barrière de potentiel $V_{T,max}$. Cette barrière de potentiel $V_{T,max}$ existe si $B \geq 2$ mais sa valeur sera grande si B possède aussi une valeur élevée. Une bonne approximation est donnée pour la barrière de potentiel $V_{T,max}$ si B >> 2:

$$V_{T,max} \approx (B - \sqrt{B}) rac{A\kappa R_N}{12}$$
 (3.43)

La barrière de potentiel dépend alors de toutes les caractéristiques de la nanoparticule immergée dans une solution ionique. Quand les nanoparticules se rapprochent, elles doivent vaincre cette barrière de potentiel $V_{T,max}$ pour former des agrégats irréversibles dans le premier minimum. Si la barrière de potentiel possède une valeur élevée, les agrégats sont formés dans le deuxième minimum mais sont plus fragiles et réversibles. La figure 3.2 illustre les cinq zones éventuellement rencontrées quand la distance interparticulaire $d = r - 2R_N$ diminue.

- Zone A : grande distance interparticulaire : aucun effet des forces attractives et répulsives sur les nanoparticules
- Zone B : les forces attractives croissent rapidement et prédominent par rapport aux forces répulsives, d'où la présence d'un minimum secondaire
- Zone C : les forces répulsives commence à croître et à prédominer par rapport aux forces attractives. Elles conduisent à l'existence d'une barrière de potentiel $V_{T,max}$ qui empêche l'agrégation des nanoparticules
- Zone D : les force attractives deviennent prépondérantes et génèrent un puit de potentiel (minimum primaire) qui provoque une agrégation importante et irréversible
- Zone E : l'énergie potentielle devient infiniment élevée lorsque la distance est nulle. L'énergie de van der Waals (attractives) devient soudainement répulsive. C'est l'énergie de Born qui correspond à la répulsion lorsque les nuages électroniques s'interpénètrent autour des noyaux des nanoparticules.

Ainsi seule la zone D présente une instabilité irréversible des nanoparticules dans le milieu ionique.



FIGURE 3.2 – Diagramme d'énergie potentielle V_T en fonction de la distance interparticulaire d [Tourbin, 2006].

3.1.3 Critère de stabilité des suspensions colloïdales

La section 3.1.2 montre que la stabilité des nanoparticules dépend de la barrière de potentiel $V_{T,max}$ (Eq. 3.43) qui est directement reliée à la longueur de Debye $1/\kappa$ par la constante B (Eq. 3.42). La valeur de $1/\kappa$ diminue avec une augmentation de (i) la "force" ionique F_i du milieu, (ii) la vitesse (énergie cinétique $\sim k_b T$) de la diffusion thermique (Eq. 3.7) des nanoparticules.

En conséquence, la balance entre les forces attractives ou répulsives dépend de la vitesse (énergie cinétique $\sim k_b T$) fournie par la diffusion thermique. Une très forte énergie cinétique permet aux nanoparticules de franchir, à courte distance, cette barrière de potentiel $V_{T,max}$ entre la zone C et D (Fig. 3.2) pour tomber dans le puit de potentiel. Les forces attractives de van der Waals seront alors prédominantes par rapport aux forces répulsives de la double couche électrostatique. Ainsi les chocs formeront des agrégats irréversibles.

En revanche, la barrière de potentiel sera grande si les forces répulsives de la double couche électrostatique deviennent prédominantes, ou que la suspension colloïdale est stable par répulsion électrostatique si la double couche est épaisse. Déterminée par la "force" ionique F_i , la longueur de Debye $1/\kappa$ sera grande si le solvant contient une faible concentration ionique ou bien des ions monovalents avec une seule charge.

En général, une suspension colloïdale est stable si la barrière de potentiel $V_{T,max}$ est strictement supérieure au potentiel cinétique de la diffusion thermique

de quelques ordres de grandeur. Le critère de stabilité d'une suspension colloïdale est :

$$V_{T,max} \ge 20k_bT , \qquad (3.44)$$

Le diagramme du potentiel total $V_T(d)$ évolue en fonction de la concentration des ions dans le milieu. Le pH va alors jouer un rôle crucial dans l'agrégation des nanoparticules. En solution, toutes les nanoparticules possèdent une charge surfacique qui peut être titrée par des cations hydroxydes H⁺ ou des anions oxydes OH⁻. Un excès de H⁺ (OH⁻) donne une surface chargée positivement (négativement). Ainsi on peut définir le point isoélectrique qui représente le pH où les nanoparticules ne possèdent aucune charge surfacique. Au fur et à mesure que le pH se déplace vers ce point, la répulsion électrostatique diminue et l'agrégation est favorisée par l'attraction de van der Waals. Une concentration critique peut-être définie où la barrière de potentiel n'existe plus : seul le potentiel attractif subsiste, menant à une agrégation irréversible (effet de coagulation). La figure 3.3 représente les différentes formes du diagramme en fonction de la concentration de sels augmentant la "force" ionique F_i du milieu. La barrière de potentiel $V_{T,max}$ diminue alors rapidement jusqu'à disparaître à forte concentration ionique. Sans barrière, les nanoparticules tombent facilement dans le puit de potentiel V_A pour former des agrégats irréversibles. Aucun moyen n'existe pour neutraliser le processus d'agrégation dans un milieu fortement ionique.



FIGURE 3.3 – Evolution de l'énergie potentielle en fonction de la concentration ionique [Tourbin, 2006].

La Fig. 3.3 montre l'effet des ions sur le potentiel total V_T . Les différents stades représentés sont les suivants :

- Courbe (a) Une forte barrière de potentiel évite l'agrégagation. Les naoparticules se repoussent facilement et sont stables grâce à la répulsion électrostatique.
- Courbe (b) (c) La barrière de potentiel diminue avec l'augmentation de la concentration en ions. Les nanoparticules la franchissent plus facilement et des agrégats sont présents dans la solution.

• Courbe (d) - (e) La barrière de potentiel n'existe plus ce qui favorise l'aggrégation.

3.2 Protection et stabilisation électrostérique par un polymère ou une protéine

Selon la théorie DLVO (Sec. 3.1.2), une suspension colloïdale peut être stabilisée par répulsion électrostatique grâce à une double couche épaisse (Sec. 3.1.3) formée par les ions de la solution à la surface des nanoparticules. Cependant cette stabilisation électrostatique est peu fiable en conditions physiologiques (pH ~ 7,4; tampons ou milieux ioniques) car elle dépend de la température T, de la force ionique F_i (concentration et nombre de charge des ions) et du pH du milieu. Ces paramètres influencent l'épaisseur de la double couche ionique caractérisée par la longueur de Debye $1/\kappa$ (Eq. 3.33). Cette épaisseur sera déjà mince $(1/\kappa < 1 \text{ nm})$ à cause de la force ionique élevée des milieux biologiques. Il faudrait alors changer un des paramètres physico-chimique du milieu (pH, T, η_S , etc.) pour rendre la stabilisation électrostatique fiable au détriment de la biocompatibilité.

3.2.1 Stabilisation stérique

Outre la répulsion électrostatique, il existe une autre interaction répulsive pour contrecarrer les forces attractives de van der Waals à courte distance et éviter la formation des agrégats : la stabilisation par encombrement stérique via l'adsorption de macromolécules organiques à la surface des nanoparticules. Si ces macromolécules possèdent une taille ($a \ge 3$ nm) et un poids moléculaire ($MW \ge 2$ kDa) élevés, elles vont former une monocouche ou une multicouche moléculaire (Figs. 3.4(a) - 3.4(c)).



FIGURE 3.4 – Adsorption des molécules organiques sur une surface : (a) monocouche homogène (b) monocouche hétérogène (c) multicouche homogène (d) Ancrage de la chaîne de polymère sur plusieurs points.

TABLE 3.2 – Tailles a et poids moléculaires MW de différentes macromolécules organiques [Cruje and Chithrani, 2014].

Macromolécules	<i>a</i> (nm)	MW (kDa)	MW (g/mol)
BSA	3,70	66	66 000
PEG (HP2K-GNP)	3,50	2	2 000
PEG (HP5K-GNP)	8,75	5	5 000

Cette couche stable, irréversible et épaisse engendre un nouveau potentiel stérique (contribution de la répulsion osmotique et élastique dont les formules sont référencées par [Hotze et al., 2010]) dont la valeur est suffisamment élevée pour augmenter la barrière de potentiel. Pour obtenir une stabilité colloïdale par répulsion stérique, il doit y avoir une forte interaction (adsorption) entre les macromolécules organiques et la surface des nanoparticules mais aussi une bonne solubilité de ces macromolécules dans le solvant.

Ces macromolécules sont souvent des protéines comme la BSA ("Bovine Serum Albumin") ou de longues chaînes constituées de plusieurs polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) souvent biocompatibles. Le tableau 3.2 résume la taille a et le poids moléculaire MW de ces 2 macromolécules organiques.

En outre, les polymères sont flexibles et peuvent être adsorbés sur plusieurs points de la chaîne (Fig. 3.4(d)) rendant l'adsorption plus forte et irréversible. Ces macromolécules possèdent souvent des groupes ionisables intégrés à leur structure [Fleer et al., 1993] engendrant ainsi une répulsion électrostérique (Fig. 3.5) créant une couche qui combine une épaisseur moléculaire (\sim taille de la macromolécule) et ionique (longueur de Debye $\sim 1/\kappa$). La répulsion électrostatique est sensible à la "force" ionique des électrolytes du milieu (concentration, nombre de charges) tandis que la répulsion stérique est plutôt sensible au changement de masse molaire MWde la macromolécule adsorbée. Dans de nombreux cas, la stabilisation colloïdale est obtenue par adsorption des macromolécules favorisant les effets stériques du polymère et les effets électrostatiques des charges à la surface du polymère adsorbé.

3.2.2 Adsorption des protéines

Si le modèle de Langmuir est utilisé pour décrire les isothermes des protéines adsorbées sur la surface des nanoparticules via la thermodynamique, cette adsorption est proche de celle des polymères flexibles qui sont capables de réagir et créer plusieurs points de contact (Fig. 3.4(d)) avec la surface de la nanoparticule. Ainsi un modèle DLVO (Sec. 3.1.2) peut alors décrire et expliquer les différents mécanismes physico-chimiques des molécules adsorbées à la surface des nanoparticules. Par exemple, les molécules peuvent être adsorbées via les interactions électrostatiques quand les charges sont opposées entre la nanoparticule et les molécules dont les potentiels dépendront du pH. Toutefois polymères et protéines peuvent aussi être adsorbés à une surface malgré une répulsion électrostatique via des mécanismes différents [Ji et al., 2010]. Notamment, les études montrent que cette adsorption est maximale au point isoélectrique des macromolécules via

3.2. PROTECTION ET STABILISATION ÉLECTROSTÉRIQUE PAR UN POLYMÈRE OU UNE PROTÉINE



FIGURE 3.5 – Répulsion électrostérique (épaisseur moléculaire a + ionique $1/\kappa$) par adsorption de la macromolécule à la surface de la nanoparticule (NP) de rayon R_N .

une interaction hydrophobe [Ji et al., 2010]. En effet, une molécule peut avoir une charge électrostatique nulle qui minimise les répulsions électrostatiques avec les nanoparticules au profit des interactions hydrophobes où la protéine cherchera à se regrouper autour des sites hydrophobes favorisant ainsi son adsorption aux surfaces des nanoparticules. Il est alors nécessaire d'accéder au potentiel électrique (dépendant du pH) pour connaître la charge surfacique de chaque entité et déduire dans quelle gamme de pHs aura lieu l'adsorption des protéines par les nanoparticules.

L'adsorption des protéines sur des nanoparticules solides reste un mécanisme physique difficile à décrire en raison de la complexité de la structure tridimensionnelle hétérogène des protéines : la présence de domaines chargés différement, hydrophobes ou hydrophiles. Il est possible d'appliquer la théorie DLVO pour décrire le comportement des protéines en solution et leur adsorption aux nanoparticules mais les informations obtenues seront partielles. La conformation et la taille des protéine est sensible au pH du solvant. Par exemple, la BSA sera sous une forme très étendue (E-form) aux pHs = [1,0 - 3,5]; étendue (F-form) aux pHs = [3,5 -4,0]; normale (N-form) plus compacte et épaisse aux pHs = [4,0 - 9,0] (Fig. 3.6). Ces changements de conformation vont influer sur la quantité de BSA adsorbée à la surface des nanoparticules. Une forme étendue recouvrira plus facilement une grande surface de la nanoparticule sur plusieurs points de contact que la forme normale mais l'épaisseur de la couche et la quantité de BSA sera moindre [Givens et al., 2017].

La protection électrostérique dépend donc de : (i) la nanoparticule (surface, courbure, porosité, matériau); (ii) la macromolécule (structure tridimensionnelle et conformation, porosité, dureté); (iii) le solvant (composants, "force" ionique, pH, température, viscosité). Deux paramètres se dégagent : le rapport macromolécules/nanoparticule et le point isoélectrique associé au pH. Le premier traduit la quantité nécessaire de molécules pour recouvrir une surface d'une nanoparticule tandis que le second permet de situer où l'adsorption est maximale. De nombreux protocoles ont été mis au point pour stabiliser les TiO_2 -NPs avec des conditions hétérogènes. Le tableau 3.3 résume quelques protocoles de stabilisation des TiO_2 -NPs

3.2. PROTECTION ET STABILISATION ÉLECTROSTÉRIQUE PAR UN POLYMÈRE OU UNE PROTÉINE



FIGURE 3.6 – Conformation de la BSA en fonction du pH du milieu [Givens et al., 2017].

TABLE 3.3 – Résumé des différents protocoles de stabilisation de TiO₂-NPs à différentes concentrations C_N et diamètres $2 \times R_N$. ¹[Bihari et al., 2008], ²[Ji et al., 2010], ³[Guiot and Spalla, 2012], ⁴[Huber and Stoll, 2018]

TiO ₂	C_N	$2 imes R_N$	Protéine	BSA :TiO ₂	Milieu
	(mg/ml)	(nm)		(%)	
rutile ¹	2	100	HSA	7.5	PBS
rutile ²	0,05	150	BSA	10 - 100	DMEM
rutile ³	0,05	100	BSA	1	LB
$anatase^4$	0,006	200	BSA	8	DPBS

dans les milieux ioniques pour différents rapports massiques BSA :TiO₂. Selon le tableau 3.3, les concentrations de TiO₂-NPs sont inférieures à celles envisagées dans notre projet où nos concentrations testées vont de 1,56 à 6,25 mg/ml.

3.2.3 Interactions des nanoparticules avec le vivant : cytotoxicité

Depuis quelques d'années, les nanoparticules sont utilisées dans de nombreux domaines : cosmétique, textiles, pharmacologie, agroalimentaires, aéronautique, automobile, optique, électronique etc. Elles sont présentes dans de nombreux produits du quotidien : crèmes solaires, peinture, dentifrice, plastique, caoutchouc. Le dioxyde de titane et l'oxyde zinc y sont majoritairement représentés pour leurs propriétés catalytiques, mécanique (superplasticité, dureté), magnétique, optique, électrique, pigmentaire. De nombreuses études toxicologiques in vitro et in vivo ont montré des effets cytotoxiques [Foldbjerg et al., 2011, Fan and Yun, 2014].

La section 3.1.2 montre que les nanoparticules fonctionnalisées possèdent une surface riche en électrons accroissant ainsi leur potentiel chimique. Leur surface réactive devient alors un terreau pour des réactions chimiques et catalytiques dans un environnement biologique. Ainsi, les nanoparticules sont susceptibles d'aggréger des protéines du milieu à leur surface lorsqu'elles pénètrent dans un milieu biologiques. Ces dernières peuvent alors subir des modifications qui entraînent une altération de leur structure conformationnelle et de leur fonction initiale.

L'étude de Foldbjerg [Foldbjerg et al., 2011] montre par exemple que des nanoparticules d'argent induisent un stress oxydatif qui engendre une cytotoxicité

3.2. PROTECTION ET STABILISATION ÉLECTROSTÉRIQUE PAR UN POLYMÈRE OU UNE PROTÉINE

et génotoxicité chez les cellules de carcinome épithélial du poumon humain.En effet suivant leur taille, elles peuvent entrer dans les cellules, par phagocytose, macropinocytose ou endocytose [Saptarshi et al., 2013]. Elles sont ensuite susceptibles d'avoir un effet déstabilisateur du cytosquelette, par exemple les TiO2-NP peuvent adsorber la tubuline sur leur surface, conduisant à une diminution de sa polymérisation [Gheshlaghi et al., 2008]. En revanche il a été démontré que pré-incuber des protéines avec des nanoparticules forme une couronne protéique entrainant une modification des forces attractives et répulsives de surface [Bihari et al., 2008, Ji et al., 2010, Saptarshi et al., 2013].

Les modèles *in vitro* permettent d'évaluer facilement la toxicité des nanoparticules pour identifier les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse cytoxique. Cependant, la grande hétérogénéité des études *in vitro* : type et concentration de nanoparticules, modèles cellulaires employés, temps d'exposition, méthode d'évaluation de la cytotoxicité, permettent difficilement de les comparer et peuvent donner des résultats contradictoires [Horie et al., 2012]. A priori, il n'existe pas de de protocoles standards pour les analyses. Dans ces articles, la cytotoxicité des nanoparticules est principalement évaluée par 2 tests : (1) le pourcentage de cellules mortes ou vivantes par cytométrie en flux; (2) le test au MTT.

La mesure du pourcentage de cellules mortes ou vivantes est réalisée par cytométrie en flux en présence d'Iodure de Propidium (IP) [Zucker et al., 2010, Prasad et al., 2013]. L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques. Cette molécule fluorescente est lipophobe et ne traverse pas les membranes biologiques intègres des cellules vivantes. En conséquence, l'IP marque les acides nucléiques des cellules mortes dont la membrane plasmique est détériorée.

Le MTT est une molécule utilisée habituellement dans les tests de prolifération cellulaire. Incubé avec des cellules présentant une activité mitochondriale, il est réduit par la succinate déshydrogénase de la chaîne respiratoire. Le produit de cette oxydo-réduction est un composé solide, le formazan de couleur bleu-violet. La mesure de l'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes actives et une fonction de leur activité mitochondriale respective. Elle donne une indication sur l'activité métabolique des cellules [Wang et al., 2007, Zhu et al., 2009, Guan et al., 2012]. Le test au MTT est largement utilisé et considéré comme un test standard pour mesurer la viabilité cellulaire dans la toxicité des médicaments [Kumar et al., 2018] ou la cytotoxicité des nanoparticules comme le dioxyde de titane (TiO_2) sur les lymphocytes T humains [Ghosh et al., 2013], le cobalt (Co) et TiO₂ sur l'activité mitochondriale humaine [Perni et al., 2018], et le suflure de calcium (CaS) sur la lignée des fibroblastes L929 [Rekha and Anila, 2019]. [Ghosh et al., 2013] ont ainsi montré que 60% de l'activité cellulaire de lymphocytes T humains était conservée après 3 heures en présence de 100 g/ml de TiO2.

3.3 Techniques instrumentales

3.3.1 Distribution des rayons hydrodynamiques par DLS

La diffusion dynamique de la lumière (DLS : "Dynamical Light Scattering") est une technique qui permet de mesurer le rayon hydrodynamique R_h des objets nanométriques en suspension afin d'obtenir une distribution statistiques des tailles. Cette approche va permettre d'évaluer la présence d'agrégats dans les solutions de TiO₂-NPs. En milieu ionique ou lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des macromolécules, le rayon R_h est le reflet du rayon de la nanoparticule et de la couche ionique la recouvrant (Fig. 3.5 où $R_h = R_N + a + 1/\kappa$). Le rayon hydrodynamique R_h sera donc supérieur au rayon réel R_N de la nanoparticule.

La DLS mesure les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée, causées par le mouvement aléatoire Brownien des particules dans le milieu. Pour ce faire, la fonction d'autocorrélation $g^{(2)}$ est mesurée en comparant l'intensité de la lumière diffusée entre un temps t de référence et un temps $t + \tau$. La fonction d'autocorrélation $g^{(2)}$ mesurée a généralement une décroissance exponentielle [Berne and Pecora, 2000]. Ces fluctuations sont aléatoires et reliées au coefficient de diffusion D soit au R_h des particules soumises au mouvement brownien [Finsy, 1994]. D est indirectement mesuré à partir de la courbe d'autocorrélation $g^{(2)}$ dont la décroissance exponentielle [Berne and Pecora, 2000] peut être approximée par les deux premiers cumulants de la distribution mesurée [Koppel, 1972] car les grandes statistiques garantissent la convergence vers une Gaussienne. Dans ces conditions, la relation de Siegert est valable pour $g^{(2)}$ [Brown, 1993] :

$$g^{(2)} = B + (|G(au)|)^2 \,,$$
 (3.45)

où B est une constante et $G(\tau)$ est la fonction de corrélation. $G(\tau)$ est pour une particule sphérique :

$$G(au) = \int_{0}^{+\infty} c(\Gamma) exp(-\Gamma au) d\Gamma ,$$
 (3.46)

$$q = 4\pi rac{n_S}{\lambda} rac{ heta}{2}$$
, (3.47)

où $\Gamma = q^2 D$ représente le taux de décroissance (ou d'extinction, de déclin), $c(\Gamma)$ est une distribution pondérée des taux de décroissance pour une intensité normalisée, q est le module du vecteur de diffusion caractérisé par l'indice de réfraction du solvant n_s , λ la longueur d'onde du laser et θ est l'angle de détection. Comme les NPs subissent un mouvement Brownien, le rayon hydrodynamique R_h est directement obtenu à partir du coefficient de diffusion D par la relation de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi D\eta_S}\,,\tag{3.48}$$

où k représente la constante de Boltzmann, T la température absolue et η_S la viscosité dynamique du milieu ($\eta_{H_2O} = 0,001 \text{ kg/m/s}$ à une température ambiante).

3.3.2 Détermination du point isoélectrique et du potentiel ζ

Toutes les nanoparticules, fonctionnalisées ou non, sont entourées par une couche électrostérique possédant une charge ionique et un potentiel électrostatique ϕ quand elles sont suspendues dans un milieu ionique. Leur stabilisation dépendra alors des répulsions électrostatiques ou électrostériques. Ces répulsions sont caractérisables par la force ionique F_i (concentration des ions et leur nombre de charges; voir Eq. 3.34) et l'épaisseur de la couche (épaisseur moléculaire et ionique) : il est donc indispensable de considérer la nanoparticule avec sa couche. Le potentiel ζ est une grandeur expérimentale qui permet de prédire la stabilité des nanoparticules dans un milieu ionique [Hunter, 2013]. Elle ne correspond ni au potentiel ϕ_0 à la surface de la nanoparticule, ni au potentiel ϕ_d de la première couche ionique (Sec. 3.1.2). Le potentiel ζ est mesuré par mobilité électrophorétique (via l'application d'un champ électrique externe entre 2 électrodes) au plan de cisaillement de la nanoparticule (plan correspondant à la limite de la couche où les ions possèdent encore la vitesse cinétique de la nanoparticule) situé dans la couche diffuse (Fig. 3.7) au-delà de la première couche ionique d'où l'inégalité suivante :

$$|\phi_0| > |\phi_d| > |\zeta|$$
. (3.49)

La figure 3.7 illustre cette définition du potentiel ζ au plan de cisaillement par rapport à la charge surfacique ϕ_0 et la charge ϕ_d de la première couche ionique (couche de Stern).



FIGURE 3.7 – Couche ionique de la nanoparticule et définition du potentiel ζ au plan de cisaillement http://en.wikipedia.org/wiki/File:Zeta_Potential_for_ a_particle_in_dispersion_medium.png.

Selon Eq. 3.43, la barrière de potentiel $V_{T,max}$ dépend de la charge ϕ de la nanoparticule. Ainsi une forte valeur du potentiel ζ implique une forte valeur ϕ soit une barrière de potentiel $V_{T,max}$ élevée. Donc une forte valeur du potentiel ζ est le
synonyme d'une bonne stabilité des nanoparticules.

Quand un champ électrique est appliqué entre deux électrodes avec une amplitude E par unité de longueur (unité : V/m), les nanoparticules chargées se déplacent à une vitesse V_N selon une direction [Hunter, 2013]. La vitesse V_N est ainsi fonction de la charge des nanoparticules, du milieu et de l'amplitude E du champ électrique. Elle est donc proportionnelle au potentiel ζ de la nanoparticule dans le plan de cisaillement. Le mouvement des particules sous un champ électrique appliqué est appelé électrophorèse mesurée par vélocimétrie Doppler (Fig. 3.8).



FIGURE 3.8 – Mobilité électrophorétique via un champ électrique E mesuré par vélocimétrie Doppler. La vitesse est déterminée par le décalage $\Delta \nu = \nu_d$ (ZS nano - Malvern).

Des nanoparticules sont mises en suspension dans un solvant d'indice de réfraction n_S , de viscosité dynamique η_S et de constante diélectrique ϵ connus. Les nanoparticules sont illuminées avec un laser de longueur d'onde λ . La lumière diffusée a un décalage de fréquence $\Delta \nu = (2V_N/\lambda)\sin(\theta/2)$ (effet Doppler) proportionnel à la vitesse V_N des nanoparticules. Le décalage de fréquence de la lumière diffusée à l'angle θ est mesuré puis la vitesse de la nanoparticule V_N est déterminée à partir du décalage de fréquence. La mobilité U_N est alors facilement obtenue sous la forme du rapport entre la vitesse et l'intensité du champ électrique V_N/E . On trouve ensuite le potentiel ζ à partir de la mobilité U_N à l'aide d'un modèle dont le plus courant est celui de Smoluchowski [Hunter, 2013] :

$$U_N = \frac{V_N}{E} = \frac{\lambda \Delta \nu}{2En_S \sin(\theta/2)} \,. \tag{3.50}$$

Cette équation précédente est utilisé pour relier la mobilité électrique U_N et le potentiel ζ par la loi de Henry [Henry, 1931] :

$$\zeta = \frac{U_N \eta_S}{\epsilon f(\kappa R_N)}, \qquad (3.51)$$

où $f(\kappa R_N)$ est le coefficient de Henry caractérisé par la longueur d'onde de Debye $1/\kappa$ et le rayon R_N de la nanoparticule. C'est une fonction monotone du produit κR_N qui prend les valeurs entre 1 et 1,5 quand κR_N varie de 0 à l'infini via des modèles appropriés (Henry, Hückel, Smoluchowski) [Hunter, 2013]. Le potentiel ζ informe directement sur la stabilité des suspensions. Une suspension est souvent instable si elle présente un potentiel ζ inférieur à |10 mV| tandis qu'une valeur supérieure à |30 mV |confère, en général, une bonne stabilité de la suspension. Divers paramètres affectent le potentiel ζ dont le pH qui permet de définir le point isoélectrique des nanoparticules dans un milieu ionique. Ce point isoélectrique représente le pH où le potentiel ζ est nul. Au point isoélectrique, les agrégats se formeront rapidement à cause de cette absence de répulsion électrostatique. Ce point isoélectrique variera selon le processus de fabrication des nanoparticules [Kosmulski, 2018].

Le potentiel ζ comprend le facteur de Henry $f(\kappa R_N) \sim \kappa R_N = R_N/(1/\kappa)$. Le potentiel ζ est donc proportionnel au rayon R_N de la nanoparticule mais inversement proportionnel à longueur de Debye $1/\kappa$. Deux constats peuvent être établis : (i) une couche épaisse augmente la valeur du potentiel ζ tandis que (ii) les gros agrégats diminuent le potentiel ζ .

3.3.3 Cinétique de sédimentation par spectrométrie d'absorption

La mesure de la cinétique de sédimentation par spectrométrie d'absorption permet également de s'assurer de la stabilisation des nanoparticules dans un milieu. Le spectrophotomètre mesure l'intensité transmise I_t à travers une cuve conteant l'échantillon éclairée par une source d'intensité I_0 . La densité optique ou absorbance A est alors calculée par la relation suivante :

$$A = -\log \frac{I_t}{I_0} \,. \tag{3.52}$$

En présence d'agrégats, la solution va sédimenter beaucoup plus vite dans la cuvette qu'en condition stabilisée. L'absorbance va diminuer au fur et à mesure de la sédimentation car le milieu deviendra transparent, tandis qu'une suspension stable de nanoparticules restera turbide (absorbance élevée).

Chapitre 4

Choix expérimentaux, matériels, méthodes et mesures préliminaires

Obtenir une amplification stimulée efficace dans un système vivant nécessite une combinaison de conditions optiques (forte diffusion isotrope), physico-chimiques (stabilité des nanoparticules) et biocompatible (conditions de pH ~ 7,4 et de milieu). A notre connaissance, il n'existe pas de laser aléatoire biocompatible. Ces conditions ont ainsi motivé et orienté nos décisions pour choisir le fluorophore (Sec. 4.1.1), des diffuseurs (Sec. 4.1.2) et de la pompe optique (Sec. 4.1.3) mais elles ont aussi guidé les méthodes de préparation des échantillons et les conditions expérimentales (concentrations de travail, milieux). Les principaux objectifs de ce travail ont été de rechercher, valider et optimiser : (i) une méthodologie pour stabiliser les nanoparticules de TiO₂ dans des tampons biologiques ou des milieux de culture cellulaire; (ii) les premiers paramètres (concentration de FITC, concentration de TiO₂, énergie de pompe) pour obtenir une première amplification stimulée de la fluorescence dans un milieu actif (FITC) homogène avant de transposer et combiner ces deux premiers objectifs (i) et (ii) dans un troisième : (iii) valider cette amplification sur des cellules marquées en conditions physiologiques.

La section 4.2.3 présente le protocole de préparation des échantillons pour tester la stabilisation des TiO₂-NPs (Sec. 4.2.3 indique les concentrations de travail) par BSA dans divers tampons et milieux de culture déjà préparés dont le protocole est indiqué dans la section 4.1. La stabilisation est évaluée et caractérisée par les différents protocoles de mesures de DLS (Sec. 4.6), de potentiel ζ (Sec. 4.6) et de cinétique de sédimentation (Sec. 4.6) dont les techniques instrumentales sous-jacents sont résumées dans la section 3.3 et tous les résultats sont discutés dans le chapitre 5.

La section 4.2.6 présente le protocole de préparation des échantillons pour caractériser cette amplification stimulée dans une solution aqueuse et homogène de FITC (résultats dans la Sec. 6.1) puis sur des cellules marquées (résultats dans la Sec. 6.2) dont la préparation cellulaire est résumée dans la section 4.2.4, et celle du marqueur fluorescent dans la section 4.2.5, marqueur étalonné (Sec. 4.2.7) aux concentrations équivalentes à celles du FITC afin de comparer le gain de fluorescence sur les deux modèles. Toutes les mesures (Chap. 6) ont été réalisées avec le banc optique (Sec. 4.3) calibré pour connaître les énergies des impulsions (Sec. 4.4) sur les échantillons et collecter les spectres de fluorescence (Sec. 4.3.2). Enfin toutes les longueur d'onde sont données dans le vide et les milieux possèdent un indice de réfraction proche de celui de l'eau (n \approx 1,33).

4.1 Choix expérimentaux

4.1.1 Fluorophore

Afin que notre technique d'amplification de la fluorescence soit biocompatible, le fluorophore a été choisi pour être le moins cytotoxique possible. Bien que la R6G soit couramment utilisée pour son excellent rendement quantique (0,95 [Magde et al., 2002]) comme milieu à gain dans les lasers [El-Dardiry and Lagendijk, 2011, Leonetti et al., 2012], elle reste cependant toxique et mutagène. Son utilisation est donc limitée aux échantillons fixés (figés par pontage chimique) [Song et al., 2010, Polson and Vardeny, 2004]. En conséquence, nous avons plutôt choisi la Fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) : un fluorophore organique largement utilisé avec un rendement quantique équivalent (0,90 [Magde et al., 2002]) et approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) [Alford et al., 2009] mais aussi l'un des premiers fluorophores utilisés en biologie cellulaire sous sa forme dérivée Carboxy-fluorescéine (CFSE) pour évaluer la prolifération cellulaire *in vivo* [Quah and Parish, 2012].

4.1.2 Diffuseurs

La forme rutile des TiO₂-NPs a un indice de réfraction élevé $(n_{rutile} = 2,87 \text{ à} 500 \text{ nm} [DeVore, 1951])$ par rapport à la forme anatase $(n_{anatase} = 2,56 \text{ à} 500 \text{ nm} [Bodurov et al., 2016])$. Le contraste élevé d'indice par rapport au milieu environnant (milieu aqueux avec $n_{milieu} \approx 1,33$ [Magde et al., 2002, Haynes, 2014]), assure une très forte diffusion de la lumière [Yi et al., 2012] dans le milieu à gain. Les TiO₂-NPs jouent alors le rôle de diffuseurs élastiques passifs (aucune perte énergétique, Chap. 2) et ils permettent d'allonger le chemin optique effectif du rayonnement lumineux (pompe et fluorescence) favorisant ainsi l'amplification de la fluorescence [Yi et al., 2012, Nastishin and Dudok, 2013, Shuzhen et al., 2008]. Malgré l'utilisation courante de TiO₂ dans les aliments et les cosmétiques en tant que pigment depuis plus de 50 ans, sa toxicité reste controversée [Winkler et al., 2018]. Nous avons donc testé l'influence des TiO₂-NPs sur l'activité cellulaire pendant la durée des expériences (estimée à 5 heures maximum) sans détecter de toxicité significative (résultats dans Sec. 5.4).

4.1.3 Pompe optique pour exciter les fluorophores

Pour exciter les fluorophores usuels de la biologie cellulaire, la source impulsionnelle a été sélectionnée pour être accordable dans le visible. La majorité des études sur les lasers aléatoires utilisent une pompe optique impulsionnelle (principalement des lasers Nd :YAG [Gather and Yun, 2011b, Luan et al., 2015]). Ce choix est motivé par la nécessité d'avoir un flux de photons élevé pour atteindre le seuil d'émission stimulée (laser) du milieu à gain. De même, un flux de photons important est nécessaire pour induire une amplification stimulée par le FITC tout en limitant la durée d'exposition à la lumière afin de limiter / restreindre la phototoxicité cellulaire. Il a été démontré que l'exposition de cellules à de fortes impulsions énergétiques d'un Nd :YAG à fréquence doublée ($\lambda = 532$ nm) pendant 30 minutes n'était pas délétère pour les cellules [Gather and Yun, 2011b]. Cela réside dans le faible taux de répétition (10 Hz) des impulsions qui limite la quantité moyenne des photons auquel la cellule est soumise.

En effet, si l'on considère des impulsions de pompe avec une énergie $E_P \approx 5$ mJ et une durée à mi-hauteur $\tau_P \approx 5$ ns, les puissances maximales instantanées au pic sont de $P_P \approx 10^6$ W, c'est-à-dire un flux maximal instantané de photons $d\Phi_P/dt \approx 2,5 \times 10^{24} \text{ s}^{-1}$ au pic et un flux $\Phi_t \approx 1,3 \times 10^{16}$ photons en intégrant sur la durée de l'impulsion. Le taux de répétition des impulsions étant de $\nu_P = 10$ Hz (Sec. 4.3), le rapport cyclique d'exposition est $\delta = \tau_P \cdot \nu_P \approx 5 \times 10^{-8}$ ce qui conduit à un flux moyen de photons $\langle \Phi \rangle = \Phi_t \cdot \delta \approx 6, 5 \times 10^8$. En comparaison avec l'exposition d'un laser continu (CW), cela reviendrait à mener des expériences de fluorescence avec une $P_{cw} \approx 2, 5$ nW, c'est-à-dire bien en dessous de la puissance des lasers continus utilisés en microscopie à fluorescence, généralement de l'ordre du milliwatt. De fait, cette approche reste originale par rapport à la microscopie de fluorescence qui utilise soit une palette de sources lasers continus délivrant des longueurs d'onde d'excitation discrètes, soit des lasers supercontinuums dont l'efficacité de pompe est moindre en raison des pertes par filtrage pour sélectionner les longueurs d'onde de travail.

4.2 Préparation des échantillons

4.2.1 Milieu aqueux ultra-purs

Toutes les préparations de TiO₂-NPs sont réalisées dans un solvant aqueux nonélectrolytique (aucune charge présente) dit aussi ultra-pur (c'est-à-dire contenant seulement des molécules d'eau sans impuretés) traité par un système de purification (PURELAB flex 2 : ELGA). Ce solvant aqueux ultra-pur (H₂O mQ) présente généralement une résistivité (résistance à un courant électrique créé par un flux ionique) élevée ($\sim 18,2 \text{ M}\Omega$).

4.2.2 Tampons et milieux de culture

Le PBS, Tampon H, RPMI et DMEM sont dissous dans l'eau H₂O mQ et ajustés à pH ~ 7. Le DPBS 10X (solution 10 fois concentrée) est dilué dans l'H₂O mQ. Toutes ces solutions sont préparées à 1,25X (solution 1,25 fois concentrées) et filtrées sur un filtre 0,22 μ m.

Le tableau 4.1 présente la composition chimique et la "force" ionique (unités : mM) des tampons testés (PBS, Tampon H) :

4.2.3 TiO₂

La solution aqueuse stock de nanoparticules de TiO_2 (400 mg/ml) sous forme rutile (Nanoamor : 7013WJWR, USA, [NanoAmor,]) de taille entre 30 nm et 50 nm possède un pH compris entre 6 \leq pH \leq 8.

PBS (mM)		Tampon H (mM)		DPBS (mM)	
NaCl	110	NaCl	145	NaCl	137
KCl	2	KCl	5	KCl	3
KH ₂ PO ₄	1	$CaCl_2$	2	$CaCl_2$	1
NaH ₂ PO ₄	7	$MgCl_2$	2	$MgCl_2$	1
		HEPES	10	KH ₂ PO ₄	1
				NaH ₂ PO ₄	10
Force ionique (mM)	120	Force ionique (mM)	168	Force ionique (mM)	155

TABLE 4.1 – Composition et "force" ionique des milieux PBS et Tampon H.

Concentrations de travail

La concentration C_N de TiO₂-NPs a été choisie pour bénéficier du régime multiple (Sec. 2.1.4) de la diffusion : $L >> l_N >> \lambda$ [Nastishin and Dudok, 2013] où L représente l'épaisseur de notre échantillon (2 mm), λ la longueur d'onde (\approx 500 nm) et l_N le libre parcours moyen de diffusion. Ce dernier paramètre peut être exprimé comme une fonction de la densité volumique ρ_N de nanoparticules et sa section efficace de diffusion σ_N tel que $l_N = \frac{1}{N \cdot \sigma_N}$ (Sec. 2.1.4, [Yi et al., 2012, Nastishin and Dudok, 2013]) et prend les valeurs numériques $l_N = (245, 123, 61) \mu m$ pour un rayon de 50 nm aux concentrations $C_N = (1,56; 3,12; 6,25)$ mg/ml.

Stabilisation du TiO₂ dans les tampons et milieux de culture

La solution stock (400 mg/ml) de TiO₂-NPs a été diluée et mélangée avec de la BSA. Les conditions de pH, rapport massique BSA/TiO₂-NPs et temps d'incubation T_{inc} ont été testées pour ajuster les conditions optimales : le rapport massique BSA/TiO₂-NPs entre 4% et 100% (0, 4, 12, 24, 48, 60 et 100%), dans H₂O mQ à pH \sim 5 ou pH \sim 7 pendant une période d'incubation $T_{inc} =$ 1h, 2h, 3h et 16h. Quand l'incubation a été réalisée à pH \sim 5, le mélange BSA/TiO₂-NPs a été réajusté à pH \sim 7 avant mélange avec les tampons ou milieux. Pour les différentes expériences menées (DLS, cytotoxicité, amplification) ces préparations de BSA/TiO₂-NPs à pH \sim 7 sont ensuite diluées dans les différents tampons et milieux à tester (Tampon H, PBS, DPBS, DMEM, RPMI en concentration finale 1×) pour des concentrations finales en TiO₂-NPs de 1 à 6,25 mg/ml. Les mesures de Dynamic Light Scattering (DLS) et sédimentation (Sec. 4.6) sont réalisées entre 0 et 5 heures (T_{exp}) après mélange à température ambiante (25°C) pour évaluer la stabilité post-mélange.

4.2.4 Modèles cellulaires : la lignée Jurkat

Les lignées de cellules en suspension Jurkat (American Type Culture Collection issue de lymphocytes T humains) ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco 61870010) contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) South American (Gibco 10270106) et 1% Pénicilline/Streptomycine (Gibco 15140122). Une lignée de cellules Jurkat, exprimant de manière stable la GFP (Jurkat-GFP) sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de la "human PhosphoGlycerate Kinase" (hPGK), a été obtenue par infection lentivirale du plasmide pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Addgene : 12252, Larbret et al., 2013). Ces cellules ont été triées en fonction de leur taux d'expression de GFP par cytométrie en flux FACSAria III (BD Biosciences). Deux populations distinctes (GFP "low" et GFP "high") ont été détectées et remises en culture séparément. La lignée de cellules Jurkat a été choisie pour les raisons suivantes : (i) ce sont des cellules en suspension ce qui permet de rester dans un système où la répartition des émetteurs de fluorescence reste homogène et tridimensionnelle, et (ii) cette lignée présente une faible cytoxicité aux nanoparticules TiO2-NP (Khlusov et al., 2018).

4.2.5 Marquage cellulaire à la Carboxy-Fluoresceine Succinimidyl Ester (CFSE)

 10^7 cellules Jurkat/ml dans du RPMI sans rouge de phénol contenant 10 mM d'HEPES sont incubées pendant 10 min à 37°C à l'obscurité avec une concentration finale de CFSE à 10 μ M, obtenue par dilution d'une solution stock de CFSE à 5 mM dans du DMSO. L'internalisation du CFSE est arrêtée par l'ajout de milieu RPMI complet avec 10% volume de SVF. Les cellules ont été centrifugées puis reprises deux fois dans du RPMI sans rouge de phénol. Les mesures de spectrofluorimétrie de contrôle et d'amplification sont effectuées le jour du marquage CFSE.

4.2.6 Préparation des échantillons fluorescents

Une solution stock de FITC (F6377, Sigma Aldrich, [Sigma-Aldrich,]) préalablement préparée dans H₂O mQ à pH \sim 7 a été mélangée et dissous dans le Tampon H, PBS, DPBS ou RPMI sans ou avec des TiO₂-NPs préparées en H₂O mQ, stabilisées sans ou avec la BSA à des concentrations finales $C_N = (1,56; 3,12; 6,25)$ mg/ml.

Les cellules Jurkat GFP ou chargées en CFSE en milieu RPMI sans rouge de phénol ont été mélangées aux TiO₂-NPs complexées à la BSA en RPMI, comme précédement décrit, à des concentrations finales $C_N = (1,56; 3,12; 6,25)$ mg/ml.

Dans un premier temps la concentration C_F a été déterminée pour donner la plus forte intensité émise susceptible de procurer une amplification stimulée de la fluorescence. Pour déterminer ce maximum, des spectres de fluorescence ont été enregistrés par spectrofluorimétrie (FP-8300 JASCO) dans H₂O mQ en fonction de C_F . La figure 4.1 montre l'intensité du pic de fluorescence à $\lambda_F \approx 520$ nm en fonction de C_F avec un maximum de la courbe obtenu à $C_F = 200 \ \mu$ M. Quand $C_F > 200 \ \mu$ M (Fig. 4.1), la fluorescence diminue probablement par "self-quenching" et réabsorption des photons émis par une autre molécule de FITC [Valeur, 2003].

Cette valeur est 10 fois plus forte que les concentrations utilisées pour les marquages intracellulaires (cellules chargées en CFSE) [Valeur, 2003] mais reste 5 fois plus faible que la concentration de R6G (1 mM) utilisée dans les lasers aléatoires [Yi et al., 2012, Shuzhen et al., 2008, Dice et al., 2005]. Les concentrations $C_F =$ 200, 20 et 2 μ M de FITC seront ensuite utilisées dans ce travail d'amplification de la fluorescence et d'étude des propriétés de cette émission (intensité, FWHM, etc.).



FIGURE 4.1 – Intensité de fluorescence en fonction de la concentration de FITC (Spectrofluorimétrie). Mesure réalisée sur 1 préparation

4.2.7 Spectrofluorimétrie de contrôle des Jurkat CFSE

La fluorescence I_F des cellules (10^5 ; 10^6 ; 10^7 cellules/ml) marquées au CFSE ($C_F = 5$, 10, 25 μ M) a été comparée à la fluorescence d'une gamme étalon FiTC de 0,2 à 25 μ M dans l'H₂O mQ afin d'ajuster les concentrations cellulaires marquées au CFSE équivalentes à 5, 10 et 25 μ M. Les mesures ont été effectuées en triplicata dans un lecteur de microplaques EnVision 2104 (Perkin Elmer).



FIGURE 4.2 – Intensité I_F en fonction de C_F : FITC (Bleue); 10⁵ cellules/ml (Violette); 10⁶ cellules/ml (Verte); 10⁷ cellules/ml (Rouge). Moyenne sur sur 10 mesures \times 3 échantillons indépendants

La figure 4.2 montre la fluorescence I_F en fonction de la concentration C_F de FITC (Courbe bleue) ou CFSE pour 3 concentrations cellullaires différentes : 10⁵ cellules/ml (Courbe violette); 10⁶ cellules/ml (Courbe verte); 10⁷ cellules/ml (Courbe rouge). Excepté le cas à $C_F = 25 \ \mu \text{M}$ pour 10⁷ cellules/ml, la figure 4.2 montre un facteur (rapport des intensités issue de FITC et CFSE à C_F fixée) de ~ 15 pour 10⁵ cellules/ml; ~ 1,8 10⁶ cellules/ml; ~ 4,3 - 5 pour 10⁷ cellules/ml. A C_F fixé, il faut donc une concentration cellulaire équivalente à ~ 2 × 10⁶ cellules/ml pour avoir la même quantité de fluorescence avec des marqueurs CFSE que celle avec une solution homogène de FITC.

4.3 Montage expérimental

4.3.1 Banc optique

Un laser Nd :YAG Q-switch (Fig. 4.3, Quanta-Ray INDI-40-10-HG, Spectra-Physics) génère des impulsions de pompe triplées en fréquence ($\lambda_t = 355$ nm) à un taux de répétition égal à $\nu_P = 10$ Hz avec une durée d'impulsion égale à $\tau_P \approx 5$ ns et une énergie ~ 120 mJ (à $\lambda_{IR} = 1064$ nm), qui sont envoyées sur un Oscillateur Paramétrique Optique accordable (OPO, VersaScan / 120 / MB - fabricant GWU) basé sur un cristal de borate de baryum (β -BaB₂O₄, BBO). L'OPO est accordé pour une émission de signal à $\lambda_P = 490$ nm correspondant à la longueur d'onde d'absorption optimale du FITC.

La stabilité des impulsions émises par l'OPO nécessite un fonctionnement continu et ininterrompu du laser Nd :YAG pour minimiser les fluctuations d'une impulsion à l'autre. Dans des conditions optimales, la sortie OPO équivaut à des impulsions d'énergie $E_P = (7.5 \pm 0.5)$ mJ, avec une durée $\tau_P \approx 5$ ns à un taux de répétition $\nu_P = 10$ Hz. Chaque impulsion est contrôlée et enregistrée au cours de l'expérience par une photodiode en Si (DET10A2, Thorlabs, P1 dans la Fig. 4.3, temps de réponse $\tau_{P1} = 1$ ns, sensibilité $S_{P1} = 0,2$ A/W à $\lambda = 500$ nm) placée sur le trajet de référence et de contrôle des impulsions. A la sortie de l'OPO, le faisceau de pompe est astigmatique, avec une divergence horizontale (< 0,7 mrad) et verticale (3 – 9 mrad) spécifiée par le fabricant. Afin de minimiser les pertes énergétiques causées par les optiques (changement des indices de réfraction) et préserver la qualité du faisceau de pompe, nous avons minimisé le nombre d'optiques sur le trajet du faisceau avant la lame de l'échantillon.

Le séparateur de faisceau S (rapport R :T = 15 :85) permet la mesure individuelle des impulsions sur P1 (Fig. 4.3). L'énergie des impulsions est réglée pour la protection du détecteur et l'exploitation optimale de sa plage dynamique par deux filtres de densité neutre (DN) : un filtre Kodak Wratten II, de densité optique DO = 2,0, et un filtre N-BK7 réfléchissant (ND30A, Thorlabs) avec une DO = 3,0. Le signal analogique du détecteur est ensuite envoyé à un oscilloscope numérique à 2,5 GHz (WaveRunner 625Zi, LeCroy) couplé avec une impédance de 50 Ω . Un étalonnage de P1 permet d'enregistrer l'énergie de chaque impulsion envoyée à l'échantillon.

Le faisceau transmis par S, avec une énergie des impulsions dans la gamme [100 μ J - 3 mJ], contrôlé par un ensemble de filtres ND ajustables F1 (Kodak Wratten II), est réfléchi par un miroir dichroïque 45° passe-haut ($\lambda_{cutoff} = 500$ nm, FF500-Di01-25x36, Semrock) et focalisé sur l'échantillon avec une lentille de focale f = 75 mm, L1. L'astigmaticité du faisceau et la variabilité d'une impulsion à



FIGURE 4.3 – Montage expérimental. Le laser de pompe est composé d'un Nd :YAG triplé en fréquence ($\lambda_t = 355$ nm) qui pompe un OPO accordable. Les impulsions $\lambda_P = 490$ nm résultantes sont divisées par le diviseur de faisceau S qui prélève une petite fraction de l'énergie sur la photodiode de référence P1 (F3 est un ensemble de filtres de protection de densité neutre (DN) pour P1). Le faisceau transmis est atténué par un ensemble ajustable de filtres DN F1, puis dévié par un miroir dichroïque (MD) passe-haut ($\lambda_{cutoff} = 500$ nm), pour être ensuite focalisé par la lentille L1 (f = 75 mm) sur l'échantillon placé à son foyer. Les impulsions de fluorescence rétrodiffusées sont collectées par L1 (estimation de l'ouverture numérique ON = 0,17) et enregistrées soit par un spectromètre, soit par un détecteur résolu en temps (les deux étant notés P2). Un filtre DN F2 peut être interposé pour atténuer les signaux de fluorescence trop intenses afin d'éviter la saturation de P2. L'obturateur Shutter mécanique permet de fixer la longueur du train d'impulsions envoyé à l'expérience.

l'autre rendent difficile l'estimation de la surface du faisceau et la densité surfacique d'énergie sur l'échantillon. En estimant un faisceau rectangulaire de $200 \times 500 \ \mu m^2$, la densité énergétique vaut alors entre 1 et 30 mJ/mm². Tous les résultats expérimentaux sont caractérisés par l'énergie des impulsions suite à cette incertitude.

Les impulsions de fluorescence rétrodiffusées, émises en réponse à chaque impulsion de pompe, sont collectées par L1 (ON estimée=0,17), filtrées spectralement par le miroir dichroïque passe-haut DM, atténuées (si nécessaire) par un ensemble de filtres DN, F2 (Kodak Wratten II) et focalisées sur un détecteur par une seconde lentille L2. La fluorescence est ensuite soit résolue temporellement par un photo-multiplicateur rapide (H10721-210, Hamamatsu, temps de réponse $\tau_{rt} = 0,57$ ns, sensibilité 0.1 A/W à $\lambda = 500$ nm) soit analysée par un spectromètre (USB 2000, OceanOptics, résolution optique à FWHM = 1,5 nm). Les deux systèmes de détection sont couplés avec une fibre (QP-200-2-UV-BX, OceanOptics, diamètre du coeur 200 μ m, adaptateur SMA905, NA = 0,22) par l'intermédiaire d'un objectif de focale f = 8 mm (NA = 0,55) L2.

4.3.2 Synchronisation

Un contrôle minutieux du nombre d'impulsions et de leur détection synchronisée est nécessaire pour des mesures quantitatives. Placé devant l'OPO, un obturateur mécanique assure la synchronisation des mesures (Fig 4.4) et empêche le photoblanchiment des Fluorophores de l'échantillon. Le contrôle de cet obturateur a été réalisé par les électroniciens du laboratoire INPHYNI. Son déclenchement est manuel mais asservi au signal TTL de synchronisation du laser Q-Switch (durée = 5 ms, chronogramme rouge). Le spectromètre ne peut pas être déclenché simultanément avec ce signal en raison du temps de retard intrinsèque du specromètre d'1 μ s et du retard de l'impulsion laser de 150 ns par rapport au front montant du signal TTL (Encart Impulsion Laser de la Fig 4.4). Pour garantir une acquisition correcte du spectre, après le déclenchement de l'obturateur le signal TTL (durée de 5 ms) est décalé de 20ms sur une fenêtre d'acquisition de 80 ms.

4.3.3 Montage des échantillons

200 μ l des échantillons fluorescents (FiTC à 2 ou 20 μ M, Jurkat CFSE ou GFP en milieu RPMI sans rouge de phénol - HEPES 10mM) additionnées ou pas de TiO₂-NPs sont placées dans une cellule de diamètre $d_c = 10$ mm, formée par une lame de microscope et une #1-lamelle espacées de $t_c = 2$ mm par la superposition de 4 × 500 μ m espaceurs (Cat. #70366-13, Electron Microscopy Sciences). Cette épaisseur permet de réduire le photoblanchiment [Valeur, 2003] dans le volume d'excitation grâce au mouvement de convection [Braun and Libchaber, 2002] dans le fluide (la cellule est aussi montée verticalement ce qui améliore la convection par gravité).

4.3.4 Optimisation de la fenêtre temporelle d'acquisition

Afin de limiter le photoblanchiment des fluorophores FITC utilisés [Song et al., 1995], le temps de demi-vie $t_{1/2}$ du FITC a été mesuré lors une exposition prolongée aux implusions de la pompe. L'objectif étant de déterminer le



FIGURE 4.4 – Chronogrammes d'acquisition des spectres de fluorescence (et impulsions de fluorescence) contrôlés par obturateur (chronogramme noir). Signal de synchronisation émis par le laser (chronogramme rouge). Contrôle du spectromètre (vert) et contrôle du retard d'impulsion laser (bleu).

nombre raisonnable d'impulsions pouvant être envoyées sur l'échantillon avant que le photoblanchiment n'influence la reproductibilité des mesures. Des séquences de spectres de fluorescence ont été collectées pour 1200 impulsions (2 minutes) pour chaque couple de paramètres expérimentaux (C_N, E_P) . Les mesures de photoblanchiment seront montrées dans la section 6.1.1. Nous observons une première pente de décroissance de la fluorescence suivie par une diminution plus lente qui atteint la moitié de sa valeur initiale après 1 minute environ. En raison de la première tendance rapide, nous avons limité la fenêtre temporelle à 10 impulsions (1s) afin de limiter l'influence du photoblanchimentsur les mesures. Ceci est valable pour toutes les couples de paramètres (C_N, E_P) . Toutes les mesures sont effectuées sur un nouvel échantillon qui sera éclairé par 10 impulsions avant d'être remplacé. Les mesures de photoblanchiment seront montrées dans la section 6.1.1.

4.4 Calibration

Les filtres F1 doivent être étalonnés pour établir une relation expérimentale entre l'énergie de pompe envoyée à l'échantillon et celle enregistrée par la photodiode P1. La procédure est réalisée en 2 étapes : (1) étalonnage de la densité optique expérimentale de chaque filtre F1 avec les impulsions de pompe à $\lambda_p = 490$ nm; (2) étalonnage de l'énergie atteignant l'échantillon par rapport à l'énergie mesurée à P1 en l'absence de filtres F1 (c'est-à-dire étalonnage de la totalité de la ligne expérimentale). La combinaison des deux étapes fournit l'énergie de pompe réelle envoyée à l'échantillon pour chaque impulsion mesurée par P1.

Un puissance-mètre (PE25BF-C, Ophir) est utilisé pour mesurer l'énergie des impulsions pour les 2 étapes. Chaque calibration est moyennée sur 100 impulsions.

DO Nominale	DO Experimentale		
0.30	0.430 ± 0.004		
0.50	0.638 ± 0.000		
0.70	0.810 ± 0.001		
0.80	0.942 ± 0.001		
0.90	1.076 ± 0.001		
1.10 = 0.30 + 0.80	1.369 ± 0.001		
1.50 = 0.70 + 0.80	1.739 ± 0.002		

TABLE 4.2 – Calibration des OD des filtres (Kodak Wratten II) F1 avec les OD determinées expérimentallement avec les pulses de pompe à $\lambda_p = 490$ nm.

Pour les filtres F1 (étape 1), les DO expérimentales sont reportées dans la colonne de droite du tableau 4.2 (avec l'écart-type) en correspondance avec la valeur de la DO nominale donnée par le fabricant.

Afin de comptabiliser toutes les pertes le long du trajet optique (étape 2), le puissance-mètre est positionné à la place de l'échantillon et l'énergie enregistrée $\langle E \rangle_{Energy-meter}$ (moyennée sur 100 impulsions à $\lambda_p = 490$ nm) est comparée à celle $\langle E \rangle_{P1}$ mesuré par P1 (aussi moyennée sur 100 impulsions) selon la relation suivante :

$$< E>_{P1} = rac{1}{100} \sum_{i=1}^{100} rac{A_i^{90\%}}{R_{P1}R_{osc.}} \,,$$
 (4.1)

où R_{P1} est la sensibilité de P1 (0,2 A/W à $\lambda_p = 490$ nm), R_{osc} est l'impédance d'entrée de l'oscilloscope (50 Ω) et $A_i^{90\%}$ est la surface de l'impulsion à 90% de son maximum (Unité : $V \cdot s$) calculé à partir des impulsions acquises individuellement.

Les résultats sont tracés sur la Fig 4.5 qui montre les moyennes expérimentales (Graphique du haut) avec leur écart-type sur les deux axes qui proviennent des fluctuations de l'énergie de pompe. Le graphique du bas représente l'écart (en pourcentage) entre la mesure réelle et le meilleur ajustement linéaire tracé dans le graphique supérieur.

Cette figure de calibration (Fig 4.5) donne aussi les fluctuations de l'énergie des impulsions arrivant sur l'échantillon comme une fonction du signal (fluctuant) mesuré sur P1 selon la formule suivante :

$$< E>_{Energy-Meter} = 10^{-OD} \cdot A \cdot < E>_{P1},$$
 (4.2)

où A représente le coefficient de la pente de la courbe affine.

4.5 Evaluation des paramètres des signaux d'amplification

Les analyses des signaux d'amplification ont suivi la procédure suivante :



FIGURE 4.5 – Courbe de calibration de l'énergie arrivant à l'échantillon en fonction de l'énergie mesurée par la photodiode P1 de référence pour différentes combinaisons de filtres neutres F1. Toutes les mesures ont été moyennées sur 100 impulsions.

- Pour toutes les combinaisons de (C_F, C_N), les spectres de fluorescence ont été mesurés pour six énergies de pompe E_P = (0,15; 0,30; 0,60; 1,20; 2,00; 3,00) mJ dont les valeurs ont été ajustées sur la base de la calibration (Fig. 4.5) et les références mesurées par P1 (Fig. 4.3).
- 2. Les mesures ont été répétées sur M = 6 échantillons indépendants pour un ensemble de paramètres (C_F, C_N, E_P) .
- 3. Pour chaque énergie et échantillon, N = 10 spectres successifs de fluorescence ont été obtenus sur 10 impulsions lasers (1s d'acquisition au total, Sec 4.3.4).
- 4. Pour chaque énergie et échantillon, la moyenne \overline{X} et son écart-type σ_X ont été effectués sur les 10 quantités mesurées $X_i =$ (amplification de fluorescence, gain, temps de réponse et largeur à mi-hauteur (FWHM) des spectres mesurés).
- 5. Pour chaque quantité mesurée, une moyenne pondérée \overline{Y} et son écart-type σ_Y ont ensuite été effectués sur les 6 échantillons indépendants :

$$\bar{Y} = \frac{1}{M} \frac{\sum_{n=1}^{M} \bar{X_n} / \sigma_{X_n^2}}{\sum_{n=1}^{M} 1 / \sigma_{X_n^2}},$$
(4.3)

$$\sigma_Y = \frac{1}{M-1} \frac{1}{\sum_{n=1}^M 1/\sigma_{X_n^2}},$$
(4.4)

où $\overline{X_N}$ représente toutes les moyennes mesurées sur N = 10, σ_{XN} son écart-type et M le nombre d'échantillons préparés (M = 6)

4.6 Evaluation de la dispersion des TiO₂-NPs en solution

Pour déterminer la présence des agrégats et connaître ainsi la stabilité colloïdale des TiO₂-NPs dans divers milieux, les protocoles suivants de mesures permettent une évaluation de la dispersion des nanoparticules : le rayon hydrodynamique et sa distribution par DLS (Sec. 3.3.1), le potentiel ζ (Sec. 3.3.2), la cinétique de sédimentation par spectroscopie d'absorption (Sec. 3.3.3). Comme la caractérisation de la stabilisation colloïdale est complexe, il est nécessaire d'avoir des mesures complémentaires pour croiser et comparer les résultats. Tous les résultats sur la stabilisation sont représentés au chapitre 5.

Mesures de DLS

Les mesures de DLS ont été acquises avec l'appareil Dynapro Protein et analysées avec le logiciel Dynamic V5 (Protein Solution). Les temps d'intégration ont été de 10 secondes entre deux mesures pour une durée totale d'acquisition de 120s soit un total de 12 mesures pour chaque échantillon. Avant l'acquisition des mesures, les échantillons ont été dilués à une concentration de 10 μ g/ml de TiO2-NPs pour éviter la saturation de l'appareil. Pour une même condition d'expérience, chaque acquisition a été réalisée en trois exemplaires.

Chaque condition a été analysée et caractérisée par le rayon hydrodynamique R_h moyen, son écart-type σ_h (polydispersité) et la distribution des différents rayons des nanoparticules classés selon l'intensité (%) de la lumière diffusée. Durant les analyses, on a fixé arbitrairement un seuil maximal des rayons d'intérêt $(R_h + \sigma_h)$ pour garder les conditions qui assurent une forte diffusion isotrope : $R_h + \sigma_h \leq 300$ nm (justification du seuil aux Figs. 4.6(a) et 4.6(b)) dans lesquelles les intensités de diffusion de toutes les NPs de rayon inférieur à ce seuil sont sommées. Les résultats sont représentés sous la forme d'histogrammes cumulés du % d'intensité I_{DLS} de diffusion de chaque groupe de taille en fonction des conditions. On tient à préciser que les histogrammes donnent seulement une information sur la présence des agrégats $(I_{DLS} << 100\%$ montre une forte concentration probable d'agrégats dans la solution) mais elles ne donnent aucunement des informations sur le rayon R_h excepté que $R_h \leq 300$ nm. Il faut alors compléter ces résultats par une analyse monomodale pour donner le rayon hydrodynamique R_h moyen et sa polydispersité P_d moyenne à partir de l'acquisition des 12 mesures. La polydispersité P_d représente la dispersité des populations de TiO₂-NPs de différentes tailles dans la solution. Elle représente l'écart-type du rayon hydrodynamique moyen des nanoparticules.

Mesure du potentiel ζ

Le point isoélectrique (IEP) est obtenu en mesurant le potentiel ζ des TiO₂-NPs en solution en fonction du pH. Les mesures ont été effectuées avec le Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Les TiO2-NPs ont été diluées à une concentration de 1 mg/ml de TiO₂-NPs pour une gamme de pHs ajustés entre 2 et 13. Chaque mesure a été effectuée en triplicata et une courbe de potentiel ζ moyenne a été tracée en fonction du pH.



FIGURE 4.6 – Justification du seuil $R_h \leq 300$ nm par comparaison des diagrammes angulaires de diffusion (réalisé sous MiePlot) des TiO₂-NPs pour un rayon de 300 nm (a) et 400 nm (b) : 300 nm est la limite où la diffusion commence à devenir anisotrope avec une diminution de son amplitude globale.

Cinétique de sédimentation

La sédimentation des TiO₂-NPs a été évaluée par la mesure de la Densité Optique (DO) par spectrophotométrie d'absorption à 500 nm (spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS MONACO) en prélevant 1 ml de surnageant des solutions de TiO₂-NPs stabilisées en BSA et préparées dans différents milieux : H₂O mQ, Tampon H, PBS, DPSS, DMEM et RPMI. Les mesures cinétique ont été effectuées à t=0, 15, 30, 60, 120, et 300 min. Chaque mesure a été effectuée en triplicata pour chaque condition d'expérience.

4.7 Evaluation de la cytotoxicité des TiO₂-NPs

Notre objectif est de tendre vers une amplification de la fluorescence dans des conditions biocompatibles. En conséquence, il était nécessaire d'évaluer la cytotoxicité des TiO_2 -NPs sur le modèle cellulaire Jurkat utilisé pendant le temps estimé des expérimentations (~ 7h). Les tests ont donc été menés en l'absence de TiO_2 -NPs et aux concentrations de 1,56; 3,12 et 6,25 mg/ml stabilités dans 60% de BSA en milieu RPMI.

La cytotoxicité a été évaluée en mesurant l'activité mitochondriale via le Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide MTT (Sigma Aldrich, M2128). Le MTT est réduit en formazan par le Succinate déshydrogénase de la chaine respiratoire des mitochondries. 5×10^5 cellules Jurkat ont été réparties par puit dans du RPMI sans rouge de phénol sur des plaques à 96 puits. Une cinétique d'incubation des cellules est effectuée avec différentes concentrations de (i) TiO₂-NPs (de 1,56 à 6,25 mg/ml) préalablement stabilisées avec la BSA, (ii) de BSA seule (de 0,94 à 15 mg/ml) ou (iii) de SVF (10%v) à 37°C, entre 0 et 5h en arrêtant les incubations toutes les heures par ajout de MTT (stock à 5mg/ml préparé dans le PBS) à une concentration finale de 500 μ g/ml, laissé en présence des cellules pendant 2 h à 37°C. Les plaques 96 puits sont centrifugées, le surnageant retiré, les puits remplis d'isopropanol-DMSO (1:1) afin de solubiliser le Formazan. Les microplaques sont ensuite centrifugées pour culoter les TiO₂-NPs et 100 μ l de surnageant de chaque puit est récupéré pour mesurer la DO du Formazan à 550 nm (MultisKan FC (Thermo Scientific)). Les pourcentages moyens d'activité cellulaire sont calculés à partir de la Densité Optique (DO) moyenne de chaque condition et grâce à la formule suivante :

% de l'activité cellulaire =
$$100 \times \frac{DO_{echantillon} - DO_{blanc}}{DO_{controle} - DO_{blanc}}$$
 (4.5)

Chapitre 5

Résultats 1 : Stabilisation et biocompatibilité des TiO₂-NPs

Ce chapitre présente les résultats de stabilisation colloïdale des TiO₂-NPs dans des conditions proches des conditions physiologiques (pH \sim 7 et milieux de culture cellulaire). Cette stabilisation colloïdale est importante pour la suite du projet car elle permet de garantir toutes les conditions nécessaires à une forte diffusion radiative multiple et isotrope conduisant à une amplification stimulée de la fluorescence (Chap. 2). La mise en solution de TiO₂-NPs directement dans un milieu ionique provoque l'aggrégation. Comme mentionné dans le chapitre 3, la condition pour obtenir une suspension stable et dispersée dans ces tampons nécessite une étape d'incubation des nanoparticules avec des protéines, dans cette étude la BSA. Toutes les études et données ont été mesurées en triplicata sur 6 préparations indépendantes.

La section 5.1 résume la caractérisation des TiO_2 -NPs seules dans H_2O mQ. La section 5.2 présente les résultats des expériences d'incubation (pH, rapport massique BSA/TiO₂, temps d'incubation) pour obtenir une stabilisation colloïdale par adsorption de BSA, validée dans un tampon ionique (PBS). Les sections 5.3.1 et 5.3.2 présentent respectivement les optimisations effectuées pour déterminer la quantité de BSA et le temps d'incubation pour obtenir une suspension colloïdale dans différents tampons et milieux de culture cellulaire. Enfin la section 5.4 résume les résultats sur la cytotoxicité des TiO₂-NPs sur un lignée de cellules Jurkat.

5.1 Caractérisation des TiO₂-NPs dans l'H₂OmQ

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules sont dépendantes du processus de fabrication et peuvent varier d'un fournisseur à l'autre. Selon les spécifications du fabricant [NanoAmor,], les TiO₂-NPs ont une forme sphérique sans porosité avec un diamètre moyen $2 \times R_N$ entre 30 nm et 50 nm quand elles sont livrées dans une suspension liquide (H₂O, CAS#7732-18-5). Une première étape a consisté à caractériser ces TiO₂-NPs dans un milieu H₂O mQ (Sec. 4.2.1) en fonction du pH. Le profil du potentiel ζ a été représenté pour déterminer et repérer le point isoélectrique et la gamme de pHs où les nanoparticules étaient instables ($|\zeta| < 30$ mV) avec une forte probabilité de former des agrégats. En outre, un milieu non-électrolytique ultra-pur a aussi permis de vérifier et caractériser le rayon "primaire" des nanoparticules quand ces dernières sont stabilisés dans une

solution sans ions, molécules et impuretés.

La figure 5.1(a) montre ainsi ce potentiel ζ en fonction du pH. La ligne horizontale rouge marque la limite de stabilité des nanoparticules et indique que la suspension est stable quand le pH \geq 4 avec 30 mV $\leq |\zeta| \leq$ 50 mV tandis que les agrégats se forment aux pHs < 4.

Les figures 5.1(b) et 5.1(c) corroborent les informations fournies par le potentiel ζ et accréditent l'affirmation précédente. La figure 5.1(b) donne le rayon hydrodynamique moyen R_h tandis que la figure 5.1(c) représente la fraction (%) d'intensité diffusée I_{DLS} par des petites nanoparticules ($R_h \leq 300$ nm) présentes dans la suspension : deux grandeurs mesurées par DLS en fonction du pH. A un pH < 4, les rayons hydrodynamiques moyens R_h et leur dispersion (écart-type) associée possèdent des valeurs élevées ($\sim 100 - 800$ nm) indiquant la présence d'agrégats tandis que les nanoparticules sont stabilisées à un pH ≥ 4 avec un $R_h \approx 60$ nm associé à une faible dispersion avec une présence à 100% (Fig. 5.1(c)) dans le milieu.



FIGURE 5.1 – Caractérisation des TiO₂-NPs dans H₂O mQ : (a) potentiel ζ , (b) rayon hydrodynamique moyen R_h , (c) fraction (%) d'intensité diffusée I_{DLS} par des petites nanoparticules ($R_h \leq 300$ nm) en fonction du pH. (d) Courbes d'autocorrélation $g^{(2)}$ en fonction du retard (délai) temporel τ_{DLS} (voir le principe de la DLS à la Sec. 3.3.1).

La figure 5.1(d) montre les courbes d'autocorrélation $g^{(2)}$ en fonction du retard (délai) temporel τ_{DLS} (voir principe de la DLS à la Sec. 3.3.1) à partir desquelles les rayons hydrodynamiques sont calculés. Les petites nanoparticules $(R_h \approx 60 \text{ nm})$ présentent un délai plus court $(\tau_{DLS} \approx 1 \text{ ms})$ que les grandes $(R_h > 350 \text{ nm})$ avec un délai $\tau_{DLS} \approx 10 \text{ ms}$ observé entre $1 \leq \text{pH} \leq 3$. Les petites nanoparticules se déplacent rapidement causant une fluctuation rapide de I_{DLS} (délais courts) tandis que les agrégats ont une mobilité lente amplifiée par leur masse $(4,23 \times 10^3 \text{ kg/m}^3)$ causant une fluctuation lente de I_{DLS} (délais longs). Le coefficient de diffusion D déduit de $g^{(2)}$ (Sec. 3.3.1) possède alors la même valeur aux pHs ≥ 4 donnant un $R_h \approx 60$ nm avec une faible dispersion. Ces résultats sont bien compatibles avec les informations fournies par les Figs (5.1(a) - 5.1(c)).

En conclusion, dans l'H₂OmQ, les TiO₂-NPs se présentent sous forme d'une solution colloïdale tant que le pH ≥ 4 . Le rayon moyen ($R_h \approx 60$ nm) est 2,5 ou 4 fois plus élevé par rapport au rayon spécifié (30 nm $\leq 2 \times R_N \leq 50$ nm) par le fabricant. Cet écart pourrait être dû à la méthodologie de mesure, la DLS mesurant un rayon hydrodynamique : pour une particule chargée la sphère considérée contient la particule entourée de sa couche diffuse, ce qui entraine une surestimation par rapport à une mesure de taille par microscopie. Malgré cette taille plus élevée, elles diffuseront et distribueront la lumière de manière homogène et isotrope en solution avec une forte amplitude (Fig. 5.2) assurant ainsi leur rôle de diffuseurs passifs. Le résultat $R_h = 60$ nm sera donc une valeur de référence pour estimer la stabilité colloïdale dans la suite du projet.



FIGURE 5.2 – Diagramme angulaire de diffusion (réalisé sous MiePlot) des TiO_2 -NPs obtenu pour un rayon de 60 nm : diffusion isotrope avec une forte amplitude.

5.2 Stabilisation des TiO₂-NPs en tampon PBS

Il est impossible de diluer directement les TiO₂-NPs dans un tampon biologique ou un milieu cellulaire sans créer une agrégation. Afin de la prévenir, des tests de fonctionnalisation des TiO₂-NPs avec de la BSA (pH, rapport massique BSA/TiO₂, temps d'incubation) ont été effectués pour valider une stabilisation colloïdale dans un milieu ionique (PBS) à pH ~ 7. Le PBS a été choisi pour ces expérimentations préliminaires car c'est un tampon ne contenant que des ions monovalents, donc avec une force ionique faible $F_i \sim 120$ mM. Selon [Ji et al., 2010], il est supposé que la BSA sera mieux adsorbée sur les TiO₂-NPs à son point isoélectrique (pH ~ 5) et que l'agrégation sera évitée après une incubation à pH5. Trois paramètres ont été testés : pH (5 et 7), temps d'incubation ($T_i = 0$ h et 16h) et rapport massique BSA/TiO₂ (0 et 12%). Toutes les incubations ont été préparées dans l'H₂OmQ Dans la sous-section 5.2.1, une incubation a été préparée aux pHs ~ 5 et 7 pendant $T_i = 16h$. Après 16h, seule la solution acide (pH5) a été ensuite réajustée au pH7. Dans la sous-section 5.2.2, une incubation a été préparée au pH ~ 5 pendant $T_i = 0h$ ou 16h puis réajustée au pH7. Ces solutions de BSA/TiO₂ (0 et 12%) sont ensuite diluées dans le PBS ($C_N = 1 \text{ mg/ml}$) et la stabilité de la dispersion est évaluée entre $T_{exp} = 0h$ et 5h. Cette démarche est récapitulée dans la section 4.6. Tous les résultats sont comparés par rapport aux valeurs de la solution contrôle (H₂O mQ avec $R_h = 60$ nm).

5.2.1 Influence du pH d'incubation

La figure 5.3 dresse et compare le profil du potentiel ζ de la BSA (60%) et celui du TiO₂ (1 mg/ml) en fonction du pH dans une solution d'H₂O mQ. Le point isoélectrique de la BSA vaut approximativement 5 : cette valeur est similaire à celle de la littérature scientifique [Ji et al., 2010].



FIGURE 5.3 – Potentiel ζ en fonction du pH pour la BSA (Violette) et les TiO₂-NPs (Bleue).

Lorsque les TiO₂-NPs sont directement incubées en présence de BSA à 12% à pH7, I_{DLS} des TiO₂-NPs de taille $R_h \leq 300$ nm devient faible (Fig. 5.4(b)) après $T_{exp} = 5$ h dans le tampon PBS, par rapport à la condition sans BSA. Néanmoins, les mesures de densité optique (DO) (Fig. 5.4(d)) montrent une sédimentation rapide comparée au contrôle (H₂O mQ) quelque soit le rapport BSA/TiO₂.

Pour une incubation à pH5 réajustée à pH7, I_{DLS} des fractions $R_h \leq 300$ nm reste élevée (Fig. 5.4(a)) et la dispersion semble maintenue en tampon PBS pour le rapport BSA/TiO₂ = 12%. Ce résultat se confirme aussi dans les courbes de sédimentation (Fig. 5.4(b)) avec une DO élevée (aucune sédimentation) pour les solutions avec un rapport BSA/TiO₂ = 12%. Ces figures 5.5(a) et 5.5(c) sont reproduites pour la sous-section 5.2.2.



FIGURE 5.4 – Influence du pH de l'incubation pour $BSA/TiO_2 = 0\%$ et 12% pendant 16h : fraction de I_{DLS} et cinétique de sédimentation (a) - (c) pH5 réajusté à pH7 et (b) - (d) pH7. Résultats $T_{exp} = 0h$ - 5h et contrôlés avec H_2O mQ.

5.2.2 Influence de la durée d'incubation

En l'absence d'incubation $(T_i = 0h)$, la population de TiO₂-NPs $(R_h \leq 300 \text{ nm})$ reste minoritaire (Fig. 5.5(b)) quelque soit le rapport BSA/TiO₂ indiquant la présence d'agrégats. Ceci est confirmé par la sédimentation observée à la Fig. 5.5(d).

En conclusion, l'incubation des TiO_2 -NPs dans la BSA à 12% à pH5 pendant 16h suivi d'un ajustement du pH à 7, permet de maintenir une suspension colloïdale des TiO_2 -NPs lorsque cet incubat est dilué dans le tampon PBS.

5.2.3 Test avec une forte concentration de TiO2 et FITC

Les résultats précédents ont été obtenus avec une concentration $C_N = 1 \text{ mg/ml}$ de TiO₂-NPs sans FITC. Afin de valider que la stabilité colloïdale sera maintenue dans les futures conditions expérimentales, une concentration extrême $C_N = 25$ mg/ml de TiO₂-NPs en présence de concentration $C_F = 200 \ \mu\text{M}$ de FITC a été testée. Ces concentrations correspondent aux maxima testés pour l'obtention d'une amplification. Les conditions d'incubation restent similaires : 12% de BSA, incubation à pH5 pendant 16h puis réajustement à pH7.

La figure 5.6 présente I_{DLS} des fractions $R_h \leq 300$ nm des solutions de TiO₂-NPs diluées dans le mélange PBS/FITC : (i) sans stabilisation par incubation avec la BSA, (ii) après incubation avec la BSA à 12%. Le contrôle étant une dilution des TiO₂-NPs dans une solution de FITC dans l'H₂O mQ.

La mesure de DLS à T_{exp} = 5h, montre une chute de I_{DLS} des fractions R_h \leq

5.3. STABILISATION DES TIO₂-NPS DANS DES TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE



FIGURE 5.5 – Influence du temps d'incubation pour BSA/TiO₂ = 0% et 12% à pH5 : fraction de I_{DLS} et cinétique de sédimentation (a) - (c) $T_i = 16h$ et (b) - (d) $T_i = 0h$. Résultats testés à $T_{exp} = 0h$ - 5h et contrôlés avec H₂O mQ.

300 nm de 100% à 60% avec une forte dispersité des résultats (30% après 5h) lorsque les TiO₂-NPs ne sont pas incubées préalablement avec la BSA. Ceci indique la présence d'agrégats, tandis que les TiO₂-NPs restent en suspension lorsqu'elles son préincubées avec la BSA à 12%. En comparaison avec les précédentes figures (Sec 5.2.1 et 5.2.2), ces résultats montrent que le FITC n'a aucune incidence sur le complexe BSA/TiO₂ et la BSA est toujours bien adsorbé aux TiO₂-NPs pour une préparation avec $C_N = 25$ mg/ml tant que le rapport BSA/TiO₂ = 12% est respecté.

5.3 Stabilisation des TiO₂-NPs dans des Tampons et milieux de culture cellulaire

La section 5.2 a permis de définir des conditions préliminaires (incubation $BSA/TiO_2 = 12\%$ à pH ~ 5 pendant 16h) pour obtenir une stabilité colloïdale par protection de la BSA dans un tampon à faible force ionique (PBS). Afin d'étendre ce mode opératoire à d'autres tampons (DPBS et tampon H) et milieux (DMEM et RPMI) il a fallu déterminer le meilleur rapport BSA/TiO₂ en fonction de ces milieux puis optimiser les temps d'incubation.

5.3.1 Influence de la quantité de BSA

Les TiO₂-NPs sont incubées dans un rapport massique de 0; 12; 24; 48; 60 et 100% de BSA à pH5 pendant 16h puis dilués dans les différents tampons et milieux de culture : H_2O mQ (contrôle), PBS, DPBS, Tampon H, DMEM et RPMI. La



FIGURE 5.6 – Distribution des TiO₂-NPs (25 mg/ml) dans une solution PBS/FITC (200 μ M) après une incubation avec 12% de BSA à pH5 pendant 16h. Résultats testés à $T_{exp} = 0h$ - 5h et contrôlés avec H₂O mQ/FITC.

figure 5.7 présente le rayon hydrodynamique R_h moyen des TiO₂-NPs en fonction du rapport BSA/TiO₂. Dans le PBS, les TiO₂-NPs sont stables à partir de BSA/TiO₂ = 12%, puis à partir de BSA/TiO₂ = 48% pour les autres milieux. Cette différence peut s'expliquer par la surface couverte par la BSA sur les TiO₂-NPs ainsi que la force ionique F_i des solvants testés. Il faut seulement 12% de BSA pour protéger la surface de TiO₂-NP dans le PBS qui contient une quantité faible d'ions monovalents ($F_i \sim 120$ mM) quand il en faut au moins 36 % supplémentaires pour les assurer une protection stérique dans le tampon H qui contient 2 mM d'ions divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ ($F_i \sim 168$ mM).



FIGURE 5.7 – Rayon hydrodynamique R_h moyen en fonction de BSA/TiO₂ pour différents tampons et milieux de culture cellulaire. Incubation réalisée à pH5 pendant 16h dans H₂O mQ.

5.3.2 Influence du temps d'incubation

Les résultats précédents ont montré qu'il était possible d'étudier l'influence du temps d'incubation sur le PBS et DPBS, ces deux tampons nécessitant des stabilisations assez différentes et représentatives, avec respectivement 24 et 60% de BSA. Des TiO_2 -NPs ont été incubées 0h, 1h, 3h et 16h dans (i) H₂O mQ sans BSA (ii) en BSA/TiO₂ = 24% puis diluées en PBS (iii) en BSA/TiO₂ = 60% puis diluées en DPBS. La figure 5.8 présente le rayon hydrodynamique R_h moyen des TiO_2 -NPs en fonction du temps d'incubation pour ces 3 conditions. Les résultats montrent que les durées d'incubation peuvent être réduites fortement.Par la suite, 1h d'incubation en 24% BSA sera suffisante pour travailler en PBS et 3h en 60% BSA dans n'importe quel tampon ou milieu, permettant de gagner en efficacité.



FIGURE 5.8 – Rayon hydrodynamique R_h moyen en fonction du temps d'incubation en BSA à pH5 dans H₂O mQ.

5.4 Evaluation de la biocompatibilité des TiO₂-NP

La cytotoxicité a été évaluée par le test d'activité enzymatique mitochondriale de réduction du MTT en Formazan, considéré comme une méthode standard pour mesurer la viabilité cellulaire, la toxicité des médicaments (Kumar et al., 2018) ou celle des nanoparticules (Ghosh et al., 2013; Perni et al., 2018; Rekha et Anila, 2019). Les résultats sont représentés par des histogrammes de l'activité cellulaire en fonction de la concentration $C_N = (0; 1,56; 3,12; 6,25)$ mg/ml de TiO₂-NPs incubées de 2h à 7h.

Les résultats montrent que plus de 50% de l'activité cellulaire est conservée entre 2 et 7 heures (Fig. 5.9) pour des fortes concentrations (1,56 à 6,25 mg/ml) de TiO₂-NPs (concentrations très supérieures par rapport à la littérature scientifique) stabilisées avec 60% de BSA. Les résultats semblent indiquer une réduction de la viabilité proportionnelle aux [TiO₂-NP/BSA 60%] (Fig. 5.9). (Khlusov et al.) montre que l'augmentation de la charge surfacique des TiO₂-NPs augmente la cytotoxicité des cellules Jurkats. Dans cette expérience la cinétique débute à 2 h (jusqu'à 7h) car le MTT est incubé 2 heures avec les cellules, toujours en présence de TiO₂-NPs, ces



FIGURE 5.9 – Activité mitochondriale des cellules Jurkat en fonction du temps d'incubation (\geq 2h) en présence (ou absence) de TiO₂-NPs : Activité cellulaire pour $C_N = 0$ mg/ml (Bleu); 1,56 mg/ml (Rouge); 3,12 mg/ml (Vert); 6,25 mg/ml (Jaune). Incubation du MTT pendant 2h.

dernières ne pouvant être retirées du milieu. Au regard de ces resultats il est possible d'effectuer des mesures d'amplification sur des cellules en présence de TiO_2 -NPs pendant 2 heures, en conservant plus de 75% de viabilité cellulaire (Fig. 5.9 : t=2h). Au regard de ces résultats, la concentration maximale de TiO2-NP a été limitée à 6,25 mg/ml dans les futures expériences pour conserver jusqu'à 80% d'activité cellulaire pendant 2h.

Chapitre 6

Résultats 2 : Amplification de la fluorescence

Ce chapitre présente l'ensemble des résultats d'amplification de la fluorescence par émission stimulée via la diffusion multiple. Comme le projet est exploratoire, ce chapitre décrit le cheminement progressif depuis les étapes de validation du processus dans une solution homogène de fluorophores vers un échantillon cellulaire pour in fine proposer une méthodologie d'amplification biocompatible. La section 6.1 représente la validation de l'approche dans une suspension colloïdale et homogène de TiO₂-NPs dans une solution de FITC dans H_2O mQ à pH ~ 7 (stabilité des NPs, voir résultats de la Sec. 5.1). Sa sous-section 6.1.2 valide et étudie une première amplification de la fluorescence à une concentration de départ $C_F = 200 \ \mu M$ de FITC, étendue dans la sous-section 6.1.3 à de plus faibles concentrations $C_F = 20$ et 2 μ M de FITC, proches de celles utilisées en biologie cellulaire. La sous-section 6.1.4 présente les résultats dans $H_2O~mQ$ avec 60% BSA (stabilité des NPs dans RPMI voir résultats de la Sec. 5.3) puis dans un milieu de culture cellulaire (RPMI). La section 6.2 termine cette étude par des mesures d'amplification dans un échantillon de cellules en suspension marquées au CFSE. Au préalable, la caractérisation du photoblanchiment du FITC (Sec.6.1.1) et des marqueurs cellulaires (Sec.6.2.1) a été réalisée pour valider la fenêtre temporelle d'acquisition des mesures.

Dans la sous-section 6.1.2, les paramètres d'amplification ont été discutés en profondeur à la concentration $C_F = 200 \ \mu g/ml$ de FITC. Une simple analyse descriptive a ensuite été effectuée sur l'évolution des paramètres pour les autres concentrations et les marqueurs cellulaires car ces études ont plutôt été exploratoires pour atteindre *in fine* une validation de l'amplification dans un système cellulaire. Il faudra alors relativiser l'importance de ces mesures.

Les expériences et les mesures ont été réalisées sur le banc optique décrit dans la section 4.3 suivant la procédure de synchronisation décrite dans la section 4.3.2. Les sections 4.1 et 4.2 résument les choix effectués, les concentrations de travail et les préparations des échantillons. Toutes les valeurs de longueurs d'onde sont données dans le vide tandis que les tampons et les milieux de culture cellulaire testés ont un indice de réfraction proche de celui de l'eau ($n \approx 1,33$).

6.1 Amplification dans une solution homogène de FITC

Dans un premier temps, l'amplification de la fluorescence dans une solution de FITC ($C_F = 2$; 20; 200 μ M) a été évaluée dans un milieu H₂O mQ non-électrolytique (Sec. 4.2.1) à pH ~ 7 (condition physiologique des échantillons biologiques et stabilité des TiO₂-NPs voir Sec. 5.1) en présence ou non de TiO₂-NPs ($C_N = 0$; 1,56; 3,12; 6,25 mg/ml) sans BSA aux énergies de pompe $E_P \sim [0,10 - 3,00]$ mJ à la longueur d'onde $\lambda_P = 490$ nm. Ces premiers échantillons constituent une bonne approche pour visualiser, valider et étudier une première fois le mécanisme d'amplification par émission stimulée via la diffusion multiple sur un ensemble de paramètres (C_F, C_N, E_P) car les molécules de FITC (gain) sont réparties de manière homogènes. La présence d'une amplification est évaluée (intensité, gain, FWHM, temps de réponse) pour la concentration $C_F = 200 \ \mu$ M de FITC (concentration présentant une intensité maximale de fluorescence voir Fig. 4.1) dans la section 4.2.6 avant de tester les concentrations $C_F = 20 \ et 2 \ \mu$ M à la section 6.1.3.

Le photoblanchiment a d'abord été caractérisé pour optimiser le nombre d'impulsions à envoyer sur les échantillons afin : (i) d'éviter une perte de fluorescence, (ii) estimer correctement le gain d'amplification et (iii) améliorer la précision de sa mesure sur une moyenne en envoyant plusieurs impulsions [Polson and Vardeny, 2004]. Le photoblanchiment, l'intensité et le gain ont été déterminés par l'intensité maximale I_F de fluorescence ($\lambda_F \sim 520$ nm) de chaque spectre émis pendant toutes les 100 ms et acquis pendant la durée de l'expérience.

6.1.1 Caractérisation du photoblanchiment

Le photoblanchiment a été caractérisé en excitant en continu les échantillons par une série d'impulsions pendant 2 min (1200 impulsions). Les pics spectraux I_F ont été normalisés par rapport au pic spectral maximal sur l'intervalle de mesures. La décroissance de l'intensité I_F normalisée a été étudiée en fonction du temps (mesurée pour 120s) à la fois en fonction de la concentration C_F de FITC, de la concentration C_N en NPs et de l'énergie E_P de pompe. La stabilité des marquages fluorescents est caractérisée par le temps de demi-vie $t_{1/2}$ (abscisse prise à 50% de I_F).

À une concentration de NPs constante $(C_N = 6, 25mg/ml)$ et une énergie de pompe constant $(E_P = 3,00 \text{ mJ})$, on trouve une décroissance monotone pour les deux concentrations plus faibles $(C_F = 2 \text{ et } 20 \ \mu\text{M})$ de FITC (Fig. 6.1, où l'échelle temporelle est agrandie entre $(0 \le t \le 30)$ s) pour une meilleure clarté visuelle). À la concentration maximale $(C_F = 200 \ \mu\text{g/ml})$, on trouve une décroissance rapide avec une récupération du signal après environs 10s (c.à.d. 100 impulsions). La remontée n'a pas été étudiée en détail car elle se trouve dans une région où l'intensité de fluorescence est fortement réduite, donc inutilisable pour les comparaisons systématiques nécessaires à ce travail. La figure illustre bien le choix annoncé à la section 4.3.4 d'utiliser seulement les 10 premièresimpulsions (c.à.d. durée 1s), car seulement parmi les premiers cycles de fluorescence on pourra avoir un rendement suffisamment constant. On remarquera que pour les impulsions maximales (3 mJ), comme celles de la Fig. 6.1, à forte concentration ($C_F = 200 \ \mu g/ml$), des effets systématiques engendreront dans les mesures des barres d'erreur plus importantes.



FIGURE 6.1 – Courbes de photoblanchiment à $C_N = 6,25 \text{ mg/ml}, E_P \sim 3 \text{ mJ}, C_F = (2; 20; 200 \ \mu\text{M})$. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

Selon la figure 6.2, les courbes présentent aussi une première décroissance rapide pendant les premières impulsions (I_F passe de 100% à 50%) suivie par une décroissance plus lente quand au moins un des paramètres (C_F, C_N, E_P) est élevé (excepté à $C_F = 2 \ \mu$ M) (Figs. 6.2(a) et 6.2(a')). Cette décroissance multi-exponentielle est observée pour $C_F = 200 \ \mu$ M quelque soit E_P (Fig. 6.2(c)) ou C_N (Fig. 6.2(c')) puis $C_F = 20 \ \mu$ M à $E_P \sim 3,00 \ m$ J (Figs. 6.2(b)) et $C_N = 6,25 \ mg/m$ l (Fig. 6.2(b')). Dans ces cas, les temps $t_{1/2}$ sont compris entre 2 et 10 secondes, c'est-à-dire entre 20 et 100 impulsions.

En conclusion, on peut constater que les temps $t_{1/2}$ de photoblanchiment sont assez longs pour réaliser des statistiques avec un nombre significatif de spectres de fluorescence. Par la suite, les spectres ont été acquis sur une fenêtre temporelle de 10 impulsions pendant laquelle I_F diminue environ de 5 à 40% maximum. Ceci va permettre de bénéficier d' I_F grandes avec une bonne statistique pour chaque expérience réalisée afin de caractériser au mieux les effets de l'amplification.

6.1.2 Amplification de la fluorescence : FITC à $C_F = 200 \ \mu M$

Influence du TiO₂ sur l'intensité de fluorescence

Pour une énergie E_P fixe, une augmentation de C_N de TiO₂-NPs produit une augmentation de la fluorescence. La figure 6.3(a) montre une croissance monotone des spectres pour une énergie $E_P \sim 3$ mJ. A son intensité maximale, la longueur



FIGURE 6.2 – Courbes de photoblanchiment (a - c) à $C_N = 6,25 \text{ mg/ml}, E_P \sim (0,10; 1,00; 3,00) \text{ mJ}$; (a' - c') $E_P \sim 3,00 \text{ mJ}, C_N = (0; 1,56; 3,12; 6,25) \text{ mg/ml}$. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

d'onde est décalée vers le rouge quand la concentration des NPs augmente, passant de $\lambda_F = 517$ nm à $C_N = 0$ mg/ml à $\lambda_F = 522$ nm à $C_N = 6,25$ mg/ml. Ce décalage peut être interprété par l'augmentation du parcours optique effectif de la fluorescence causée par la diffusion multiple et la densité élevée des diffuseurs dans la solution augmentant ainsi la probabilité de réabsorption par une autre molécule de FITC.



FIGURE 6.3 – $C_F = 200 \ \mu M$ (a) Spectres de fluorescence à une énergie nominale de pompe $E_P \sim 3 \text{ mJ}$; (b) Maximum de l'intensité de fluorescence en fonction de l'énergie de pompe E_P pour $C_N = 0$ (Bleue non visible); 1,56 (Rouge); 3,12 (Verte); 6,25 (Noire) mg /ml. Encarts : Spectre de fluorescence (a) ou intensité (b) à $C_N = 0$ mg/ml sur une échelle aggrandie. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

La figure 6.3(b) montre une amplification nette en fonction de E_P pour toutes les concentrations C_N induite par la diffusion multiple des NPs. En l'abscence de TiO₂-NPs, la dépendance énergétique de l'intensité de fluorescence est bien visible sur l'insert de la figure 6.3(b) à une échelle aggrandie. La croissance superlinéaire de la fluorescence reflète une amplification induite par de l'émission stimulée.

Influence du TiO₂ sur les spectres de fluorescence

Parallèlement à l'amplification, un rétrécissement spectral est aussi observé dans les spectres de fluorescence collectés. Ce rétrécissement est illustré par la forme des spectres normalisés (Fig 6.4(a)) pour différentes concentrations de TiO₂-NPs mesurés à une énergie nominale $E_P \sim 3$ mJ. La figure 6.4(b) montre l'évolution de la FWHM en fonction de l'énergie E_P : on observe une diminution monotone en fonction de E_P ou C_N pour atteindre une valeur limite de FWHM ≈ 5 nm. En l'abscence de TiO₂-NPs (courbe bleue), la FWHM reste sensiblement constante (FWHM ≈ 20 nm) pour toutes les valeurs E_P .

Influence du TiO₂ sur le temps de réponse de fluorescence

Les impulsions de la pompe ont une durée à mi-hauteur $\tau_P \approx 5$ ns équivalente au temps de vie de la fluorescence de FITC $\tau_F \approx 4$ ns : chaque fluorophore émet alors en moyenne un seul photon spontané par impulsion limitant fortement le rendement du fluorophore et la quantité de fluorescence émise dans le milieu. On



FIGURE 6.4 – $C_F = 200 \ \mu M$ (a) Spectres de fluorescence normalisés à $E_P = 3 \ mJ$ et (b) FWHM des spectres en fonction de l'énergie de pompe pour $C_N = 0$ (Bleue); 1.56 (Rouge); 3.12 (Verte); 6.25 (Noire) mg/mL. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants

préfère néanmoins définir la durée τ_{FP} de la fluorescence au lieu de τ_F car τ_{FP} est le résultat de la convolution entre la durée τ_P de l'impulsion et la durée τ_F de la relaxation moléculaire. Dans un régime spontané, on a alors $\tau_{FP} > (\tau_P, \tau_F)$. L'émission stimulée est un processus rapide : sa durée est beaucoup plus courte que τ_F (jusqu'à 6 ordres de grandeur). L'émission stimulée prépare ainsi le fluorophore pour un nouveau cycle de fluorescence dans les limites bien sûr de la durée τ_P des impulsions permettant au fluorophore d'émettre plusieurs photons par impulsion, augmentant ainsi son rendement par rapport au processus spontané. La relaxation stimulée diminue la valeur τ_F réduisant automatiquement la valeur τ_{FP} . Cependant, la limite $\tau_{FP} = \tau_P$ ne pourra jamais être atteinte car la réponse impulsionnelle de la fluorescence est la convolution entre la relaxation moléculaire et l'impulsion de la pompe. Toutes les deux décroîent temporellement $(I(t) \sim \exp(-t/\tau))$ fournissant ainsi un flux de photon de plus en plus faible au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur en dessous du taux nécessaire au maintient du processus stimulée qui cède alors sa place à une émission spontanée. En outre, il faut aussi prendre en compte le temps de réponse ($\tau_D = 0.57$ ns) du détecteur qui amène une petite contribution aux mesures. Cela conduit donc à un allongement de la valeur τ_{FP} .

Ces considérations sont confirmées par la figure 6.5 qui donne la durée τ_{FP} de fluorescence, mesurée par P2 (Fig. 4.3), en fonction de C_N pour différentes valeurs E_P . La valeur τ_{FP} est obtenue par la fonction d'autocorrélation $g^{(2)}$ du signal de fluorescence définie par la relation suivante :

$$g^{(2)}(au) = rac{< I_F(t) I_F(t+ au)>}{< I_F(t)>^2}\,,$$
 (6.1)

où < \cdots > défini une moyenne temporelle :

$$< I_F(t)> = \lim_{T
ightarrow +\infty} rac{1}{T} \int_0^T I_F(t) dt$$
 (6.2)

Les propriétés de $g^{(2)}$ sont [Loudon, 2000] :

• $g^{(2)}$ atteint son pic à l'origine (inégalité de Cauchy-Schwartz) : $g^{(2)}(au) \leq g^{(2)}(0),$

• $g^{(2)}$ est symétrique : $g^{(2)}(-\tau) = g^{(2)}(+\tau)$. Toutes les propriétés pour des délais positifs sont donc aussi valables pour les délais négatifs. Ce sera le cas aussi pour les mesures expérimentales.

L'autocorrélation $g^{(2)}$ est une technique qui mesure les variations du temps de l'impulsion. On tient aussi à préciser que la durée τ_{FP} ne provient pas d'un seul fluorophore mais elle provient de toutes les sources émissives indépendantes issues des différents fluorophores vues et collectées dans l'angle solide de notre montage qui correspond à l'ouverture numérique de la lentille de collecte (NA = 0,17). La durée τ_{FP} pourrait avoir des contributions décorrélées de ces différentes sources émissives. Il faudrait donc étudier la cohérence spatiale mais cette étude n'est pas primordiale dans notre objectif qui consiste seulement à détecter une hausse de la quantité de fluorescence.



FIGURE 6.5 – $C_F = 200 \ \mu\text{M}$: durée de vie τ_{FP} en fonction de C_N pour $E_P = (0,30; 1,20; 3,00) \text{ mJ}$. Encart : fonction autocorrélation $g^{(2)}$. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants

La valeur τ_{FP} diminue de 8,5 ns à environ 7,0 ns quand C_N passe de 0 à 6,25 mg/ml à partir de $E_P > 1,2$ mJ avec un phénomène de seuil à $C_N = 1,56$ mg/ml (présence de TiO₂-NPs). Ce changement abrupt est cohérent avec les résultats et la discussion précédente et renforcé par les fortes fluctuations de τ_{FP} qui accompagnent ce changement abrupt pour les concentrations supérieures à 1,56 mg/ml. Ces fluctuations étant typiques de transitions de phase [Reichl, 1999] du processus spontané à un processus stimulé.

Influence du TiO₂ sur le gain optique

Les résultats précédents ont montré que les principales caractéristiques physiques d'amplification stimulée de la fluorescence sont bien induites par la présence des diffuseurs. Pour connaître l'avantage apporté par les TiO₂-NPs par rapport au rendement du fluorophore sans NPs, leur gain G a été défini comme le rapport entre l'intensité maximale I_{F,C_N} en présence de NPs et celle $I_{F,0}$ en leur absence :
$$G = \frac{I_{F,C_N}(E_P)}{I_{F,0}(E_P)}$$
(6.3)

Le gain G est représenté par la figure 6.6 pour différentes valeurs de C_N . La courbe bleue correspond aux données en l'absence de NPs ($C_N = 0 \text{ mg/ml}$) d'où G = 1. Il est aussi intéressant de noter que les courbes de gain G possèdent une forme différente des courbes d'intensité I_F de la figure 6.3(b). Tandis que ces dernières présentent un comportement superlinéaire avec un démarrage lent en fonction de E_P , G affiche une croissance rapide avant de ralentir (puis peut-être saturer pour $C_N = 6,25 \text{ mg/ml}$) avec E_P . Ce comportement contrasté reflète la nature des grandeurs : tandis que I_F montre une quantité absolue de lumière collectée, G quantifie plutôt l'avantage relatif de la présence des NPs dans un échantillon fluorescent. Les résultats expérimentaux montrent que le gain est beaucoup plus fort avec une croissance rapide quand l'énergie E_P ou la concentration C_N est faible $(E_P < 1 \text{ mJ ou } C_N < 1,56 \text{ mg/ml})$. Ceci est en faveur d'une optimisation de la biocompatibilité avec de plus faibles valeurs de C_N et E_P qui devraient limiter la cytoxicité des NPs et la phototoxicité du laser de pompe sur les cellules ainsi que le photoblanchiment des fluorophores.



FIGURE 6.6 – $C_F = 200 \ \mu\text{M}$: gain G de fluorescence pour $C_N = (a) \ 0$ (Bleue : valeurs de référence); (b) 1,56 (Rouge); (c) 3,12 (Verte) et (d) 6,25 mg/ml. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

6.1.3 Influence de la concentration de FITC sur le gain optique

La concentration $C_F = 200 \ \mu \text{M}$ a permis de mettre en évidence un mécanisme d'amplification par émission stimulée via la diffusion multiple. Les résultats précédents ont été reportés sur la figure 6.7(a) pour comparaison avec des concentrations inférieures. La figure 6.7(a') montre une réduction drastique de la FWHM $\approx 5 \text{ nm}$; et la figure 6.8(a) un gain atteignant une valeur maximale de 40. On rappelle que les paramètres ont été discutés en profondeur à $C_F = 200 \ \mu \text{M}$ tandis qu'une simple analyse descriptive a été effectuée pour les mesures exploratoires à $C_F = 2$ et 20 μ M.

L'amplification a été testée avec $C_F = 20$ et 2 μ M qui sont des concentrations plus proches des conditions d'usage de cette sonde (de son analogue CFSE) en biologie cellulaire. Seules les intensités, la FWHM et le gain ont été étudiés. Ces grandeurs sont représentées 6.7(b) et 6.7(b') (Intensité); 6.7(c) et 6.7(c') (FWHM); 6.8(b) et 6.8(c) (Gain) respectivement pour les concentrations $C_F = 20$ et 2 μ M. Ces résultats indiquent une amplification et un gain nets induits par les NPs pour les concentrations $C_F = 20$ (Figs. 6.7(b) et 6.7(b')) et 2 μ M (Figs. 6.7(c) et 6.7(c')) de FITC. Le retrécissement spectral (diminution de la FWHM) est moins prononcée à $C_F = 20 \ \mu$ M pour disparaître à $C_F = 2 \ \mu$ M. Il existe toujours un gain G aux faibles concentrations de FITC mais celui-ci sature rapidement à une valeur ≥ 10 à partir de $C_N = 1,56 \ \text{mg/ml}$ et $E_P = 0,30 \ \text{mJ}$ pour $C_F = 20 \ \mu$ M (Fig. 6.8(b)) et une valeur $\sim 10 \ \text{pour } C_F = 2\mu$ M (Fig. 6.8(c)).

Cette saturation du gain peut être expliquée par une saturation de l'absorption. En effet, une molécule de FITC est excitée pendant toute sa durée de vie τ_F à chaque photon de pompe absorbé. Aux faibles énergies E_P , le nombre de photons $E_P/(h\nu)$ reste faible par rapport au nombre de molécules de FITC $N_A \times C_F$. Ainsi le nombre de molécules à l'état excité est négligeable. Cependant, aux fortes énergies E_P , si le taux d'absorption par molécule $(I_P\sigma_a)/(\hbar\omega)$ est comparable à $1/\tau_F$, une fraction importante de la population est excitée à tout moment. Autrement dit, l'absorption est saturée par des énergies de pompe supérieures à l'intensité de saturation $(\hbar\omega)/(\tau_F\sigma_a)$ conduisant à une saturation du gain.

La présence du processus stimulé est une situation plus difficile à déterminer par rapport aux résultats car un gain important est toujours présent aux deux concentrations. Plusieurs suppositions peuvent expliquer cette amplification via deux mécanismes : (i) amplification de l'émission spontanée (processus non-linéaire); (ii) un recyclage des photons de pompe. Des études ultérieures sont éventuellement nécessaires pour comprendre le phénomène physique mais ces études sont ne sont pas primordiales dans notre objectif.

En conclusion, les résultats indiquent que la moitié du gain (G < 20) peut être obtenue avec $E_P < 1$ mJ et $C_N < 1,56$ mg/ml pour $C_F = 200 \ \mu$ M tandis que E_P et C_N n'ont aucune influence sur l'évolution du gain pour $C_F = 2$ et 20 μ M. La diminution de la puissance de la source et de la quantité de TiO₂-NPs à ajouter dans le milieu est en faveur d'une diminution du photoblanchiment, de la phototoxicité et de la cytoxicité.

6.1.4 Influence du rapport massique BSA/TiO_2 et du milieu

Les résultats précédents ayant été obtenus dans l'H₂O mQ, l'étape suivante a consisté à évaluer l'influence d'une modification des conditions physico-chimiques sur l'amplification : nanoparticules fonctionnalisées dans une milieu de culture cellulaire. L'intensité I_F de fluorescence a été mesurée pour une concentration $C_F =$ 20 μ M en milieu RPMI (sans rouge de phénol) avec des TiO₂-NPs stabilisées (ou non) avec 60% de BSA (Chap. 4). Trois conditions ont été testées : (i) BSA/TiO₂



FIGURE 6.7 – (a - c) Maximum de l'intensité de fluorescence et (a' - c') FWHM en fonction de l'énergie de pompe E_P pour $C_N = 0$ (Bleue); 1,56 (Rouge); 3,12 (Verte); 6,25 (Noire) mg /ml. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.



FIGURE 6.8 – (a - c) Gain en fonction de l'énergie de pompe E_P pour $C_N = 0$ (Bleue); 1,56 (Rouge); 3,12 (Verte); 6,25 (Noire) mg /ml. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

= 0% et H₂O mQ (cette mesure est indépendante des expériences précédentes); BSA/TiO₂ = 60% et H₂O mQ; (iii) BSA/TiO₂ = 60% et RPMI.

Les figures 6.9(a)-6.9(c) représentent l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de l'énergie de pompe tandis que les figures 6.9(a')-6.9(c') représentent le gain de fluorescence en fonction de l'énergie nominale de pompe $E_P \sim (0,2$ - 4) mJ pour les concentrations $C_N = (1,56; 3,12 \text{ et } 6,25 \text{ mg/ml})$ de TiO₂-NPs respectivement dans les conditions (i) (Figs. 6.9(a) et 6.9(a')); (ii) (Figs. 6.9(b) et 6.9(b')) et (iii) (Figs. 6.9(c) et 6.9(c')).



FIGURE 6.9 – (a - c) Maximum de l'intensité de fluorescence et (a' - c') FWHM en fonction de l'énergie de pompe E_P pour $C_N = 0$ (Bleue); 1,56 (Rouge); 3,12 (Verte); 6,25 (Noire) mg /ml. Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

La fonctionnalisation des TiO₂-NPs avec 60% de BSA entraîne une diminution et un écrasement des différences des valeurs de G autour de 10 (Figs. 6.9(b')) comparée aux valeurs de $G \ge 10$ sans BSA (Figs. 6.9(a')) dans le même solvant H₂O mQ. En milieu RPMI $G \sim 10$ quand les TiO₂-NPs sont fonctionnalisées avec la même quantité de BSA. Cette diminution du gain est donc causée par la présence de BSA dans le milieu et/ou sur les TiO₂-NPs. L'adsoption de la BSA sur les TiO₂-NPs serait susceptible de modifier leur indice de réfraction, en conséquence diminuer leur contraste d'indice par rapport au milieu environnant [McArthur and Papoff, 2019] et faire décroître l'amplification de fluorescence. La BSA contenue dans le solvant pourrait se combiner à cet effet en contribuant à gommer les différences d'indices.

6.2 Amplification de la fluorescence de cellules marquées

Les résultats précédents ont montré qu'il était possible d'amplifier la fluorescence sur une dizaine d'impulsions laser grâce aux TiO₂-NPs et d'obtenir ainsi un gain ~ 10 pour une solution homogène de FITC à une faible concentration $C_F = 20 \ \mu \text{M}$ (Fig. 6.9(c)) dans un milieu RPMI avec des TiO₂-NPs fonctionnalisées avec 60% de BSA quelque soit l'énergie E_P de pompe ou la concentration C_N de TiO₂-NPs.

Dans cette dernière partie, nous avons voulu démontrer qu'il serait possible d'amplifier la fluorescence de cellules de la lignée Jurkat marquées en intracellulaire par un "cell tracker", la CFSE ou exprimant de façon stable la GFP dans toute la cellule. Deux populations de cellules GFP ont été séparées par tri cellulaire, en fonctions de leurs distributions d'intensités (high ou low). Les mesures ont été réalisées en milieu RPMI sans rouge de phénol avec des TiO₂-NPs stabilisées avec 60% de BSA.

Plusieurs concentrations de charge de CFSE (5, 10, 25 μ M) ont été testées ainsi que des dilutions cellulaires (10⁵,10⁶, 10⁷ cellules/ml) de manière à obtenir une intensité de fluorescence proche de celle obtenue avec une concentration homogène de FITC à 20 μ M afin de comparer les gains entre ces deux situations. Toutes les expériences et traitement des résultats ont été réalisés de façon similaire aux mesures sur les échantillons de FITC en solution. Les échantillons contiennent 2 \times 10⁶ cellules /ml chargées à 10 μ M en CFSE ou 10⁷ cellules/ml Jurkat en GFP.

6.2.1 Caractérisation du photoblanchiment

La figure 6.10 représente les décroissances des intensités en fonction du temps pour chaque marquage cellulaire réalisé. Tous ces résultats sont comparés avec une solution homogène de FITC à la concentration $C_F = 20 \ \mu$ M. Excepté le marquage GFP high, tous les autres marquages présentent une décroissance rapide entre 10 et 20 secondes (I_F passe de 100% à 60-70%) puis une composante lente avec des temps $t_{1/2}$ compris entre 80 et 100 secondes (800 et 1000 impulsions). Le marquage "GFP high" photoblanchit à partir de $t_{1/2} = 20$ s soit 200 impulsions. Malgré cette exception, les temps de photoblanchiment sont suffisament longs pour réaliser une statistique sur plusieurs spectres de fluorescence. Les spectres ont été enregistrés pour 10 impulsions; temps pendant lequel l'intensité maximale I_F subit environ entre 30 et 40% de perte par photoblanchiment.



FIGURE 6.10 – Courbes de photoblanchiment à $C_N = 6,25 \text{ mg/ml}$, $E_P \sim 3 \text{ mJ}$ pour une concentration $C_F = 2 \text{ et } 20 \ \mu\text{M}$ de FITC, cellules marquées par la CFSE ($\sim 20\mu\text{M}$) ou exprimées par la GFP "low" ou "high" ($\sim 2\mu\text{M}$). Moyenne réalisée sur 6 échantillons indépendants.

6.2.2 Amplification de la fluorescence de cellules marquées au CFSE ou exprimant la GFP

Les figures 6.11(a) et 6.11(b) représentent l'intensité de fluorescence des cellules et le gain (Eq. 6.3) en fonction de l'énergie de pompe E_P pour différents concentrations C_N de TiO₂-NPs.

La fluorescence des cellules marquées est amplifiée avec un gain au moins égal à 2 en présence de TiO₂-NPs. Parmi tous ces résultats, on constate que le marquage au CFSE est mieux amplifié que les cellules exprimant la GFP avec une valeur moyenne quasi-constante (saturation de gain) qui oscille entre 5 et 9 quelque soit E_P et C_N . Le gain d'amplification de la fluorescence des cellules marquées par la GFP augmente avec E_P passant environ de 2 à 4 pour les "GFP high", et de 1 à 3 pour les "GFP low'. Le comportement du gain en fonction de l'énergie de la source est similaire aux résultats obtenus avec le FITC à faibles concentrations $C_F = 2$ et 20 μ M : une saturation rapide en fonction de E_P et C_N ($C_F = 20 \ \mu$ M) voire une indépendence vis à vis de E_P et C_N ($C_F = 2 \ \mu$ M).



FIGURE 6.11 – (a - c) Maximum de l'intensité de fluorescence et (a' - c') Gain en fonction de l'énergie de pompe E_P pour $C_N = 0$ (Bleue); 1,56 (Rouge); 3,12 (Verte); 6,25 (Noire) mg /ml. Mesure réalisée sur 6 échantillons indépendants.

Conclusion

Les résultats montrent que la diffusion multiple avec une suspension homogène de TiO_2 -NPs permet de bénéficier une amplification de la fluorescence émise par des marqueurs cellulaires (GFP, CFSE) ou par des fluorophores organiques (FITC).

Une première amplification stimulée a été montrée et validée dans une solution aqueuse homogène de FITC à une concentration $C_F = 200 \ \mu M$, concentration cinq fois inférieure à celle de la rhodamine 6G (\sim 1 mM) couramment utilisée pour les lasers aléatoires dans un solvant pur ou dans les tissus fixés. Cette expérience a prouvé qu'il est possible d'atteindre un gain relatif de fluorescence jusqu'à 40 ($C_N = 6,25$ mg/ml et $E_P \sim 3,00$ mJ) associé à une diminution de la largeur spectrale jusqu'à 5 nm, et une réduction globale de la durée de vie qui caractérise ainsi une transition de phase. La présence du processus d'émission stimulée dans l'amplification est confirmée par la corrélation entre la fluorescence et la concentration des nanoparticules ou l'énergie de pompe. Les valeurs élevées de gain aux autres concentrations C_N de nanoparticules et énergies E_P de pompe permettent de contrôler ces valeurs ($E_P < 1 \text{ mJ}$ ou $C_N \sim 1,56 \text{ mg/ml}$) pour limiter le photoblanchiment ainsi que la cytotoxicité et la photoxicité cellulaire tout en gardant un gain élevé (G > 10). Cette première démarche a été étendue à des concentrations C_F = 2 et 20 μ M pour lesquelles une saturation rapide du gain (respectivement \sim 10 et 20) a été constatée. La contribution de l'émission stimulée semble moindre à 2 et 20 μ M : seul le recyclage de la pompe devient prédominant et permet d'assurer une amplification et un gain.

Stables ($R_h \sim 60$ nm) dans un milieu aqueux non-électrolytique à pH ≥ 4 , les TiO₂-NPs forment des agrégats ($R_h > 1 \ \mu$ m) dans un tampon ionique ou un milieu de culture cellulaire. L'incubation préalable des NPs avec 60% de BSA (rapport massique) pendant 1 à 3h à pH5 permet de les fonctionnaliser et les protéger en évitant leur aggégation ultérieure dans des solvants à forte force ionique. Grâce à cette fonctionnalisation il a été possible d'obtenir des solution colloïdales de nanoparticules et de les mélanger avec des cellules marquées par la CFSE ou exprimant la GFP, en suspension dans leur milieu de culture pour obtenir une amplification. Dans ces conditions une diminution du gain a été constatée par rapport aux conditions en FITC (jusqu'à 6-10 fois). En testant l'influence des milieux sur l'amplification, la présence de BSA semble être la cause de cette diminution ; probablement liée à la couche qu'elle forme autour des NPs susceptible de réduire l'indice de réfraction effectif des TiO₂-NPs [McArthur and Papoff, 2019].

La mise au point du processus expérimental reste complexe et a nécessité des compromis. L'amplification de la fluorescence avec un gain ≥ 2 sur des cellules a demandé une maîtrise de la stabilisation colloïdale tout en optimisant les conditions pour tendre vers une biocompatibilité raisonnable sur la durée des expériences. L'obtention d'une suspension colloïdale des nanoparticules a nécessité le test de nombreux paramètres (pH, milieux, temps d'incubation, rapport massique). Il a fallu ensuite vérifier et tester la cytotoxicité, stabilité, phototoxicité, photoblanchiment et gain de cette suspension dans un milieu de culture cellulaire avant de

déboucher sur une mesure biologique quantitative. La BSA est un bon exemple car cette protéine stabilise bien les nanoparticules mais sa présence diminue le gain de fluorescence.

A la suite de notre étude, différentes pistes d'optimistion peuvent être explorées : (i) la méthode de stabilisation des TiO_2 -NPs avec la BSA ou d'autres macromolécules, (ii) l'utilisation d'autres fluorophores (Alexa Fluor 488, protéines fluorescentes) dans des cellules en suspension ou adhérente avec différents milieux et nanoparticules (ZnO, argent, or).

Une autre solution consiste à créer un milieu désordonné distinct du milieu à gain en séparant et en isolant les diffuseurs de la solution de fluorophores et du matériel biologique. Ces nanoparticules seraient, par exemple, immergées dans une gel ou une matrice solide. Sans contact direct avec les cellules et le milieu, les conditions de biocompatibilité (cytotoxicité) et physico-chimique (stabilité) des diffuseurs ne seraient plus prises en compte dans le milieu à gain amenant l'étude du gain sur des nanoparticules jugées toxiques mais offrant une meilleure diffusion (nanoparticules semiconductrices). Il restera à vérifier la biocompatibilité du gel et à prouver si les performances d'amplification ne seront pas affectées.

Bibliographie

- [Alford et al., 2009] Alford, R., Simpson, H. M., Duberman, J., Hill, G. C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H., and Choyke, P. L. (2009). Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging : literature review. *Molecular Imaging*, 8(6) :7290-2009.
- [Alivisatos, 1996] Alivisatos, A. P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *science*, 271(5251) :933-937.
- [Allouni et al., 2009] Allouni, Z. E., Cimpan, M. R., Høl, P. J., Skodvin, T., and Gjerdet, N. R. (2009). Agglomeration and sedimentation of tio2 nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 68(1):83-87.
- [Ambartsumyan et al., 1966] Ambartsumyan, R., Basov, N., Kryukov, P., and Letokhov, V. (1966). A laser with a nonresonant feedback. *IEEE J. Quantum Electron*, 2(9):442-446.
- [Andreasen et al., 2011] Andreasen, J., Asatryan, A., Botten, L., Byrne, M., Cao, H., Ge, L., Labonté, L., Sebbah, P., Stone, A., Türeci, H., et al. (2011). Modes of random lasers. Advances in Optics and Photonics, 3(1):88-127.
- [Aubry et al., 2011] Aubry, G., Kou, Q., Soto-Velasco, J., Wang, C., Meance, S., He, J., and Haghiri-Gosnet, A. (2011). A multicolor microfluidic droplet dye laser with single mode emission. *Applied Physics Letters*, 98(11) :111111.
- [Bachelard et al., 2014] Bachelard, N., Gigan, S., Noblin, X., and Sebbah, P. (2014). Adaptive pumping for spectral control of random lasers. *Nature physics*, 10(6):426.
- [Berne and Pecora, 2000] Berne, B. J. and Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics. Courier Corporation.
- [Bihari et al., 2008] Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., and Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and fibre toxicology*, 5(1):14.
- [Bingi et al., 2013] Bingi, J., Warrier, A. R., and Vijayan, C. (2013). Raman mode random lasing in zns-β-carotene random gain media. Applied Physics Letters, 102(22) :221105.
- [Blancafior et al., 2001] Blancafior, E., Gilroy, S., Meyer, A., and Plieth, C. (2001). Fluorescent probes for living plant cells. *Plant cell biology : a practical approach*, (250) :35.
- [Bodurov et al., 2016] Bodurov, I., Vlaeva, I., Viraneva, A., Yovcheva, T., and Sainov, S. (2016). Modified design of a laser refractometer. *Nanosci. Nanotechnol*, 16:31-33.

- [Braun and Libchaber, 2002] Braun, D. and Libchaber, A. (2002). Trapping of dna by thermophoretic depletion and convection. *Physical Review Letters*, 89(18):188103.
- [Brown et al., 2004] Brown, S., Poujol-Talbot, C., Kronenberger, J., Traas, J., and Satiat-Jeunemaître, B. (2004). 11. l'apport de la microscopie et de l'imagerie en génomique. La génomique en biologie végétale, page 209.
- [Brown, 1993] Brown, W. (1993). Dynamic light scattering : the method and some applications, volume 313. Clarendon press Oxford.
- [Cao et al., 1999] Cao, H., Zhao, Y., Ho, S.-T., Seelig, E., Wang, Q., and Chang, R. P. (1999). Random laser action in semiconductor powder. *Physical Review Letters*, 82(11) :2278.
- [Carminati, 2016] Carminati, R. (2016). Ondes en milieux complexes. cours du m2 du master omp de l'université paris-sud.
- [Cattoni et al., 2011] Cattoni, A., Ghenuche, P., Haghiri-Gosnet, A.-M., Decanini, D., Chen, J., Pelouard, J.-L., and Collin, S. (2011). λ3/1000 plasmonic nanocavities for biosensing fabricated by soft uv nanoimprint lithography. *Nano letters*, 11(9):3557-3563.
- [Cerdán et al., 2012] Cerdán, L., Enciso, E., Martín, V., Banuelos, J., López-Arbeloa, I., Costela, A., and García-Moreno, I. (2012). Fret-assisted laser emission in colloidal suspensions of dye-doped latex nanoparticles. *Nature Photonics*, 6(9):621.
- [Chalfie et al., 1994] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148) :802-805.
- [Chapman, 1913] Chapman, D. L. (1913). Li. a contribution to the theory of electrocapillarity. The London, Edinburgh, and Dublin philosophical magazine and journal of science, 25(148):475–481.
- [Chelnokov et al., 2006] Chelnokov, E., Bityurin, N., Ozerov, I., and Marine, W. (2006). Two-photon pumped random laser in nanocrystalline zno. Applied physics letters, 89(17) :171119.
- [Chen et al., 2011] Chen, Y., Herrnsdorf, J., Guilhabert, B., Zhang, Y., Watson, I. M., Gu, E., Laurand, N., and Dawson, M. D. (2011). Colloidal quantum dot random laser. *Optics Express*, 19(4) :2996-3003.
- [Chen et al., 2010] Chen, Y., Lei, L., Zhang, K., Shi, J., Wang, L., Li, H., Zhang, X., Wang, Y., and Chan, H. L. (2010). Optofluidic microcavities : Dye-lasers and biosensors. *Biomicrofluidics*, 4(4) :043002.
- [Coons et al., 1941] Coons, A. H., Creech, H. J., and Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of* the Society for Experimental Biology and Medicine, 47(2):200-202.
- [Cruje and Chithrani, 2014] Cruje, C. and Chithrani, D. (2014). Polyethylene glycol density and length affects nanoparticle uptake by cancer cells. J. Nanomed. Res, 1(00006).
- [de la Chapelle, 2013] de la Chapelle, M. L. (2013). Nanoparticules métalliques. *Photoniques*, (65) :31-35.

- [de Oliveira et al., 2011] de Oliveira, M. A., de Araújo, C. B., and Messaddeq, Y. (2011). Upconversion ultraviolet random lasing in nd 3+ doped fluoroindate glass powder. Optics Express, 19(6) :5620-5626.
- [Denk and Svoboda, 1997] Denk, W. and Svoboda, K. (1997). Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18(3) :351-357.

[Derjaguin, 1941] Derjaguin, B. V. (1941). Acta physicochim. USSR, 14.

- [DeVore, 1951] DeVore, J. R. (1951). Refractive indices of rutile and sphalerite. JOSA, 41(6) :416-419.
- [Dice et al., 2005] Dice, G., Mujumdar, S., and Elezzabi, A. (2005). Plasmonically enhanced diffusive and subdiffusive metal nanoparticle-dye random laser. *Applied Physics Letters*, 86(13):131105.
- [Dominguez, 2015] Dominguez, C. T. (2015). M. d. a. gomes, zs macedo, cb de araújo, and asl gomes,". Multi-photon excited coherent random laser emission in ZnO powders," Nanoscale, 7(1):317-323.
- [Dominguez et al., 2014] Dominguez, C. T., Vieira, M., Oliveira, R., Ueda, M., de Araújo, C. B., and Gomes, A. S. (2014). Three-photon excitation of an upconversion random laser in zno-on-si nanostructured films. JOSA B, 31(8) :1975– 1980.
- [Donaldson et al., 2010] Donaldson, L., Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., and Jeremić, M. (2010). Quantification of compression wood severity in tracheids of pinus radiata d. don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *Journal of structural biology*, 169(1) :106-115.
- [Dubertret et al., 2002] Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., and Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 298(5599) :1759-1762.
- [Einstein, 1906] Einstein, A. (1906). Zur theorie der brownschen bewegung. Annalen der physik, 324(2):371-381.
- [El-Dardiry and Lagendijk, 2011] El-Dardiry, R. G. and Lagendijk, A. (2011). Tuning random lasers by engineered absorption. *Applied Physics Letters*, 98(16):161106.
- [Eloy, 2018] Eloy, A. (2018). Étude des fluctuations temporelles de la lumière diffusée par des atomes froids. PhD thesis.
- [Faget and Hnasko, 2015] Faget, L. and Hnasko, T. S. (2015). Tyramide signal amplification for immunofluorescent enhancement. In *ELISA*, pages 161–172. Springer.
- [Fan and Yun, 2014] Fan, X. and Yun, S.-H. (2014). The potential of optofluidic biolasers. Nature Methods, 11(2):141.
- [Finsy, 1994] Finsy, R. (1994). Particle sizing by quasi-elastic light scattering. Advances in Colloid and Interface Science, 52:79-143.
- [Firdaus et al., 2012] Firdaus, K., Nakamura, T., and Adachi, S. (2012). Improved lasing characteristics of zno/organic-dye random laser. Applied Physics Letters, 100(17) :171101.
- [Fleer et al., 1993] Fleer, G., Stuart, M. C., Scheutjens, J. M., Cosgrove, T., and Vincent, B. (1993). Polymers at interfaces. Springer Science & Business Media.

- [Foldbjerg et al., 2011] Foldbjerg, R., Dang, D. A., and Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, a549. Archives of toxicology, 85(7):743-750.
- [Furth and Cowper, 1956] Furth, R. and Cowper, A. (1956). Albert einstein : Investigations on the theory of brownian movement.
- [Gather and Yun, 2011a] Gather, M. C. and Yun, S. H. (2011a). Lasing from escherichia coli bacteria genetically programmed to express green fluorescent protein. *Optics letters*, 36(16) :3299-3301.
- [Gather and Yun, 2011b] Gather, M. C. and Yun, S. H. (2011b). Single-cell biological lasers. *Nature Photonics*, 5(7):406.
- [Germain et al., 2006] Germain, R. N., Miller, M. J., Dustin, M. L., and Nussenzweig, M. C. (2006). Dynamic imaging of the immune system : progress, pitfalls and promise. *Nature Reviews Immunology*, 6(7) :497.
- [Gheshlaghi et al., 2008] Gheshlaghi, Z. N., Riazi, G. H., Ahmadian, S., Ghafari, M., and Mahinpour, R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. Acta biochimica et biophysica Sinica, 40(9):777-782.
- [Ghosh et al., 2013] Ghosh, M., Chakraborty, A., and Mukherjee, A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (tio2) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *Journal of applied toxicology*, 33(10) :1097-1110.
- [Givens et al., 2017] Givens, B. E., Xu, Z., Fiegel, J., and Grassian, V. H. (2017). Bovine serum albumin adsorption on sio2 and tio2 nanoparticle surfaces at circumneutral and acidic ph : A tale of two nano-bio surface interactions. *Journal* of colloid and interface science, 493:334-341.
- [Gottardo et al., 2008] Gottardo, S., Sapienza, R., García, P. D., Blanco, A., Wiersma, D. S., and López, C. (2008). Resonance-driven random lasing. Nature Photonics, 2(7) :429.
- [Gouy, 1910] Gouy, M. (1910). Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. J. Phys. Theor. Appl., 9(1):457-468.
- [Guan et al., 2012] Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., and Liu, M. (2012). Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to zno nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 7(1):602.
- [Guerra et al., 2012] Guerra, F., Leone, M., and Robotti, N. (2012). The discovery of artificial radioactivity. *Physics in Perspective*, 14(1):33-58.
- [Guiot and Spalla, 2012] Guiot, C. and Spalla, O. (2012). Stabilization of tio2 nanoparticles in complex medium through a ph adjustment protocol. *Environmental* science & technology, 47(2) :1057-1064.
- [Hamaker, 1937] Hamaker, H. C. (1937). The london—van der waals attraction between spherical particles. *physica*, 4(10) :1058–1072.
- [Haseloff, 2003] Haseloff, J. (2003). Old botanical techniques for new microscopes. Biotechniques, 34(6) :1174-1182.
- [Haynes, 2014] Haynes, W. M. (2014). CRC handbook of chemistry and physics. CRC press.

- [Henry, 1931] Henry, D. (1931). The cataphoresis of suspended particles. part i.—the equation of cataphoresis. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 133(821):106– 129.
- [Hergert and Wriedt, 2012] Hergert, W. and Wriedt, T. (2012). The Mie theory : basics and applications, volume 169. Springer.
- [Herschel, 1845] Herschel, J. F. W. (1845). On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless. *Philosophical Transactions of* the Royal Society of London, (135) :143-145.
- [Hooke, 1845] Hooke, R. (1845). Milestones. Phil. Trans. R. Soc. Lond, 135 :143-145.
- [Horie et al., 2012] Horie, M., Fujita, K., Kato, H., Endoh, S., Nishio, K., Komaba, L. K., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Hagihara, Y., et al. (2012). Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles : metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*, 4(4) :350-360.
- [Hotze et al., 2010] Hotze, E. M., Phenrat, T., and Lowry, G. V. (2010). Nanoparticle aggregation : challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *Journal of environmental quality*, 39(6) :1909-1924.
- [Hsu et al., 2014] Hsu, C. W., Zhen, B., Qiu, W., Shapira, O., DeLacy, B. G., Joannopoulos, J. D., and Soljačić, M. (2014). Transparent displays enabled by resonant nanoparticle scattering. *Nature communications*, 5 :3152.
- [Huber and Stoll, 2018] Huber, R. and Stoll, S. (2018). Protein affinity for tio2 and ceo2 manufactured nanoparticles. from ultra-pure water to biological media. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 553:425– 431.
- [Humar et al., 2015] Humar, M., Gather, M. C., and Yun, S.-H. (2015). Cellular dye lasers : lasing thresholds and sensing in a planar resonator. Optics express, 23(21) :27865-27879.
- [Humar and Yun, 2017] Humar, M. and Yun, S. H. (2017). Whispering-gallery-mode emission from biological luminescent protein microcavity assemblies. Optica, 4(2):222-228.
- [Hunter, 2013] Hunter, R. J. (2013). Zeta potential in colloid science : principles and applications, volume 2. Academic press.
- [Idziorek et al., 2018] Idziorek, T., Cazareth, J., Blanc, C., Jouy, N., Bourdely, P., and Corneau, A. (2018). Fiat lux. may be no more true in cytometry! go to mass and spectrum but still stay classic. *Medecine sciences : M/S*, 34(5):439-447.
- [Israelachvili, 1991] Israelachvili, J. (1991). Intermolecular and surface forces, 2nd ed. Academic Press, London.
- [Jackson, 1999] Jackson, J. D. (1999). Classical Electrodynamics 3rd ed John Wiley & Sons.
- [Jaiswal et al., 2003] Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M., and Simon, S. M. (2003). Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature biotechnology*, 21(1):47.

- [Ji et al., 2010] Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E. M., Godwin, H., et al. (2010). Dispersion and stability optimization of tio2 nanoparticles in cell culture media. *Environmental science* & technology, 44(19) :7309-7314.
- [Kikuchi et al., 2004] Kikuchi, A., Yamano, K., Tada, M., and Kishino, K. (2004). Stimulated emission from gan nanocolumns. *physica status solidi* (b), 241(12) :2754–2758.
- [Kobat et al., 2009] Kobat, D., Durst, M. E., Nishimura, N., Wong, A. W., Schaffer, C. B., and Xu, C. (2009). Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Optics express*, 17(16) :13354-13364.
- [Koppel, 1972] Koppel, D. E. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy : the method of cumulants. The Journal of Chemical Physics, 57(11) :4814-4820.
- [Kosmulski, 2018] Kosmulski, M. (2018). The ph dependent surface charging and points of zero charge. vii. update. Advances in Colloid and Interface Science, 251 :115-138.
- [Kumar et al., 2018] Kumar, N., Afjei, R., Massoud, T. F., and Paulmurugan, R. (2018). Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for bodipy-l-cystine to measure apoptosis. *Scientific reports*, 8(1) :16363.
- [Labeyrie et al., 1999] Labeyrie, G., De Tomasi, F., Bernard, J.-C., Müller, C., Miniatura, C., and Kaiser, R. (1999). Coherent backscattering of light by cold atoms. *Physical Review Letters*, 83(25) :5266.
- [Lacoste et al., 2000] Lacoste, T. D., Michalet, X., Pinaud, F., Chemla, D. S., Alivisatos, A. P., and Weiss, S. (2000). Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17):9461-9466.
- [Lakowicz, 2013] Lakowicz, J. R. (2013). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Science & Business Media.
- [Lambert and Waters, 2014] Lambert, T. J. and Waters, J. C. (2014). Assessing camera performance for quantitative microscopy. In *Methods in cell biology*, volume 123, pages 35-53. Elsevier.
- [Langevin, 1908] Langevin, P. (1908). On the theory of Brownian motion.
- [Laven, 2011] Laven, P. (2011). Mieplot (a computer program for scattering of light from a sphere using mie theory & the debye series). http://www.philiplaven. com/mieplot. htm.
- [Lawandy et al., 1994] Lawandy, N. M., Balachandran, R., Gomes, A., and Sauvain,
 E. (1994). Laser action in strongly scattering media. *Nature*, 368(6470) :436.
- [Leonetti et al., 2012] Leonetti, M., Conti, C., and López, C. (2012). Random laser tailored by directional stimulated emission. *Physical Review A*, 85(4):043841.
- [Leonetti and López, 2013] Leonetti, M. and López, C. (2013). Active subnanometer spectral control of a random laser. *Applied Physics Letters*, 102(7):071105.
- [Leray et al., 2008] Leray, A., Lillis, K., and Mertz, J. (2008). Enhanced background rejection in thick tissue with differential-aberration two-photon microscopy. *Biophysical journal*, 94(4) :1449-1458.

- [Letokhov, 1968] Letokhov, V. (1968). Generation of light by a scattering medium with negative resonance absorption. Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics, 26:835.
- [Leung and Chou, 2011] Leung, B. O. and Chou, K. C. (2011). Review of superresolution fluorescence microscopy for biology. *Applied spectroscopy*, 65(9):967– 980.
- [Lichtman and Conchello, 2005] Lichtman, J. W. and Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12) :910.
- [Livet, 2007] Livet, J. (2007). Brainbow ou le cerveau en couleurs. *méde-cine/sciences*, 23(12):1173-1176.
- [Loudon, 2000] Loudon, R. (2000). The quantum theory of light. OUP Oxford.
- [Luan et al., 2015] Luan, F., Gu, B., Gomes, A. S., Yong, K.-T., Wen, S., and Prasad, P. N. (2015). Lasing in nanocomposite random media. *Nano Today*, 10(2):168– 192.
- [Magde et al., 2002] Magde, D., Wong, R., and Seybold, P. G. (2002). Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6g and fluorescein in nine solvents : Improved absolute standards for quantum yields. *Photochemistry* and *Photobiology*, 75(4) :327-334.
- [McArthur and Papoff, 2019] McArthur, D. and Papoff, F. (2019). The effect of oxidation on the far-field scattering of aluminium patch antennae from visible to uv. *International Journal of Optics*, 2019.
- [Méance et al., 2012] Méance, S., Aubry, G., Cattoni, A., Galas, J.-C., Collin, S., Kou, Q., and Haghiri-Gosnet, A.-M. (2012). L'optofluidique, l'optique et la fluidique intégrée sur puce. *Photoniques*, (57) :39-44.
- [Meisenhelder and Semba, 1998] Meisenhelder, J. and Semba, K. (1998). Safe use of radioisotopes. *Current protocols in cell biology*, (1) :A-1D.
- [Michalet et al., 2005] Michalet, X., Pinaud, F., Bentolila, L., Tsay, J., Doose, S., Li, J., Sundaresan, G., Wu, A., Gambhir, S., and Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307(5709) :538-544.
- [Murray et al., 1993] Murray, C., Norris, D. J., and Bawendi, M. G. (1993). Synthesis and characterization of nearly monodisperse cde (e= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. Journal of the American Chemical Society, 115(19) :8706-8715.
- [Nakamura et al., 2011] Nakamura, T., Tiwari, B. P., and Adachi, S. (2011). Control of random lasing in zno/al2o3 nanopowders. *Applied Physics Letters*, 99(23):231105.
- [NanoAmor,] NanoAmor. Titanium Oxide (Rutile, 40 wt%, 30-50 nm) in water. https://www.nanoamor.com/inc/sdetail/14252. Accessed : 2019-07-23.
- [Nastishin and Dudok, 2013] Nastishin, Y. A. and Dudok, T. (2013). Optically pumped mirrorless lasing. a review. part i. random lasing. Ukrainian Journal of Physical Optics, (14,№ 3) :146-170.
- [Nemkovich et al., 2002] Nemkovich, N. A., Rubinov, A. N., and Tomin, V. I. (2002). Inhomogeneous broadening of electronic spectra of dye molecules in solutions. In *Topics in fluorescence spectroscopy*, pages 367–428. Springer.

- [Noginov et al., 2004] Noginov, M., Zhu, G., Fowlkes, I., and Bahoura, M. (2004). Gaas random laser. Laser Physics Letters, 1(6):291.
- [Noginov, 2005] Noginov, M. A. (2005). Other types of solid-state random lasers. Solid-State Random Lasers, pages 198-221.
- [Perni et al., 2018] Perni, S., Yang, L., Preedy, E. C., and Prokopovich, P. (2018). Cobalt and titanium nanoparticles influence on human osteoblast mitochondrial activity and biophysical properties of their cytoskeleton. *Journal of colloid and interface science*, 531:410-420.
- [Polson and Vardeny, 2004] Polson, R. C. and Vardeny, Z. V. (2004). Random lasing in human tissues. Applied Physics Letters, 85(7):1289-1291.
- [Prasad et al., 2013] Prasad, R. Y., Wallace, K., Daniel, K. M., Tennant, A. H., Zucker, R. M., Strickland, J., Dreher, K., Kligerman, A. D., Blackman, C. F., and DeMarini, D. M. (2013). Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles : impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. ACS nano, 7(3) :1929-1942.
- [Psaltis et al., 2006] Psaltis, D., Quake, S. R., and Yang, C. (2006). Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *nature*, 442(7101):381.
- [Quah and Parish, 2012] Quah, B. J. and Parish, C. R. (2012). New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using cfse-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods*, 379(1-2) :1-14.
- [Reichl, 1999] Reichl, L. E. (1999). A modern course in statistical physics.
- [Rekha and Anila, 2019] Rekha, S. and Anila, E. (2019). In vitro cytotoxicity studies of surface modified cas nanoparticles on 1929 cell lines using mtt assay. *Materials Letters*, 236 :637–639.
- [Rueckel et al., 2006] Rueckel, M., Mack-Bucher, J. A., and Denk, W. (2006). Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46):17137-17142.
- [Saptarshi et al., 2013] Saptarshi, S. R., Duschl, A., and Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins : relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*, 11(1) :26.
- [Schubert et al., 2015] Schubert, M., Steude, A., Liehm, P., Kronenberg, N. M., Karl, M., Campbell, E. C., Powis, S. J., and Gather, M. C. (2015). Lasing within live cells containing intracellular optical microresonators for barcode-type cell tagging and tracking. *Nano Letters*, 15(8) :5647–5652.
- [Servent and Boulay, 2006] Servent, J. and Boulay, C. G. E. M.-H. (2006). les rayonnements ionisants. prévention et maîtrise du risque.
- [Sha et al., 1994] Sha, W., Liu, C.-H., and Alfano, R. (1994). Spectral and temporal measurements of laser action of rhodamine 640 dye in strongly scattering media. *Optics letters*, 19(23) :1922-1924.
- [Shaner et al., 2004] Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12) :1567.

- [Shaner et al., 2007] Shaner, N. C., Patterson, G. H., and Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal of cell science*, 120(24):4247-4260.
- [Shin et al., 2006] Shin, H.-W., Cho, S. Y., Choi, K.-H., Oh, S.-L., and Kim, Y.-R. (2006). Directional random lasing in dye-ti o 2 doped polymer nanowire array embedded in porous alumina membrane. *Applied physics letters*, 88(26) :263112.
- [Shuzhen et al., 2008] Shuzhen, F., Xingyu, Z., Qingpu, W., Chen, Z., Zhengping, W., and Ruijun, L. (2008). Inflection point of the spectral shifts of the random lasing in dye solution with tio2 nanoscatterers. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 42(1) :015105.
- [Sigma-Aldrich,] Sigma-Aldrich. Fluorescein sodium salt. https://www. sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f6377. Accessed : 2019-07-23.
- [Song et al., 1995] Song, L., Hennink, E., Young, I. T., and Tanke, H. J. (1995). Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 68(6) :2588-2600.
- [Song et al., 2006] Song, Q., Liu, L., Xiao, S., Zhou, X., Wang, W., and Xu, L. (2006). Unidirectional high intensity narrow-linewidth lasing from a planar random microcavity laser. *Physical review letters*, 96(3):033902.
- [Song et al., 2010] Song, Q., Xiao, S., Xu, Z., Liu, J., Sun, X., Drachev, V., Shalaev, V. M., Akkus, O., and Kim, Y. L. (2010). Random lasing in bone tissue. *Optics Letters*, 35(9) :1425-1427.
- [Spence and Johnson, 2010] Spence, M. T. and Johnson, I. D. (2010). The molecular probes handbook : a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
- [Stephens and Allan, 2003] Stephens, D. J. and Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *science*, 300(5616) :82-86.
- [Stern, 1924] Stern, O. (1924). Z elektrochem. Angew Phys Chem, 30:508-516.
- [Stockman, 2011] Stockman, M. I. (2011). Nanoplasmonics : past, present, and glimpse into future. *Optics express*, 19(22) :22029–22106.
- [Stokes, 1852] Stokes, G. G. (1852). On the change of refrangibility of light. Philosophical transactions of the Royal Society of London, (142) :463-562.
- [Stumm and Morgan, 2012] Stumm, W. and Morgan, J. J. (2012). Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters, volume 126. John Wiley & Sons.
- [Takahashi et al., 2009] Takahashi, T., Nakamura, T., and Adachi, S. (2009). Bluelight-emitting znse random laser. *Optics letters*, 34(24) :3923-3925.
- [Tourbin, 2006] Tourbin, M. (2006). Caractérisation et comportement de suspensions concentrées de nanoparticules sous écoulement : Application aux processus d'agrégation et de rupture. PhD thesis.
- [Valeur, 2003] Valeur, B. (2003). Molecular fluorescence : Principle and application. digital Encyclopedia of Applied Physics, pages 477–531.
- [Verwey et al., 1948] Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G., and Van Nes, K. (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids : the interaction of sol particles having an electric double layer. Elsevier Publishing Company.

- [Wang et al., 2014] Wang, C.-S., Chang, T.-Y., Lin, T.-Y., and Chen, Y.-F. (2014). Biologically inspired flexible quasi-single-mode random laser : An integration of pieris canidia butterfly wing and semiconductors. *Scientific reports*, 4:6736.
- [Wang et al., 2012] Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., and Luo, Y. (2012). Rnascope : a novel in situ rna analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal* of *Molecular Diagnostics*, 14(1) :22-29.
- [Wang et al., 2007] Wang, J. J., Sanderson, B. J., and Wang, H. (2007). Cytoand genotoxicity of ultrafine tio2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 628(2) :99-106.
- [Wang et al., 2017] Wang, Y., Duan, Z., Qiu, Z., Zhang, P., Wu, J., Zhang, D., and Xiang, T. (2017). Random lasing in human tissues embedded with organic dyes for cancer diagnosis. *Scientific reports*, 7(1) :8385.
- [Wiersma, 2008] Wiersma, D. S. (2008). The physics and applications of random lasers. *Nature Physics*, 4(5):359.
- [Winkler et al., 2018] Winkler, H. C., Notter, T., Meyer, U., and Naegeli, H. (2018). Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. Journal of Nanobiotechnology, 16(1):51.
- [Witschger and Fabriès, 2005] Witschger, O. and Fabriès, J.-F. (2005). Particules ultra-fines et santé au travail : 1-caractéristiques et effets potentiels sur la santé.
- [Wu et al., 2003] Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., and Bruchez, M. P. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*, 21(1):41.
- [Yang et al., 2006] Yang, H., Lau, S., Yu, S., Abiyasa, A., Tanemura, M., Okita, T., and Hatano, H. (2006). High-temperature random lasing in zno nanoneedles. *Applied physics letters*, 89(1):011103.
- [Yang et al., 2009] Yang, H., Yu, S., Lau, S., Tsang, S., Xing, G., and Wu, T. (2009). Ultraviolet coherent random lasing in randomly assembled sno 2 nanowires. Applied physics letters, 94(24):241121.
- [Yee, 1966] Yee, K. (1966). Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell's equations in isotropic media. *IEEE Transactions on anten*nas and propagation, 14(3):302-307.
- [Yi et al., 2012] Yi, J., Feng, G., Yang, L., Yao, K., Yang, C., Song, Y., and Zhou, S. (2012). Behaviors of the rh6g random laser comprising solvents and scatterers with different refractive indices. *Optics Communications*, 285(24) :5276-5282.
- [Ying et al., 2007] Ying, B.-W., Fourmy, D., and Yoshizawa, S. (2007). Substitution of the use of radioactivity by fluorescence for biochemical studies of rna. *Rna*, 13(11):2042-2050.
- [Yuste, 2005] Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. Nature methods, 2(12):902.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, D., Kostovski, G., Karnutsch, C., and Mitchell, A. (2012). Random lasing from dye doped polymer within biological source scatters : The pomponia imperatorial cicada wing random nanostructures. Organic Electronics, 13(11) :2342-2345.

- [Zhang et al., 2008] Zhang, Y.-Z., Jaron, S., Buller, G., and Godfrey, W. L. (2008). Use of qdot[®] nanocrystal primary antibody conjugates in flow cytometry. *Journal* [serial on the Internet].
- [Zhu et al., 2009] Zhu, R. R., Wang, S. L., Chao, J., Shi, D. L., Zhang, R., Sun, X. Y., and Yao, S. D. (2009). Bio-effects of nano-tio2 on dna and cellular ultrastructure with different polymorph and size. *Materials Science and Engineering* : C, 29(3):691-696.
- [Ziegler et al., 2015] Ziegler, J., Djiango, M., Vidal, C., Hrelescu, C., and Klar, T. A. (2015). Gold nanostars for random lasing enhancement. Optics express, 23(12) :15152-15159.
- [Zucker et al., 2010] Zucker, R., Massaro, E., Sanders, K., Degn, L., and Boyes, W. (2010). Detection of tio2 nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77(7):677-685.