Etude de la structure nanométrique et de la viscosité locale de l'espace extracellulaire du cerveau par microscopie de fluorescence de nanotubes de carbone uniques

Noémie Danné

▶ **To cite this version:**

Noémie Danné. Etude de la structure nanométrique et de la viscosité locale de l'espace extracellulaire du cerveau par microscopie de fluorescence de nanotubes de carbone uniques. Autre. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0199 . tel-01960563

HAL Id: tel-01960563
https://theses.hal.science/tel-01960563

Submitted on 19 Dec 2018

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

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

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

par Noémie DANNÉ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : " Lasers, Matière et Nanosciences "

Etude de la structure nanométrique et de la viscosité locale de l'espace extracellulaire du cerveau par microscopie de fluorescence de nanotubes de carbone uniques

---

Soutenue le 30 octobre 2018

Devant la commission d'examen formée de :

Mme. ARGOUL Françoise	Directrice de Recherche CNRS	Présidente
Mme. FRAGOLA Alexandra	Maître de Conférence Univ. Pierre et Marie Curie	Rapporteuse
M. BERCIAUD Stéphane	Professeur Univ. de Strasbourg	Rapporteur
M. TREUSSART François	Professeur ENS Paris-Saclay	Examinateur
M. GROC Laurent	Directeur de Recherche CNRS	Examinateur
M. COGNET Laurent	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de Thèse

"Traitez les gens comme s'ils étaient ce qu'ils devraient être, et vous les aiderez ainsi à devenir ce qu'ils peuvent être"

De Johann Wolfgang von Goethe

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Françoise Argoul d'avoir présidé l'ensemble du jury pour ma soutenance. Merci également à Alexandra Fragolas et Stephan Berciaud d'avoir accepté d'être rapporteur.euse de ma thèse ainsi que François Treussart et Laurent Groc d'avoir accepté d'être examinateurs malgré les vacances scolaires.

Je voudrais également remercier ma maman, mon frère et mon oncle de m'avoir soutenu tout au long de mon parcours.

Bien évidemment, je remercie mon directeur de thèse, Laurent Cognet, de m'avoir accompagné très généreusement tout au long de ces trois années intenses en rebondissements. Tu as toujours su trouver les bons mots pour que je donne le meilleur de moi-même.

Merci également à Phillipe Bouyer et Brahim Lounis de m'avoir accepté respectivement dans leur laboratoire et leur équipe. Je remercie également Philippe Tamarat pour tous ses précieux conseils.

Un grand Merci à Antoine Godin qui a encadré efficacement ce début de thèse. Merci pour tous les savoirs expérimentaux et théoriques que tu m'as apporté. Un grand Merci également à mon colocataire de bureau, Pierre Bon, de m'avoir supporté pendant ces trois années riches en émotions en trouvant toujours un petit mot pour me remonter le moral avec humour. Je voudrais également remercier Jean-Baptiste Trebbia pour tous nos échanges très enrichissants ainsi que pour tes petites "blagounettes" qui donnent le sourire. Merci également à Chiara Paviolo et Fédérico Soria pour votre soutien et pour la richesse de nos échanges scientifiques.

De manière générale, Merci à tous les membres du LP2N, autant doctorants que post-doctorants et permanents, d'avoir pu partager cette aventure ensemble.

"Bla, bla, bla ..." Je remercie Nelson (Nestor) Helaine pour nos longues discussions scientifiques et "philosophiques" que j'ai eu plaisir à partager.

Je remercie Jeanne Linares-Loyez pour son optimisme impressionnant qui m'a appris à voir certains aspects de la vie sous de nouveaux angles. Merci également à Antonine Rochet de m'avoir initié à la relaxation et à la méditation qui m'ont été et me seront très utiles pour

la suite. Vous serez toujours mes "petites sœurs de thèse" :)

"Nanonube... Marynland... Nouvelles Zélande..." et j'en passe. Merci Camille d'avoir apporté une touche de fraicheur dans l'équipe et de m'avoir apporté beaucoup autant humainement que scientifiquement.

Je remercie le site "Ciel mon doctorat" de m'avoir permis d'anticiper et/ou d'accepter avec humour certaines situations qui ont ou qui auraient pu se produire.

Merci également à certains de mes anciens professeurs de physique et de chimie : Karine Labarde, Françoise Marc, Carine Ferrand, Catherine Bernou qui m'ont donné l'envie de f aire ce métier.

Enfin, je souhaiterai faire une dernière dédicace à toutes les personnes en coulisses, qui se reconnaitront et qui sans elles ce parcours n'aurait pas été possible.

Table des matières

Introduction i

1 Les nanotubes de carbone luminescents 1

1.1 Synthèse des nanotubes de carbone . . . 2

1.1.1 Dépôt chimique en phase vapeur (CVD) . . . 2

1.1.2 Autres méthodes de synthèse . . . 3

1.2 Propriétés géométriques des SWCNTs . . . 4

1.2.1 Structure géométrique dans l'espace réel . . . 4

1.2.2 Structure géométrique dans l'espace réciproque . . . 5

1.3 Propriétés électroniques . . . 7

1.4 Transitions optiques . . . 10

1.4.1 Modèle à un électron . . . 10

1.4.2 Modèle excitonique . . . 12

1.5 Photoluminescence des nanotubes de carbone . . . 16

1.5.1 Photoluminescence . . . 16

1.5.2 Efficacité de la photoluminescence : . . . 17

1.5.3 Mobilité des excitons . . . 18

1.6 Bilan du premier chapitre . . . 19

2 Détection optimale de nanotubes de carbone individuels pour la biologie 21

2.1 Identification d'un complexe "nanotube-tensioactif" biocompatible minimisant les interactions non-spécifiques avec les cellules . . . 22

2.1.1 Etat de l'art . . . 22

2.1.2 Préparation des échantillons . . . 24

2.1.2.1 Préparation des complexes "SWCNTs-tensioactifs" . . . 24

2.1.2.2 Préparation des cellules . . . 25

2.1.3 Etude morphologique des cellules . . . 26

2.1.4 Tests de viabilité . . . 27

2.1.5 Tests de prolifération 28
2.1.6 Mesure de l'interaction "nanotubes-cellules" 29
2.1.7 Intensité de photoluminescence 31
2.1.8 Mouvements de diffusion des nanotubes dans les réseaux biomimétiques 33
2.1.9 Conclusion 34
2.2 Longueur d'onde optimale pour l'excitation de la photoluminescence de nanotubes uniques dans les tissus neuronaux 35
2.2.1 Etudes préliminaires sur le mécanisme de génération de la photoluminescence par up-conversion 37
2.2.2 Détection et suivi de nanotubes *biocompatibles* photoluminescents uniques excités par upconversion 40
2.2.3 Comparaison de l'efficacité de photoluminescence des "nanotubes-PLPEG" en fonction des longueurs d'onde d'excitation 42
2.2.4 Détection des nanotubes individuels dans des tissus neuronaux 46
2.2.5 Intégrités des tissus soumis à des illuminations laser 48
2.2.5.1 Coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus 48
2.2.5.2 Modélisation de l'augmentation de température des tissus sous l'effet d'une irradiation laser 49
2.3 Bilan du Chapitre 2 53

3 Imagerie de super-résolution de l'espace extra-cellulaire du cerveau par suivi de nanotubes de carbone individuels 55
3.1 Imagerie de tissus biologiques à très haute résolution 56
3.1.1 Microscopie électronique 56
3.1.2 Méthodes dynamiques non-résolutives 57
3.1.3 Les techniques de super-résolution optiques 58
3.2 Cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux intactes en profondeur 60
3.2.1 Protocole expérimental 61
3.2.2 Précision de localisation d'un nanotube individuel : super-localisation 63
3.2.3 Mesures *in situ* de la longueur des nanotubes 64
3.2.4 Mesure des dimensions caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats 66
3.2.5 Dimensions de l'espace extra-cellulaire mesurées par analyse dynamique 68
3.2.6 Mesure de la viscosité linéaire locale de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats : Etude simplifiée 70

3.2.7 Modification chimique de l'espace extra-cellulaire 73
3.3 Bilan du Chapitre 3 75

Notations du Chapitre 4 **77**

4 Analyse de la diffusion des nanotubes de carbone dans les espaces complexes : extraction des paramètres rhéologiques locaux **81**
4.1 Mouvements browniens d'objets individuels - Introduction 82
4.1.1 Mouvement brownien d'objets sphériques dans un fluide newtonien . 82
4.1.2 Mouvement brownien d'objets uni-dimensionnels 84
4.2 Diffusion de nano-objets dans les espaces complexes : Etat de l'art 90
4.2.1 Les gels de polymères comme système modèle d'environnements complexes 90
4.2.2 Modèles d'analyse macroscospiques prenant en compte la tortuosité des espaces complexes 92
4.2.3 Modèles d'analyse prenant en compte la tortuosité des espaces complexes et les interactions hydrodynamiques locales 94
4.2.4 Impact de la flexibilité des nanotubes sur leur diffusion dans les espaces encombrés 96
4.3 Méthodologie proposée pour extraire la viscosité locale et la complexité d'un environnement complexe à partir de la diffusion d'un nanotube individuel . . 100
4.3.1 Détails expérimentaux 100
4.3.2 Détermination du paramètre de complexité d'un gel d'agarose et de sa viscosité moyennés sur la trajectoire d'un nanotube individuel 101
4.3.3 Détermination du paramètre de complexité d'un gel d'agarose et de sa viscosité localement le long de la trajectoire d'un nanotube individuel 105
4.3.3.1 Extraction du paramètre de complexité local 105
4.3.3.2 Calcul des viscosités *in situ* locales 107
4.4 Validation du modèle d'analyse sur des gels d'agarose 108
4.4.1 Evolution du paramètre de complexité en fonction de la concentration des gels 108
4.4.2 Evolution des viscosités linéaires et *in situ* en fonction de la concentration des gels 109
4.4.2.1 Evolution des viscosités locales déterminées avec des nanosphères 109
4.4.2.2 Evolution des viscosités locales déterminées par l'utilisation de nanotubes 114

4.4.2.3 Estimation de la viscosité intrinsèque du fluide contenu dans les gels . . . 117
4.5 Extraction du paramètre de complexité et de la viscosité *in situ* locales au sein de l'espace extra-cellulaire de tissus de cerveaux vivants . . . 119
4.5.1 Caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats sains et altérés induites chimiquement . . . 119
4.5.2 Caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de souris sains et dans un modèle de la maladie de Parkinson . . . 122
4.5.3 Cartes de viscosités *in situ* locales de l'ECS de cerveaux vivants qui seraient vues par des molécules sub-micrométriques de différentes tailles 124
4.6 Bilan du Chapitre 4 . . . 127

5 Génération de nanotubes de carbone ultra-courts luminescents par localisations des excitons 131
5.1 Etat de l'art . . . 132
5.1.1 Photoluminescence des nanotubes en fonction de leur longueur . . . 132
5.1.2 Défauts luminescents dans les nanotubes de carbone . . . 133
5.2 Nanotubes ultra-courts luminescents . . . 134
5.2.1 Préparation des nanotubes ultra-courts . . . 134
5.2.2 Fonctionnalisation des nanotubes ultra-courts . . . 136
5.2.3 Photoluminescence des nanotubes ultra-courts . . . 136
5.2.3.1 Mesures d'ensemble . . . 136
5.2.3.2 Mesures sur des nanotubes individuels . . . 137
5.2.3.3 Origine de la photoluminescence à l'énergie E_{11} . . . 139
5.3 Super-localisation des sites de photoluminescence . . . 144
5.3.1 Génération et observation du clignotement des nanotubes . . . 144
5.3.2 Localisation super-résolue des sites de photoluminescence . . . 145
5.4 Bilan du Chapitre 5 . . . 149

Conclusions et Perspectives 151

Introduction

Contexte :

Depuis ces 40 dernières années, la communauté scientifique cherche à toujours mieux imager le cerveau pour l'observer, le comprendre et détecter d'éventuelles anomalies ou modifications au cours du temps. Le cerveau est principalement composé de neurones qui sont les cellules de base de la communication neuronale et de cellules gliales qui jouent entre autre un rôle de protection et de maintien de la structure neuronale. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la compréhension de l'espace extra-cellulaire (ECS – Extra-Cellular Space) du cerveau qui correspond à l'espace qui existe entre toutes ces cellules. L'ECS est un environnement clé du cerveau. Nous savons que les nutriments et neurotransmetteurs y circulent pour assurer une communication neuronale optimale. La structure de l'ECS semble jouer un rôle dans les processus d'élimination des toxines durant le sommeil [1] et dans le cadre de la progression de maladies neuro-dégénératives entre autres [2]. Sa structure et ses dimensions pourraient ainsi varier dans ses diverses situations et également en fonction de l'âge et des régions du cerveaux [3]. Malgré son importance, sa viscosité et sa structure locale sont encore mal appréhendées.

Les techniques couramment utilisées dans le domaine médical pour imager le cerveau humain comme l'imagerie fonctionnelle par résonnance magnétique (f-MRI, *functional Magnetic Resonnance Imaging*), la tomographie par émission positron (PET, *Positron Emission Tomography*), la tomographie de rayon X assistée par ordinateur (X-CT *rayon X Computed Tomography*), et la tomographie par émission de photons uniques SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) ont l'avantage d'être non-invasives. Cependant ces techniques sont limitées par le niveau de contraste entre le signal d'intérêt et le bruit de fond limitant la résolution spatiale (40 µm pour le MRI [4], 2 mm pour le PET [5], 5 μm pour le X-CT [6] et 250 μm pour le SPECT [7]).

Les dimensions des structures cellulaires de l'ECS sont souvent plus petites que 10 μm ce qui est inférieur aux résolutions précédemment citées. De manière à observer les mécanismes cellulaires au sein de tissus à l'échelle microscopique, plusieurs techniques à haute

résolution ont été développées comme la microscopie électronique [8] et les techniques de super-résolution optique [9].

La microscopie électronique offre une très bonne résolution spatiale ($\sim$ 0.04 nm sur des matériaux non-organiques [10]) et permet de révéler la structure des réseaux cellulaires de tranches de cerveaux fixés. Les tranches peuvent être fixée chimiquement [11] ou par cryo-fixation. La Figure.1 montre un exemple d'images de microscopie électronique de tranches de cerveau cryo-fixée et fixée chimiquement [12].

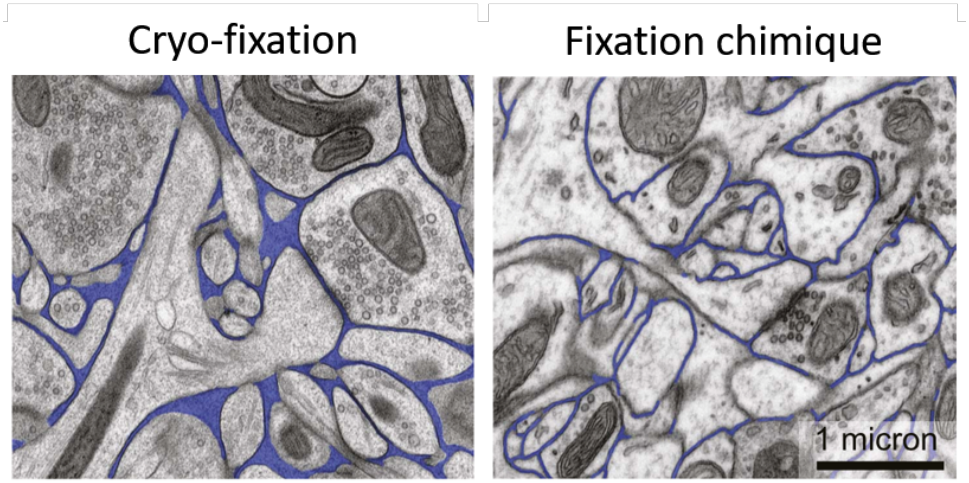

Figure 1 : *Image de l'ECS de tranche de cerveau fixée par cryo-fixation et par fixation chimique. Les cellules sont en gris et l'ECS est en bleu. La barre d'échelle est de 1 μm. Figure extraite de la référence [12]*

L'espace extra-cellulaire est représenté en bleu et les cellules en gris. Nous pouvons voir que le réseau de cellules est dense mais que les dimensions caractéristiques de l'ECS révélées par microscopie électronique dépendent fortement des protocoles de fixation.

Plus précisément, les travaux de Korogod et al. ont montré que le volume de l'ECS était plus grand pour des tranches cryo-fixées que pour des tranches fixées chimiquement. Cette valeur a également été obtenue précedemment par des mesures de coefficients de diffusion moyens de différents traceurs introduits dans l'ECS [13]. La véritable valeur de ses dimensions intimes reste cependant encore débattue. Par ailleurs, la microscopie électronique ne permet pas de mesurer ni les propriétés morphologiques de l'ECS dans des conditions physiologiques ni ses propriétés rhéologiques.

L'étude de la diffusion d'un ensemble de molécules introduites dans l'ECS permet de mesurer ses propriétés rhéologiques à l'échelle macroscopique et dans des conditions physiologiques *via* l'étude de l'évolution du profil de fluorescence des molécules introduites dans l'ECS en fonction du temps (Integrative Optic Imaging measurements). À un instant t, les molécules fluorescentes sont introduites grâce à une micropipette dans la zone d'intérêt de l'ECS. Les

molécules diffusent naturellement dans l'espace extra-cellulaire. La largeur et l'intensité du profil de fluorescence enregistré dans le plan focal d'intérêt permet d'obtenir une mesure globale du coefficient de diffusion qui est ensuite comparé au coefficient de diffusion des mêmes molécules dans un gel d'agarose à 0.3%. Le coefficient de diffusion dans l'ECS dépendrait ainsi de l'augmentation du chemin pris pour contourner les cellules $(1/3)$, de la viscosité $(1/3)$ et de la présence de cul-de-sac $(1/3)$ avec des contributions similaires [14] [15] [16] [17]. Cependant, cette méthode ne permet pas actuellement de mesurer directement les propriétés rhéologiques à l'échelle nanométrique (locale) et donc de rendre compte de l'hétérogénéité des structures et des propriétés rhéologiques de l'ECS.

Cette impossibilité actuelle est liée aux manques d'approches expérimentales disponibles pour cette tâche, et en particulier la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus, le photoblanchiment des molécules généralement utilisées et la limite de diffraction inhérente aux systèmes optiques conventionnels. Cette limite rend compte de la distance minimale entre deux points lumineux que l'on peut différencier avec un système optique (cf. Figure.2). Dans le spectre visible, cette limite est de l'ordre de 300 nm $(\lambda/2)$.

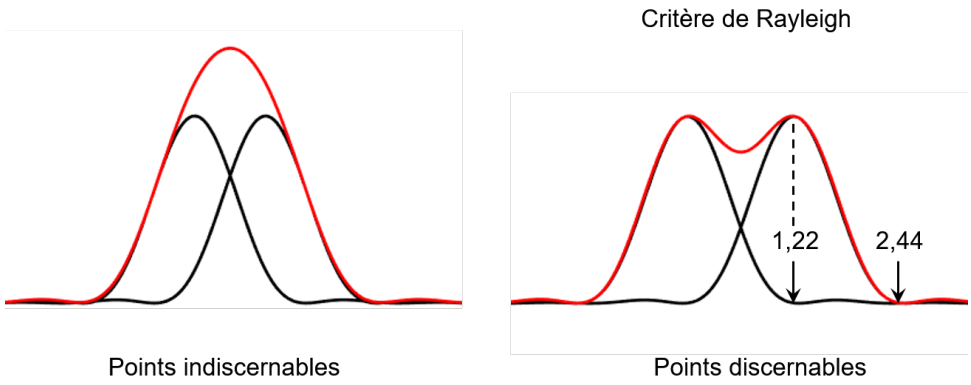

Figure 2 : *Limite de résolution optique : Critère de Rayleigh*

Dans cette thèse, nous allons exposer des stratégies mises en place pour mesurer les dimensions caractéristiques et les propriétés rhéologiques de l'espace extra-cellulaire de cerveau de rongeur sous la limite de diffraction et simultanément.

Pour cela, nous avons développé une technique de microscopie de super-résolution basée sur le suivi de nanotubes de carbone individuels luminescents avec une précision de localisation sub-longueur d'onde. Les nanotubes de carbone sont d'excellents émetteurs photo-stables dans le proche infra-rouge ce qui est un grand avantage pour les applications biologiques car cette fenêtre spectrale correspond à la première fenêtre de transparence des tissus biologiques. Nous verrons que par leurs dimensions fortement anisotropes, les nanotubes de carbone ont des propriétés de diffusion singulières. De précédents travaux au sein du groupe ont montré

que les nanotubes pouvaient se mouvoir dans les espaces encombrés même si les dimensions latérales caractéristiques étaient inférieures à la longueur des nanotubes [18]. De plus, la photo-stabilité des nanotubes permet de les imager durant plusieurs minutes ce qui sera un avantage pour mesurer les propriétés rhéologiques locales des environnements.

Pour réaliser ces expériences dans de bonnes conditions, les nanotubes devront être biocompatibles et le rapport signal sur bruit devra être suffisant pour les détecter en profondeur dans les tissus, sans les endommager.

Organisation du manuscrit :

Dans le chapitre 1, nous exposerons les propriétés géométriques et optiques des nanotubes de carbone. A partir de la structure de bande du graphène et des nanotubes, nous exposerons brièvement les propriétés de photoluminescence des nanotubes. Nous verrons également qu'il sera nécessaire d'encapsuler les nanotubes dans des tensio-actifs pour les individualiser dans les milieux polaires et les rendre luminescents.

Dans le chapitre 2, nous nous intéresserons aux problématiques de biocompatibilité des complexes « nanotubes – tensioactifs » dans les milieux biologiques. Pour cela, nous comparerons premièrement la cytotoxicité et le degré d'interactions non-spécifiques entre les complexes « nanotubes-tensioactifs » et les cellules pour des complexes qui n'ont pas révélé de forte toxicité dans des études de la littérature.

Deuxièmement, la richesse des propriétés optiques des nanotubes nous permettra d'envisager différentes stratégies pour exciter leur photoluminescence. Pour déterminer notre capacité à détecter la luminescence des nanotubes en profondeur dans les tissus, nous mesurerons les efficacités de luminescence en fonction des différentes stratégies d'excitations. Compte tenu des propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière au sein des tissus biologiques, nous déterminerons la stratégie optimale nous permettant de réaliser nos expériences sans altérer les conditions physiologiques de nos échantillons.

Grâce aux connaissances des chapitres 1 et 2, nous utiliserons dans le chapitre 3, les nanotubes comme sonde de l'espace extra-cellulaire (ECS) de tranches de cerveaux de rats vivantes. Grâce à la super-localisation des nanotubes, nous mesurerons les dimensions caractéristiques de l'ECS et reconstruirons des cartes super-résolues de la topologie de l'ECS. Nous proposerons également une approche simple pour mesurer les propriétés rhéologiques locales de l'ECS. Nous nous intéresserons aux propriétés de l'ECS de cerveaux de rats sains et de cerveaux de rats dont on a altéré chimiquement l'espace extra-cellulaire.

Nous proposerons dans le chapitre 4 une analyse plus fine de la diffusion des nanotubes dans les espaces encombrés. Nous exposerons premièrement, les modèles les plus couramment

utilisés dans la littérature. À partir des modèles macroscopiques et microscopique de diffusion des nano-objets dans les gels de polymères, pris comme systèmes modèles, nous proposerons une stratégie pour mesurer un paramètre de complexité et les viscosités locales intrinsèques des fluides contenus au sein des structures complexes. Nous appliquerons ensuite la méthodologie choisie à la diffusion des nanotubes introduits dans l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rongeurs. Nous verrons qu'à partir des viscosités intrinsèques locales et des dimensions moyennes de l'ECS, nous serons en mesure de modéliser la viscosité moyenne qui serait vue par des molécules de tailles arbitraires pour simuler les molécules naturellement présentes dans l'ECS.

Le chapitre 5 sera consacré à une étude purement photonique réalisée sur des nanotubes ultra-courts ($L < 100$ nm) qui ne sont pas intrinsèquement luminescents. Pour les rendre luminescents, nous utiliserons des fonctions chimiques afin de créer des défauts luminescents localisés sur lesquels les excitons ont la possibilité de se piéger et éventuellement de se dépiéger.

Dans le futur, il pourrait être intéressant d'utiliser ces nanotubes ultra-courts pour faciliter la diffusion et mesurer les viscosités locales qui seraient vues par des molécules naturellement présentes dans l'ECS.

Chapitre 1

Les nanotubes de carbone luminescents

Les nanotubes de carbone peuvent être classés en deux catégories : les nanotubes de carbone mono-parois (*Single Wall Carbon Nanotubes* - SWCNTs) et les nanotubes de carbone multi-parois (*Multi Wall Carbon Nanotubes* - MWCNTs). Les MWCNTs sont composés de plusieurs feuillets d'atomes de carbone superposés. Les SWCNTs sont eux constitués d'un seul feuillet d'atomes de carbone et peuvent se sous-diviser en deux familles : les SWCNTs métalliques et les SWCNTs semi-conducteurs en fonction de l'enroulement du feuillet de graphène. Sous certaines conditions que nous expliciterons dans ce chapitre, les SWCNTs semi-conducteurs peuvent être intrinsèquement photoluminescents dans le proche infra-rouge. Cette propriété est à la base de ce travail de thèse et sera particulièrement utile pour des applications en neurosciences.

Dans ce chapitre, nous exposerons succinctement les propriétés géométriques et électronique des nanotubes de carbone, avant de présenter les notions de base nécessaires à la compréhension de leurs propriétés de luminescence. Nous allons dans un premier temps présenter quelques détails sur la synthèse des nanotubes utilisés lors de cette thèse.

1.1 Synthèse des nanotubes de carbone

Dans cette thèse, nous avons essentiellement utilisé des nanotubes HipCo (*High Pressure Carbon Monoxide*) et des nanotubes CoMoCAT (*Cobalt-Molybdenum Catalyst*) qui sont synthétisés par dépôt chimique en phase vapeur (CVD) [19]. Nous allons premièrement donner quelques détails sur les procédés de synthèse des nanotubes HipCo et CoMoCAT. Nous décrierons ensuite brièvement les étapes de synthèse des nanotubes par génération d'arc électrique [20] et par ablation laser [21].

1.1.1 Dépôt chimique en phase vapeur (CVD)

Le dépôt chimique en phase vapeur est une méthode de synthèse s'appuyant sur des réactions chimiques entre des composés solides (catalyseurs) et des composés en phase vapeur (monoxide de carbone - CO). Au contact des catalyseurs, le CO se décompose en carbone solide $C_{(s)}$ et en dioxyde de carbone CO_2 induisant la croissance des nanotubes à partir des sites de réaction.

Nanotubes HipCo

La synthèse des nanotubes HipCo a lieu dans un écoulement gazeux de monoxyde de carbone (CO) chauffé et maintenu sous haute pression dans une enceinte. La température varie typiquement entre 800°C et 1200°C sous une pression de 1 [22] à 100 atm [23]. La distribution des diamètres des nanotubes varie en fonction de la température et de la pression. Le pentacarbonyl de fer ($Fe(CO)_5$) sert de catalyseur. Sous l'effet de la chaleur, le $Fe(CO)_5$ se décompose et produit des atome de fer en phase vapeur qui s'agrègent. Ces agrégats servent de supports pour la croissance des nanotubes. Le diamètre des nanotubes varie typiquement entre 0.6 nm et 1.3 nm pour une température de 1200°C et une pression de 10 atm. Les nanotubes peuvent éventuellement être ensuite purifiés pour éliminer le fer [24].

Nanotubes CoMoCAT

La synthèse des nanotubes CoMoCAT a été mise au point par D. E. Resasco et al [25]. La température de synthèse varie typiquement entre 700 et 950°C sous une pression de 1 à 10 atm de CO. Dans cette technique, le Cobalt (Co) et le Molybdenum (Mo) sont utilisés comme catalyseurs. Un substrat d'oxyde de Mo et une couche de cobalt molybdate ($CoMoO_4$) sont déposés successivement dans l'enceinte sur une partie de la surface. Du cobalt non-métallique est déposé en excès sur l'autre partie de la surface. Au cours de la réaction, la structure cristalline du cobalt va changer. Sous atmosphère de CO, l'oxyde de Mo devient du carbure de Mo. Cette réaction casse la structure du $CoMoO_4$ permettant la réduction du cobalt par le monoxyde de carbone. Le cobalt devient métallique. De la même manière que pour les HipCo, le cobalt métallique s'agglomère et les nanotubes croissent sur les agrégats de cobalt grâce à

la réaction de décomposition du CO.

Les proportions de Co et de Mo peuvent varier pour favoriser différents types de nanotubes. Si le Co est en excès par rapport au Mo, la synthèse favorisera les nanotubes multi-parois. Après l'étape de synthèse, les nanotubes sont détachés du support. Pour cela, l'échantillon est tout d'abord plongé dans un bain basique pour éliminer les catalyseurs. Il est ensuite oxydé dans l'air à 200 - 250°C et est finalement plongé dans un bain d'acide nitrique ou chlorhydrique.

En fonction des procédés de synthèse, la distribution des diamètres des nanotubes varie. La distribution des HipCo est plus large que celle des CoMoCAT [25] car cette dernière favorise la synthèse de nanotubes de petits diamètres.

1.1.2 Autres méthodes de synthèse

Arc électrique

La synthèse des nanotubes de carbone par génération d'un arc électrique est un procédé d'exfoliation. Elle se produit sous atmosphère d'Helium et à basse pression ($\sim$ 650 mbar).

Pour cette méthode, un arc électrique est généré entre une cathode et une anode. La cathode est typiquement munie d'une tige en graphite de $\sim$ 16 mm de diamètre et de $\sim$ 40 mm de long [20]. L'anode possède également une tige de graphite de plus petit diamètre et de plus grande longueur. La tige formant l'anode est forée et remplie d'un mélange de catalyseurs métalliques et de poudre de graphite. Une tension d'environ 30 Volts est maintenue entre l'anode et la cathode. La distance entre les deux tiges est de quelques millimètres tout au long de la synthèse. La différence de tension génère un courant entre les deux tiges produisant un arc électrique. Les nanotubes exfoliés se retrouvent sur la cathode sous forme de filaments de carbone enchevêtrés. Avec cette méthode de synthèse, le diamètre moyen des nanotubes est typiquement de 1.4 nm.

Ablation laser

Pour la synthèse des nanotubes par ablation laser, une cible de Nickel - Cobalt - Graphite est placée dans une enceinte où circule un écoulement gazeux d'Argon. La température de l'enceinte est maintenue autour de 1500 K [26] et un laser irradie la cible. La surface de la cible se vaporise et un panache de vapeur se dilate et se refroidit très vite. La température proche de la cible est estimée autour de 3500 K. Le Nickel et le Cobalt servent de catalyseurs pour la croissance des nanotubes. Cette technique favorise la synthèse de nanotubes mono-paroi métalliques [21].

1.2 Propriétés géométriques des SWCNTs

1.2.1 Structure géométrique dans l'espace réel

Pour comprendre la structure géométrique des nanotubes, nous pouvons partir de l'arrangement atomique du graphène.

Le graphène est une couche de graphite à deux dimensions. Les atomes du graphène forment une structure hexagonale contenant deux atomes par maille. La distance interatomique est de 1.42 Å [27]. Chaque atome est relié à 3 atomes plus proches voisins. L'axe longitudinal du nanotube est représenté par le vecteur $\vec{T}$ qui est aussi appelé vecteur de translation (cf. Figure.1.1).

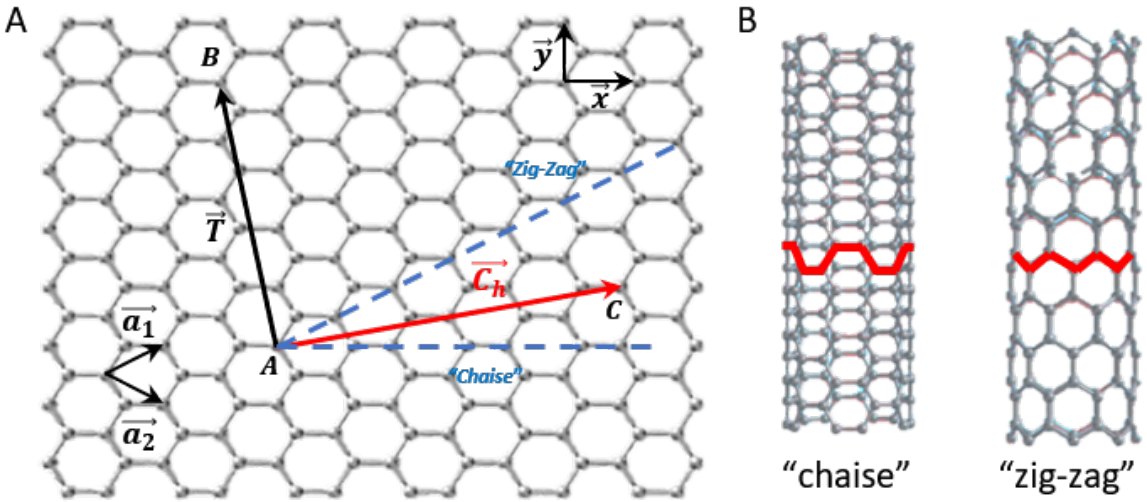

Figure 1.1 : *(A) Feuillet de graphène et représentation du vecteur chiral $\vec{C_h}$ et du vecteur de translation $\vec{T}$ pour un nanotube (4,2), (B) Exemple de nanotubes de forme "chaise" et "zig-zag".*

La direction de l'enroulement du feuillet de graphène formant un nanotube est définie par le vecteur chiral $\vec{C_h}$, qui est perpendiculaire au vecteur $\vec{T}$.

$$\vec{T}.\vec{C_h} = 0 \tag{1.1}$$

Le vecteur chiral peut se décomposer en deux vecteurs $\vec{a_1}$ et $\vec{a_2}$, qui sont les vecteurs de translation fondamentaux de la maille unitaire du graphène.

$$\vec{C_h} = n\ \vec{a_1} + m\ \vec{a_2} \tag{1.2}$$

Les coordonnées de $\vec{a_1}$ et $\vec{a_2}$ dans la base orthonormée $(\vec{x}, \vec{y})$ sont respectivement $a_0\left(\frac{\sqrt{3}}{2}, \frac{1}{2}\right)$ et $a_0\left(\frac{\sqrt{3}}{2}, -\frac{1}{2}\right)$ avec $a_0 = 0.246\ nm$.

Les coefficients n et m permettent de nommer les nanotubes par chiralité (n, m). Si $n = 0$, le nanotube est de forme "zig-zag", si $m = 0$, le nanotube est de forme "chaise" et si $n, m \neq 0$, le nanotube est dit "chiral".

En remplaçant l'équation 1.2 dans l'équation 1.1, le vecteur $\vec{T}$ s'écrit :

$$\vec{T} = t_1 \ \vec{a_1} + t_2 \ \vec{a_2} \tag{1.3}$$

Avec $t_1 = \dfrac{2m+n}{d_R}$ et $t_2 = -\dfrac{2n+m}{d_R}$, où d_R est le plus grand diviseur commun de $2m+n$ et $2n+m$.

En fonction de la chiralité, nous verrons que les propriétés géométriques et photoniques des nanotubes sont différentes. Le diamètre du nanotube est défini à partir de la norme du vecteur chiral :

$$d = \frac{|\vec{C_h}|}{\pi} = \frac{a_0}{\pi}\sqrt{n^2 + m^2 + nm} \tag{1.4}$$

Plus les coefficients n et m augmentent, plus le diamètre est grand. Le diamètre (d) varie typiquement entre 0.32 nm pour des nanotubes $(4, 0)$ et 1.35 nm pour des nanotubes $(10, 10)$. Dans cette thèse, nous avons utilisé principalement des nanotubes $(6, 5)$ dont le diamètre est de 0.76 nm. Notons dès à présent que la longueur (L) des nanotubes était beaucoup plus importante puisqu'elle variait de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres [20].

Les nanotubes sont donc des objets uni-dimensionnels $(L \gg d)$ avec un très fort confinement suivant deux dimensions et nous verrons que cette géométrie influence leurs propriétés électroniques et optiques.

1.2.2 Structure géométrique dans l'espace réciproque

Pour comprendre les propriétés électroniques et optiques des nanotubes, il est plus aisé de passer dans l'espace réciproque. L'espace réciproque est une représentation abstraite des fréquences spatiales décrites par des vecteurs d'onde notés $\vec{k}$. Dans les matériaux, les propriétés électroniques dépendent de la géométrie de l'espace réciproque. Cette géométrie est directement corrélée à la géométrie du réseau cristallin dans l'espace réel.

Les nanotubes de carbone possédant une structure cristalline locale similaire au graphène dans l'espace réel, nous pouvons partir de l'espace réciproque du graphène. Comme le graphène possède une structure cristalline hexagonale dans l'espace réel, son réseau réciproque est également hexagonal (cf. Figure.1.2.A). Le point Γ est un point de symétrie centrale de rotation $\dfrac{\pi}{3}$. Les propriétés des points K et K' seront discutés à la Section 1.3.

La géométrie uni-dimensionnelle des nanotubes $(L \gg d)$ nécessite une distinction entre

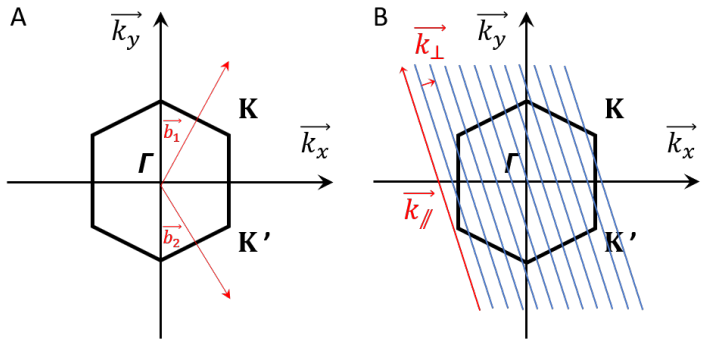

Figure 1.2 : *(A) Réseau réciproque du graphène : représentation des vecteurs translation $\vec{b_1}$ et $\vec{b_2}$ dans le réseau réciproque,(B) Discrétisation de la première zone de Brillouin du graphène.*

le vecteur d'onde parallèle à l'axe du nanotube, $\vec{k_{\parallel}}$ et le vecteur d'onde perpendiculaire à l'axe, $\vec{k_{\perp}}$. Pour un nanotube de longueur infinie, le vecteur d'onde $\vec{k_{\parallel}}$ n'est pas influencé par la longueur du nanotube. Le diamètre des nanotubes étant petit, le vecteur d'onde $\vec{k_{\perp}}$ est discrétisé (cf. Figure1.2.B).

Les valeurs et les orientations prises par les deux vecteurs d'onde dans la base du réseau réciproque vont déterminer les propriétés électroniques des nanotubes. Les vecteurs de base du réseau réciproque $\left(\vec{b_1}, \vec{b_2}\right)$ s'écrivent par définition :

$$\vec{b_i}.\vec{a_j} = \delta_{i,j} \tag{1.5}$$

Où $\delta_{i,j}$ est le symbole de Kronecker. Ils ont pour coordonnées dans l'espace des phases $\left(\vec{k_x}, \vec{k_y}\right)$:

$$\vec{b_1} = \frac{4\pi}{\sqrt{3}a_0}\left(\frac{1}{2}, \frac{\sqrt{3}}{2}\right) \quad \text{et} \quad \vec{b_2} = \frac{4\pi}{\sqrt{3}a_0}\left(\frac{1}{2}, -\frac{\sqrt{3}}{2}\right) \tag{1.6}$$

On note $\vec{K_1}$, l'orientation de $\vec{k_{\perp}}$ et $\vec{K_2}$, l'orientation de $\vec{k_{\parallel}}$. Par construction, ces vecteurs obéissent aux équations suivantes [28] :

$$\vec{C_h}.\vec{K_1} = 2\pi \quad \vec{C_h}.\vec{K_2} = 0 \tag{1.7}$$

$$\vec{T}.\vec{K_1} = 0 \quad \vec{T}.\vec{K_2} = 2\pi$$

Leur décomposition dans la base du réseau réciproque s'écrit :

$$\vec{K_1} = \frac{2\pi\vec{C_h}}{|\vec{C_h}|^2} = \left(-t_2\vec{b_1} + t_1\vec{b_2}\right), \vec{K_2} = \frac{2\pi\vec{T}}{|\vec{T}|^2} = \left(-m\vec{b_1} + n\vec{b_2}\right) \tag{1.8}$$

Le réseau cristallin et la géométrie tubulaire des nanotubes impliquent une continuité de la fonction d'onde électronique. Cette continuité se traduit par des conditions aux limites. Pour

un nanotube de longueur infinie et de circonférence $|\vec{C_h}|$, la condition aux limites périodique implique :

$$\varphi\left(\vec{r_\perp}\right) = \varphi\left(\vec{r_\perp} + \vec{C_h}\right) \tag{1.9}$$

$$e^{-i\vec{k}.\vec{r_\perp}} = e^{-i\vec{k}.\left(\vec{r_\perp}+\vec{C_h}\right)}$$

$$\vec{k_\perp} = \frac{2\pi\mu}{|\vec{C_h}|} = \mu|\vec{K_1}| \quad \text{, où} \quad \mu \in Z$$

Cette relation implique que plus le diamètre est petit, plus $\vec{k_\perp}$ est grand. Sur la Figure.1.2, les vecteurs d'onde $\vec{k_\perp}$ et $\vec{k_\parallel}$ sont indiqués sur le réseau réciproque du graphène montrant ainsi la discrétisation de la première Zone de Brillouin (BZ) du graphène. La première zone de Brillouin des nanotubes correspond à la zone de Brillouin du graphène coupée le long du vecteur d'onde $\vec{k_\parallel}$.

1.3 Propriétés électroniques

Pour comprendre les propriétés électroniques des nanotubes, nous pouvons examiner la structure électronique des atomes de carbone. Les atomes de carbone possèdent 4 électrons sur leur couche de valence. Dans les nanotubes, les 3 premiers électrons participent aux 3 liaisons sigma, hybridé sp^2 et le dernier électron est sur l'orbitale p_z et forme une liaison π avec un électron p_z d'un atome voisin. Les électrons π de chaque atome de carbone sont délocalisés sur l'ensemble de la structure et participent aux propriétés électroniques du graphène et des nanotubes. Nous pouvons considérer ici que seuls les électrons π participent aux propriétés électroniques. Les dimensions transverses des nanotubes imposent un fort confinement. Les nanotubes sont donc des systèmes quantiques et leurs propriétés électroniques sont dictées par les valeurs des énergies propres satisfaisant l'équation séculaire de Schrödinger.

Pour connaître les états électroniques, la première étape consiste à écrire le Hamiltonien moléculaire. Le nombre d'atomes de carbone dans la maille unitaire d'un réseau hexagonal est égal à 2. Nous considérons donc ici que la maille unitaire du graphène est représentée par deux atomes de carbone possédant chacun un électron π. Les deux atomes de carbone N_1 et N_2 ont une masse M_C et un numéro atomique Z_C. Ils sont à une distance r_{CC} l'un de l'autre. Chaque atome possède un électron π, noté e_1 et e_2 distants de r_{ee}. Le Hamiltonien moléculaire s'écrit :

$$\widehat{H} = \widehat{T_N} + \widehat{T_e} + \widehat{V_{Ne}} + \widehat{V_{ee}} + \widehat{V_{NN}} \tag{1.10}$$

Avec $\widehat{T_e} = -\frac{1}{2}\sum_j \Delta\left(e_j\right)$, l'énergie cinétique des électrons,

$\widehat{T_N} = -\frac{1}{2M_C}\sum_i \Delta\left(N_i\right)$, l'énergie cinétique des noyaux,

$\widehat{V_{Ne}} = -\frac{1}{2M_C}\sum_{i,j} -\frac{Z_C}{r_{C_i e_j}}$, le potentiel d'interaction entre les noyaux et les électrons,

$\widehat{V_{ee}} = -\frac{1}{2M_C}$, le potentiel d'interaction entre les électrons,

$\widehat{V_{NN}} = -\frac{Z_C^2}{r_{CC}}$, le potentiel d'interaction entre les noyaux.

La masse des noyaux de carbone étant 2000 fois plus importante que celle des électrons, les mouvements des noyaux sont négligeables devant ceux des électrons. Nous pouvons donc considérer qu'ils sont immobiles (approximation de Born-Oppenheimer). Ceci implique que $\widehat{T_N} = 0$ et $\widehat{V_{NN}}$ est une constante. On a donc :

$$\widehat{H} = \widehat{T_e} + \widehat{V_{Ne}} + \widehat{V_{ee}} + \widehat{V_{NN}} \tag{1.11}$$

Cette équation peut se réécrire comme la somme du hamiltonien électronique $\widehat{H_{el}}$ qui prend en compte tous les termes faisant intervenir les électrons et du potentiel d'interaction des noyaux, $\widehat{V_{NN}}$:

$$\widehat{H} = \widehat{H_{el}} + \widehat{V_{NN}} \tag{1.12}$$

Pour résoudre l'équation de Schrödinger, nous avons besoin de déterminer la fonction d'onde du système quantique. La fonction d'onde électronique du système est une fonction d'onde multiélectronique prenant en compte les deux électrons.

Dans l'approximation orbitale, les électrons sont indépendants les uns des autres. La fonction d'onde multiélectronique est donc la combinaison linéaire de fonctions mono-électroniques, appelées aussi orbitales. La fonction d'onde du système à deux électrons est notée :

$$\psi = -\frac{1}{\sqrt{2!}}\begin{vmatrix} \varphi_1(e_1) & \varphi_1(e_2) \\ \varphi_2(e_1) & \varphi_2(e_2) \end{vmatrix} \tag{1.13}$$

où φ_1 et φ_2 sont les deux spinorbitales. Cette fonction d'onde doit satisfaire l'équation de Schrödinger :

$$\widehat{H}\,|\psi\rangle = \widehat{H_{el}}\,|\psi\rangle + \widehat{V_{NN}}\,|\psi\rangle = E_g^{\pm}\,|\psi\rangle$$

où les valeurs de $E_g^{\pm}$ sont les valeurs propres du hamiltonien.

Les énergies propres du Hamiltonien correspondent aux états électroniques permis. Dans le cas du graphène et en ne considérant qu'une seule maille, les énergies propres s'écrivent :

$$E_g^{\pm} = \pm\gamma_0\sqrt{1 + 4cos\left(\frac{\sqrt{3}k_x a_0}{2}\right)cos\left(\frac{k_y a_0}{2}\right) + cos^2\left(\frac{k_y a_0}{2}\right)} \tag{1.14}$$

où k_x et k_y sont les vecteurs de bases de l'espace réciproque, γ_0 est la valeur de l'intégrale d'échange et le signe $\pm$ représente les énergies de la bande de conduction et de la bande de valence [28].

La géométrie de ces bandes détermine les propriétés électroniques du graphène. L'équation 1.14 est appelée relation de dispersion. Les bandes d'énergie du graphène sont représentée sur la Figure.1.3.A. Les points K et K' sont des points de singularités électroniques où la bande de conduction et la bande de valence se rejoignent ce qui confèrent au graphène ses propriétés de conducteur (cf. Figure.1.3.B).

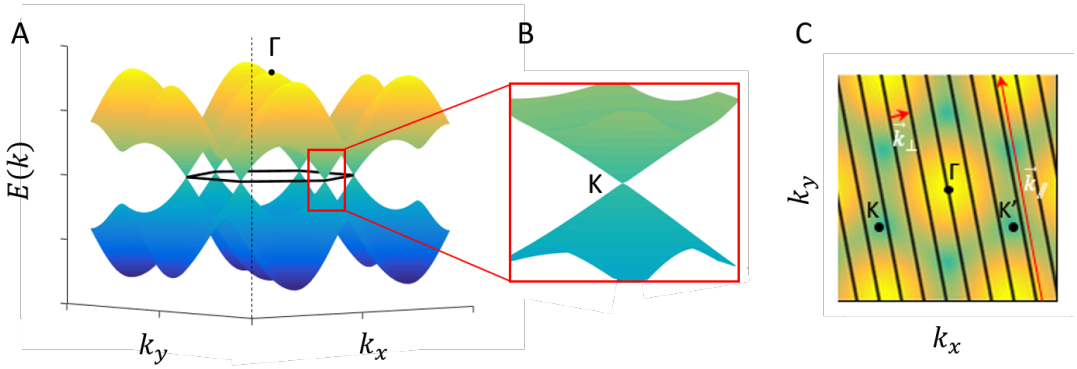

Figure 1.3 : *(A) Bandes électronique de la première BZ du graphène, (B) Singularité des points K et K', (C) Superposition de la BZ d'un nanotube (4,2) sur la BZ du graphène.*

Dû à la discrétisation du vecteur $\vec{k_\perp}$, les bandes électroniques des nanotubes correspondent aux bandes électroniques du graphène coupées le long des vecteurs d'onde parallèles (en noir sur la Figure.1.3.C). Ces lignes de coupe correspondent à des lignes d'états permis ayant chacune une relation de dispersion (cf. Figure.1.4).

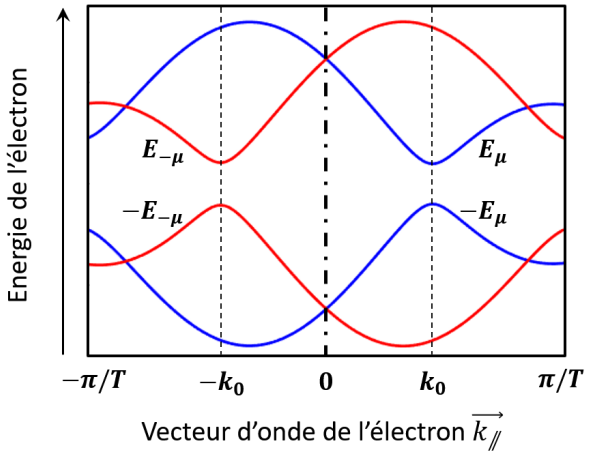

Figure 1.4 : *Représentation des deux relations de dispersion dégénérées pour un nanotube (4,2) ; proche du point K ($k_x > 0$) en bleu et proche du point K' ($k_x < 0$) en rouge*

La symétrie du réseau réciproque autour de point Γ (cf. Figure.1.2) implique que pour toute ligne de coupe proche du point K, il existe toujours une ligne de coupe proche du point K' ayant la même relation de dispersion. Cette dégénérescence inter-vallée implique que $E_{-\mu}(-k) = E_\mu(k)$, où $\mu = \left|\vec{k_\perp}\right|$. La Figure.1.4 montre les deux relations de dispersion d'un nanotube (4,2) semi-conducteur avec $\mu = 15$ et $\mu = -15$ (valeurs arbitraires).

Si une ligne de coupe passe par les points KK', le nanotube est métallique. Cette propriété se traduit par la relation :

$$\Gamma\vec{K} = \frac{2n+m}{3}\vec{K_1} \tag{1.15}$$

Ainsi, si $2n + m$ est un multiple de 3, le nanotube est métallique, sinon il est semi-conducteur. Selon cette équation, un tier des nanotubes sont métalliques mais en réalité, en prenant en compte les effets de courbure et la symétrie de groupe, seuls les nanotubes de forme "chaise" le sont [29].

1.4 Transitions optiques

Les transitions optiques des nanotubes permises dépendent des densités d'états électroniques (*Density of States* - DOS). De façon à simplifier le raisonnement, nous pouvons dans un premier temps négliger les effets de confinement et considérer le modèle à un électron. Dans un deuxième temps, nous considérerons ces effets qui imposeront la prise en compte de processus excitoniques.

1.4.1 Modèle à un électron

Densité d'états électroniques et Singularités de Van Hove

La densité d'états électroniques peut être définie pour toutes les valeurs d'énergie. Cependant, nous ne développerons dans cette partie que la densité d'état électronique proche des points KK'. Ce paragraphe est largement inspiré des travaux de J. W. Mintmire et al. [30] qui expriment la densité d'états proche de l'énergie de Fermi ε_F, c'est à dire proche des points KK'.

Généralement, la densité d'états ne peut être exprimée de façon exacte qu'en ne considérant que les deux relations de dispersion dégénérées (cf. Figure.1.4). Elle s'écrit :

$$n(E) = \frac{2}{l}\sum_\mu \int dk\delta\left(k - k_\mu\right)\left|\frac{\partial E_\mu}{\partial k}\right|^{-1} \tag{1.16}$$

où k_μ est la solution de l'équation $E - E_\mu(k_\mu) = 0$, l est la longueur de la première zone de Brillouin ($l = \int dk$), et $n(E)$ est le nombre total d'état électroniques par cellule unitaire du

graphène et d'énergie E.

La densité d'états proche de ε_F correspond aux niveaux d'énergie proche du point K (k_F). Proche de ε_F, les relations de dispersions peuvent s'écrire :

$$\left|E_\mu\left(\vec{k}\right)\right| \simeq \gamma_0 \frac{\sqrt{3}a_0}{2}\left|\vec{k}-\vec{k_F}\right| \quad \text{pour} \quad \frac{\left|E_\mu\left(\vec{k}\right)\right|}{\gamma_0} \ll 1 \tag{1.17}$$

Cette équation revient à considérer que les énergies d'interactions entre les électrons π sont très grandes devant l'énergie des bandes dégénérées proche de k_F. Quand $k \to k_F$ l'énergie $|E_\mu\left(k \to k_F\right)|$ tend vers 0 ce qui induit des divergences de la densité d'états électroniques, appelées Singularités de Van Hove (cf. Figure.1.5).

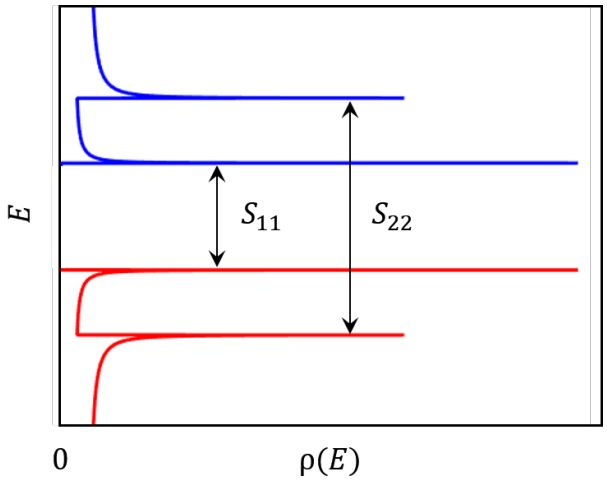

Figure 1.5 : *Densité d'états et Singularités de Van Hove pour un nanotube* $(6,5)$*. La bande de valence est en rouge et la bande de conduction en bleu.*

Pour chaque ligne proche du point K, la courbure de la structure de bande implique l'existence de deux valeurs d'énergie minimales qui sont égales à $E_\mu(\vec{k} \to k_F)$. Les bandes étant dégénérées, il existe aussi deux valeurs égales proches du point K' ($-k_F$). Toutes ces valeurs contribuent à la densité d'état par atome de carbone, $\rho\left(E\right) = n(E)/2$, qui peut s'écrire comme suit :

$$\rho\left(E\right) = \frac{2a_0}{\pi^2\gamma_0\, d}\sum_\mu g\left(E, E_\mu\right) \tag{1.18}$$

Où d est le diamétre du nanotube et avec

$$g\left(E, E_\mu\right) = \begin{vmatrix} \dfrac{|E|}{\sqrt{E^2 - E_\mu^2}} & |E| > |E_\mu| \\ 0 & |E| < |E_\mu| \end{vmatrix} \tag{1.19}$$

Quand $E \rightarrow E_\mu$, la densité d'états par atome de carbone diverge. La périodicité des divergences dépend de la valeur du vecteur d'onde perpendiculaire ($k_\perp \propto \frac{\mu}{d}$) et donc de la chiralité du nanotube via le diamètre [31].

La Figure.1.5 montre la densités d'états électroniques d'un nanotube $(6,5)$. On retrouve la bande de conduction en bleu et la bande de valence en rouge.

Les résonances optiques se font sur les transitions S_{ii}, où i est l'ordre de la transition. Les énergies de transition s'écrivent :

$$S_{ii} = \frac{6a_0\gamma_0}{\sqrt{3}d} p\,(i) \quad \text{où} \quad p = \{1, 2, 4, 5, 7, ...\} \tag{1.20}$$

Pour les nanotubes de petits diamètres (de 0,7 à 1 nm), les valeurs des transitions S_{11} sont de l'ordre de 1 eV à 1,6 eV [32], dans le proche infrarouge.

Cependant, le modèle à un électron décrit précédemment dans le cadre de l'approximation des liaisons fortes, ne prend pas en compte les effets de confinements dus au petit diamètre du nanotube ce qui rend ce modèle incomplet et trop approximatif pour décrire quantitativement les expériences [33] [34]. Pour décrire plus en détail les transitions optiques impliquées dans les nanotubes de carbone, il est nécessaire d'introduire des processus excitoniques [29] [35] [36] [37].

1.4.2 Modèle excitonique

Le confinement extrême dû au diamètre des nanotubes considérés implique la formation d'excitons sous l'effet de l'excitation par la lumière. Quand le nanotube absorbe un photon, un électron de la bande de valence passe dans la bande de conduction, ce qui laisse un trou dans la bande de valence. Le confinement crée une interaction d'attraction coulombienne entre l'électron (e^-) et le trou (e^+) et par la même la formation d'un exciton. La formation de l'exciton est accompagnée d'une énergie de liaison E_b inter-fermionique qui peut atteindre plusieurs centaines de meV, soit une fraction importante de la transition S_{11} [38]. Cette énergie de liaison dépend entre autres de l'environnement immédiat du nanotube [39].

Etats excitoniques

Les états excitoniques correspondent aux énergie propres solutions de l'équation de Schrödinger pour l'exciton. Sans résoudre cette équation, nous pouvons nous baser sur les éléments de symétrie de la fonction d'onde excitonique pour comprendre phénoménologiquement les transitions optiquement permises. La fonction d'onde excitonique correspond au couplage entre la fonction d'onde de l'électron et celle du trou. Pour des petits diamètres (d $<$ 1.5 nm), les écarts entre les Singularité de Van Hove sont relativement grand. En effet, l'écart

minimal étant égal à $\frac{6a_0\gamma_0}{\sqrt{3}d}$ (cf. Equation.1.20), plus le diamètre du nanotube est petit, plus l'écart est grand. Cette condition nous permet de calculer la fonction d'onde de l'exciton en ne prenant en compte que la première singularité de Van Hove. La fonction d'onde s'écrit :

$$\Phi\left(\vec{r_e},\vec{r_h}\right) = \sum_{c,v}{}' A_{c,v}\,\varphi_c\left(\vec{r_e}\right)\,\varphi_v^*\left(\vec{r_h}\right)$$

où $\varphi_c\left(\vec{r_e}\right)$ et $\varphi_v\left(\vec{r_h}\right)$ sont les fonctions d'onde de l'électron et du trou dans la bande de conduction et de valence respectivement. Le terme $A_{c,v}$ prend en compte l'enveloppe de la fonction d'onde. Le signe ' signifie que l'on ne considère que la première singularité de Van Hove. Cette équation prend en compte l'approximation de la masse effective de l'exciton.

L'approximation de la masse effective est valable quand la taille de l'exciton ($\sim$ 10 nm) est très grande devant la taille de la constante du réseau ($a_0 = 0.14$ nm). Physiquement, cela signifie que le potentiel d'interactions entre l'exciton et le réseau cristallin varie peu à l'échelle de la cellule unitaire.

De façon à expliciter le terme $A_{c,v}$, nous supposons que l'enveloppe de la fonction d'onde varie lentement à l'échelle de la distance interatomique (approximation de la fonction d'enveloppe) [40].

Ces approximations permettent d'expliciter la fonction enveloppe et d'écrire la fonction d'onde approchée sous la forme :

$$\Phi\left(\vec{r_e},\vec{r_h}\right) \simeq F_\nu(z_e - z_h)\sum_{c,v}{}' B_{c,v}\,\varphi_c\left(\vec{r_e}\right)\,\varphi_v^*\left(\vec{r_h}\right) \tag{1.21}$$

où $F_\nu(z_e - z_h)$ est l'enveloppe de la fonction d'onde. Le terme $z_e - z_h$ correspond à la distance entre l'électron et le trou. L'indice ν correspond au niveau de la série de Rydberg pour les atomes hydrogénoïdes. La fonction enveloppe prend en compte le potentiel de déformation (phonons) dû au couplage entre l'exciton et les atomes du réseau. Quand ν est paire, la fonction d'enveloppe est paire.

La fonction d'onde de l'exciton est donc constituée de trois termes dépendant de la géométrie de l'espace ($\vec{r}$ et z). La symétrie (parité) de cette fonction d'onde détermine les transitions optiquement permises. La résolution de l'équation de Schrödinger donne quatre états excitoniques de symétries différentes.

Les spins de l'électron et du trou nous donnent quatre états de spin possibles : un singulet et trois triplets. Le nombre total d'états excitoniques est donc de 16 pour chaque singularité de Van Hove. Les états triplets ont une énergie plus haute que les états singulets et en première approximation, ils n'interviennent pas dans les transitions optiques. En effet, les effets de spin apportent des corrections de second ordre sur les niveaux d'énergie. Les quatre niveaux

excitoniques singulets de plus basses énergies pour la première Singularité de Van Hove sont représentés sur la Figure.1.6. Les notations seront explicitées dans la section suivante.

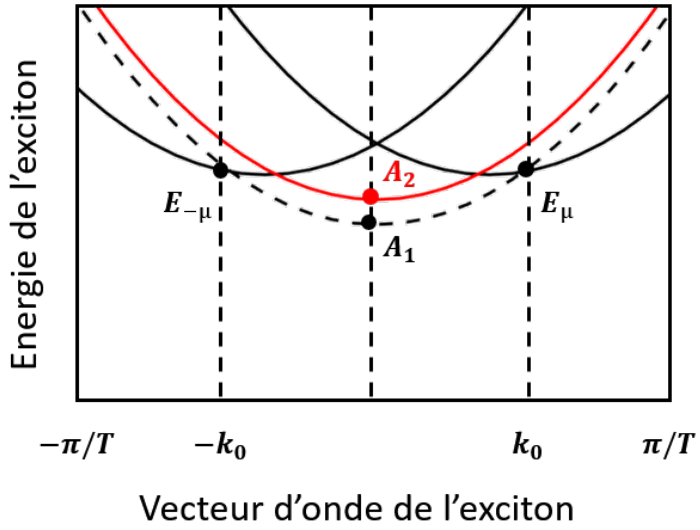

Figure 1.6 : *Représentation schématique des 4 niveaux excitoniques singulets de plus basses énergies pour la première Singularité de Van Hove. La ligne en rouge correspond à l'état brillant. Figure adaptée de la référence [41]*

Transitions optiques permises

Les interactions dipolaires électriques doivent respecter des règles de sélection. Pour expliquer simplement ces règles de sélection, prenons le cas de l'atome d'hydrogène. L'état fondamental correspond au nombre quantique $n = 1$ et donc $l = 0$. La parité de la fonction d'onde hydrogénoïque est égale à $\epsilon = (-1)^l$. Dans l'état fondamental, la parité est donc égale à 1. Le premier état excité correspond à $n = 2$, soit $l = 0$ ou 1. La transition n'est permise que lorsque $l = 1$ ($\epsilon = -1$), c'est à dire quand la parité de la fonction d'onde de l'état excité est opposée.

Comme dans le cas de l'atome d'hydrogène, la transition dipolaire pour l'exciton n'est permise que si les parités de la fonction d'onde sous une rotation C_2 avant et après l'excitation sont opposées. Cette condition correspond à l'état excitonique singulet A_2. Un exciton peut donc être formé directement à partir de l'absorption d'un photon d'énergie "A_2" (cf. Figure.1.6). Pour cet état excitonique optiquement permis, l'exciton est dit "brillant".

La fonction d'onde de l'état excitonique A_1 est impaire. Cette transition n'est donc pas optiquement permise. Notons que la présence de ce niveau d'énergie, seulement quelques meV sous le niveau A_2 participe cependant la dynamique temporelle de désexcitation de l'exciton [42]. Nous pouvons également voir sur la Figure.1.6 qu'une transition optique assistée par un phonon est possible pour former des excitons "noirs" d'énergie E_μ (communément appelés «

K-momentum dark excitons ») ou dans le processus de relaxation de l'exciton entre les états d'énergie E_μ et A_2 [43].

Propriétés d'absorption

La Figure.1.6 permet de comprendre la présence des 3 pics d'absorption principaux visibles sur un spectre d'absorption de nanotubes de carbone semi-conducteurs d'une chiralité donnée. Par exemple, la Figure.1.7 montre les spectres d'absorption de nanotubes $(6,5)$ et $(8,4)$. Nous pouvons ainsi voir sur ces spectres les deux pics correspondants à des absorptions sur les transitions S_{22} et S_{11} ainsi que le pic correspondant à une absorption vers le K-momentum dark exciton assistée par phonons que nous appellerons transition KSB (K-momentum exciton-phonon sideband).

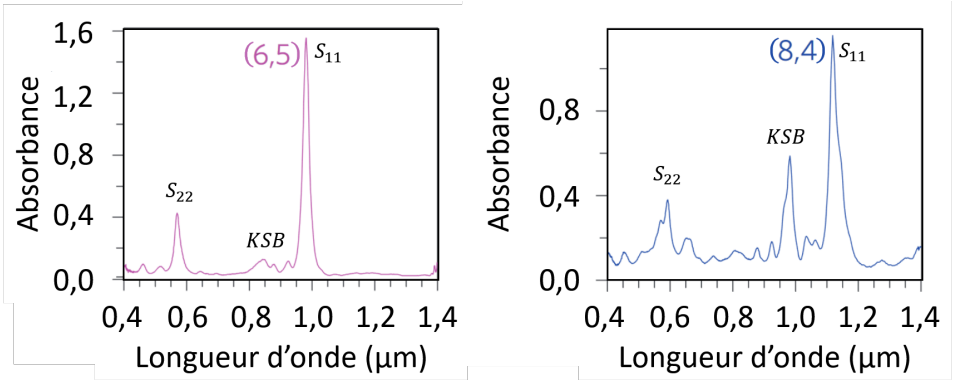

Figure 1.7 : *Absorption de nanotubes* $(6,5)$ *et* $(8,4)$ *en fonction de la longueur d'onde d'excitation montrant les transitions optiquement permises. La figure est adaptée de la référence [44]*

Le spectre d'absorption pour les nanotubes $(8,4)$ est décalé vers le rouge par rapport aux nanotubes $(6,5)$. En effet, le diamètre des nanotubes $(8,4)$ est plus grand ce qui diminue l'énergie des transitions E_{ii}.

Les nanotubes étant des objets uni-dimensionnels, la section efficace d'absorption peut être définie par unité de longueur. Pour une absorption à un photon, le nombre de photons absorbés N_{abs} est linéaire avec l'intensité laser appliquée, I :

$$N_{abs}(\lambda) = \sigma_\lambda L \frac{I}{\hbar\omega} \tag{1.22}$$

Où σ_λ est la section efficace d'absorption qui dépend de la longueur d'onde d'excitation λ ; $\hbar\omega$ est l'énergie du photon absorbé ; et L est la longueur du nanotube.

La section efficace d'absorption dépend de la polarisation de l'excitation. Elle est maximale quand l'excitation est polarisée parallèlement à l'axe longitudinal du nanotube [45] [46]. En effet, dans cette configuration, le terme d'interaction dipolaire est maximal.

Pour des nanotubes de chiralité $(6, 5)$, la section efficace d'absorption avec une excitation sur la transition S_{22} a été déterminée précisément par notre groupe en 2013 : $3.2 \times 10^{-17}\ cm^2$ par atome de carbone [47].

1.5 Photoluminescence des nanotubes de carbone

1.5.1 Photoluminescence

La photoluminescence des nanotubes a été découverte en 2002 par l'équipe de R. Bruce Weisman [33] pour des nanotubes de carbone encapsulés dans du sodium dedocyl sulfate (SDS). L'encapsulation permet d'individualiser les nanotubes et de se prémunir ainsi des phénomènes de quenching de la luminescence liés à des interactions entre nanotubes de nature (métalliques vs semi-conducteurs) ou de chiralité différentes. La photoluminescence a lieu à partir du niveau excitonique brillant de plus petite énergie A_2, sur la transition S_{11}. La longueur d'onde d'émission dépend ainsi de la chiralité des nanotubes via leurs structures excitoniques. La Figure.1.8 montre une carte d'excitation de la photoluminescence pour un échantillon de nanotubes suspendus dans du SDS [34]. Chaque pic (en rouge) sur cette Figure correspond à une chiralité de nanotubes donnée.

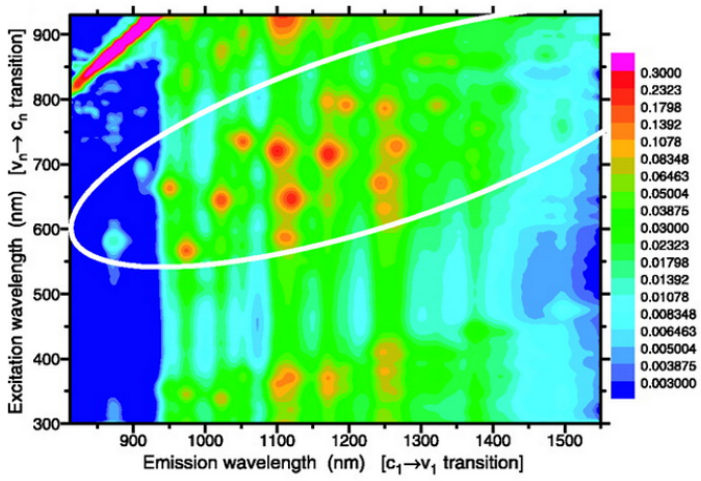

Figure 1.8 : *Carte d'excitation de la photoluminescence pour un échantillon de nanotubes suspendus dans du SDS. La Figure est reproduite de la référence [34]*

Les progrès spectaculaires des méthodes de tri en chiralité des nanotubes de carbone ont permis plus récemment d'obtenir des spectres de photoluminescence de nanotubes de chiralités déterminées, comme indiqué sur la Figure.1.9.A.

Cette photoluminescence est en fait suffisamment intense pour être directement visible en microscopie de fluorescence de molécules uniques (cf. Figure.1.9.B) ce qui a permis à

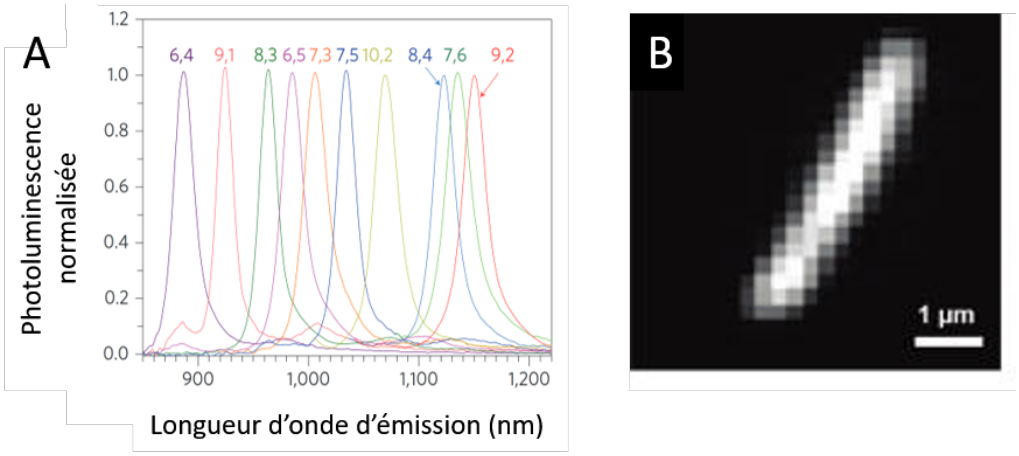

Figure 1.9 : *A) Spectres de photoluminescence en fonction de la chiralité des nanotubes [44], (B) Image d'un nanotube de carbone* $(6,5)$ *par imagerie de microscopie de fluorescence [48].*

la communauté de réaliser de nombreuses études pour comprendre finement les processus excitoniques complexes à l'origine de la photoluminescence des nanotubes de carbone [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] sans avoir recours au tri des nanotubes en chiralité. Exposer de manière exhaustive tous ces résultats dépasse naturellement le cadre de cette thèse, et nous allons présenter simplement quelques caractéristiques importantes.

1.5.2 Efficacité de la photoluminescence :

Le taux de photoluminescence d'un nanotube individuel dépend de son rendement quantique ($Quantum\,Yield$ - QY) et de la durée de vie de l'exciton. Les excitons formés pouvant se recombiner radiativement ou non-radiativement, les processus de désexcitation non-radiatifs intrinsèques et extrinsèques [48] [52] affectent fortement le rendement quantique. Notre groupe a établi en 2008 que les déclins de luminescence des nanotubes de carbone étaient biexponentiels (avec une composante longue pouvant atteindre quelques ns et une composante courte de quelques dizaines de ps) à température ambiante en raison de la présence de l'exciton noir A_1 quelques meV en dessous de l'exciton brillant A_2 [42]. Ces déclins peuvent cependant devenir monoexponentiels lors de la présence de processus additionnels extrinsèques. Les processus extrinsèques incluent l'interaction des excitons avec les phonons du réseau, les fluctuations environnementales, les défauts de structure, les impuretés et les porteurs de charge [49] [48] [52] [56] [54] [57]. Les processus d'annihilation exciton-exciton sont également une voie intrinsèque de désexcitation non-radiative [58]. D'autres processus intrinsèques ont également été décrits dans les nanotubes de carbone (MPD *Multi-Phonon Decay* et PAIEI *Phonon Assisted Indirect Exciton Ionization* [59]) et participeraient également à diminuer le rendement quantique des nanotubes de carbone. Expérimentalement, le

rendement quantique d'un ensemble de nanotubes a été estimé au mieux à 1.1% [60]. Il serait supérieur pour des nanotubes individuels exposés à peu de facteurs extrinsèques [61]. Cette différence serait due à la présence de nanotubes non- ou peu luminescents dans les mesures d'ensemble et aux effets de quenching dus aux interactions "nanotube-nanotube" de différentes chiralité.

Même si le rendement quantique des nanotubes est affecté par tous ces processus de désexcitations excitoniques, la photoluminescence des nanotubes est suffisamment intense et photo-stable pour être détecté par microscopie de fluorescence dans des milieux aqueux au niveau du tube individuel. La photoluminescence est stable sur plusieurs dizaines de minutes [62] [18].

1.5.3 Mobilité des excitons

Dès 2003, les travaux de M. S. Strano et al. ont montré que l'intensité de luminescence de nanotubes suspendus dans des milieux aqueux diminuait quand le pH de la solution diminuait dû à une protonation réversible des parois des nanotubes [63]. L'oxydation des parois créé également une diminution de l'intensité de photoluminescence [64] suggérant que la luminescence des nanotubes était très sensible à la présence de défauts structuraux sur les parois.

En 2007, les travaux de L. Cognet et al. réalisés sur des nanotubes individuels ont montré que l'intensité de luminescence des nanotubes sur des segments sub-micrométriques distincts changeait par pas discrets successifs après une exposition à des réactifs acido-basiques et diazonium [49]. Les pas étaient décorrélés spatialement et temporellement et l'analyse de l'amplitude des pas a suggéré que les excitons étaient mobiles sur une distance d'environ 100 nm selon un mode de diffusion avant leur recombinaison radiative. Cette distance est appelée longueur de diffusion des excitons (L_e). Sa valeur peut dépendre des tensio-actifs utilisés pour suspendre les nanotubes [65]. L'effet de la mobilité des excitons sur la photoluminescence des nanotubes a été largement étudiée expérimentalement et théoriquement [66] [67]

Grâce à la combinaison de microscopies d'absorption et de luminescence, la longueur de diffusion des excitons a également été retrouvée à partir du profil d'intensité de luminescence de nanotubes longs immobilisés [47] [54]. Les bouts des nanotubes étant des sites de défauts non-radiatifs et n'étant pas luminescents les profils d'intensité ont permis d'estimer la longueur de diffusion des excitons.

Pour cette thèse, nous retiendrons donc que les excitons photo-créés sont mobiles sur une distance d'environ 100 nm [49] [66] [68] avant leur recombinaison radiative et que les bouts des nanotubes agissent en tant que site de désexcitation non-radiative ou aucune photoluminescence n'est générée sur une distance de $\sim$ 100 nm à partir des bouts (cf. Figure.1.10).

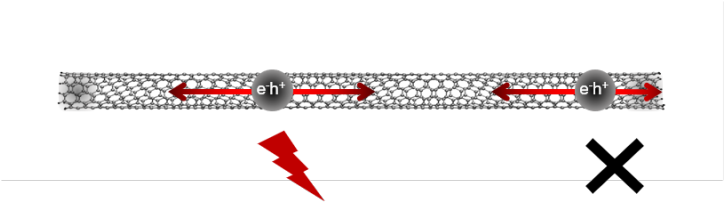

Figure 1.10 : *Représentation de la longueur de diffusion des excitons. Les bouts des nanotubes agissent comme des sites de défauts non-luminescents.*

Nous verrons dans le chapitre 5 comment contourner cette limite pour rendre luminescents des nanotubes ultra-courts dont la taille est inférieure à la longueur de diffusion des excitons.

1.6 Bilan du premier chapitre

Nous avons vu que les nanotubes de carbone ont une forte section efficace d'absorption associées à des déclins de luminescence rapides. Ils peuvent être ainsi des émetteurs intenses et très photostables dans le proche infrarouge malgré leur faible rendement quantique. Cette propriété est très avantageuse pour les applications en biologie. En effet, le proche - IR correspond à la première fenêtre de transparence des tissus biologiques (cf. Chapitre 2, Section 2.2). Leur photophysique est dictée par des processus excitoniques dont nous avons maintenant une bonne compréhension. Il est donc possible de mettre à profit l'ensemble de ces connaissances pour des applications biologiques ce qui a constitué une partie majeure de ce travail de thèse. En particulier, nous avons vu que les nanotubes peuvent être excités sur différentes transitions. Dans le chapitre suivant, nous explorerons la stratégie d'excitation optimale pour la détection des nanotubes dans les échantillons biologiques épais.

De surcroît, la découverte de la photoluminescence des nanotubes en 2002 a été réalisée en milieu aqueux [33] avec des nanotubes encapsulés dans du sodium dedocyl sulfate (SDS). L'encapsulation permet en effet d'individualiser les nanotubes et de se prémunir ainsi des phénomènes de quenching de la luminescence liés à des interactions entre nanotubes de nature (métalliques vs semi-conducteurs) ou de chiralité différentes. Cependant, nous savons que certaines molécules utilisées pour l'encapsulation ne sont pas biocompatibles [69] [70]. Ces molécules sont potentiellement toxiques et favoriseraient la carcinogénèse [70] [69]. Dans le chapitre suivant, nous avons donc également cherché à optimiser l'encapsulation des nanotubes en limitant la cytotoxicité et les interactions non-spécifiques entre les nanotubes et les cellules constituant les tissus.

Chapitre 2

Détection optimale de nanotubes de carbone individuels pour la biologie

Afin de mettre en place une méthodologie dans laquelle les nanotubes de carbone seront utilisés pour sonder l'espace extra-cellulaire de cerveaux vivants, les nanotubes de carbone individuels luminescents doivent remplir préalablement deux critères. Ils doivent être biocompatibles pour limiter les interactions non-spécifiques avec les cellules et permettre l'étude de leur mouvements de diffusion et leur intensité de photoluminescence doit être suffisamment importante pour que le signal des nanotubes soit détecté au niveau du tube unique dans les tissus épais.

L'encapsulation des nanotubes par des molécules amphiphiles (tensioactifs) permet de les individualiser et de les rendre luminescents.

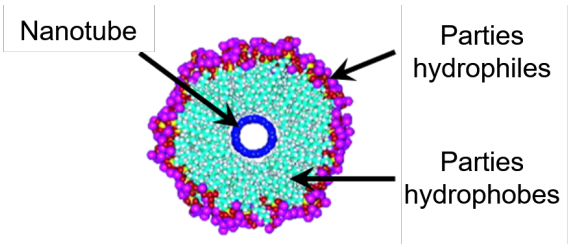

Figure 2.1 : *Section modèle d'un nanotube individuel encapsulé dans des molécules amphiphiles. Figure reproduite de la référence [33].*

Ces molécules possèdent une partie hydrophobe (chaines carbonées ou cycles aromatiques)

et une partie hydrophile ($R-O^-$ ou $R-OH$). La partie hydrophobe s'attache aux parois des nanotubes tandis que la partie hydrophile est en contact avec le milieu polaire. De manière générale, les molécules sont attachées par liaisons non-covalentes permettant ainsi de ne pas altérer les propriétés optiques des nanotubes.

Différentes molécules permettent de suspendre les nanotubes comme le sodium dodecyl sulfate (SDS) utilisé originellement [33], le sodium deoxycholate (NaDOC) qui produit les meilleurs rendements quantiques [48] et le Pluronic® ou le phospholipide polyethylène glycol (PLPEG) utilisé dans les milieux biologiques [71] [72]. Cependant, tous les complexes "nanotube-tensioactifs" ne sont pas biocompatibles. La succession des étapes nécessaires à l'encapsulation reste généralement similaire dans son principe.

La poudre de nanotubes est tout d'abord mélangée à un tensioactif. Une agitation ou une sonication sont ensuite réalisées [73] et permet d'individualiser les nanotubes dans les micelles [72] ce qui les rend photoluminescents. Une étape de centrifugation permet de séparer les nanotubes encapsulés et les fagots de nanotubes. Les nanotubes contenus dans le surnageant sont collectés et utilisés dans les milieux aqueux ou les tissus biologiques.

Dans la première partie de ce chapitre, nous allons étudier et comparer la biocompatibilité de certains complexes "nanotube-tensioactif" que nous avons identifiés comme étant des candidats potentiels pour nos applications en microscopie de molécules uniques.

Dans la deuxième partie, nous présenterons une étude comparative de différentes longueurs d'onde d'excitation utilisables pour obtenir avec le meilleur rapport signal sur bruit (RSB) des nanotubes photoluminescents dans des tissus biologiques. En effet, la richesse des propriétés excitoniques des nanotubes offrent plusieurs possibilités qu'il convient de comparer. Nous prendrons en compte les propriétés optiques des tissus et modéliserons l'augmentation de température induite par l'irradiation laser.

2.1 Identification d'un complexe "nanotube-tensioactif" biocompatible minimisant les interactions non-spécifiques avec les cellules

2.1.1 Etat de l'art

Dans cette section, nous allons présenter de manière synthétique des études de la littérature ayant identifié différents complexes "nanotube-tensioactif" dits "biocompatibles". Nous avons sélectionné ces études car elles ont montré des degrés de toxicité limités tout en suspendant efficacement les nanotubes.

En 2001, la toxicité des complexes "nanotubes-Tween20" (polyéthylèneglycol sorbitan monolaurate) a été testé sur des porcs. Les porcs ont été exposés aux complexes par des procédés communément utilisés pour tester les effets de l'amiante sur les voies respiratoires. Le temps d'exposition par inhalation était de 4 semaines et la concentration était de $50\,\mu$g/ml. Pour mesurer la toxicité, A. Hucko et al. ont réalisé des endoscopies bronchiques qui n'ont pas révélé de grosses anomalies pulmonaires ou d'inflammation mesurable [74].

En 2004, l'équipe de R. B. Weisman a étudié la phagocytose des complexes "nanotubes-F108" (Pluronic®, 4 μg/ml). Le temps d'incubation maximal était de 96 heures. Ils ont montré que la croissance des macrophages n'était pas affectée par ces complexes [75].

Pour nos applications, l'intensité de photoluminescence doit être stable quelles que soient les conditions acido-basiques des milieux biologiques. Nous nous sommes donc intéressés aux travaux de Juan G. Duque et al. menés en 2008 portant sur l'étude de l'influence du pH sur la photoluminescence des nanotubes. Les auteurs ont montré que l'intensité de photoluminescence des complexes "nanotubes-ISPVP" (polyvinylpyrrolidone polymérisé *insitu*) était moins sensible aux variations de pH que celle des complexes "nanotubes-SDBS" (sodium dodecyl benzène sulfonate) seuls [50]. Pour cette raison, nous avons choisi d'inclure les complexes "nanotubes-ISPVP" dans notre étude.

Dès 2009, le groupe de H. Dai a utilisé des nanotubes encapsulés dans du phospholipide polyéthylène-glycol (PLPEG). Ils ont observé, pour la première fois, la photoluminescence de nanotubes injectés par intraveineuse dans un animal entier. La photoluminescence était visible à travers la peau et les os du crâne et a permis de révéler le système circulatoire des souris. Le volume injecté était de 200μl de nanotubes (260 μg/ml). L'imagerie a été réalisée 30 minutes et 24 heures après l'injection [76]. Ils ont constaté que plus le poids moléculaire du PLPEG augmentait, plus le temps de circulation intraveineux était grand. Le poids moléculaire est relié au nombre de branchements des chaînes carbonées du PLPEG et à la longueur de ces branchements. Plus ce poids augmentait, plus la quantité de nanotubes retrouvés dans le foie diminuait. Cette étude a suggéré que l'utilisation de PL-PEG pourrait permettre d'éviter les adsorptions biomoléculaires non-spécifiques avec les cellules biologiques [72].

En 2010, J. Pauwels et al. ont étudié l'influence de plusieurs complexes "nanotube-tensioactifs" en présence d'un isoforme des enzymes P405 qui joue un rôle important dans le métabolisme des médicaments. Les complexes ont été introduits dans une solution contenant l'enzyme. La concentration en complexes était de $670\,\mu$g/ml et le temps d'incubation de 5 minutes. Ils ont montré que les MWCNTs-Brij35 n'affectaient pas significativement l'activité de l'enzyme [77].

En 2011, B. D. Holt et al. ont incubé des complexes "nanotubes-Pluronic" ® F127 ($50\,\mu$g/ml) avec des cellules Hela pendant 2 jours. Pour cette dose, les SWCNTs-F127 n'ont pas induit d'augmentation de la mortalité cellulaire mais ont fortement diminué la prolifération des cellules [78].

En 2012, G. Hong et al. ont mesuré la viabilité de cellules endothéliales dermiques humaines en présence de complexes "nanotubes-PLPEG" (5kDa). Ils ont montré que pour une dose inférieure à 0.18 g/L, la viabilité des cellules n'était pas affectée [79]. Les terminaisons -PEG augmenterait la stabilité des nanotubes dans les solutions physiologiques [80]. Cependant, en 2010, S. M. Moghini et al., ont montré que ces complexes activaient le système du complément qui participe aux réactions immunitaires [71].

Les résultats de ces études ont suggéré que ces tensioactifs (c'est à dire le Tween20, le Pluronic, l'ISPVP, le PLPEG et le Brij35) n'altéraient pas de manière drastique les conditions physiologiques nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire. Nous avons donc choisi de les étudier et comparer leur influence sur des cultures cellulaires. Nous étudierons la viabilité et la prolifération des cellules exposées à ces complexes, l'intensité de photoluminescence des complexes et leur capacité à se mouvoir "furtivement" dans les environnements biomimétiques c'est à dire sans interaction non-spécifiques avec les cellules.

2.1.2 Préparation des échantillons

Pour quantifier ces paramètres, nous avons premièrement préparé les complexes "nanotubes-tensioactifs". Les cellules ont ensuite été préparées et incubées avec les complexes. Ce travail a été réalisé conjointement avec Zhenghong Gao, en particulier les tests de viabilité et de prolifération des cellules qui seront décrits ici.

2.1.2.1 Préparation des complexes "SWCNTs-tensioactifs"

Pour les tensioactifs Brij35, F108 et Tween20, nous avons incorporé 2 mg de poudre de SWCNTs dans 2 ml d'une solution aqueuse contenant 1% de tensioactif. Nous avons ensuite réalisé une sonication à l'aide d'un sonicateur à ultrasons de type sonde à une puissance de 6 W pendant 3 minutes. Une étape de centrifugation (10 600 g pendant 1 heure) a permis de séparer les nanotubes individuels des agrégats. Les nanotubes contenus dans le surnageant ont ensuite été collectés pour être utilisés lors des expériences.

Pour le tensioactif PLPEG, nous avons incorporé 2 mg de poudre de nanotubes et 10 mg de PLPEG dans 2 ml d'eau MiliQ. La centrifugation a été réalisée à une température de 4°C. Le surnageant a été conservé à 4°C pendant 48 heures puis remis à température ambiante quelques minutes avant son utilisation.

Pour le tensioactif ISPVP, nous avons suivi le protocole de la référence [50]. La poudre de nanotubes a été ajoutée à une solution aqueuse contenant 1% de SDBS. Nous avons ensuite procédé aux étapes de sonication et de centrifugation. Le surnageant (1 ml) a ensuite été mélangé à 3 ml de PVP 1%.

Les solutions contenant les nanotubes ont ensuite été filtrées de façon à minimiser les interactions éventuelles entre l'excès de tensioactif et les cellules [72]. La filtration a été réalisée par centrifugation (2 700 g pendant 30 minutes et à une température de 4°C) à l'aide de filtres (MWCOfilter, Burlington, MA, USA) dont la taille des pores était de 100 kDalton. Les nanotubes ont ensuite été re-suspendus dans une solution tampon de phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline* - PBS) pour être incubés avec les cellules. La concentration finale en nanotubes était de 1μg/ml pour reproduire les conditions expérimentales typiques lors des expériences réalisées dans les chapitres suivants. Cette concentration a été estimée à partir des spectres d'absorption des solutions de nanotubes en utilisant le coefficient d'extinction molaire (0.00465 L. $mg^{-1}.cm^{-1}$ à 808 nm) pour les nanotubes [76] dans la loi de Beer-Lambert.

2.1.2.2 Préparation des cellules

Pour notre étude, nous avons utilisé des cellules COS7 qui sont une lignée de fibroblastes de reins de singes verts d'Afrique couramment utilisée en biologie cellulaire. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de microscopes préalablement stérilisées dans des bains successifs d'éthanol, de méthanol et de PBS. Les cellules ont ensuite été décollées des supports de culture cellulaire avec de la trypsine et centrifugées dans un tube à 300 g pendant 5 minutes.

Après la centrifugation, les cellules formaient un culot dans le tube et l'excès de solution a été jeté pour enlever la trypsine potentiellement toxique pour les cellules. Les cellules ont ensuite été re-suspendues dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté avec de la streptomycine (100 μg/ml),de la penicilline (100 U/ml) et 10% de sérum bovin. La solution cellulaire a été déposée sur les lamelles de microscope préalablement disposées dans des puits spécifiquement conçus pour la culture cellulaire. Les cellules ont été conservées dans un incubateur (95% d'atmosphère humide et 5% de CO_2 à une température de 37°C) pendant 24 heures pour assurer l'adhérence des cellules sur les lamelles. Pour les tests de viabilité et de prolifération, le nombre initial de cellules était de 10^5 cellules/ml pour toutes les conditions.

Les nanotubes ont ensuite été incubés avec les cellules pendant 1 et 4 jours. Les cellules ont été rincées avec du PBS avant les observations pour enlever les nanotubes libres présents dans le milieu.

2.1.3 Etude morphologique des cellules

Avant de quantifier l'effet des complexes sur la viabilité et la prolifération des cellules, nous avons dans un premier temps observé la morphologie des cellules. La Figure.2.2 montre les images des cellules obtenues par microscopie en lumière blanche en fonction des complexes utilisés après 1 et 4 jours d'incubation.

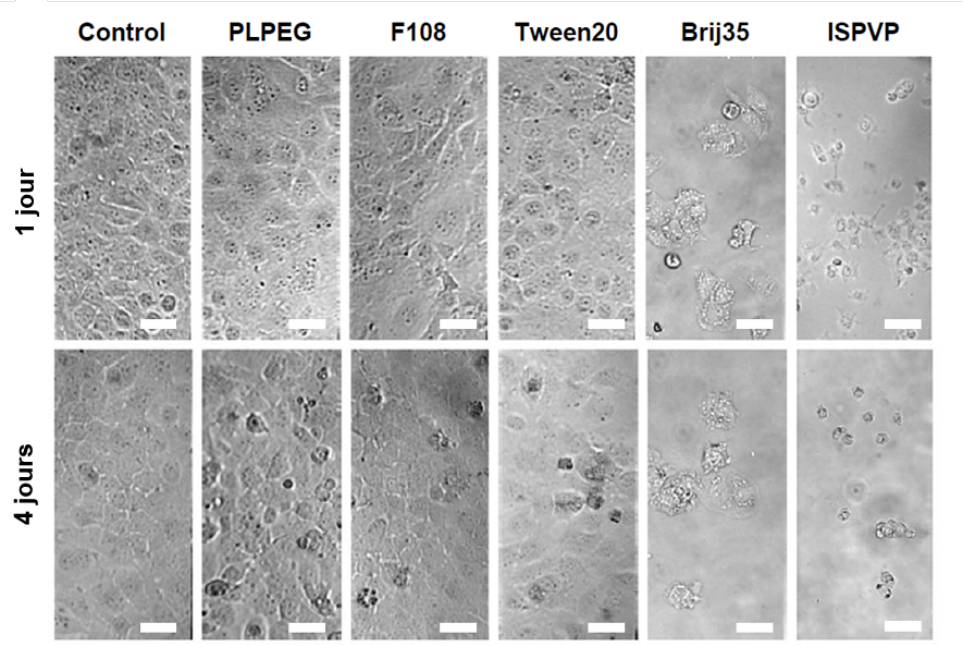

Figure 2.2 : *Images en lumière blanche des cellules COS7 après 1 et 4 jours d'incubation avec les complexes "nanotubes-tensioactifs". La barre d'échelle est de 30 µm.*

Du point de vue morphologique, quand la cellule est bien étalée sur la lamelle c'est une indication de "la bonne santé" de la cellule. Lorsque la cellule est en souffrance, certains domaines intra-cellulaires deviennent noirs ce qui est facilement identifiable par microscopie en lumière blanche [81]. Si la membrane plasmique de la cellule devient sphérique, cela signifie vraisemblablement que la cellule est en apoptose. Par ailleurs, si la membrane montre des protrusions, cela signifie qu'elle nécrose. Lors de la mort cellulaire, la cellule se détache peu à peu de ses voisines.

Sur la Figure.2.2, nous pouvons voir qu'après un jour d'incubation, les morphologies des cellules incubées avec les complexes "SWCNTs-PLPEG", "-F108" et "-Tween20" étaient très similaires à celles qui n'ont pas été en contact avec les nanotubes (Contrôle). Les cellules étaient bien étalées sur la lamelle de culture. Après 4 jours d'incubation, un petit nombre de cellules mortes possédant des domaines intracellulaires noirs étaient visibles. Avec les tensioactifs Brij35 et ISPVP, la situation était totalement différente car dès le premier jour, la plupart des cellules se sont détachées de la lamelle et/ou sont mortes. Nous pouvons observer

sur la Figure.2.2 que la densité cellulaire pour ces complexes est faible.

Pour quantifier la cytotoxicité des complexes nous avons ensuite réalisé des tests de viabilité cellulaire.

2.1.4 Tests de viabilité

Pour ces tests, les cellules doivent être comptées précisément. Pour cela, elles ont tout d'abord été décollées de la lamelle en utilisant de la trypsine (1%) et ont été centrifugées à 2000 r.p.m. pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été re-suspendues dans 1 ml de PBS (1X) et la solution cellulaire a été diluée pour compter les cellules à l'aide d'un hémocytomètre. Pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes, nous avons marquées les cellules avec du bleu de trypan (4%) pendant 20 minutes à température ambiante. En effet, les cellules mortes ont une membrane perméable qui permet au bleu de trypan de pénétrer dans le cytoplasme des cellules. Nous avons ensuite recouvert le tout d'une lamelle. Les cellules intactes et mortes ont été comptées à l'aide d'un microscope éclairé en lumière blanche (grossissement X10) à température ambiante dans les quatre coins de l'hémocytomètre (cf. Figure.2.3).

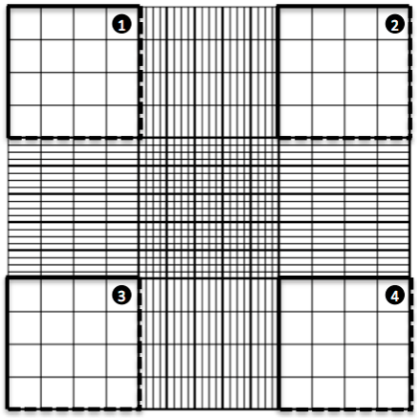

Figure 2.3 : *Illustration d'un hemocytomètre. Le comptage des cellules se fait dans les quatre parties numérotées.*

La viabilité cellulaire est donnée par la relation suivante :

$$viabilité = 1 - \frac{Nombre\,de\,cellules\,mortes}{Nombre\,total\,de\,cellules} \tag{2.1}$$

La Figure.2.4 montre les résultats des tests de viabilité. Les taux de viabilité cellulaire en présence des complexes "SWCNTs-Brij35" et "-ISPVP" étaient inférieurs à 50% après 1 jour d'incubation et inférieurs à 10% après 4 jours d'incubation. Ce résultat est en accord avec les observations morphologiques et suggère que ces complexes altèrent les conditions physiologiques nécessaires à l'intégrité des cellules. Au contraire, les complexes "SWCNTs-F108", "-Tween20" et "-PLPEG" présentent des taux de viabilité supérieurs à 80% après

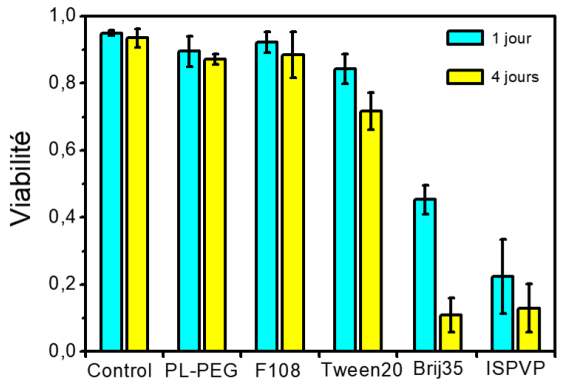

Figure 2.4 : *Résultats des tests de viabilité réalisés sur des cellules COS7.*

1 jour d'incubation et supérieurs à 70% après 4 jours d'incubation. Cela suggère que les complexes "SWCNTs-PLPEG", "-F108" et "-Tween20" (à 1 μg/ml) induisent beaucoup moins de mortalité cellulaire que les complexes "-Brij35" et les "-ISPVP".

2.1.5 Tests de prolifération

Nous avons ensuite réalisé des tests de prolifération cellulaire qui permettent de quantifier l'effet des complexes sur les mécanisme de division cellulaire. Pour ces tests, les cellules ont également été incubées, rincées et déposées sur un hemocytomètre.

Avant l'incubation, le nombre initial de cellules était le même pour toutes les conditions. Pour quantifier la prolifération des cellules en présence des complexes, le nombre total de cellules après l'incubation a été divisé par le nombre total moyen de cellules en absence de nanotubes. Les résultats des tests de prolifération sont représentés sur la Figure.2.5.

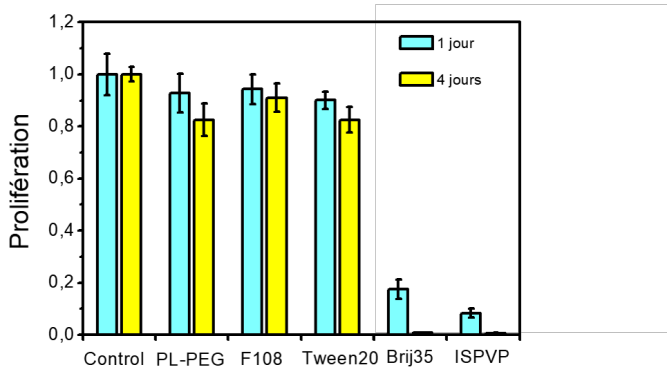

Figure 2.5 : *Résultats des tests de prolifération réalisés sur des cellules COS7.*

Les complexes "SWCNTs-F108", "-Tween20" et "-PLPEG" présentent des taux de prolifération cellulaire supérieurs à 80% des valeurs obtenues pour le contrôle après 1 et 4 jours d'incubation. Ces résultats suggèrent que les complexes SWCNTs-PLPEG, -F108 et -Tween20 (à 1 μg/ml) sont de bons candidats pour nos applications. Avec les complexes "SWCNTs-Brij35" et "-ISPVP", les taux de prolifération cellulaire diminuent fortement dès le premier jour d'incubation. Nous les avons donc écartés dès ce stade de l'étude et retenu les complexes "nanotubes-F108", "nanotubes-Tween20" et "nanotubes-PLPEG".

2.1.6 Mesure de l'interaction "nanotubes-cellules"

Pour la suite de l'étude, il était important de sélectionner les complexes interagissant le moins possible avec les cellules car nous souhaitons que les nanotubes diffusent efficacement dans l'espace extra-cellulaire de tissus. Pour étudier ce phénomène, nous avons défini ici le degré d'interactions non-spécifiques avec les cellules à travers le nombre de nanotubes moyen collés aux cellules ou internalisés par les cellules (cf. Figure.2.7). Les nanotubes ont été incubés avec les cellules pendant 24 heures. Juste avant l'imagerie, les cellules ont été rincées avec du PBS à 35°C pour enlever les nanotubes restés en suspension dans le milieu de culture.

Les lamelles ont ensuite été montées dans une chambre d'imagerie (Ludin Chamber type 1, Life Imaging Services). Pour enregistrer les positions des cellules et des nanotubes, les échantillons ont été éclairées successivement en lumière blanche et par microscopie de fluorescence en champ large.

Nous avons utilisé un microscope droit muni d'un objectif à immersion à eau de grossissement X60 et d'ouverture numérique 1.0. Pour l'imagerie du fluorescence en champ large, nous avons excité les nanotubes $(6,5)$ sur la transition KSB (845 nm) à l'aide d'un laser continu Titane-Saphir ajustable en longueur d'onde (Spectra Physics). Ce choix de longueur d'onde sera explicité dans la section 2.2. La polarisation du faisceau laser était circulaire pour exciter de façon équivalente les nanotubes orientés aléatoirement dans les échantillons. Afin de séparer le faisceau d'excitation et la photoluminescence des nanotubes, nous avons utilisé un miroir dichroïque passe-haut 875 nm (FF875-Di01, Semrock). Pour sélectionner uniquement la photoluminescence provenant des nanotubes $(6,5)$ (985 nm), nous avons utilisé une combinaison de filtres passe-haut 900 nm (ET900LP, Chroma) et passe-bas 1000 nm (FESH 1000 Thorlabs). Les filtres ont été enlevés pour l'imagerie en lumière blanche. Les images ont été enregistrées à l'aide d'une caméra ProEM CCD (Princeton Instrument).

Pour l'analyse, nous avons colocalisé les images de fluorescence et les images en lumière blanche. La Figure.2.6 montre les images obtenues après un jour d'incubation à 37°C (5% CO_2).

Sur cette figure, les carrés blancs correspondent aux zones où se trouvait le laser d'exci-

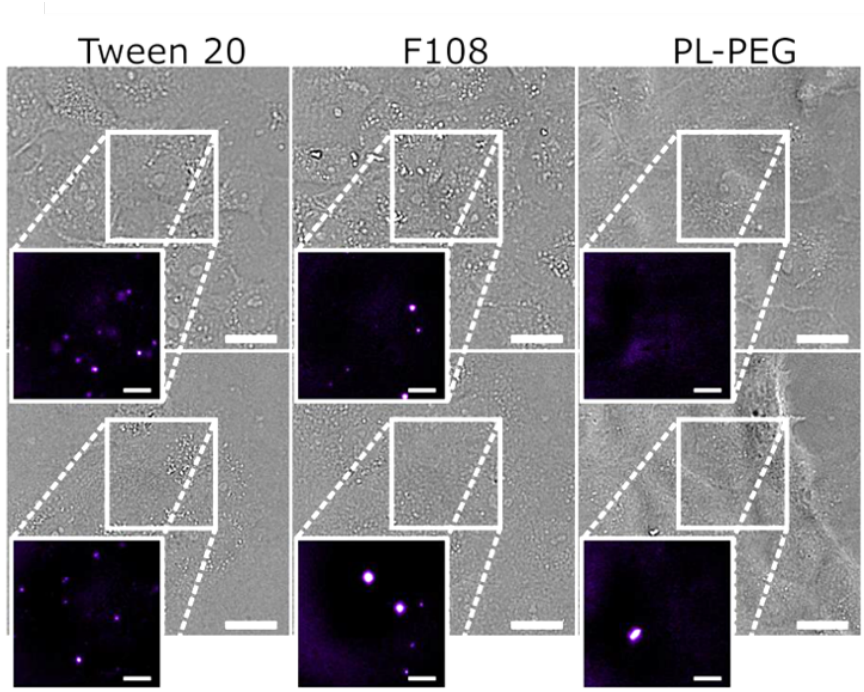

Figure 2.6 : *Images des cellules en lumière blanche et des nanotubes excités à 845 nm pour différents tensioactifs. Les carrés blancs correspondent aux régions où se trouve le faisceau laser. La barre d'échelle est de 10 μm.*

tation. Les images de fluorescence montrent que certains nanotubes sont colocalisés avec les cellules.

De façon à quantifier les interactions non-spécifiques, nous avons compté le nombre de nanotubes observés par cellule. Lors des expériences, nous avons sélectionné les cellules qui étaient intactes (bien étalées sur la surface de la lamelle et sans domaines intracellulaires noirs) et cherché la présence de nanotubes. Si une cellule ne comportait pas de nanotubes alors une valeur nulle a été ajoutée dans la statistique. La Figure.2.7 regroupe les résultats obtenus pour chaque complexe. La médiane est représentée en rouge, les 25-75 percentiles sont en bleu et la totalité de la distribution est en noir.

Pour différencier les populations et donc le degré d'interactions non-spécifiques, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Pour les complexes "nanotubes-PLPEG" et "-F108", les différences sont non-significatives ($p = 0.12$). En revanche, les degrés d'interactions non-spécifiques entre les complexes "nanotubes-Tween20" et "-PLPEG" sont différents ($p < 0.05$). Ce résultat suggère que les nanotubes encapsulés dans le tensioactif Tween20 interagissent de manière plus marquée que ceux encapsulés dans les tensioactifs PLPEG et F108. En effet, lors des expériences avec les "nanotubes-Tween20", nous trouvions très facilement des zones avec des nanotubes collés sur les cellules ce qui n'était pas le cas avec les complexes "-PLPEG" et "-F108".

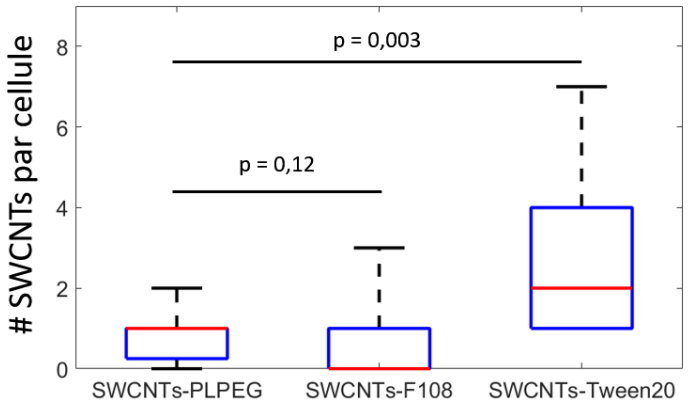

Figure 2.7 : *Quantification de l'interaction 'nanotubes-cellules" en fonction des tensio-actifs utilisés sur des cellules COS. PLPEG (N = 32 cellules), F108 (N = 36 cellules), Tween20 (N = 32 cellules)*

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes donc principalement intéressés aux complexes "nanotubes-PLPEG" et "nanotubes-F108".

2.1.7 Intensité de photoluminescence

Pour nos applications de suivi de nanotubes individuels, il est primordial de maximiser l'intensité de photoluminescence pour localiser avec précision les nanotubes et réaliser des cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire (cf. Chapitre 3).

Pour comparer l'intensité de photoluminescence des deux différents complexes, nous les avons dispersés dans du milieu de culture (DMEM) pour reproduire les conditions physiologiques. Nous avons ensuite déposé 8μl de cette solution entre lame et lamelle de microscope et mesuré les intensités de photoluminescence par microscopie de fluorescence en champ large. Le temps d'intégration était de 30 ms.

Nous avons ensuite enregistré plusieurs zones de l'échantillon de façon à ne pas prendre en compte deux fois les mêmes nanotubes. Pour chaque nanotube, nous avons défini l'intensité de photoluminescence comme étant égale à la photoluminescence totale des nanotubes intégrée sur la longueur. La Figure.2.8 montre les distributions cumulatives des intensités de photoluminescence. Nous pouvons voir que l'intensité médiane de photoluminescence des "nanotubes-PLPEG" (N=162) est 1.5 fois plus importante que celle des "-F108" (N=256). En toute rigueur, ces distributions peuvent être légèrement affectées par la distribution des longueurs des nanotubes. Cependant, sur les images de photoluminescence, nous n'avons pas remarqué de différences significatives entre les longueurs des "nanotubes-PLPEG" et celles des "-F108" pouvant justifier ce facteur.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu mesurer les intensités de photoluminescence des com-

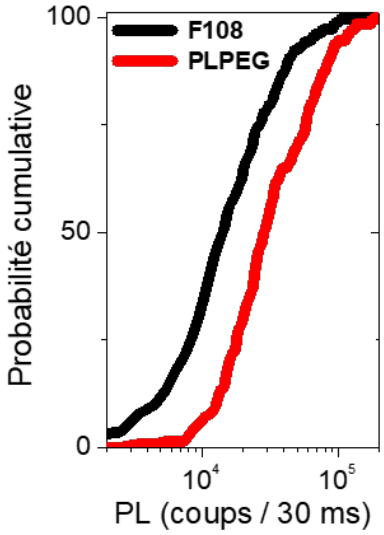

Figure 2.8 : *Distribution cumulative des intensités de photoluminescence de 162 "nanotubes-PLPEG" et 256 "nanotubes-F108" dans du DMEM.*

plexes "nanotubes-Tween20" car lors de la préparation des échantillons, nous avons remarqué qu'en moins d'une heure, ces complexes s'étaient agrégés entre eux et avaient sédimenté au fond du tube. Cette observation montre que les "nanotubes-Tween20" ne sont pas stables dans le milieu de culture. Ce résultat est en accord avec la quantification du degré d'interactions non-spécifiques mesuré pour ces complexes. En effet, les "nanotubes-Tween20" n'étant pas stables dans le milieu de culture, la probabilité d'interaction des nanotubes avec les membranes plasmiques est plus grande.

Nous avons également remarqué que les "nanotubes-F108" collaient fréquemment sur la lamelle de microscope que ce soit avec ou sans traitement hydrophile de la lamelle au plasma-cleaner. Ce phénomène n'était pas visible en utilisant les complexes "nanotubes-PLPEG".

En effet, même si de précédentes études ont montré que les "nanotubes-F108" pouvaient être utilisés sans risque majeur avec les macrophages [75], des études plus récentes ont montré que les tensioactifs F108 pouvaient se détacher de la surface du nanotube et rapidement être remplacés par le sérum présent dans les environnements physiologiques. Les travaux de P. Cherukuri et al. ont suggéré que lors de l'injection intraveineuse de ces nanotubes dans des rats, les protéines contenues dans le sang déplaçaient les molécules tensioactives en seulement une seconde [82]. Les protéines présentes dans le milieu de culture pourraient également se lier aux parois des nanotubes. Ce phénomène est appelé "effet corona" et pourrait affecter les mouvements de diffusion des nanotubes dans les milieux biologiques.

Pour cette raison, nous avons complété notre étude en prenant en compte les mouvements

de diffusion des "nanotubes-PLPEG" et "-F108" dans les réseaux biomimétiques.

2.1.8 Mouvements de diffusion des nanotubes dans les réseaux biomimétiques

Pour finaliser notre étude et tendre vers les conditions proches de nos applications visées, nous avons étudié notre capacité à mesurer les mouvements de diffusion des complexes "nanotubes-PLPEG" et "nanotubes-F108" dans des réseaux biomimétiques. Nous avons donc utilisé des gels d'agarose qui reproduisent la structure hétérogène des environnements biologiques.

La poudre d'agarose (*Low Gelling Temperature*, lot SLBJ7989V, Sigma-Aldrich) a été mélangée avec de l'eau MilliQ. Nous avons utilisé un gel de concentration 1.5%. Le mélange a été chauffé à l'aide d'une plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'une solution transparente homogène. Environ 1.5 μl de solution de nanotubes a été mélangée dans 1e liquide visqueux (1 ml). Pour être sûr que les nanotubes que nous observions étaient bien dans le gel, nous avons préparé des échantillons relativement épais ($\sim$ 2 mm d'épaisseur). Pour cela nous avons déposé 82 μl d'agarose sur une lamelle de microscope. Une deuxième lamelle a été déposée dessus avant la gélification et les bords ont été scellés avec de la graisse. Un support maintient le tout pour l'imagerie (cf. Figure.2.9).

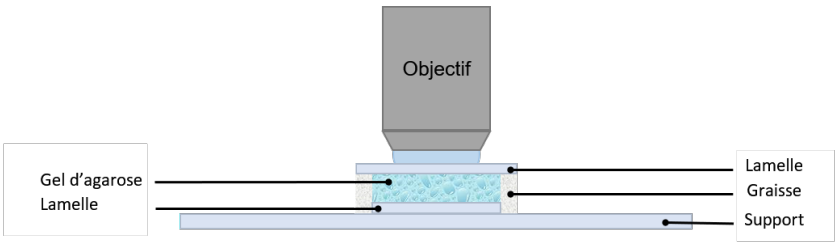

Figure 2.9 : *Coupe longitudinale d'un échantillon de gel d'agarose.*

Nous avons ensuite enregistré les mouvements de diffusion des "nanotubes-PLPEG" et "-F108". Les temps d'acquisition étaient de 30 ms par image. Clairement, nous avons observé que les "nanotubes-F108" bougeaient peu tandis que les "nanotubes-PLPEG" diffusaient facilement dans les canaux des gels.

Les Figures.2.10.(A-C) montrent un nanotube-PLPEG à différents instants de sa trajectoire. Grâce au bon rapport signal sur bruit, nous avons pu calculer les positions du nanotube (2096 localisations). Pour cela, nous avons utilisé le plugin GDSC SMLM dans ImageJ et reconstruit sa trajectoire (cf. Figures.2.10.D). La trajectoire d'un nanotube-F108 sur une centaine d'images est montrée sur la Figure.2.10.E.

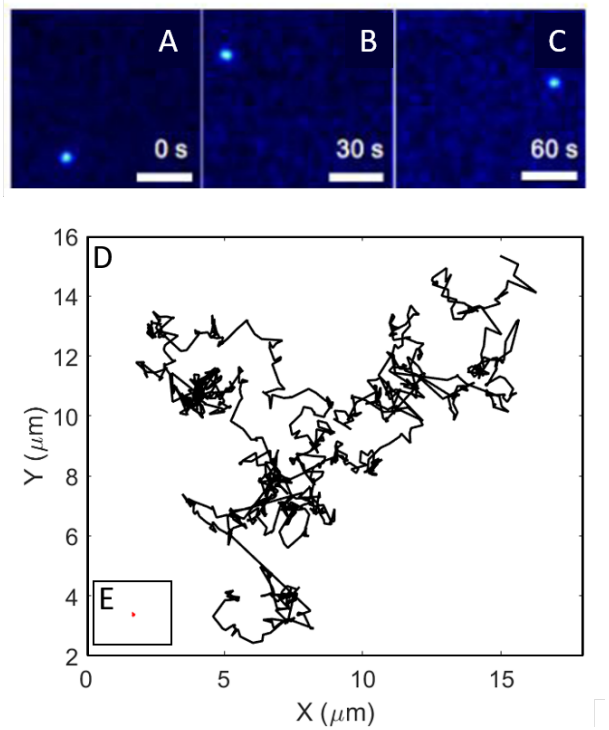

Figure 2.10 : *(A-C) Images d'un nanotube-PLPEG diffusant dans un gel d'agarose 1.5%m. (D) Trajectoire d'un nanotube-PLPEG. (E) Trajectoire d'un nanotube-F108. La barre d'échelle est de 5 μm*

2.1.9 Conclusion

Nous avons vu dans cette section que les "nanotubes-F108", "-Tween20" et "-PLPEG" présentaient des taux de viabilité et de prolifération cellulaire supérieurs à 80% après un jour d'incubation et supérieur à 70% après quatre jours d'incubation. Nous avons effectué des tests d'interactions non-spécifiques qui ont révélé que les "-Tween20" ne sont pas stables dans le milieu de culture ce qui augmente la probabilité d'interactions non-spécifiques. L'étude de l'intensité de photoluminescence des nanotubes dans le milieu de culture a montré que les complexes "nanotubes-PLPEG" sont 1.5 fois plus brillants que les complexes "nanotubes-F108". Nous avons également observé que les complexes "nanotubes-F108" collaient parfois à la lamelle de microscope ce qui a suggéré que l'encapsulation de ces nanotubes pourrait être altérée dans le DMEM. Ce résultat a été confirmé par l'étude des mouvements de diffusion des "nanotubes-F108" et "-PLPEG" dans les gels d'agarose. Nous concluons donc que les nanotubes encapsulés dans du PLPEG ont une meilleure capacité de diffusion dans les environnements biomimétiques. Dans la suite de cette thèse, nous utiliserons donc des nanotubes suspendus par du phospholipide polyéthylène-glycol (PLPEG). Ces résultats ont été publiés dans la référence [83].

2.2 Longueur d'onde optimale pour l'excitation de la photoluminescence de nanotubes uniques dans les tissus neuronaux

Dans cette partie, nous allons comparer les différentes longueurs d'onde d'excitation utilisables pour obtenir le meilleur rapport signal sur bruit des nanotubes luminescents dans les échantillons biologiques épais.

Dans un tissu biologique, les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière dépendent de la composition des tissus. Pour ce qui nous intéresse, le cerveau est principalement composé d'eau, de sang (hémoglobine, HGb), de graisse, de sels organiques et de protéines [84]. Chaque constituant participe à l'absorption et à la transmission de la lumière dans les tissus. La contribution de chaque constituant sera détaillée dans la section 2.2.5.1. Nous considérerons dans un premier temps les propriétés optiques globales des tissus.

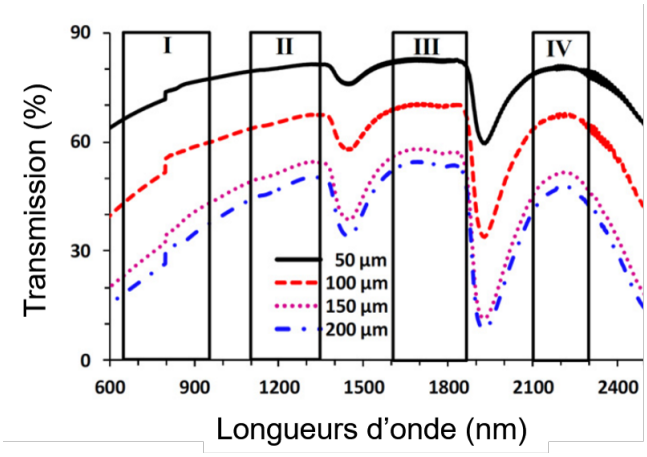

Figure 2.11 : *Evolution de la transmission des tissus neuronaux en fonction de l'épaisseur de la tranche. Figure extraite de la référence [85]*

La Figure.2.11 montre les pourcentages de transmission de la lumière à travers des tranches de cerveau de rat en fonction de la longueur d'onde de la lumière et de l'épaisseur des tranches de cerveau. Sur la Figure.2.11, nous distinguons quatre zones où la transmission est importante. Ces zones sont appelées "fenêtres de transparence" des tissus.

La première fenêtre se situe entre 650 nm et 950 nm, la deuxième entre 1100 nm et 1350 nm, la troisième entre 1600 nm et 1870 nm et la quatrième est centrée autour de 2200 nm.

La pénétration de la lumière dans les fenêtres II et III est plus importante que dans la fenêtre I [85]. La fenêtre III présente un maxima de transmission.

Les nanotubes $(6,5)$ peuvent être excités sur les transitions S_{22} et KSB (cf. Chapitre 1) qui sont respectivement à 568 nm et 845 nm. Ces longueurs d'onde se situent dans la

première fenêtre de transparence des tissus. La photoluminescence des nanotubes $(6,5)$ se situe à 985 nm. En raison de leur abondance dans les synthèses HipCo et CoMoCAT, de leur forte brillance et de la possibilité de les détecter avec une caméra silicium à très bas bruit, nous nous sommes concentrés sur les nanotubes $(6,5)$.

Par ailleurs, de récentes études ont montré que ces nanotubes peuvent être excités par up-conversion suite à une excitation autour de 1100 nm [86] [87] [88]. Cette longueur d'onde se situe au bord de la deuxième fenêtre de transparence des tissus. L'excitation des nanotubes $(6,5)$ par up-conversion est donc une stratégie à explorer pour nos applications. Elle pourrait augmenter la profondeur de pénétration de la lumière.

Dans les travaux de N. Akizuki et al. menés en 2015 [86], les nanotubes ont été excités à 1100 nm à faible intensité laser pour exclure les processus d'excitation multi-photonique et à 568 nm (S_{22}). Ils ont montré que l'intensité de photoluminescence ne dépendait pas de la longueur d'onde d'excitation (1100 nm ou 568 nm) ce qui a suggéré que le mécanisme d'excitation par up-conversion ne correspondait pas à un processus Raman anti-Stokes. L'intensité des spectres de photoluminescence des nanotubes augmentait avec la température ce qui pourrait suggérer un processus faisant intervenir un ou plusieurs phonons permettant de réaliser l'up-conversion à partir d'un état excitonique de basse énergie [86]. Ils ont également montré que l'intensité de photoluminescence était sublinéaire avec l'intensité d'excitation des nanotubes (cf. Figure.2.12) ce qui pourrait exclure les possibilités de photoémission induite par une absorption faisant intervenir plusieurs photons ou une recombinaison Auger car dans ces cas la dépendance serait sur-linéaire.

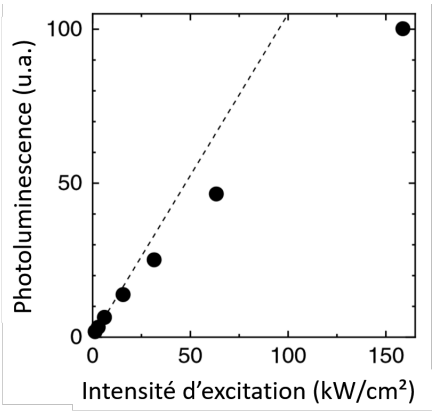

Figure 2.12 : *Evolution de la photoluminescence par up-conversion en fonction de l'intensité d'excitation. Figure reproduite de la référence [86].*

Les auteurs ont suggéré que la dépendance sublinéaire de la photoluminescence en fonction de l'intensité laser confirme l'existence d'un état intermédiaire de basse énergie et de durée de vie courte produisant la saturation de la photoluminescence. Cet état intermédiaire pourrait

provenir de défauts préexistants sur les nanotubes créés lors de la synthèse.

En 2016, les travaux de S. Aota et al. [88] ont montré que l'intensité de photoluminescence par up-conversion dépendait de la polarisation du laser d'excitation comme la photoluminescence lors d'une excitation sur la transition S_{22} (en $\cos^2\theta$) mais que cette dépendance faisait apparaître une constante supplémentaire. Ce résultat suggère une modification des règles de sélection pour les états électroniques initialement excités. Cet état excité ne correspondrait pas à l'état excitonique intrinsèque 1D mais à un état excitonique localisé (0D) dû à la présence de défauts localisés.

2.2.1 Etudes préliminaires sur le mécanisme de génération de la photoluminescence par up-conversion

Dans ce contexte où la nature des défauts luminescents sous une excitation par up-conversion n'est pas complètement comprise, nous avons effectué une étude préliminaire visant à déterminer si les défauts intervenant dans le mécanisme de up-conversion pouvaient être photo-induits. Pour cela, nous avons utilisé des nanotubes DOC de longueur moyenne ~ 4 μm. En effet, cette encapsulation permet de produire des nanotubes $(6,5)$ très brillants et dont la longueur est supérieure à la limite de diffraction ($\sim$ 430 nm) ce qui nous a permis d'avoir l'opportunité de voir des inhomogénéités de photoluminescence sur un même nanotube.

Plusieurs sources laser ont été utilisées pour exciter les nanotubes $(6,5)$: un laser solide continu à 568 nm (Saphirre Coherent) et un laser continu Nd :YAG à 1064 nm (Mephisto

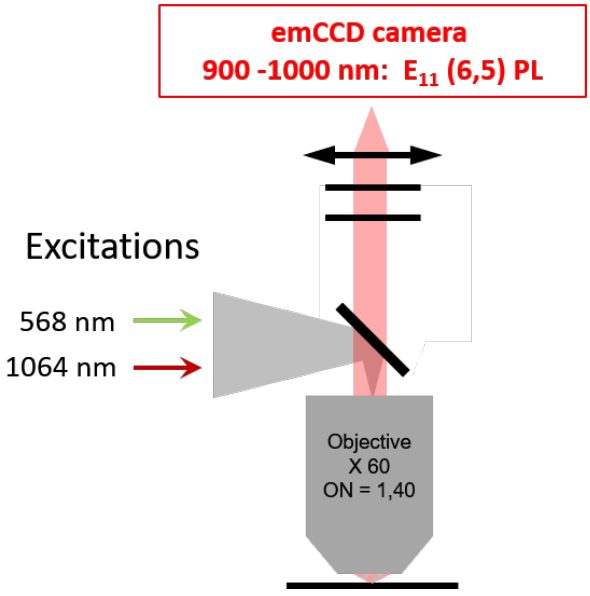

Figure 2.13 : *Montage expérimental de microscopie de fluorescence en champ large.*

Coherent). La polarisation de tous les faisceaux lasers était circulaire pour exciter de façon équivalente les nanotubes dispersés sur la lamelle et d'orientations aléatoires.

Afin de séparer le laser d'excitation et la photoluminescence, un miroir dichroïque passe-haut 875 nm (FF875-Di01, Semrock) a été utilisé pour l'excitation sur la transition S_{22} . Pour l'excitation par up-conversion, nous avons utilisé un miroir dichroïque passe-bas 1050 nm (Edmund Optics). De façon à sélectionner uniquement la photoluminescence venant des nanotubes de chiralité $(6, 5)$ (985 nm), nous avons utilisé une combinaison de filtre passe-haut 900 nm (ET900LP, Chroma) et passe-bas 1000 nm (FESH 1000 Thorlabs). Le montage expérimental est résumé sur la Figure.2.13.

Pour cette étude, nous nous sommes placés dans le régime de basses intensités. Les intensités lasers étaient de 0.2 kW/cm^2 (S_{22}) et 3.2 kW/cm^2 (up-conversion). La Figure.2.14 montre plusieurs nanotubes excités successivement sur la transition S_{22} et par up-conversion.

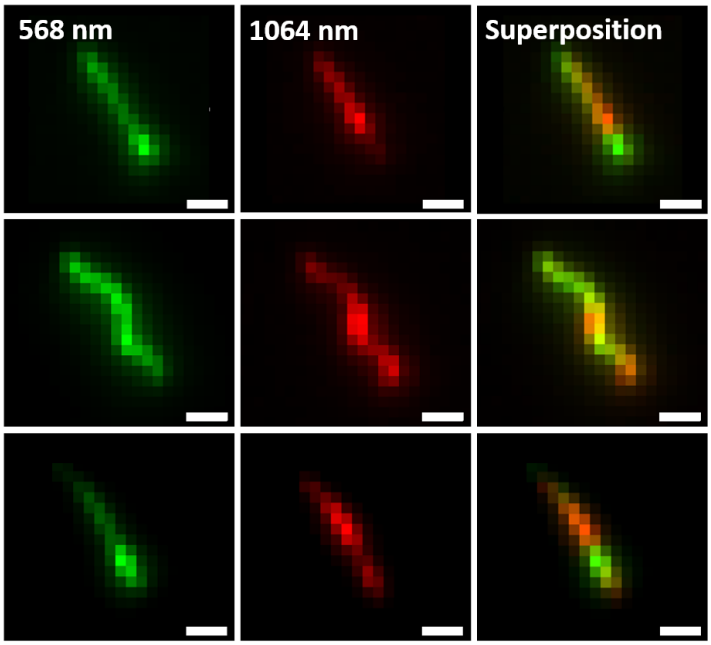

Figure 2.14 : *Images de la photoluminescence d'un nanotube DOC excité sur la transition S_{22}(0.2 kW/cm^2) et par up-conversion (3.2 kW/cm^2). La caméra est en mode Low Noise et le temps d'intégration est de 100 ms. Les images sont moyennées sur 50 images brutes. La barre d'échelle est de 1 μm.*

Clairement, nous observons une anti-corrélation spatiale des sites de photoluminescence. Ce résultat est directement compatible avec les références [86] et [88] car il suggère que l'excitation par up-conversion s'effectue préférentiellement sur des sites de défauts localisés fournissant des états de basses énergies suivi de processus multi-phononiques permettant l'émission à partir de l'état excitonique dit "brillant" (cf. Figure.2.15).

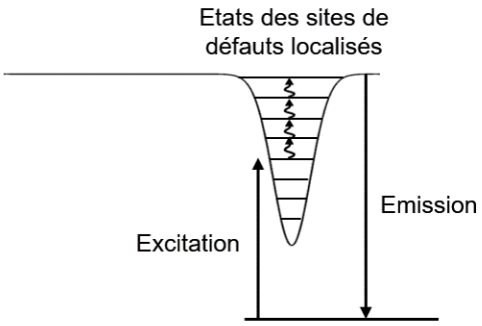

Figure 2.15 : *Représentation des états des sites de défauts localisés pouvant être à l'origine du mécanisme d'up-conversion.*

Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces défauts localisés pourraient correspondre à des défauts photo-induits par une excitation intense sur la transition S_{22}.

Pour cela, nous avons tout d'abord enregistré la photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion à 3.2 kW/ cm^2 (cf. Figure.2.16.A). Ces images ont été prises comme référence. Nous avons ensuite enregistré un film de ces mêmes nanotubes excités sur la transition

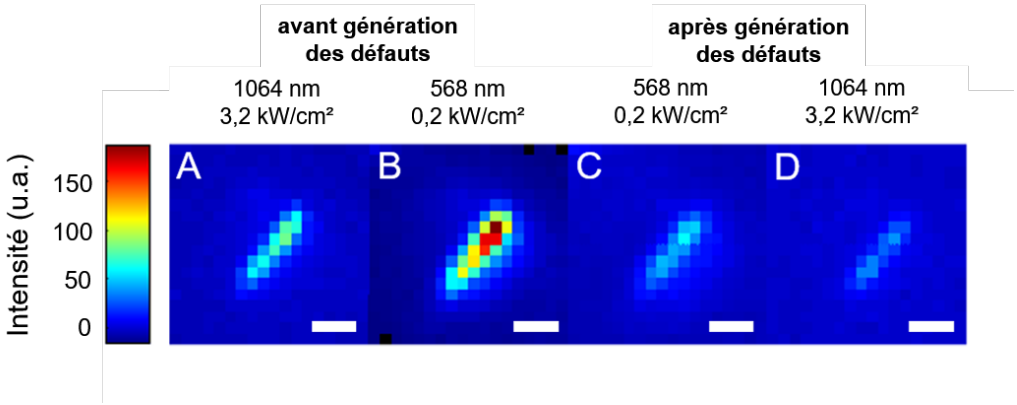

Figure 2.16 : *Images de la photoluminescence d'un nanotube DOC excité par up-conversion à 3.2 kW/cm^2 (A), sur la transition S_{22} à 0.2 kW/cm^2 avant la photo-génération des défauts (B) et après la photo-génération des défauts (C), par up-conversion à 3.2 kW/cm^2 après génération des défauts (D). Les intensités des figures A et D sont multipliées par 2 pour une meilleure visualisation. La barre d'échelle est de 1 µm.*

S_{22} pour une intensité de 0.2 kW/cm^2 (cf. Figure.2.16.B). Nous avons augmenté l'intensité laser d'excitation sur la transition S_{22} pendant 4 minutes (I = 1.1 kW/cm^2) pour photo-induire des défauts. Nous avons ensuite baissé cette intensité et ré-enregistré une image pour une intensité de 0.2 kW/cm^2 à 568 nm (cf. Figure.2.16.C) pour visualiser la création des défauts et donc la diminution de la photoluminescence. Finalement nous avons enregistré la photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion pour une intensité de 3.2 kW/cm^2

identique à celle de départ (cf. Figure.2.16.D).

La Figure.2.16 montre les images d'un nanotube excité selon la séquence précédemment décrite. Nous voyons que le signal de photoluminescence après l'irradiation intense sur la transition S_{22} a fortement diminué à cause de la création de défauts photo-induits (cf. Figure.2.16.C). La photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion après la création de ces défauts est également plus faible à la fin qu'au début de la séquence. Cela suggère que les défauts photo-induits ne favorisent pas l'excitation de la photoluminescence par up-conversion. La photoluminescence par up-conversion serait donc favorisée par d'autres défauts intrinsèques au niveau du réseau cristallin idéalement hybridé sp^2, vraisemblablement de type sp^3 [86]. Nous avons également observé qu'après une excitation par up-conversion intense, le signal de photoluminescence avec une excitation sur la transition S_{22} diminuait.

Même si la nature des défauts luminescents sous une excitation par up-conversion n'est pas totalement identifiée, nous nous sommes tout de même intéressés à l'opportunité d'utiliser cette stratégie pour exciter des nanotubes biocompatibles dans les tissus épais. Pour des applications biologiques, les nanotubes encapsulés dans du DOC ne sont pas biocompatibles. Nous avons donc utilisé par la suite des nanotubes encapsulés dans du PLPEG.

2.2.2 Détection et suivi de nanotubes *biocompatibles* photoluminescents uniques excités par upconversion

Pour une utilisation des nanotubes individuels en imagerie dynamique, l'intensité de photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion doit être stable et le rapport signal sur bruit doit être important. Dans un premier temps, nous avons souhaité montrer que l'efficacité de détection des "nanotubes-PLPEG" excités par up-conversion était semblable aux efficacités de détection obtenues par des excitations sur les "transitions" S_{22} et KSB.

Pour cette étude, une solution de nanotubes ($\sim$ 15-30 μl) a été dispersée sur une lamelle de microscope (20 x 20 mm) à l'aide d'une tournette (Speciality Coating Systems G3P-8-Spincoat, INC.) à une vitesse de 2500 r.p.m. pendant 3 minutes. Les lamelles ont été préalablement nettoyées dans un plasma-cleaner (Harrick Plasma, ITACA New York modèle PDC 002) pendant deux minutes. En effet, le plasma permet d'enlever les impuretés à la surface des lamelles et de les rendre hydrophiles. L'échantillon a ensuite été monté sur une lame de microscope pour les observations en microscopie de fluorescence en champ large.

La Figure.2.17 montre un nanotube encapsulé dans du PLPEG excité consécutivement avec les trois longueurs d'onde d'excitation : 568 nm (S_{22}), 845 nm (KSB), 1064 nm (up-conversion). Nous avons utilisé un laser continu Titane-Saphir ajustable en longueur d'onde à 845 nm (Spectra Physics) pour exciter les nanotubes sur la transition KSB.

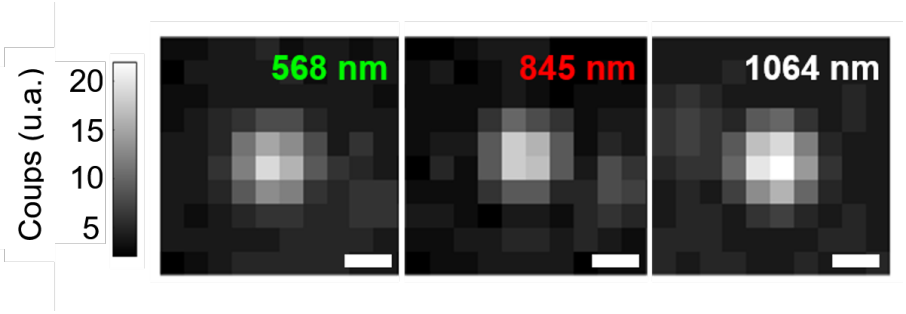

Figure 2.17 : *Images de la photoluminescence d'un nanotube PLPEG excité au trois longueur d'onde d'intérêt. Les intensités laser sont de : 0.4 kW/cm^2 (568 nm), 1.6 kW/cm^2 (845 nm), et 6.4 kW/cm^2 (1064 nm). Le temps d'intégration est de 100 ms. La barre d'échelle est de 500 nm.*

Pour cette séquence d'acquisition, nous avons tout d'abord excité le nanotube à 845 nm, puis à 1064 nm et enfin à 568 nm. En effet, l'excitation sur la transition S_{22} (568 nm) peut induire des défauts permanents sur le nanotube si l'intensité laser est supérieure à l'intensité de saturation. Ces défauts pourraient induire une diminution de l'intensité de photoluminescence au cours de notre étude. Nous pouvons voir sur la Figure.2.17 qu'en ajustant les intensités d'excitation, les rapports signaux sur bruit du nanotube présenté sont similaires pour les trois longueurs d'onde d'excitation.

Nous avons ensuite étudié la stabilité du signal de photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion. Pour cela, nous avons enregistré le signal de photoluminescence d'un nanotube fixé sur une lamelle de microscope en fonction du temps. Le temps d'intégration était de 100 ms et l'intensité d'excitation était de 6.4 kW/cm^2 (cf. Figure.2.18).

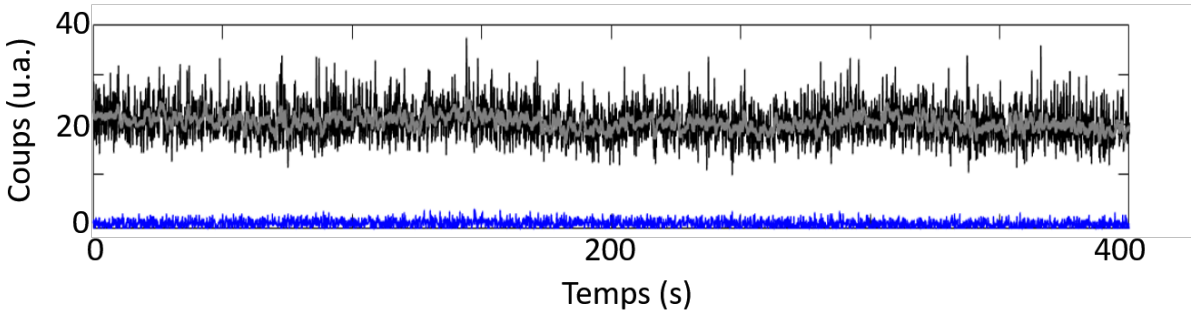

Figure 2.18 : *Photo-stabilité d'un nanotube PLPEG excité par up-conversion. L'axe des ordonnées correspond au nombre de coups par pixel. Le temps d'intégration est de 100 ms et l'intensité laser est de 6.4 kW/cm^2.*

Le profil en gris correspond aux signaux de photoluminescence moyennés sur 10 images et le profil bleu correspond au bruit. Nous pouvons voir que la photoluminescence des nanotubes-

PLPEG excités par up-conversion est relativement stable durant plus de 6 minutes.

Nous avons donc ensuite cherché à déterminer si le rapport signal sur bruit des nanotubes excités par up-conversion était assez grand pour les suivre à *cadence vidéo* dans des conditions physiologiques. Pour cela, nous les avons introduits dans du milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal.

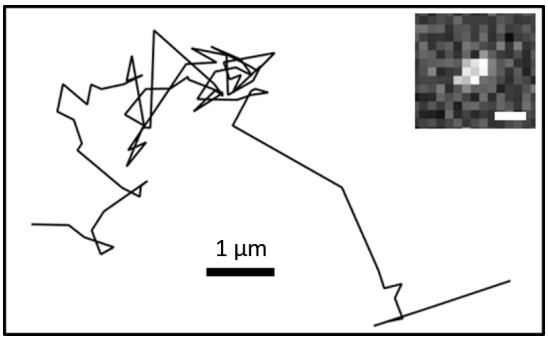

Figure 2.19 : *Trajectoire et image d'un nanotube* $(6,5)$ *PLPEG diffusant dans du DMEM et excité par up-conversion. Le temps d'intégration est de 30 ms et l'intensité laser est de 3.2* kW/cm^2*. La barre d'échelle est de 1* μm*.*

La Figure.2.19 montre la trajectoire d'un nanotube diffusant dans le DMEM ainsi que la capture d'image du nanotube à un instant donné de sa trajectoire. Le rapport Signal sur Bruit est d'environ 6. Ce résultat suggère que le suivi de nanotubes biocompatibles individuels excités par up-conversion est réalisable pendant des temps relativement longs. Nous allons donc étudier précisément si cette stratégie d'excitation des nanotubes est envisageable pour des études dans des cerveaux vivants.

2.2.3 Comparaison de l'efficacité de photoluminescence des "nanotubes-PLPEG" en fonction des longueurs d'onde d'excitation

Pour connaître les valeurs des intensités d'excitation nécessaires à la détection des nanotubes biocompatibles dans les tissus neuronaux, nous avons cherché à quantifier les efficacités de photoluminescence en fonction des longueurs d'onde d'excitation : 568 nm (S_{22}), 845 nm (KSB) et 1064 nm (up-conversion).

Pour cela, nous avons pris en compte la puissance de nos sources lasers P, les transmissions du microscope en fonction des longueurs d'onde T_λ et la taille des faisceaux selon l'axe x ($\sigma_{f,x}$) et y ($\sigma_{f,y}$) dans le plan d'observation. L'intensité laser au centre du faisceau gaussien est donnée par la relation suivante :

$$I_0 = \frac{T_\lambda \cdot P}{2\pi\sigma_{f,x}\sigma_{f,y}} \tag{2.2}$$

Les transmissions du microscope T_λ dépendent des transmissions du dichroïque et de l'objectif. Elles ont été obtenues en mesurant les puissances à l'entrée et à la sortie du microscope pour chaque longueur d'onde. La taille de chacun des faisceaux laser a été obtenue en mesurant le signal de photoluminescence d'une solution concentrée de nanotubes encapsulés dans du DOC et dispersés dans l'eau. Pour cela, nous avons enregistré le signal de photoluminescence tout en se déplaçant dans le plan focal. Nous avons ensuite moyenné toutes les images du film (cf. Figure.2.20). Cette méthode permet de lisser le profil du faisceau qui a ensuite été modélisé par une gaussienne à deux dimensions. La largeur à mi-hauteur de la gaussienne définit le diamètre de notre faisceau. Les pixels de la caméra ont été préalablement mesurés à l'aide d'une grille micrométrique et font 0.27 x 0.27 μm^2.

Le signal de photoluminescence des nanotubes dépend du rendement quantique η_q, de la section efficace d'absorption σ_λ et de l'intensité d'excitation au niveau du nanotube I_{NT}^{exc} :

$$PL_{NT} \propto \eta_q \, \sigma_\lambda \, I_{NT}^{exc} \tag{2.3}$$

L'intensité d'excitation au niveau du nanotube est déterminée en prenant en compte le centroïde des faisceaux laser (x_0, y_0) dans l'image, leur largeur à mi-hauteur $\sigma_{x,y}$ et la position du nanotube dans l'image (x_{NT}, y_{NT}) :

$$I_{NT}^{exc} = I_0 \; exp\left[-ln2\left(\frac{(x_{NT}-x_0)^2}{\sigma_{f,x}^2} + \frac{(y_{NT}-y_0)^2}{\sigma_{f,y}^2}\right)\right] \tag{2.4}$$

Pour mesurer l'évolution du signal de photoluminescence en fonction des intensités d'excitation, nous avons enregistré 50 images de chaque zone contenant des nanotubes pour chaque longueur d'onde et chaque intensité $I_{0,i}$. Pour chaque nanotube, nous avons dessiné une ré-

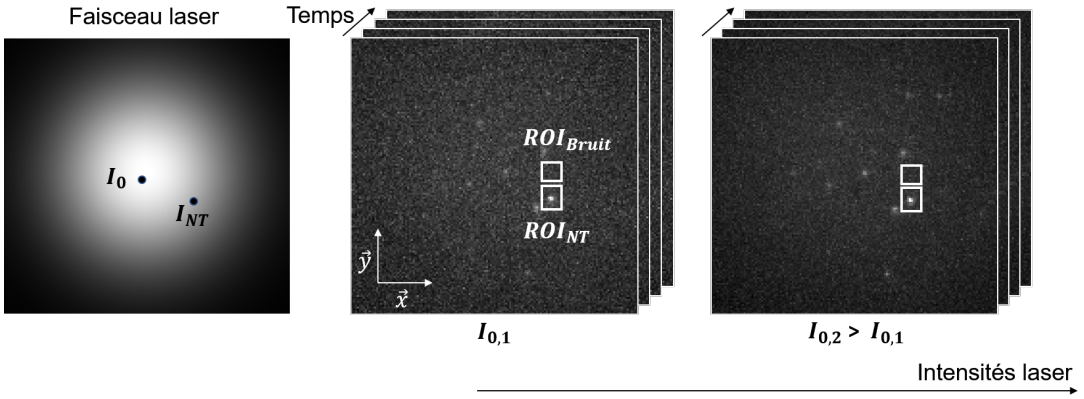

Figure 2.20 : *Visualisation de la séquence expérimentale permettant de calculer les signaux de photoluminescence en fonction de l'intensité laser.*

gion où il y a le nanotube ROI_{NT} et une région où il n'y a pas de nanotube ROI_{Bruit} (cf.

Figure.2.20). Pour mesurer le signal de photoluminescence, nous avons pris la valeur maximale de l'intensité dans l'image ROI_{NT} et nous avons soustrait la valeur moyenne du bruit (moyenne de ROI_{Bruit}). Nous avons ensuite fait une moyenne temporelle sur les 50 images pour chaque intensité laser $I_{0,i}$.

Nous avons ensuite obtenu le signal détecté moyen PL_{NT} par pixel en fonction de l'intensité laser au niveau du nanotube I_{NT}^{exc} (cf. Figure.2.21). Les barres d'erreur correspondent aux valeurs de la déviation standard des signaux de photoluminescence sur les 50 images.

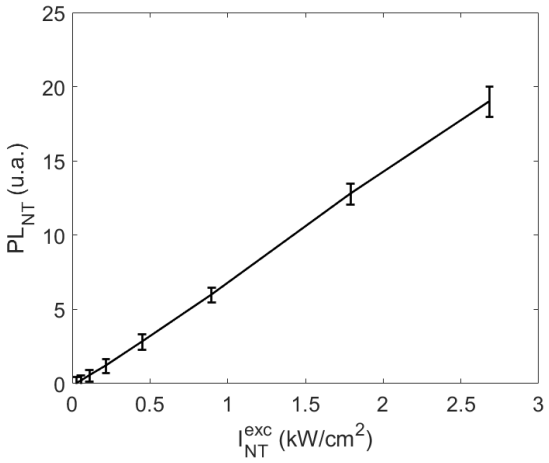

Figure 2.21 : *Evolution du signal de photoluminescence d'un nanotube-PLPEG* $(6,5)$ *excité à 845 nm.*

Nous avons répété cette analyse pour chaque nanotube et chaque longueur d'onde d'excitation. Nous avons choisi de ne pas exciter les mêmes nanotubes avec les trois longueurs d'onde consécutivement. Cette méthode permet de ne pas être biaisé par la création éventuelle de défauts permanents sur les nanotubes.

Pour chaque intensité $I_{0,i}$, nous avons alors moyenné les couples de points (PL_{NT},I_{NT}^{exc}) sur le nombre de nanotubes étudiés (N = 16 pour le 568 nm, 13 pour le 845 nm et 12 pour le 1064 nm) :

$$PL =< PL_{NT} >_N \quad \text{et} \quad I =< I_{NT}^{exc} >_N \tag{2.5}$$

La Figure.2.22 regroupe les résultats obtenus pour les trois longueurs d'onde d'excitation. Pour des excitations sur les transitions S_{22} et KSB, nous constatons que le signal de photoluminescence est linéaire avec l'intensité d'excitation. La saturation de la photoluminescence pour la S_{22} n'est pas visible car les intensités lasers utilisées sont inférieures à l'intensité de saturation de l'ordre de 1-2 kW/cm^2 [42]. Par contre, pour une excitation par up-conversion, le signal de photoluminescence en fonction de l'intensité laser est légèrement sublinéaire.

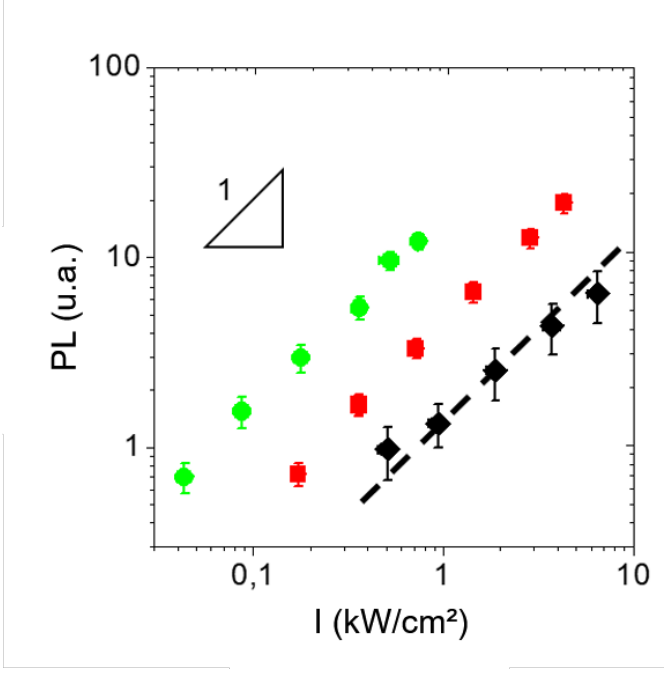

Figure 2.22 : *Evolution du signal de photoluminescence en fonction des intensités laser pour les trois longueurs d'onde d'intérêt (vert : 568 nm, rouge : 845 nm et noir : 1064 nm). Les temps d'intégration sont de 100 ms.*

Cette dépendance est en accord avec les travaux de N. Akizuki et al. [86] même si elle n'est pas totalement comprise. Dans la suite, par soucis de simplification, nous considèrerons que cette dépendance est linéaire (cf. Figure.2.22). Cela nous a permis de définir l'efficacité de photoluminescence A_{PL} comme étant égale à la valeur de la pente dans le régime linéaire.

$$A_{PL} = \left.\frac{dPL}{dI}\right|_{I<I_{sat}} \tag{2.6}$$

Elle est proportionnelle au produit de la section efficace d'absorption σ_λ et du rendement quantique η_q :

$$A_{PL} \propto \eta_q \, \sigma_\lambda \tag{2.7}$$

La Figure.2.23 présente les efficacités de photoluminescence normalisées ($A_{PL,norm}$) à l'efficacité de photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion ($A_{PL,uc}$).

$$A_{PL,norm} = \frac{A_{PL}}{A_{PL,uc}} \tag{2.8}$$

Les incertitudes de $A_{PL,norm}$ sont données par :

$$\Delta A_{PL,norm} = A_{PL,norm}\left(\frac{\Delta A_{PL}}{A_{PL}} + \frac{\Delta A_{PL,uc}}{A_{PL,uc}}\right) \tag{2.9}$$

où ΔA_{PL} et $\Delta A_{PL,uc}$ sont les incertitudes sur les valeurs des pentes calculées précédemment.

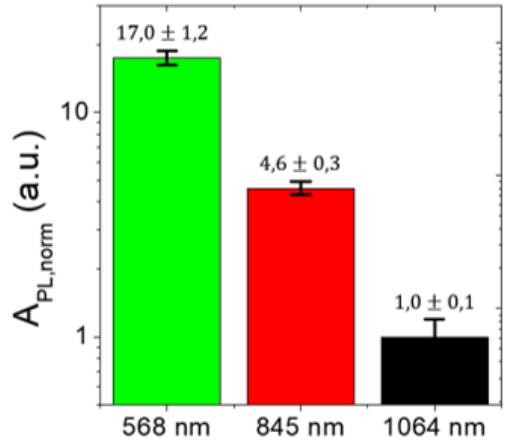

Figure 2.23 : *Efficacités de photoluminescence normalisées des nanotubes-PLPEG. Les temps d'intégration sont de 100 ms.*

La transition S_{22} étant optiquement résonnante, nous pouvons voir sur la Figure.2.23 que l'efficacité de photoluminescence sur cette transition est sans surprise supérieure aux autres. Le rapport des efficacités de photoluminescence entre des excitations sur les "transitions" S_{22} et KSB est d'environ 3.7 ce qui est en accord avec de précédentes études réalisées au sein du groupe [89]. Nous pouvons noter que l'efficacité de photoluminescence sous une excitation par up-conversion est 17 fois plus faible que l'efficacité sur la transition S_{22}.

2.2.4 Détection des nanotubes individuels dans des tissus neuronaux

La qualité de détection des nanotubes dans les tissus épais est donnée par le rapport signal sur bruit de fond (RSB). Nous allons donc mesurer ce rapport pour des nanotubes introduits dans des tranches de cerveaux de rats. De plus, en fonction des longueurs d'onde d'irradiation, les tissus absorbent plus ou moins fortement la lumière. Cet effet pourrait conduire à une augmentation locale de la température susceptible d'altérer l'intégrité des tissus. Nous allons donc également évaluer cet effet.

Pour mesurer le signal de photoluminescence des nanotubes $(6,5)$ au sein des tissus biologiques, nous avons injecté les nanotubes dans le ventricule du cerveau d'un jeune rat. Le protocole sera explicité dans le Chapitre 3. Ce mode d'injection minimise l'inflammation des tissus [90]. A partir du site d'injection, les nanotubes diffusent vers les différentes régions du cerveau. L'animal a été sacrifié 30 minutes après l'injection. Le cerveau a été disséqué et des tranches de cerveau de 100 μm d'épaisseur ont été préparées. Pour cette expérience, les

tranches de cerveaux ont été fixées et marquées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui permet de visualiser les noyaux des cellules (cf. Figure.2.24.A).

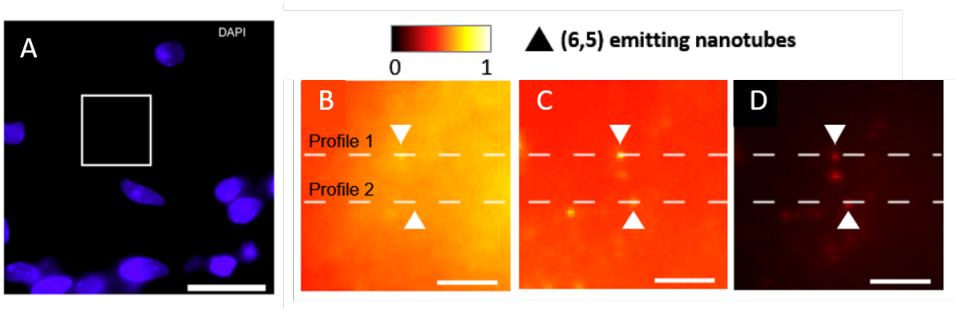

Figure 2.24 : *(A) Image du noyau des cellules marquées avec du DAPI (La barre d'échelle est de 20 µm), (B)-(C)-(D) images de plusieurs nanotubes encapsulés dans du PLPEG situé à 50 µm de profondeur dans une tranche de cerveau de rat excité à des intensités laser de 0,5 kW/cm^2 (568 nm), 0,7 kW/cm^2 (845 nm) et 23.3 kW/cm^2 (1064 nm) de gauche à droite. Les barres d'échelles sont de 5 µm.*

Nous avons choisi une zone située à 50 μm de profondeur. Nous avons ensuite excité les nanotubes successivement sur la "transition" KSB, par up-conversion et sur la transition S_{22}. Expérimentalement, nous avons ajusté les intensités de façon à observer un rapport signal sur bruit similaire (entre la KSB et l'up-conversion) ou un nombre de coups détectés similaire (entre la KSB et la S_{22}).

Pour une excitation à 568 nm, nous pouvons voir sur la Figure.2.24 un fort signal d'auto-fluorescence comme attendu à cette longueur d'onde [91]. Pour quantifier le rapport signal sur bruit, nous avons ensuite tracé les profils d'intensité des nanotubes enregistrés (cf. Figure.2.25) correspondant aux lignes blanches sur les Figures.2.24.B-C-D. La Figure.2.25 montre effec-

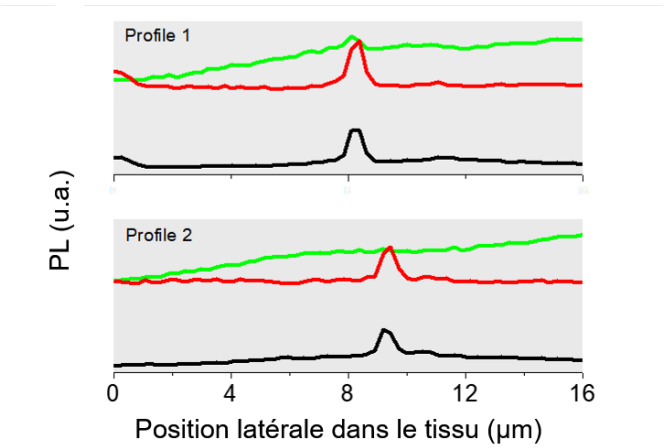

Figure 2.25 : *Intensités des profils 1 et 2 présentés sur les Figures.2.24.B-C-D.*

tivement que l'amplitude du fond est très faible pour l'up-conversion comparativement aux autres. Plus la longueur d'onde d'excitation augmente plus le signal de fond diminue [92]. Les rapports signaux sur fond sont respectivement de 2.5, 0.3 et < 0.1 pour les excitations à 1064 nm, 845 nm et 568 nm. En revanche, le rapport signal sur bruit (RSB) qui est une grandeur plus pertinente en imagerie, est d'environ 25 pour les excitations à 1064 nm et 845 nm tandis qu'il n'est que de 5 pour une excitation à 568 nm.

Ces résultats suggèrent que l'auto-fluorescence des tissus ne permet pas de détecter efficacement les nanotubes excités à 568 nm en profondeur même si l'efficacité de photoluminescence sur cette transition est importante. L'auto-fluorescence pourrait être due à la présence de granules cytoplasmiques présentes dans les astrocytes [93] et/ou due à des fluorophores endogènes [94].

L'excitation des nanotubes sur la transition KSB et par up-conversion semblent être toutes deux appropriées dans les tissus. Pour assurer l'intégrité des tissus vivants, l'augmentation locale de la température sous l'effet de l'irradiation laser doit cependant être évaluée, d'autant plus que des intensités d'excitation très différentes sont utilisées à ces deux différentes longueurs d'onde.

2.2.5 Intégrités des tissus soumis à des illuminations laser

2.2.5.1 Coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus

L'élévation locale de la température dépend des propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière des tissus neuronaux. De nombreux constituants du cerveau participent à l'absorption et la diffusion de la lumière via leurs coefficients d'absorption μ_a et de diffusion μ_s. Le cerveau est composé principalement de 77% (W) d'eau [95], de 10% (F_a) de graisse [96] et de 3% (B) d'hémoglobine (HGb) dont 60% (S_a) sont saturés en oxygène [84]. Il est également constitué de sels minéraux et de protéines. Cependant, ces deux constituants ne participent pas à l'absorption de la lumière dans le spectre visible et infra-rouge. Les protéines absorbent en effet principalement dans l'ultra-violet ($\lambda < 250$ nm) [97].

Les valeurs des coefficients d'absorption et de diffusion pour chaque longueur d'onde vont nous permettre de modéliser l'augmentation de la température au niveau de l'échantillon liée à l'illumination laser.

Le coefficient d'absorption total prend en compte la composition du cerveau et s'écrit :

$$\mu_{a,tot} = W\mu_{a,W} + F_a\mu_{a,F} + BS_a\mu_{a,oxy} + B(1-S_a)\mu_{a,desoxy} \tag{2.10}$$

où μ_w, μ_F, μ_{oxy} et μ_{desoxy} sont les coefficients d'absorption de l'eau, de la graisse, du sang saturé en oxygène et du sang non-oxygéné. Ces coefficients dépendent de la longueur

d'onde de la lumière [84]. Les premières colonnes du tableau 2.1 regroupent les valeurs de ces coefficients pour nos trois longueurs d'onde d'intérêt à partir des données de la référence [84].

λ (nm)	$\mu_{a,W}$ (cm^{-1})	$\mu_{a,F}$ (cm^{-1})	$\mu_{a,oxy}$ (cm^{-1})	$\mu_{a,desoxy}$ (cm^{-1})	$\mu_{a,tot}$ (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})
568	$6.5{\cdot}10^{-4}$	$6{\cdot}10^{-2}$	300	300	9	21.5
845	$5{\cdot}10^{-2}$	$6{\cdot}10^{-2}$	5	3	0.17	11.7
1064	$8{\cdot}10^{-1}$	$4{\cdot}10^{-1}$	3	0.5	0.7	8.7

Table 2.1 : *Coefficients d'absorption de chaque constituant, coefficient d'absorption total $\mu_{a,tot}$ et de diffusion de la lumière μ_s dans des cerveaux de rats.*

Les propriétés d'absorption sont presque systématiquement dominées par la contribution du sang. Quand la longueur d'onde augmente, la contribution du sang diminue et celle de l'eau augmente. Le coefficient d'absorption total de la lumière comporte ainsi un minimum pour une illumination laser à 845 nm.

Le coefficient de diffusion de la lumière dépend également de la longueur d'onde d'illumination et s'écrit [84] :

$$\mu_s = a\left(f_{ray}\left(\frac{\lambda}{500\,(nm)}\right)^{-4} + (1-f_{ray})\left(\frac{\lambda}{500(nm)}\right)^{-b_{Mie}}\right) \tag{2.11}$$

où $a \sim 27.4cm^{-1}$ est un facteur d'échelle, $f_{ray} \sim 31.5\%$ correspond à la contribution de Rayleigh et $b_{Mie} \sim 1.087$ est une puissance relative à la diffusion de Mie [84]. Le premier terme de l'équation 2.11 correspond au régime de Rayleigh qui a lieu lorsque la taille des constituants est très petite devant la longueur d'onde de la lumière. La diffusion de la lumière est relativement isotrope. Le deuxième terme correspond à la diffusion de Mie, valable quelle que soit la taille des constituants et fortement orientée dans le sens de propagation de l'illumination. Les valeurs du coefficient de diffusion total μ_s sont résumées dans la dernière colonne du tableau 2.1 pour chaque longueur d'onde d'intérêt. Plus la longueur d'onde diminue, plus le coefficient total de diffusion de la lumière augmente.

A l'aide des paramètres de diffusion et d'absorption de la lumière dans les tissus et des efficacités de photoluminescence des nanotubes, nous allons modéliser l'augmentation de température au niveau de l'échantillon.

2.2.5.2 Modélisation de l'augmentation de température des tissus sous l'effet d'une irradiation laser

L'objectif est de modéliser l'augmentation de température d'un tissu neuronal vivant dans les conditions expérimentales précédentes. Pour cela, nous avons considéré le cas d'un nano-

tube localisé à 50 μm de profondeur dans un cerveau. Une lamelle de microscope d'épaisseur 170 μm recouvre la tranche. Nous avons modélisé la tranche de cerveau par un disque d'épaisseur $e_{tranche} = 2$ mm et de diamètre $d_{cerveau} = 1$ cm. Ces paramètres sont caractéristiques par exemple des tranches para-saggitales de cerveaux de souris âgées de 4 à 6 mois. L'échantillon est éclairé en champ large aux différentes longueurs d'onde évoquées précédemment.

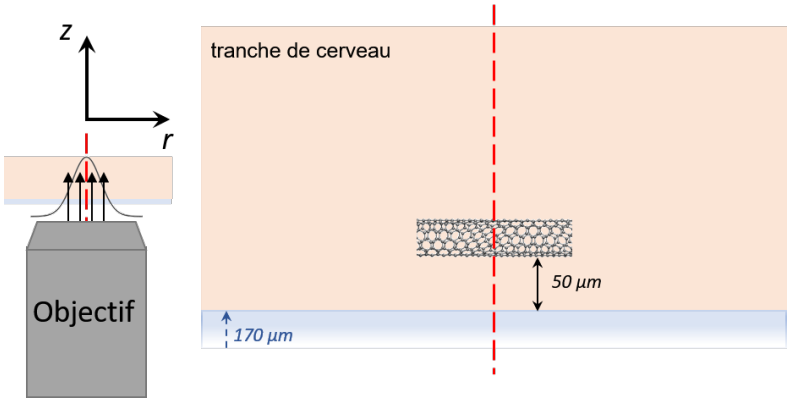

Figure 2.26 : *Schéma du système étudié pour modéliser l'augmentation locale de la température sous l'effet de l'illumination laser. Les dimensions du nanotube ne sont pas à l'échelle.*

Pour cette modélisation, nous nous sommes placé dans le repère cylindrique $(\vec{r}, \vec{z})$. L'équation de la chaleur s'écrit :

$$\rho\, C_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + div(-k \cdot \vec{grad}(T)) = I_{abs}(\vec{r}, z) \tag{2.12}$$

où ρ, C_p, k, T et $I_{abs}(\vec{r}, z)$ sont la masse volumique, la capacité calorifique, le coefficient de conduction thermique du cerveau, la température et le terme de source de chaleur. Le premier terme à gauche dans l'équation 2.12 correspond aux mouvements de convection qui dépendent du temps. Le deuxième terme est lié à la diffusion de la chaleur. Le terme source à droite correspond à l'irradiation laser sur le volume du tissu considéré. Nous avons considéré que les faisceaux étaient gaussiens et nous avons négligé ici leur divergence selon l'axe $\vec{z}$. Le terme source s'écrit donc :

$$I(\vec{r}, z = 0) = I_0\, exp\left(-\frac{1}{2}\frac{r^2}{R_f^2}\right) \tag{2.13}$$

où $\vec{r}$ est le vecteur radial, R_f et I_0 correspondent à la largeur à mi-hauteur du faisceau gaussien et à la valeur de l'intensité maximale au centre du faisceau gaussien.

L'intensité transmise au point de profondeur dz s'écrit :

$$I_t(\vec{r}, dz) = I_0\, exp(-\frac{\vec{r}^{\,2}}{{R_f}^2}) \cdot exp(-(\mu_{a,tot} + \mu_s)dz) \tag{2.14}$$

Cette équation n'est valable que pour une profondeur inférieure ou égale à la longueur de Rayleigh. La fraction de lumière absorbée entre les points de profondeur z et $z + dz$ est :

$$dI_{abs}(\vec{r}, z) = \mu_{a,tot}\, dz\, I_0\, exp(-\frac{\vec{r}^{\,2}}{{R_f}^2}) \cdot exp(-(\mu_{a,tot} + \mu_s)z) \quad \text{pour} \quad z > z_{lamelle} \tag{2.15}$$

Ce terme correspond à notre source de chaleur. De façon à simplifier le problème, nous avons émis certaines hypothèses.

Comme les temps d'exposition des tranches à la lumière sont de l'ordre de plusieurs minutes ($\sim$ 30 min), nous n'avons considéré que les solutions à l'état stationnaire. Nous avons également considéré que la lamelle est non-absorbante et non-diffusante. Cependant, nous avons pris en compte sa conductivité thermique dans la modélisation. Nous avons considéré que les conductivités thermiques de la lamelle et de la tranche de cerveau ne dépendaient pas de la température et que le cerveau était un milieu homogène. L'équation de la chaleur peut ainsi se réécrire sous la forme :

$$-\, k\, \Delta T = I_{abs}(\vec{r}, z) \tag{2.16}$$

Nous avons considéré qu'il n'y avait pas de transfert de chaleur possible aux bords de l'échantillon. Pour les études in vivo, les échantillons sont maintenus à 35°C pendant les expériences. La température au niveau des bords a donc été fixée à 35°C. Pour chaque longueur d'onde, nous avons ajusté l'intensité laser d'excitation en $z = 0$ en prenant en compte les efficacités de photoluminescence des nanotubes (cf. Figure.2.23) et les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière des tissus afin d'obtenir le même signal de photoluminescence venant du nanotube considéré. Tous les jeux de paramètres sont regroupés dans le tableau 2.2.

Paramètres	568 nm	845 nm	1064 nm
R_f (μm)	60	60	60
k_{verre} (W/(m.K))	1.3	1.3	1.3
$k_{cerveau}$ (W/(m.K))	0.539	0.539	0.539 [98]
$I_{z=0}$ (kW/cm^2)	0.23	0.8	3.64
$I_{z=50\,\mu m}$ (kW/cm^2)	0.2	0.75	3.47
$\mu_{a,tot}$ (cm^{-1})	9	0.17	0.7
$\mu_{s,tot}$ (cm^{-1})	21.5	11.7	8.7

Table 2.2 : *Jeux de paramètres pour la modélisation de l'augmentation de la température au sein de l'échantillon soumis à une irradiation laser*

La simulation a été réalisée grâce au logiciel Comsol Multiphysique. Les résultats de la

modélisation de l'augmentation de température au niveau de la tranche de cerveau sont présentés sur la Figure.2.27.

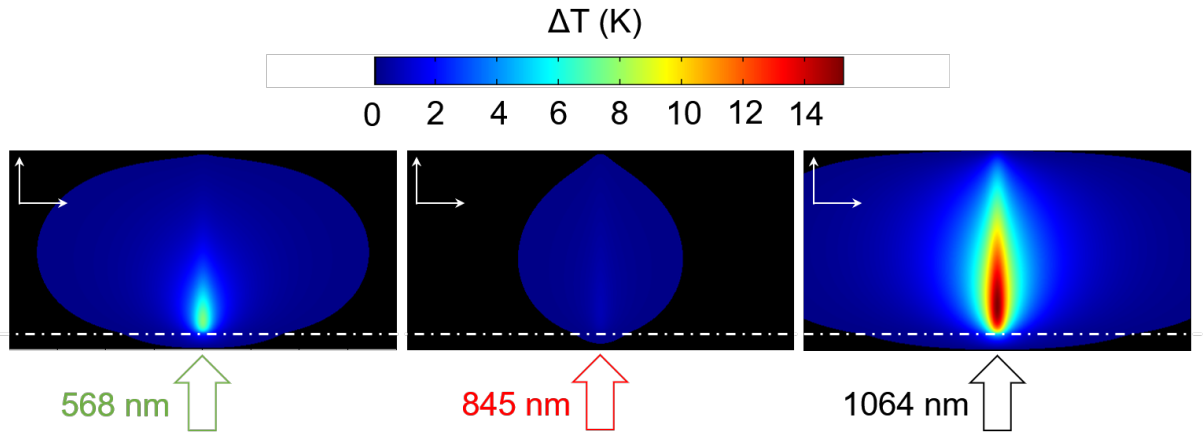

Figure 2.27 : *Modélisation de l'augmentation de la température au sein de tranches de cerveau de rat. La ligne en pointillés blanche correspond à l'interface entre la lamelle de microscope et la tranche de cerveau. Les flèches indiquent le sens de propagation des lasers. L'échelle est de 500 μm*

La simulation indique que les augmentations de températures sont maximales pour une profondeur de 250 μm. Elles valent 8°C (568 nm), 0.8°C (845 nm) et >15°C (1064 nm). Pour une excitation par up-conversion, l'augmentation de température dans le tissu est très élevée et pourrait altérer certaines protéines cellulaires. En effet, la température totale $(T_0 + \Delta T)$ au niveau de l'échantillon est supérieure à 50°C ce qui correspond au seuil de température provoquant une dénaturation protéique pouvant mener à la nécrose des cellules par coagulation. Bien sûr, cette augmentation de température est fortement liée à la faible efficacité de photoluminescence des nanotubes par up-conversion.

En faisant varier l'épaisseur de la tranche de cerveau dans la simulation, nous avons vu que plus l'épaisseur de la tranche augmente, plus l'augmentation de la température est importante. En effet, les coefficients d'absorption et de diffusion dépendent de la profondeur (unités en cm^{-1}). Quand l'épaisseur de la tranche augmente, la quantité d'énergie déposée dans le tissu augmente.

Nous avons également modélisé l'augmentation de la température sans la contribution du sang dans les coefficients d'absorption totaux du cerveau. Les résultats ont montré que l'absence du sang dans le cerveau diminuait l'augmentation de la température d'un facteur $\sim$ 4. Ce cas de figure pourrait correspondre au cas de tranches d'organotypiques.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la référence [99].

2.3 Bilan du Chapitre 2

Nous avons montré dans ce chapitre que la viabilité et la prolifération de cellules étaient moins affectées par l'utilisation des tensioactifs PLPEG, F108 et Tween20 nécessaires à la suspension des nanotubes dans les liquides. Les nanotubes encapsulés dans le Tween20 ne sont pas stables dans le milieu de culture ce qui augmente le nombre d'interactions non-spécifiques entre les nanotubes et les cellules. L'intensité de photoluminescence des nanotubes encapsulés dans du PLPEG et dispersés dans du milieu de culture est supérieure à celle des nanotubes encapsulés dans le F108. Les nanotubes encapsulés dans le PLPEG ont une meilleure capacité de diffusion dans les environnements biomimétiques.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi dans la suite de cette thèse d'utiliser des nanotubes encapsulés dans du PLPEG pour étudier les propriétés rhéologiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux vivants.

Nous avons également montré que l'efficacité de photoluminescence des nanotubes excités sur la transition S_{22} à 568 nm est la plus favorable comme attendu. Cependant, à cette longueur d'onde d'excitation, l'auto-fluorescence des tissus est importante ce qui ne permet pas d'obtenir un rapport signal sur bruit de fond nécessaire à la détection des nanotubes dans les tissus épais. L'excitation des nanotubes $(6,5)$ par up-conversion à 1064 nm permet d'obtenir une meilleure profondeur de pénétration et limite fortement l'auto-fluorescence des tissus. Le rapport signal sur bruit peut atteindre une valeur de 25 à 50 μm de profondeur pour un nanotube $(6,5)$ excité à une intensité de 23 kW/cm^2 ce qui permet de détecter les nanotubes avec un fort rapport signal sur bruit et ainsi connaître leurs positions avec précision. Cependant, l'efficacité de photoluminescence des nanotubes excités par up-conversion est très faible ce qui nécessite l'utilisation d'une intensité d'excitation très élevée. L'augmentation de la température au niveau de la tranche de cerveau étant proportionnelle à l'intensité laser appliquée, l'excitation par up-conversion induit une augmentation de la température $>$15°C qui pourrait altérer les protéines présentes dans les cellules.

Une excitation sur la transition KSB à 845 nm semble ainsi être la meilleure stratégie pour détecter les nanotubes $(6,5)$ individuels dans les échantillons épais. En effet, le rapport signal sur bruit est de 25 à 50 μm de profondeur pour un nanotube $(6,5)$ excité à 0.7 kW/cm^2, l'auto-fluorescence est faible et la profondeur de pénétration est relativement grande. De plus, l'efficacité de photoluminescence est convenable et n'induit pas d'augmentation de la température au niveau de l'échantillon ($<$1°C).

Pour les applications en neurosciences, nous allons donc utiliser des nanotubes encapsulés dans du PLPEG et excités sur la transition KSB afin de sonder la structure et mesurer les viscosités locales de l'espace extra-cellulaire.

Chapitre 3

Imagerie de super-résolution de l'espace extra-cellulaire du cerveau par suivi de nanotubes de carbone individuels

Le cerveau est composé d'un réseau impliquant plusieurs types de cellules, en particulier des neurones, principaux responsables de l'activité cérébrale et des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, macrophages et cellules NG2) qui jouent entre autres un rôle de soutien et de protection du tissu neuronal.

L'espace extra-cellulaire (ECS) correspond à l'espace qui existe entre toutes ces cellules. Son volume a été estimé à $\sim 20\%$ du volume total du cerveau [100]. L'espace extra-cellulaire contient du liquide cérébrospinal (CSF) mais aussi des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes [101] [102] ainsi que des fibres d'acide hyaluronique (glycosaminoglycane non-sulfaté) qui maintiennent les structures cellulaires en place [102]. Les travaux de G. Bruckner et al. menés en 1996 ont suggéré que la matrice extra-cellulaire n'était pas homogène et qu'elle possédait des particularités locales [103]. De nombreuses molécules clés comme les neurotransmetteurs et les nutriments circulent dans cet espace pour assurer une communication neuronale optimale.

Dès 1993, A. Lehmenkuler et al. ont montré que le volume de l'espace extra-cellulaire variait en fonction de l'âge et des régions du cerveau [3]. La compacité de l'ECS pourrait se modifier pendant le sommeil pour faciliter l'élimination des toxines produites par l'activité cérébrale [1]. L'ECS pourrait également jouer un rôle dans les maladies neuropsychiatriques et neuro-dégénératives [2].

Malgré de nombreuses études au cours de ces 30 dernières années, la compréhension du rôle et de la structure de l'ECS sont toujours énigmatiques et apparues récemment comme

primordiales pour la compréhension du fonctionnement du cerveau.

3.1 Imagerie de tissus biologiques à très haute résolution

3.1.1 Microscopie électronique

La microscopie électronique a été pendant longtemps l'unique méthode de choix pour visualiser les structures nanométriques des tissus. Dès les années 1950, D. C. Pease et al. ont développé une technique pour sectionner et visualiser des tranches de foie de rats par microscopie électronique. Ils ont montré cependant que des biais de mesure pouvaient venir de la fixation et du découpage des tranches [104]. De manière générale, les tranches étaient fixées avec du collodion et de la paraffine ou de l'osmium [11] [105]. Dans leurs travaux, D. C. Pease et al. ont conclu qu'il n'existait pas d'espace extra-cellulaire entre les cellules du cerveau. Cependant, ces travaux ont été contredits par la suite.

Récemment, les travaux de N. Korogod et al. menés en 2015 ont montré que les dimensions de l'espace extra-cellulaire observé étaient en effet différentes en fonction des protocoles de fixation [12]. La Figure.3.1.A, montre des images de microscopie électronique de tranches de cerveaux obtenues selon deux protocoles de fixation : cryo-fixation et fixation chimique. En cryo-microscopie électronique [106] [107], les échantillons sont fixés très rapidement à une température cryogénique qui permet de mieux préserver la structure des tissus observés.

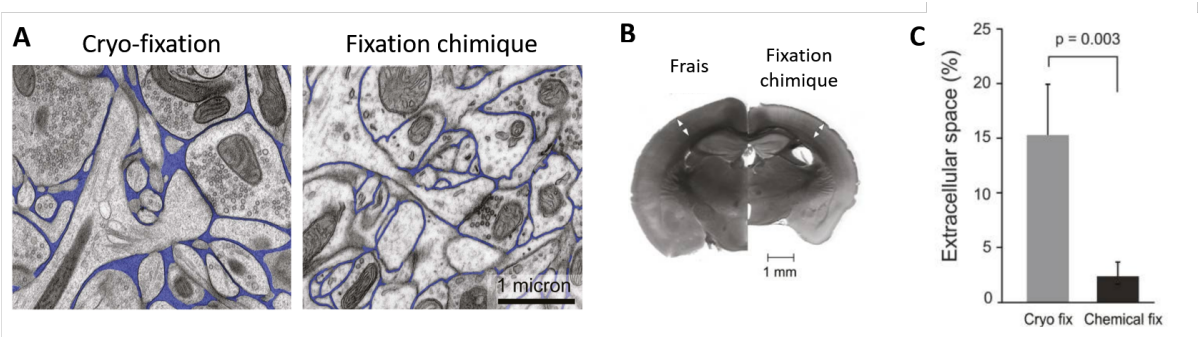

Figure 3.1 : *(A) Image de l'ECS de tranche de cerveau fixée par cryo-fixation et par fixation chimique. Les cellules sont en gris et l'ECS en bleu. La barre d'échelle est de 1 µm. (B) Image d'une tranche de cerveau frais et d'une tranche de cerveau fixée chimiquement, (C) Volumes de l'espace extra-cellulaire mesurés en fonction des deux protocoles de fixation.*

Plus précisément, sur la Figure.3.1.A, reproduite de la référence [12], les cellules sont grises et l'espace extra-cellulaire est en bleu. Nous pouvons voir que l'ECS est polymorphe et tortueux. Les dimensions caractéristiques observées sont plus grandes pour une cryo-fixation

que pour une fixation chimique. Le volume moyen de l'ECS sur des tranches fixées par cryo-fixation serait d'environ 15% alors qu'il serait seulement de ∼3% pour des tranches fixées chimiquement. Cet effet de rétraction est clairement visible sur la Figure.3.1.B où l'on peut voir que le volume total d'une tranche de cerveau fixé chimiquement est plus faible que celui d'un cerveau intact.

Ainsi, la microscopie électronique permet maintenant d'observer des structures a priori mieux préservées. En revanche, elle ne donne pas accès aux propriétés de ces structures dans des conditions physiologiques.

3.1.2 Méthodes dynamiques non-résolutives

S'agissant de conditions physiologiques, le volume et la tortuosité de l'ECS ont été mesurés successivement en étudiant la diffusion d'ensemble de différents types de molécules : radio-traceurs [13], ions [108] ou molécules fluorescentes [109]. Ces études réalisées principalement par le groupe de C. Nicholson depuis plus de 40 années ont permis de mesurer le coefficient de diffusion apparent de molécules injectées dans l'espace extra-cellulaire et donc de rendre compte de l'encombrement de cet espace vu par ces molécules dans des conditions physiologiques. L'étude de la diffusion du sucrose et de l'insuline introduits par perfusion et détecté par radioactivité a permis d'estimer le volume de l'espace extra-cellulaire du cortex cérébral de différentes espèces animales entre 17% et 20% [13]. En injectant des molécules fluorescentes dans les tissus et en étudiant l'évolution du profil d'intensité de fluorescence en fonction du temps (cf. Figure 3.2), C. Nicholson et al. ont mesuré la tortuosité T des tissus définie arbitrairement comme dépendant du rapport entre les coefficients de diffusion des molécules dans les tissus et dans des gels de faibles concentration (0.3%), $T = \sqrt{D_{0.3\%}/D_{ECS}}$.

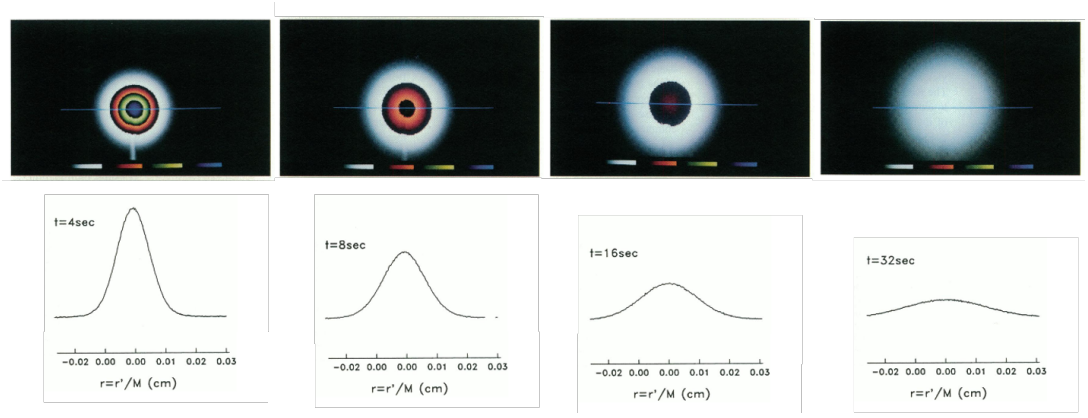

Figure 3.2 : *Techniques d'imagerie optique intégrative pour mesurer la tortuosité de l'espace extra-cellulaire à partir de la diffusion de molécules fluorescentes. Figure adaptée de la référence [109].*

Ce rapport contiendrait une information sur l'augmentation de chemin pris par les molécules dû à la présence d'obstacles, la présence de culs-de-sac, les effets visqueux, les interactions spécifiques et non-spécifiques.

La présence des obstacles, des cul-de-sac et la viscosité contribueraient apparemment de manière équivalente (1/3) dans la diminution du coefficient de diffusion des nano-objets dans l'espace extra-cellulaire de cerveaux [14] [15] [16] [17]. Les valeurs des contributions ont été obtenues à partir de modèles semi-quantitatifs pouvant expliquer les résultats observés expérimentalement [14]. Il est cependant impossible de révéler directement la géométrie de l'ECS dans ses conditions physiologiques avec ces approches "macroscopiques".

3.1.3 Les techniques de super-résolution optiques

Dans ce contexte, les techniques de super-résolution optiques pourraient permettre de mesurer la structure locale de l'espace extra-cellulaire dans des conditions physiologiques. Ces techniques permettent en effet d'observer des structures dont la taille est inférieure à la taille de la tache de diffraction d'un instrument d'ouverture numériqua $N.A.$ à la longueur d'onde λ ($\sim 1.22\ \lambda\ /\ (2\ N.A.)$) inhérente aux méthodes d'imagerie optiques conventionnelles.

Il ne s'agira pas ici de faire une revue exhaustive des techniques de super-résolution optiques mais nous allons simplement en énoncer les principes généraux. Des revues sur le sujet peuvent être facilement consultées [110] [111] [112]. Cette section a été inspirés de la référence [9].

La Figure.3.3.B montre l'image simulée d'un objet micrométrique fluorescent obtenue par microscopie conventionnelle (d'épi-fluorescence en champ large par exemple). Nous pouvons voir que cette technique ne permet pas de révéler les détails de l'objet réel (A) à cause de la limite de diffraction.

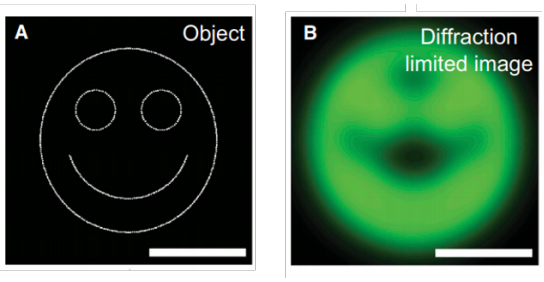

Figure 3.3 : *(A) Représentation didactique d'un objet micrométrique à observer, (B) et de l'image de l'objet limitée par diffraction obtenue par microscopie de fluorescence conventionnelle. La barre d'échelle est de 1 µm. Figure reproduite de la référence [9]*

Pour obtenir des informations structurelles à l'échelle nanométrique, plusieurs techniques d'imagerie de super-résolution ont été développées ces dernières années basées sur différentes approches.

Pour les techniques utilisant une déplétion sélective de la fluorescence (STED - *STimulated Emission Depletion* et RESOLFT - *REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions*) (cf. Figure.3.4.C), les échantillons sont scannés en utilisant un faisceau excitateur fortement focalisé et un faisceau de déplétion en forme d'anneau ce qui permet d'éliminer la fluorescence provenant des molécules environnantes et donc d'obtenir des résolutions de l'ordre de 60 nm à 80 nm dans des échantillons biologiques [113].

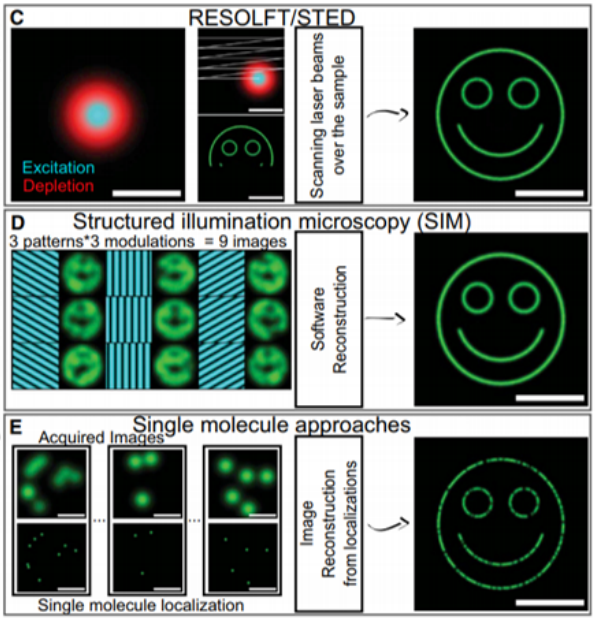

Figure 3.4 : *Techniques d'imagerie de super-résolution :(C) STED et RESOLFT,(D) SIM, (E) Approches utilisant le clignotement des molécules fluorescentes uniques. La barre d'échelle est de 1 μm. Figure reproduite de la référence [9]*

En structurant le faisceau excitateur, la technique SIM - *Structured Illumination Microscopy* (cf. Figure.3.4.D) permet de reconstruire une image super-résolue sans scanner l'échantillon à partir d'acquisitions multiples utilisant des structures différentes. Le temps d'acquisition pour imager une zone de 50 μm x 50 μm est d'environ 1 seconde. Cette technique permet d'obtenir des résolutions latérales améliorées d'un facteur 2 par rapport à la limite de diffraction, voire jusqu'à 20 nm avec des méthodes non-linéaires [114].

La troisième famille d'approches est basée sur la super-localisation de molécules uniques. En induisant un clignotement aléatoire des molécules fluorescentes sous excitation continue uniforme de l'échantillon (cf. Figure.3.4.E) il est possible d'isoler le signal de fluorescence provenant de chaque molécule et donc de localiser leur position avec une résolution latérale typique de l'ordre de 20 à 60 nm en fonction du rapport signal à bruit dans les échantillons [115].

A ce jour, il existe peu d'applications de ces méthodes à l'étude de l'espace extra-cellulaire.

Avant d'expliciter la méthode mise au point dans notre groupe, se basant sur l'imagerie de nanotubes individuels, nous pouvons citer le travail tout récent du groupe de V. Nagërl (IINS, Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences de Bordeaux) utilisant la microscopie STED. Des molécules fluorescentes ont été introduites à haute concentration dans l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux organotypiques [116] et la fluorescence des molécules présentes dans l'ECS a été mesurée à haute résolution par microscopie STED.

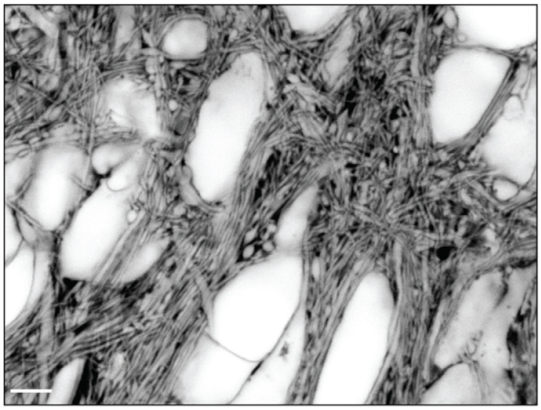

Figure 3.5 : *Image de l'ECS d'une tranche de cerveau organotypique par microscopie STED (imagerie utilisant la déplétion par émission stimulée). Les cellules sont en blanc et l'ECS en noir. La barre d'échelle est de 4 μm. Figure reproduite de la référence [116]*

La méthode a été nommée SUSHI (SUper-resolution SHadow Imaging) pour indiquer que les images présentées ont été obtenues par inversion de contraste. Nous pouvons voir sur la Figure.3.5 que le réseau cellulaire est très dense et polymorphe. Cette technique permet de visualiser de manière très détaillée la structure cellulaire de tranches de cerveaux maintenues en culture organotypiques dans les premiers microns à la surface de l'échantillon. Cependant, la résolution se dégrade rapidement au-delà des 5 premiers micromètres et cette approche ne permet pas actuellement de mesurer les propriétés rhéologiques locales de l'ECS.

Aucune des stratégies actuelles ne permet donc de mesurer les dimensions de l'espace extra-cellulaire sur des tissus intacts à des profondeurs pour lesquelles les tissus ne sont pas abimés par le découpage des tranches ($\gtrsim$ 10-20 μm).

3.2 Cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux intactes en profondeur

Nous allons expliciter ici notre stratégie de super-résolution basée sur le suivi de nanotubes de carbone diffusant dans l'espace extra-cellulaire. Grâce au bon rapport signal sur bruit dans le spectre infra-rouge (cf. Chapitre 2), nous avons vu qu'il était possible de détecter le signal

de photoluminescence de nanotubes individuels en profondeur dans les tissus épais. De plus, la grande photostabilité des nanotubes nous permet d'enregistrer de longues trajectoires. Une des clés de notre approche viendra de la géométrie uni-dimensionnelle des nanotubes qui leur permet de diffuser efficacement dans les espaces encombrés même si les dimensions latérales sondées sont inférieures à la longueur des nanotubes [18]. Ainsi, à partir de la super-localisation du centroïde des nanotubes au cours du temps lorsqu'ils diffusent dans les tissus, nous allons reconstruire des cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire pour fournir pour la première fois une image de ces structures dans des tranches épaisses de cerveaux intacts vivantes.

Le travail présenté ici a été réalisé en collaboration avec le groupe de Laurent Groc de l'Institut Interdisciplinaire de Neuroscience (CNRS UMR 5297, Bordeaux, France). Les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec Antoine G. Godin et Zhenghong Gao, post-doctorants au sein de notre groupe ainsi que Juan A. Varela, post-doctorant à l'IINS *.

3.2.1 Protocole expérimental

Des nanotubes de type HiPCo ont été encapsulés dans du phospholipide polyéthylène-glycol (PLPEG) comme décrit dans le protocole du Chapitre 2 (Section 2.1.2). La carte d'excitation de la photoluminescence (PLE) de nos échantillons de nanotubes-PLPEG montre la présence de plusieurs chiralités (cf. Figure.3.6) et les nanotubes $(6,5)$ imagés par la suite représentent 3-5% du nombre total de nanotubes photoluminescents.

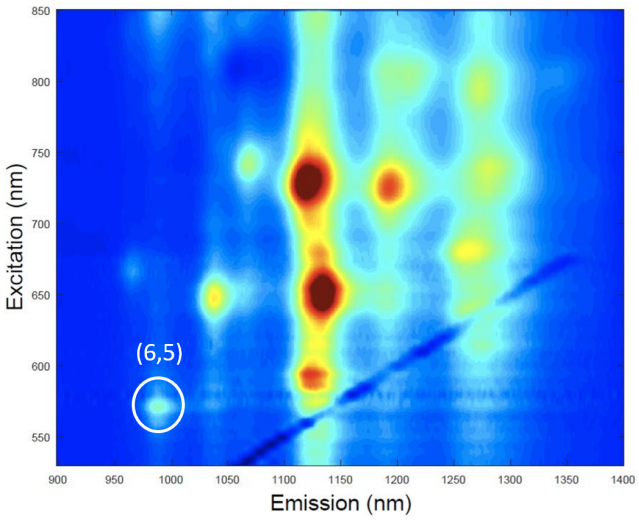

Figure 3.6 : *Spectre d'excitation de la photoluminescence de nos échantillons de nanotubes encapsulés dans du PLPEG. Le cercle blanc correspond à la population de nanotubes de chiralité* $(6,5)$ *imagés par la suite.*

∗. Tous les animaux utilisés ont été traités selon les règles "Animal Care and Use Commitee" de l'Université de Bordeaux/CNRS.

La concentration totale de nanotubes de carbone dans nos échantillons a été estimée à 3 μg/ml. Les injections ont été réalisées sur de jeunes rats Sprague-Dawley (Janvier), âgés de 1 à 4 jours et anesthésiés par hypothermie. Au total, 12 rats ont été utilisés. Environ 5 μl de solution de nanotubes ont été injectés dans chaque ventricule latéral pour minimiser l'inflammation des tissus [90]. La Figure.3.7 montre la localisation des sites d'injection. Les ventricules latéraux du cerveau de rat sont représentés en noir.

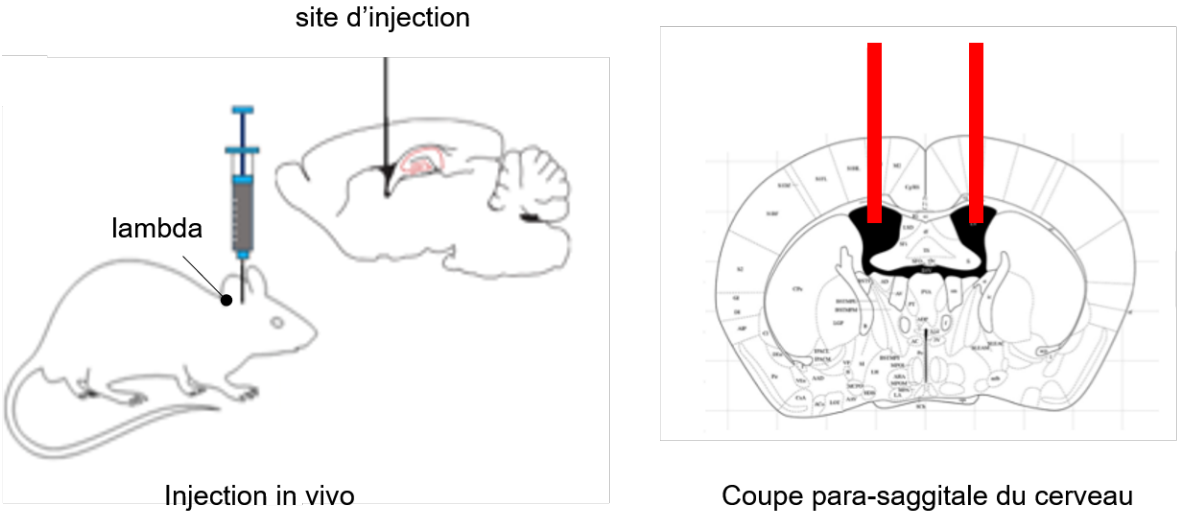

Figure 3.7 : *Injection in vivo des nanotubes de carbone dans les ventricules latéraux de cerveau de rats. Les ventricules sont représentés en noir sur les coupes longitudinale et para-saggitale.*

Pour trouver le point d'injection, une ligne a été tracée mentalement en reliant les yeux et le lambda que l'on voit facilement à travers la peau. Le point d'injection était localisé 2 mm en dessous du milieu de cette ligne. L'injection a été effectuée à une profondeur de 2.6 mm pour les rats P1, 2.9 mm pour les rats P2, 3.1 mm pour les rats P3 et 3.5 mm pour les rats P4 où Pi correspond à l'âge postnatal des rats en jours.

Entre 10 minutes et 3h après l'injection des nanotubes, les rats ont été euthanasiés par dislocation cervicale et des tranches de cerveau para-saggitales ont été préparées dans une solution de fluide cérébrospinal artificiel (ACSF) contenant 126 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 2 mM de $CaCl_2$, 1.3 mM de $MgCl_2$, 1.2 mM de NaH_2PO_4, 25 mM de $NaHCO_3$ et 12.1 mM de glucose (gazé avec 95% d'O_2, 5% de CO_2 à pH 7.35). Les tranches ont ensuite été déposées dans une chambre d'imagerie contenant une solution d'ACSF oxygénée et maintenue à 33°C. Elles ont été maintenues en vie en faisant circuler l'ACSF à l'aide d'une pompe péristaltique.

Les nanotubes ont été excités sur la transition KSB (cf. Chapitre 2). Grâce au grand rapport signal sur bruit observé, la photoluminescence des nanotubes individuels était visible jusqu'à $\sim$ 300 μm de profondeur. La Figure.3.8 montre les images de la photoluminescence des nanotubes enregistrées à différentes profondeurs dans la tranche de cerveau de rat.

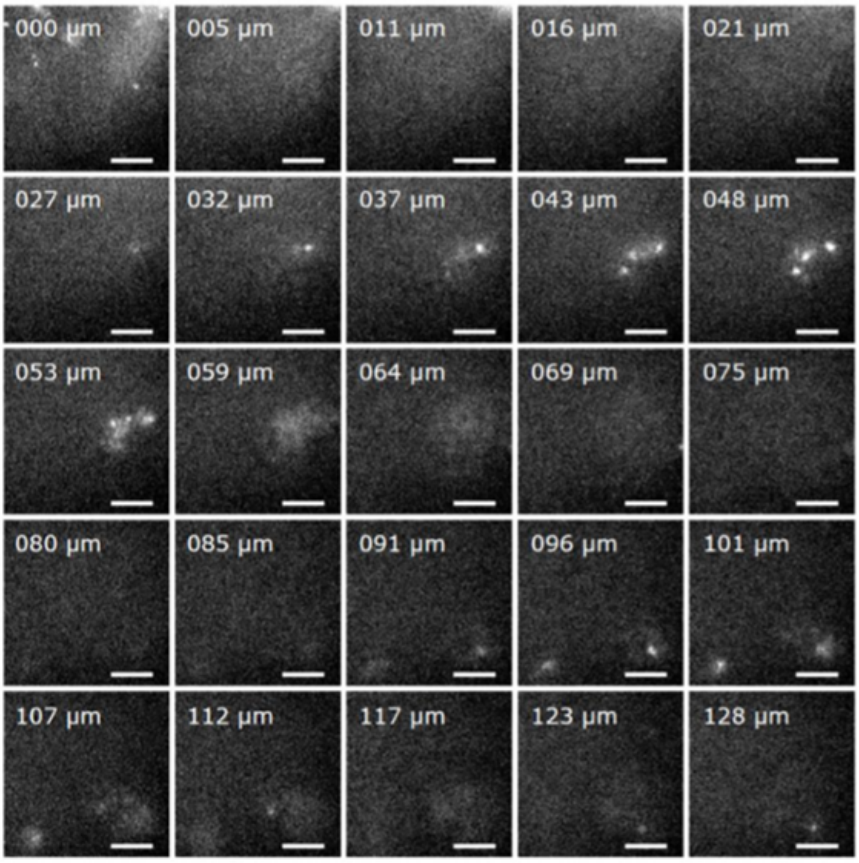

Figure 3.8 : *Image de photoluminescence montrant la distribution des nanotubes dans le tissu en fonction de la profondeur du plan d'observation. Le temps d'intégration est de 57 ms par image. La barre d'échelle est de 10 µm.*

Les nanotubes étaient visibles dans différentes régions du cerveau comme le néocortex, l'hippocampe et le striatum. Cette observation est importante car cela indique que les nanotubes ont diffusé efficacement à partir du site d'injection dans l'ECS.

3.2.2 Précision de localisation d'un nanotube individuel : super-localisation

Pour reconstruire les cartes super-résolues de l'ECS, nous avons enregistré les mouvements de diffusion des nanotubes de carbone au sein de l'espace extra-cellulaire. Nous avons modélisé la fonction d'étalement du signal (PSF - *Point Spread Function*) de luminescence issue des nanotubes par des profils gaussiens asymétriques 2D dans chaque image.

La Figure.3.9 montre l'image brute d'un nanotube individuel et l'ajustement gaussien associé. Le centroïde du profil gaussien nous donne la position du nanotube à l'instant t. Nous avons également défini l'orientation du nanotube θ comme étant l'angle formé entre

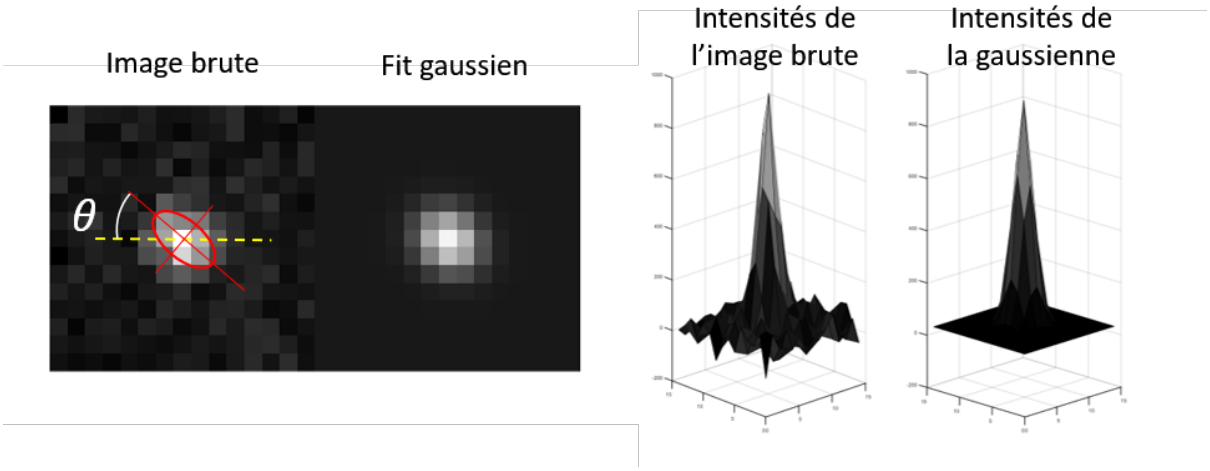

Figure 3.9 : *Extraction de la position et de l'intensité de photoluminescence des nanotubes. L'image brute de la PSF du nanotube est ajustée par un profil gaussien. Le centroïde du profil gaussien nous donne la position et l'intégrale de la gaussienne nous donne l'intensité de photoluminescence. La taille des pixels est de 270 nm.*

l'axe horizontal et le plus grand axe de la gaussienne 2D.

Pour calculer la précision avec laquelle nous super-localisons le centroïde des nanotubes, nous avons enregistré une séquence d'images contenant des nanotubes qui ne bougeaient pas. Nous avons modélisé la PSF de ces nanotubes par des profils gaussiens sur toutes les images du film et nous avons mesuré les variations spatiales des centroïdes. Nous avons ensuite tracé l'histogramme de ces variations et avons considéré que la largeur à mi-hauteur était égale à notre précision de localisation.

Dans nos échantillons, la valeur moyenne de notre précision de localisation était de 40 nm à 40-50 μm de profondeur. Comme présenté dans le paragraphe suivant, l'ajustement gaussien de la PSF des nanotubes nous permettra également de mesurer la longueur de chaque nanotube ce qui nous sera utile par la suite pour calculer les propriétés rhéologiques locales des milieux.

3.2.3 Mesures *in situ* de la longueur des nanotubes

La longueur des nanotubes a été estimée à partir de la largeur à mi-hauteur des ajustements gaussiens 2D selon le plus grand axe (cf. Figure.3.9). Dans la pratique pour chaque nanotube diffusant dans l'ECS, nous avons sélectionné uniquement les images pour lesquelles le rapport signal sur bruit était supérieur à 70% du rapport maximal pour ne prendre en compte que les images où le nanotube se trouvait dans le plan focal objet. Nous avons ensuite tracé l'histogramme de ces largeurs et avons pris la valeur la plus probable ($FWMH_{max}$). La Figure.3.10 montre un exemple d'histogramme des largeurs à mi-hauteur d'un nanotube et

l'ajustement utilisé pour obtenir la valeur ayant le maximum d'occurrences.

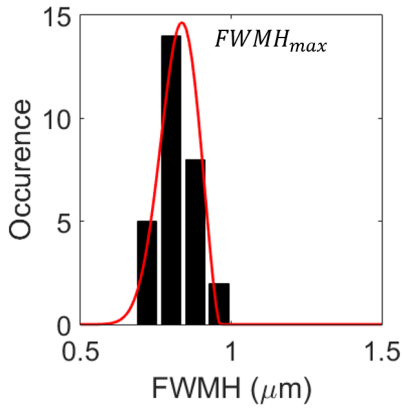

Figure 3.10 : *Histogramme des largeurs à mi-hauteur pour un nanotube de 890 nm obtenues à partir de l'ajustement du signal de photoluminescence du nanotubes par des profils gaussiens. L'ajustement en rouge par une fonction "Extreme Generalized Value" nous donne la valeur ayant le maximum d'occurence.*

Nous avons ensuite enlevé à cette valeur le diamètre de la tâche d'Airy ($d_{Airy} \sim 450$ nm) pour déconvoluer le signal de la PSF et la longueur réelle des nanotubes. Nous avons également ajouté la longueur de diffusion des excitons ($L_e \sim 90$ nm) car les bouts des nanotubes sont des sites de défauts non-luminescents qui ne sont pas visibles par microscopie de fluorescence (cf. Chapitre 5). Nous avons donc défini la longueur des nanotubes comme suit :

$$L = \sqrt{FWMH^2 - d_{Airy}^2} + 2L_e \tag{3.1}$$

La distribution des longueurs des nanotubes analysés dans l'ECS est représentée sur la Figure.3.11.A (N= 23). Les longueurs varient entre 490 nm et 780 nm.

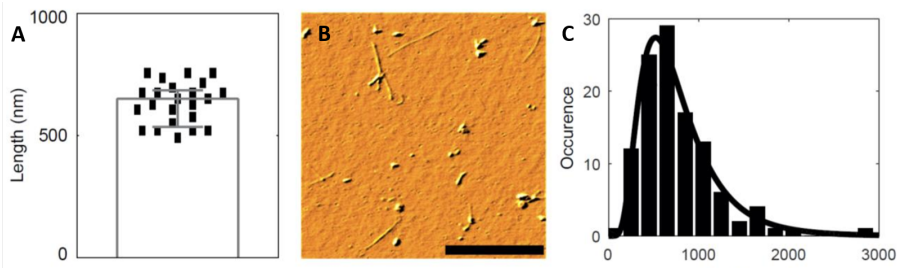

Figure 3.11 : *(A) Distribution des longueurs des nanotubes diffusants dans les tranches de cerveau de rats, (B) Exemple d'image enregistrée par imagerie AFM pour mesurer les longueurs des nanotubes présents dans nos solutions, (C) Histogramme des longueurs des nanotubes mesurées par AFM. La barre d'échelle est de 1 μm.*

A titre de comparaison, la longueur moyenne des nanotubes contenus dans nos suspensions a également été mesurée par microscopie à force atomique (N = 112). Pour cela, les nanotubes

ont été dispersés sur une lamelle préalablement nettoyée dans un plasma cleaner. Pour enlever l'excès de PLPEG, les échantillons ont été rincés avec de l'eau Milli-Q. Les images ont été enregistrées en utilisant une pointe Si_3N_4 de 8 nm de diamètre (cf. Figure.3.11.B). Pour chaque nanotube isolé, la longueur a été mesurée avec le plugin NeuronJ d'ImageJ. L'histogramme des longueurs est représenté sur la Figure.3.11.C et la longueur médiane mesurée était de $\sim$ 500 nm ce qui est cohérent avec la distribution présentée sur la Figure.3.11.A.

Dans la suite de ce travail, le diamètre des nanotubes retenu a été de 5 nm. Cette valeur prend en compte le diamètre des nanotubes de chiralité $(6, 5)$ ($\sim$ 1 nm) et la couche de PLPEG encapsulant le nanotube ($\sim$ 2 nm) [117].

3.2.4 Mesure des dimensions caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats

En regroupant l'ensemble des localisations de chaque nanotube, nous avons pu reconstruire des cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire (cf. Figure.3.12).

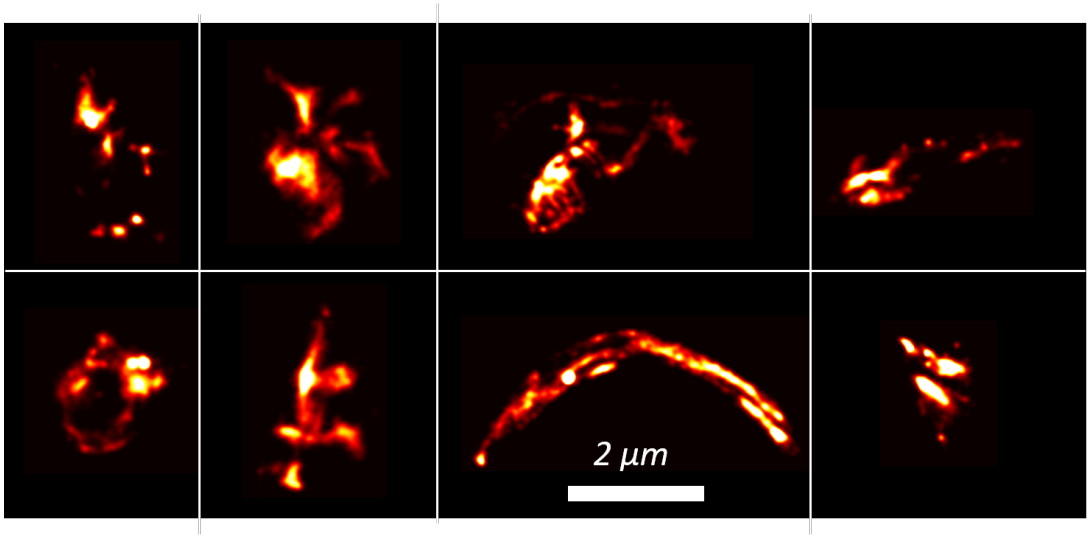

Figure 3.12 : *Cartes super-résolues de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats sains. La barre d'échelle est de 2 µm.*

Les trajectoires utilisées dans la Figure.3.12 comportent de 10 000 à 20 000 localisations. Chaque point de la trajectoire a été représenté par un profil gaussien de largeur à mi-hauteur égale à notre précision de localisation moyenne. L'échelle de couleur correspond à la densité du nombre de points. Plus le nombre de localisations est grand, plus le dégradé de couleurs devient clair. La Figure.3.12 suggère d'ores et déjà visuellement que les morphologies des régions de l'espace extra-cellulaire explorées par les nanotubes sont très variables.

Plus quantitativement, à partir de ces trajectoires, nous avons mesuré les dimensions carac-

téristiques de l'ECS, notées ξ. Pour cela, nous montrons sur la Figure.3.13.A-B comment nous avons modélisé la distribution de toutes les localisations (N = 20 000) d'un nanotube par une combinaison de profils gaussiens asymétriques. Nous avons ensuite tracé sur la Figure.3.13.C l'histogramme des largeurs à mi-hauteur de ces profils pour le nanotube considéré.

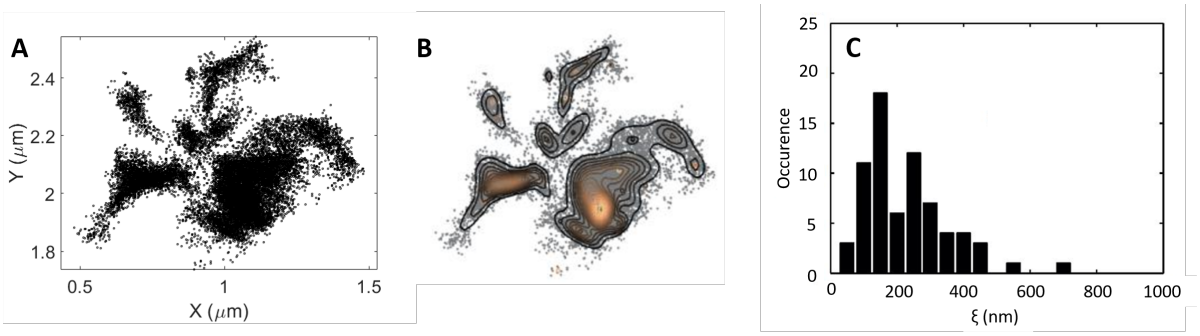

Figure 3.13 : *(A) Exemple des localisations obtenues (N = 20 000) pour un nanotube diffusant dans une tranche de cerveau, (B) Modélisation de la distribution des localisations par une combinaison de profils gaussiens asymétriques,(C) Histogramme des dimensions de l'espace extra-cellulaire obtenues à partir des ajustements gaussiens prenant en compte tous les points de la trajectoire considérée.*

En répétant la même analyse sur différents nanotubes, nous avons tracé le même histogramme pour l'ensemble des nanotubes considérés (N=14) (cf. Figure.3.14.A).

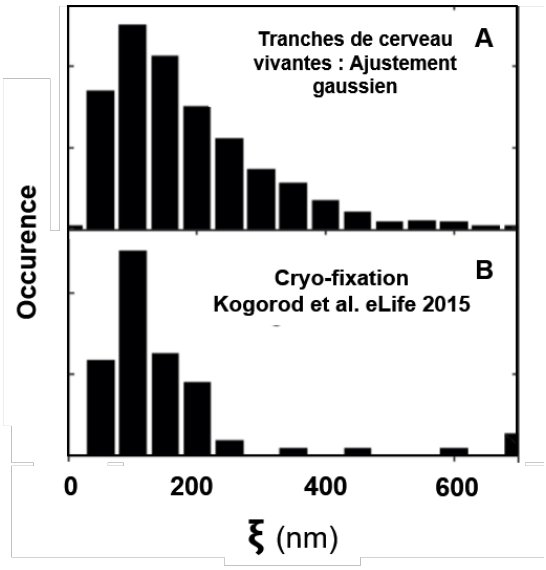

Figure 3.14 : *(A) Histogramme des dimensions de l'ECS de tranches de cerveaux vivantes obtenu à partir de 14 trajectoires de nanotubes, (B) Histogramme des dimensions caractéristiques de l'ECS obtenues par cyo-microscopie électronique sur des tranches de cerveaux cryo-fixées [12].*

Nous avons obtenu que les dimensions de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats vivantes, ξ, étaient hétérogènes puisqu'elles variaient entre $\sim$ 50 nm et 700 nm.

Nous avons ensuite comparé nos valeurs expérimentales aux valeurs obtenues dans la littérature par cryo-microscopie électronique [12] (cf. Figure.3.14.B). De manière remarquable, les distributions sont quasiment identiques, validant l'hypothèse suggérée par la cryo-microscopie selon laquelle, dans un cerveau intact et vivant, les dimensions de l'ECS révélées par microscopie électronique sont plus larges que ce que l'on imaginait auparavant.

3.2.5 Dimensions de l'espace extra-cellulaire mesurées par analyse dynamique

Nous avons également mesuré les dimensions de l'espace extra-cellulaire par une analyse dynamique utilisant la distribution des déplacements des nanotubes au carré (DSD - *Distribution of Squared Displacement*). Cette approche a été développée principalement par Antoine Godin. Nous en retraçons ici les principes généraux. Le DSD correspond à la probabilité de trouver le nanotube considéré dans un cercle de rayon r au temps τ_{lag} par rapport à sa position initiale.

Grâce à la mesure de l'orientation du nanotube dans le repère du laboratoire, nous avons décorrélés les mouvements parallèles et perpendiculaires à l'axe longitudinal du nanotube et calculé les DSD selon ces deux directions. Pour un mouvement unidimensionnel, le DSD s'écrit [89] :

$$DSD(r, \tau_{lag}) = erf\left(\sqrt{r^2/\langle \Delta R^2 \rangle(\tau_{lag})}\right) \tag{3.2}$$

où le terme $\langle \Delta R^2 \rangle(\tau_{lag})$ correspond au déplacement quadratique moyen à l'instant τ_{lag} [†].

La Figure.3.15.A et B montre un exemple de distributions pour des échelles de temps inférieures à 300 ms. Nous avons découplé les mouvements parallèles et perpendiculaires

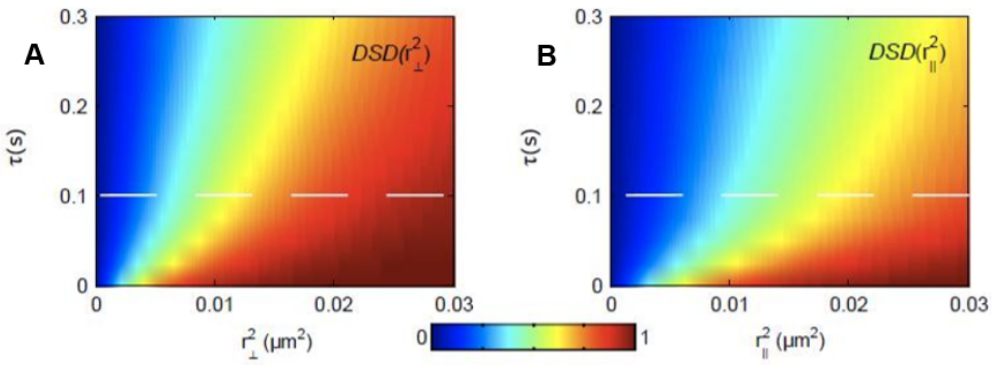

Figure 3.15 : *(A-B) Exemple de cartes de probabilités (DSD) de trouver un nanotube dans un cercle de rayon $r_{\perp,\parallel}$ aux instants τ.*

†. Les modèles de diffusion seront exposés dans la Section 3.2.6 et dans le Chapitre 4.

à l'axe du nanotube de manière à obtenir les $DSD_{\parallel et \perp}$. Pour chaque τ, nous avons ajusté le $DSD_{\perp et \parallel}$ par l'équation 3.3 pour obtenir le déplacement quadratique moyen (MSD = $\langle \Delta R^2_{\perp,\parallel}(\tau) \rangle$).

$$DSD_{i,\perp,\parallel}(r_{\perp,\parallel}, \tau_{lag}) = \sum_{i=1}^{2} A_i \, erf\left(\sqrt{r^2_{\perp,\parallel} / \langle \Delta R^2_{i,\perp,\parallel} \rangle (\tau_{lag})}\right) \tag{3.3}$$

où $i = 1, 2$ correspond au nombre de paramètres ou populations prises pour ajuster la formule sur les données expérimentales.

Des exemples sont donnés sur la Figure.3.16. Les valeurs expérimentales sont tracées en lignes épaisses et les ajustements sont tracée avec des lignes fines. Les déplacements quadratiques moyens mesurés dans cet exemple sont encadrés sur la Figure.3.17.

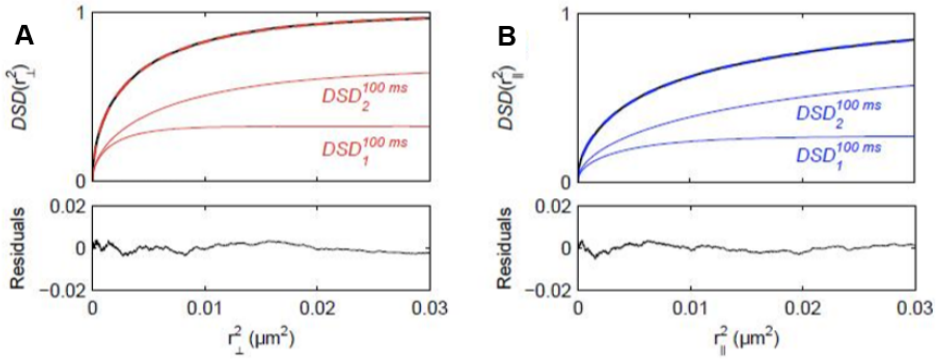

Figure 3.16 : *(A-B) Ajustement des DSD expérimentaux par l'équation 3.3 en utilisant 2 populations. Les données expérimentales sont représentées en rouge et bleu foncée à τ = 100 ms.*

Nous pouvons voir sur la Figure.3.17 que le déplacement quadratique moyen parallèle est linéaire en fonction des intervalles de temps considérés ce qui indique que les mouvements longitudinaux du nanotube ne sont pas confinés par la géométrie du réseau. Au contraire, le

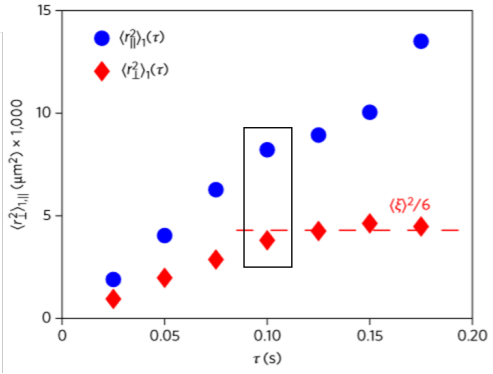

Figure 3.17 : *(A-B) Déplacements quadratiques moyens parallèle $\langle r_1^2 \rangle_\parallel$ et perpendiculaire $\langle r_1^2 \rangle_\perp$ en fonction de l'intervalle de temps considéré τ.*

déplacement quadratique moyen perpendiculaire montre une saturation révélant un confinement des mouvements transverses du nanotube considéré.

Les plus petites dimensions caractéristiques de l'espace extra-cellulaire responsables de ce confinement $\langle \xi_\perp \rangle$ ont finalement été extraites à partir de la valeur de $\langle R_{1,\perp} \rangle^2 = \langle \xi_\perp \rangle^2/6$ puisque l'exploration transverse des nanotubes doit refléter l'étroitesse des lieux visités par les nanotubes. L'histogramme des dimensions caractéristiques de l'ECS obtenues par cette analyse est montré sur la Figure.3.18.A et comparée à l'analyse des localisations présentée dans la section 3.2.4 (cf. Figure.3.18.B).

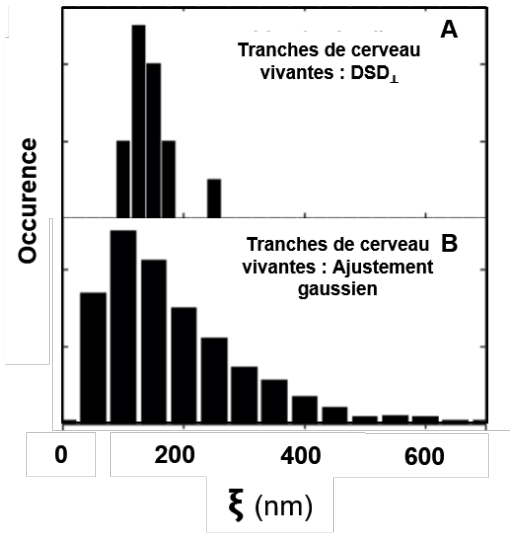

Figure 3.18 : *Histogramme des dimensions caractéristiques de l'ECS obtenues par l'analyse dynamique (A) et l'analyse statique (B).*

Nous pouvons voir que la distribution obtenue avec l'approche des DSD est plus étroite que celle obtenues avec l'étude statique sur l'ensemble des localisations et qu'elle est plus centrée sur les petites valeurs (cf. Figure.3.18). Ceci était attendu car intrinsèquement, cette approche donne une mesure des plus petites dimensions. Nous obtenons ainsi un bon accord entre les deux méthodes d'analyse totalement indépendantes.

L'étude de la diffusion des nanotubes en profondeur dans l'ECS nous a donc permis de mesurer les dimensions caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats vivantes.

3.2.6 Mesure de la viscosité linéaire locale de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats : Etude simplifiée

Cette étude simplifiée a été initiée par Antoine Godin. L'extension de cette analyse fera l'objet du chapitre 4. La diffusion des nanotubes de carbone permet également d'obtenir

des informations sur les propriétés rhéologiques locales de l'espace extra-cellulaire. A partir des trajectoires, nous avons calculé le déplacement quadratique moyen (MSD) en 2D en fonction de l'intervalle de temps considéré (τ) afin de remonter à la viscosité du milieu. Nous avons simplement considéré ici que le déplacement quadratique moyen était proportionnel au coefficient de diffusion instantané des nanotubes D_{Lin} qui dépend de la géométrie du nanotube (L et d), de la température T et de la viscosité "linéaire" du milieu η_{Lin} :

$$\left\langle \Delta R^2 \right\rangle_\tau = MSD(\tau) = 4D_{Lin}\tau \quad \text{avec} \quad D_{Lin} = \frac{3}{8}\frac{k_B T\, ln\,(2\phi)}{\pi \eta_{Lin} L} \tag{3.4}$$

où $\phi = \dfrac{L}{d}$ et k_B correspondent au rapport d'aspect des nanotubes et à la constante de Boltzmann. L'origine de cette formule sera explicitée dans le Chapitre 4 et nous verrons comment aller au-delà de cette hypothèse simplificatrice.

A partir du calcul des déplacements quadratiques moyens pour chaque intervalle de temps $i\Delta t = \tau$ où i varie entre 1 et le nombre maximum d'images N, nous avons tracé le MSD_{xy} dans le référentiel du laboratoire en fonction de l'intervalle de temps (cf. Figure.3.19 en noir) ainsi que les $\text{MSD}_{\parallel,\perp}$ le long de l'axe et perpendiculaire à l'axe du nanotube.

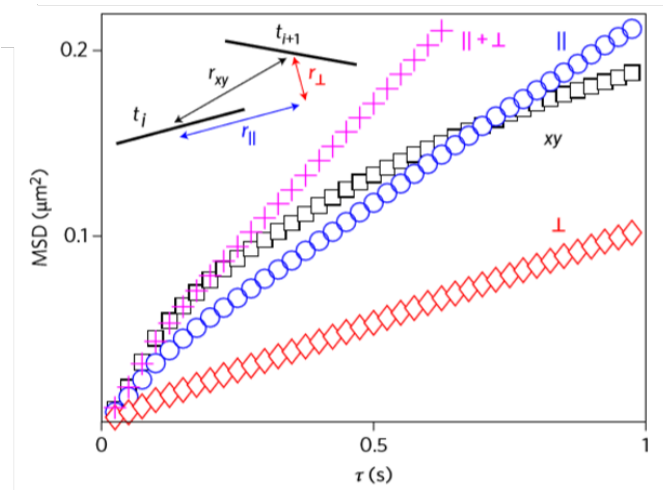

Figure 3.19 : *Déplacements quadratiques moyens (MSD) en fonction de l'intervalle de temps τ. La longueur du nanotube était de 650 nm.*

Pour des échelles de temps inférieures à 200 ms, le MSD_{xy} dans le repère du laboratoire était égal à la somme des $\text{MSD}_{\parallel,\perp}$ parallèles et perpendiculaires (cf. Figure.3.19 en magenta). Cependant, pour des échelles de temps longues, le MSD_{xy} dans le repère du laboratoire n'était pas égal à la somme des $\text{MSD}_{\parallel,\perp}$ parallèles et perpendiculaires dans le repère du nanotube (cf. Figure.3.19 en bleu et rouge). Cela suggère fortement que les mouvements du nanotube pour des temps longs ($\tau >$ 200 ms) étaient confinés par la géométrie du réseau.

$$MSD_{xy} < MSD_{\parallel} + MSD_{\perp} \quad \text{pour} \quad \tau > 200\,ms$$
$$MSD_{xy} = MSD_{\parallel} + MSD_{\perp} \quad \text{pour} \quad \tau < 200\,ms \tag{3.5}$$

Ce résultat a suggéré que pour des échelles de temps courtes, le nanotube explorait "quasi-librement" des sous-domaines de l'espace extra-cellulaire [89] ce qui permet d'extraire la viscosité locale "linéaire" dans ce régime.

Pour obtenir la viscosité locale, la trajectoire du nanotube considéré a donc été découpée en petits intervalles de temps. A chaque instant i de la trajectoire, une fenêtre temporelle glissante $[i - 7\Delta t; i + 7\Delta t]$ a été définie et le MSD instantané a été calculé. La Figure.3.20 montre un exemple d'analyse de la trajectoire d'un nanotube à plusieurs instants i.

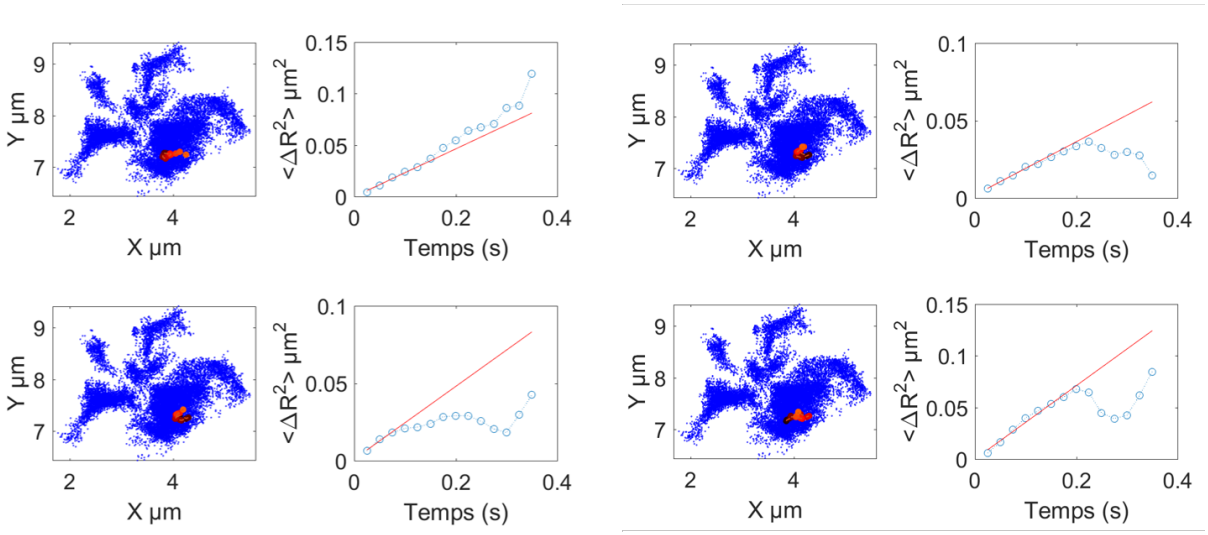

Figure 3.20 : *Exemples d'analyse du déplacement quadratique moyen instantané à quatre instants de la trajectoire. Les points de la trajectoire pris pour mesurer le MSD sont en dégradé de orange. La régression linéaire sur les 3 premiers points permettant de mesurer le coefficient de diffusion est tracée en rouge.*

La colonne de gauche montre la trajectoire en bleu et les points utilisés pour tracer le déplacement quadratique moyen instantané en fonction du temps. La droite rouge sur la Figure.3.20 correspond à la régression linéaire sur les 3 premiers points du MSD. A partir de l'équation 3.4, nous avons calculé le coefficient de diffusion instantané D_{Lin} assigné à une certaine localisation dans la trajectoire.

A partir de l'équation 3.4 et en connaissant la longueur et le diamètre du nanotube, nous avons ensuite calculé la viscosité linéaire locale du milieu à chaque instant et à chaque lieu.

$$\eta_{Lin} = \frac{3}{8} \frac{k_B T\, ln\,(2\phi)}{\pi D_{Lin} L} \tag{3.6}$$

Tout au long de la trajectoire, nous avons ainsi obtenu une valeur de la viscosité linéaire locale et avons généré des cartes de viscosités locales (cf. Figure.3.21).

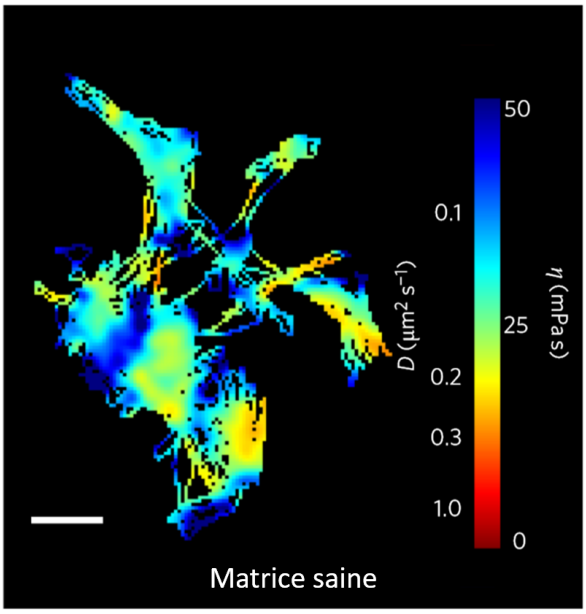

Figure 3.21 : *Exemple de cartes de viscosités et de diffusions locales pour des tranches de cerveaux de rat vivantes intactes. La barre d'échelle est de 500 nm.*

Chaque point a été représenté par un profil gaussien de largeur à mi-hauteur égale à notre précision de localisation. Lorsque la distance entre deux points de la trajectoire du nanotube était inférieure à notre précision de localisation (50 nm) ou si le nanotube revenait à la même position, nous avons moyenné les valeurs des viscosités locales. Le coefficient de diffusion étant proportionnel à la viscosité linéaire, cette figure représente également le coefficient de diffusion linéaire. La viscosité linéaire locale était très hétérogène et variait entre 1 mPa.s (en rouge) et 50 mPa.s (en bleu) ce qui est jusqu'à deux ordres de grandeur plus grand que la viscosité du fluide cérébrospinal ($\sim$ 0.7 - 1 mPa.s [118] [119]). La pertinence de cette valeur sera discutée dans le chapitre suivant.

3.2.7 Modification chimique de l'espace extra-cellulaire

Nous avons également mesuré la viscosité linéaire locale de cerveaux de rats dont la matrice extra-cellulaire a été altérée chimiquement de manière à savoir si les nanotubes étaient sensibles aux modifications de l'ECS. Pour cela, nous avons injecté une enzyme, l'hyaluronidase de testicules bovins (20 mg/ml dans du PBS), dans le ventricule des cerveaux la nuit précédant les injections des nanotubes. Cette enzyme couramment utilisée en neurobiologie [120] a pour propriété de digérer la matrice extra-cellulaire. La Figure.3.22 montre un exemple de carte super-résolue des viscosités linéaires locales obtenues pour une matrice extra-cellulaire altérée.

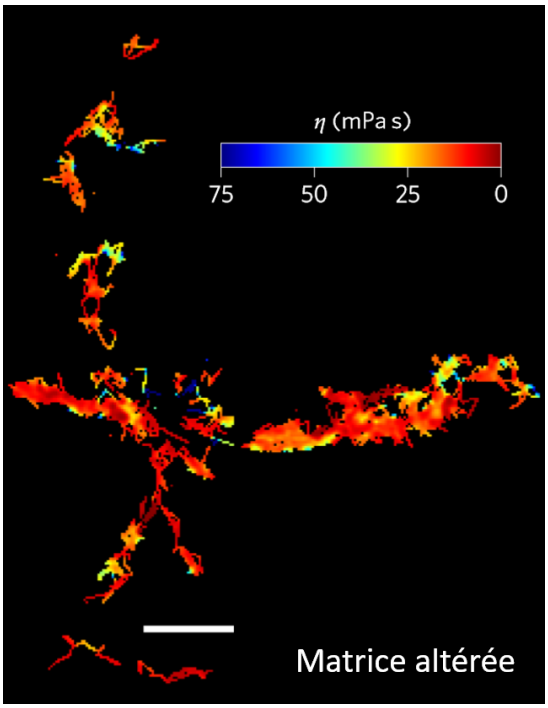

Figure 3.22 : *Exemple de cartes de viscosités et de diffusions locales pour des matrices extra-cellulaire altérée. La barre d'échelle est de 2 µm.*

Nous avons obtenu que l'espace exploré par les nanotubes est beaucoup plus grand dans les cerveaux dont la matrice a été altérée. Conjointement, la viscosité linéaire locale variait entre 1 mPa.s et 25 mPa.s. Une comparaison des coefficients de diffusion linéaires pour des matrices saines et pour des matrices altérées a montré l'apparition d'une deuxième population (cf. Figure.3.23) pour la matrice altérée dont les coefficients de diffusion sont plus élevés.

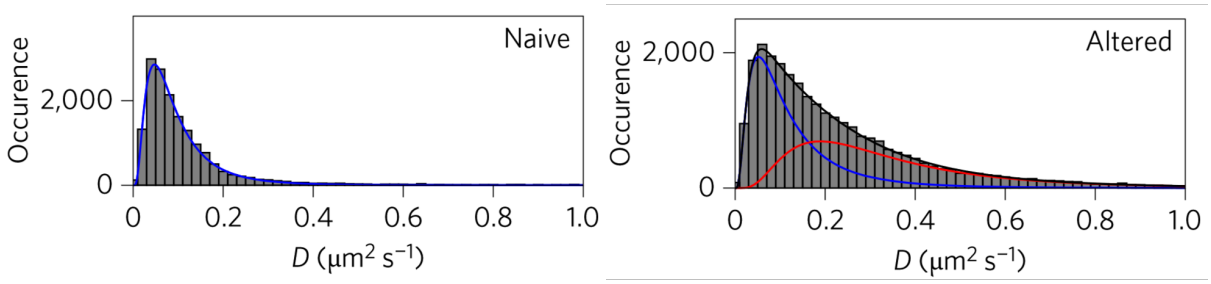

Figure 3.23 : *Coefficients de diffusion des nanotubes dans les matrices saines et altérée montrant l'apparition d'une deuxième population dans les matrice altérées.*

Ce résultat montre que les nanotubes explorent bien l'ECS des cerveaux. De plus, ce résultat suggère que l'enzyme a altéré la matrice de manière locale et non-uniforme. Les propriétés de diffusion des nanotubes de carbone permettraient donc de mesurer les modifications rhéologiques de l'espace extra-cellulaire induites artificiellement par réactions enzymatiques et ouvre des perspectives importantes pour l'étude de l'ECS dans des conditions physiologiques

ou pathologiques. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans la référence [89].

3.3 Bilan du Chapitre 3

Nous avons vu dans ce chapitre que les mouvements de diffusion des nanotubes permettent de sonder efficacement les espaces encombrés comme l'espace extra-cellulaire de cerveaux intacts vivants. A partir du point d'injection, les nanotubes se sont dispersés efficacement par diffusion dans l'ECS dans différentes régions du cerveau.

Grâce à l'ensemble des localisations de chaque nanotube dans l'ECS, nous avons reconstruit des cartes super-résolues de la morphologie de l'espace extra-cellulaire de cerveaux vivants et mesuré ses dimensions caractéristiques. Les tailles et morphologies de l'ECS sont très hétérogènes en fonction des régions sondées par les nanotubes et les valeurs obtenues coïncident avec les valeurs mesurées par cryo-microscopie électronique réalisée sur des tranches de cerveaux fixées [12].

Par ailleurs, l'analyse des déplacements quadratiques moyens instantanés des nanotubes nous a permis de mesurer les viscosités linéaires locales de l'espace extra-cellulaire en considérant que les déplacements quadratiques moyens étaient proportionnels à l'intervalle de temps. Cette possibilité offerte par les nanotubes ouvre la voie à l'étude rhéologique de l'ECS avec des résolutions spatiales jamais attendues.

Cependant, le modèle d'analyse de la viscosité présenté dans ce chapitre est trop simplificateur. En effet, la viscosité linéaire inclue certainement les effets d'encombrement liés à la tortuosité du réseau cellulaire qui pourrait avoir tendance à faire diminuer le coefficient de diffusion et donc augmenter les valeurs de viscosités apparentes obtenues.

Pour affiner cette analyse, nous allons présenter dans le chapitre suivant, différents modèles qui pourraient permettre de décorréler les effets de confinement et la viscosité *in situ* de l'espace extra-cellulaire et rendre compte plus finement de la structure et de la rhéologie de l'ECS dans des cerveaux intacts.

Notations du Chapitre 4

α, paramètre de complexité du réseau

α_v, taux de relaxation de la particule

C, concentration des gels en poudre d'agarose

$C*$, concentration critique des gels

C_r, rigidité dans le plan d'un feuillet de graphène

d, diamètre d'un objet unidimensionnel

D, coefficient de diffusion macroscopique d'une molécule plongée dans un espace complexe

$D_{\parallel,\perp}$, coefficients de diffusion parallèle et perpendiculaire à l'axe longitudinal d'un objet unidimensionnel

$D_{xy} = (D_{\parallel} + D_{\perp})/2$, coefficient de diffusion d'un objet unidimensionnel dans le plan 2D d'observation

D_θ, coefficient de diffusion rotationnel d'un objet unidimensionnel

D_θ^{Odijk}, coefficient de diffusion rotationnel dans le modèle d'Odijk

D_θ^{Doi}, coefficient de diffusion rotationnel dans le modèle de Doi

D_{Lin}, coefficient de diffusion instantané d'une particule plongée dans un espace complexe (approximation linéaire du MSD sur des échelles de temps courtes)

D_α, coefficient de diffusion débarrassé des effets de tortuosité

D_∞, coefficient de diffusion d'une particule plongée dans un fluide newtonien homogène

e, épaisseur de la membrane de gel

E, module d'Young

$\langle E \rangle$, énergie cinétique de la particule

η, viscosité d'un fluide newtonien homogène

η_{Lin}, viscosité linéaire incluant les effets de tortuosité S, les effets hydrodynamiques F et les effets visqueux.

η_{Lin}^{theo} = viscosité linéaire théorique

η_α, viscosité complexe débarrassée des effets de tortuosité

η_α^{theo} = viscosité complexe débarrassée des effets de tortuosité théorique

η_W, viscosité de l'eau

η_∞, viscosité intrinsèque du fluide contenu dans les canaux présents dans les réseaux
$\eta_{\infty,0}$, viscosité intrinsèque du fluide en absence de gel $C = 0$
F, effets hydrodynamiques
F_{ext}, force extérieure de dérive ou d'entraînement
F_{stoch}, force stochastique caractéristique du mouvement brownien
γ, puissance permettant de relier les dimensions locales et la concentration des gels
$\gamma_{\parallel,\perp}$, coefficient de friction parallèle et perpendiculaire pour un objet unidimensionnel plongé dans un fluide newtonien homogène
Γ, paramètre prenant en compte les effets hydrodynamiques et visqueux
Γ_f, terme de fluctuation des vitesses de la particule
I, moment d'inertie
k_B, constante de Boltzmann
k, perméabilité hydraulique
k_0, perméabilité hydraulique en absence de différence de pression ΔP
$\sqrt{k}$, longueur hydrodynamique d'écrantage
$\sqrt{k_{0,theo}}$, longueur hydrodynamique d'écrantage estimée pour nos gels à partir des dimensions locales théoriques
κ, rigidité de courbure des nanotubes
l, dimension caractéristique de l'écoulement
L, longueur d'un objet unidimensionnel
L_p, longueur de persistance des nanotubes de carbone
λ_d, longueur de déflexion
m, masse de la particule diffusante
MSD, déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement*)
$MSD_{\parallel,\perp}$, déplacements quadratique moyen parallèle et perpendiculaire à l'axe longitudinal d'un objet unidimensionnel
MSD_θ, déplacement quadratique angulaire moyen
$\nu_{\parallel,\perp}$, $\delta_\perp$ facteurs correctifs dans les coefficients de diffusions parallèle, perpendiculaire et rotationnel prenant en compte la géométrie des extrémités des objets unidimensionnels
ΔP, différence de pression
$\phi = L/d$, rapport d'aspect d'un objet unidimensionnel
ϕ_v, fraction volumique d'agarose dans les gels
Q, débit dans l'équation de Darcy
$\vec{r}$, position de la particule
$\vec{r_0}$, position initiale de la particule
R, rayon d'une particule sphérique
Re, nombre de Reynolds

R_h, rayon hydrodynamique de la particule diffusante
r_f, rayon d'une fibre d'agarose
$\delta r_{\parallel,\perp}$, déplacements parallèle et perpendiculaire à l'axe longitudinal d'un objet unidimensionnel
ρ, masse volumique du fluide
S, effets de la tortuosité
S_{NT}, effets de la tortuosité du réseau vus par les nanotubes de carbone
$S_{nano-sphère}$, effets de la tortuosité du réseau vus par les nano-sphères
$std(\alpha)$, déviation standard du paramètre de complexité α
$std(\eta_\alpha)$, déviation standard de la viscosité débarrassée des effets de tortuosité η_α
t, temps
T, température du fluide
Δt, temps d'intégration des images
$\delta(t)$, pic de Dirac
τ, intervalle de temps
τ_d, temps de désengagement des nanotubes
$\vec{v}$, vitesse de la particule diffusante
$\vec{v_0}$, vitesse initiale de la particule diffusante
$\vec{v_f}$, vitesse de l'écoulement fluide
V, volume d'un ellipsoide
$(\vec{x}, \vec{y})$, repère du laboratoire
$x_\parallel$, position sur l'axe longitudinal d'un objet unidimensionnel
ξ, dimensions caractéristiques locales des canaux présents dans les réseaux
$\langle \xi_{theo} \rangle$, dimensions caractéristiques locales théoriques moyennes des canaux présents dans les gels

Chapitre 4

Analyse de la diffusion des nanotubes de carbone dans les espaces complexes : extraction des paramètres rhéologiques locaux

Nous proposons dans ce chapitre d'affiner l'analyse de la diffusion des nanotubes en utilisant leurs propriétés de diffusion singulière pour définir un paramètre de complexité et la viscosité locale *in situ* de l'espace extra-cellulaire vus par les nanotubes. En comparant nos données expérimentales à des modèles macroscopiques et microscopiques nous en déduirons alors la viscosité qui serait vue, non pas par des nanotubes, mais par des molécules de tailles sub-micrométriques arbitraires naturellement présentes au sein du cerveau.

La structure du chapitre est la suivante : Dans la partie 1, nous exposerons brièvement les notions de base du mouvement brownien d'objets sphériques et uni-dimensionnels plongés dans un fluide homogène. Dans la partie 2, nous ferons un état de l'art des modèles de diffusion de nano-objets dans les espaces confinés les plus couramment utilisés. Dans la partie 3, nous exposerons les étapes de la méthodologie proposée pour définir un paramètre de complexité et la viscosité *in situ* locale des espaces encombrés vue par les nanotubes. Dans la partie 4, nous validerons cette méthodologie pour des nano-objets diffusant dans des gels d'agarose en s'appuyant sur certains modèles présentés dans la partie 2. Dans la partie 5, nous appliquerons cette méthodologie à la diffusion des nanotubes dans l'espace extra-cellulaire du cerveau.

4.1 Mouvements browniens d'objets individuels - Introduction

Comme toute molécule ou particule plongée dans un fluide, les nanotubes sont soumis au mouvement brownien en milieu aqueux. Le mouvement brownien a été observé pour la première fois en 1828 par Robert Brown. En tant que botaniste, il a étudié le mouvement de particules contenues dans les grains de pollen et dispersées dans l'eau [121]. L'origine du mouvement des particules était inconnue. En 1905, Einstein a décrit la théorie moléculaire cinétique de la chaleur [122]. Il a découvert que l'agitation thermique était à l'origine du mouvement des particules de tailles micrométriques. Avant de s'intéresser au mouvement brownien des nanotubes, nous allons tout d'abord considérer le cas d'un objet sphérique plongé dans un fluide.

4.1.1 Mouvement brownien d'objets sphériques dans un fluide newtonien

Prenons le cas d'une particule sphérique de rayon R, de masse m et qui se déplace à une vitesse $\vec{v}$. Le principe fondamental de la dynamique nous donne :

$$m\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -m\alpha_v \vec{v} + \vec{F}_{ext} + \vec{F}_{stoch} \tag{4.1}$$

Le premier terme à droite correspond aux forces de frottement entre la surface de la sphère et le fluide qui s'opposent aux déplacements de la particule. La résultante des forces dépend de la taille de la sphère (R) et de la viscosité (η) du fluide dans lequel la sphère diffuse. Elle est donnée par la loi de Stokes :

$$-m\alpha_v \vec{v} = -6\pi\eta R\vec{v} \tag{4.2}$$

où α_v est le taux de relaxation de la particule. Cette loi est solution de l'équation de Navier-Stokes pour une particule sphérique plongée dans un fluide newtonien homogène dans l'approximation d'un écoulement laminaire. Nous avons supposé ici que les particules du fluide n'interagissaient pas entre elles.

Le deuxième terme à droite dans l'équation 4.1 est une force extérieure éventuelle qui oriente les déplacements de la particule dans sa direction. La force extérieure pourrait être due à une vitesse de dérive ou de gravitation. Elle sera prise nulle pour un système sans convection. Cette hypothèse est réaliste dans le cas d'un système isolé. Les effets de la gravitation sur la particule peuvent être négligés par rapport aux forces visqueuses. Pour une particule en silice

de rayon 40 nm plongée dans de l'eau, la résultante des forces visqueuses est en effet 10^9 fois plus importante que le poids de la particule et que la poussée d'Archimède.

Le troisième terme à droite dans l'équation 4.1 correspond à la force stochastique décrivant les collisions entre les particules du fluide et l'objet sphérique. Elle est à l'origine du caractère aléatoire du mouvement brownien. Elle est caractérisée par sa valeur moyenne et sa fonction d'autocorrélation :

$$< \vec{F}_{stoch} >= 0 \quad \text{et} \quad < \vec{F}_{stoch}(t)\vec{F}_{stoch}(t+\tau) >= 2\Gamma_f m^2\,\delta(\tau) \tag{4.3}$$

Où $\delta(\tau)$ est le pic de Dirac et Γ_f correspond à un terme de fluctuation des vitesses.

La moyenne d'ensemble de la force stochastique est nulle. Cette propriété traduit qu'en l'absence de force extérieure ($\vec{F}_{ext} = 0$), la vitesse moyenne de la particule à l'état stationnaire ($\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$) est nulle.

La fonction d'autocorrélation de la force stochastique prend en compte la probabilité de localisation de la particule aux instants t et $t+\tau$. Cette fonction est nulle quand $\tau \neq 0$ et maximale pour $\tau = 0$.

En résolvant l'équation 4.1 (conditions initiales : $t = 0$, $\vec{v} = \vec{v}_0$), la vitesse de la particule est donnée par :

$$\vec{v}(t) = \vec{v}_0 e^{-\alpha_v t} + \frac{1}{m}\int_0^t \vec{F}_{stoch}(t')e^{-\alpha_v(t'-t)}dt' \tag{4.4}$$

En intégrant cette équation (conditions initiales : $t = 0$, $\vec{r} = \vec{r}_0$), la position de la particule à l'instant t est :

$$\vec{r}(t) = \vec{r}_0 + \vec{v}_0\frac{1-e^{-\alpha_v t}}{\alpha_v} + \frac{1}{m}\int_0^t \vec{F}_{stoch}(t')\frac{1-e^{-\alpha_v(t'-t)}}{\alpha_v}dt' \tag{4.5}$$

Le déplacement quadratique moyen (MSD - *Mean Square Displacement*) qui décrit la surface moyenne explorée par une particule diffusante pendant un intervalle de temps τ est défini par la relation suivante :

$$MSD(\tau) = \Delta r^2(\tau) = \left\langle \left(r(t+\tau) - r(t)\right)^2 \right\rangle_\tau \tag{4.6}$$

En introduisant l'équation 4.5 dans l'équation 4.6, le MSD peut s'écrire :

$$MSD(\tau) = 2\,\frac{\Gamma_f}{\alpha_v^2}\cdot\tau \quad \text{avec} \quad \tau \gg \alpha_v^{-1} \tag{4.7}$$

Pour une particule en silice de diamètre 40 nm qui se déplace dans l'eau, l'ordre de grandeur de α_v^{-1} est de 10 ps ce qui est très petit devant les échelles de temps considérées au cours de cette thèse. Nous nous placerons donc toujours dans ce régime par la suite.

Le terme de fluctuation des vitesses (Γ_f) dépend des paramètres du fluide et de la particule. Par conservation de l'énergie, nous pouvons écrire :

$$\langle E \rangle = \frac{1}{2} m \left\langle \vec{v}^2 \right\rangle = \frac{3}{2} k_B T \tag{4.8}$$

En introduisant l'équation 4.4 dans l'équation 4.8, le terme de fluctuation des vitesses peut se réécrire :

$$\Gamma_f = \frac{3\, k_B T\, \alpha_v}{m} \tag{4.9}$$

Ce terme est relié au coefficient de diffusion (D_∞) qui correspond à la moyenne du carré des déplacements effectués en une seconde *via* le théorème de "fluctuations-dissipation" :

$$D_\infty = \frac{\Gamma_f}{\alpha_v^2} \tag{4.10}$$

A partir des équations 4.2, 4.9 et 4.10, le coefficient de diffusion d'un objet sphérique de rayon R plongé dans un fluide homogène de viscosité η s'écrit :

$$D_\infty = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \tag{4.11}$$

Le déplacement quadratique moyen (MSD) en 3D peut donc se ré-écrire simplement comme :

$$MSD(\tau) = \Delta r^2(\tau) \approx 6 D_\infty \cdot \tau \quad \text{avec} \quad \tau \gg \alpha_v^{-1} \tag{4.12}$$

4.1.2 Mouvement brownien d'objets uni-dimensionnels

Dans cette partie, nous ne serons pas exhaustifs sur tous les modèles développés pour décrire la diffusion d'objets uni-dimensionnels. Nous nous concentrerons sur des modèles que nous avons estimé pertinents pour les nanotubes.

En 2006, R. Duggal et M. Pasquali ont montré que l'expression de la diffusion rotationnelle des nanotubes diffusants dans un liquide homogène était en accord avec l'expression de la diffusion rotationnelle de tiges rigides [123]. Dans leurs travaux, les auteurs avaient pris en compte le modèle de Broersma (1981).

En 1984, M. M. Tirado et al. ont comparé la diffusion rotationelle et translationnelle prédites par le modèle de Broersma [124], le modèle de Happel et Brenner [125] et le modèle de Tirado et Garcia (1980) pour des fragments d'ADN de petites longueurs considérés comme rigides [126]. En comparant le diamètre des fragments d'ADN reporté dans la littérature et leurs mesures du diamètre via la diffusion rotationnelle et translationnelle, M. M. Tirado et al. ont conclu que le modèle de Tirado et Garcia produisait un diamètre plus proche de la

littérature que celui obtenu avec le modèle de Broersma et celui de Happel et Brenner. Notons que dans ces travaux, la flexibilité de l'ADN n'a pas été prise en compte.

Bien avant le développement de ces modèles, F. Perrin et al. avaient décrit le mouvement brownien d'ellipsoïdes rigides (1934) [127]. Dans cette section, nous allons exposer et comparer les différents modèles cités ci-dessus.

Modèle de Perrin (ellipsoïde) :

Le modèle de Perrin décrit les propriétés de diffusion des ellipsoïdes. La Figure.4.1 montre un ellipsoïde d'orientation θ définie dans le repère du laboratoire $(\vec{x},\vec{y})$. L'objet étant aniso-

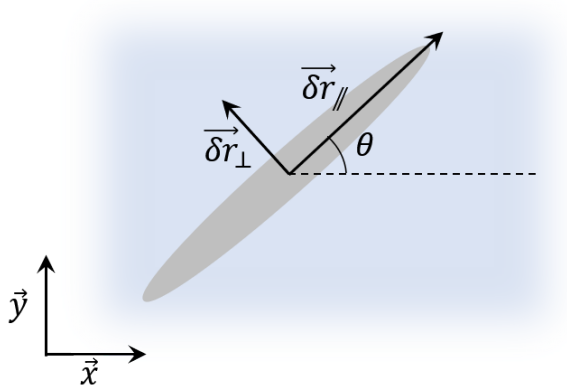

Figure 4.1 : *Ellipsoïde contenu dans le plan $(\vec{x},\vec{y})$ montrant les déplacements élémentaires parallèles $\delta\vec{r}_{\parallel}$ et perpendiculaires $\delta\vec{r}_{\perp}$ à l'axe longitudinal de l'ellipsoïde.*

trope, son mouvement brownien est également anisotrope. Nous distinguons ainsi les mouvements parallèles $\delta\vec{r}_{\parallel}$ et perpendiculaires $\delta\vec{r}_{\perp}$ à l'axe longitudinal de l'ellipsoïde.

Les coefficients de diffusion translationnels s'écrivent :

$$D_{\parallel,\perp} = \frac{k_B T}{\gamma_{\parallel,\perp}} \tag{4.13}$$

Pour un ellipsoïde de diamètre d et de longueur L, les coefficients de frottement, $\gamma_{\parallel,\perp}$ sont définis par [128] :

$$\gamma_{\parallel,\perp} = 3\pi\eta L G_{\parallel,\perp} \tag{4.14}$$

Avec :

$$G_{\parallel} = \frac{8}{3}\left[\frac{2\phi}{1-\phi^2}\ \frac{2\phi^2-1}{(1-\phi^2)^{3/2}}\ ln\left(\frac{\phi+\sqrt{\phi^2-1}}{\phi-\sqrt{\phi^2-1}}\right)\right]^{-1}$$

$$G_{\perp} = \frac{8}{3}\left[\frac{\phi}{\phi^2-1}\ \frac{2\phi^2-3}{(1-\phi^2)^{3/2}}\ ln\left(\phi+\sqrt{\phi^2-1}\right)\right]^{-1} \tag{4.15}$$

Où $\phi = L/d$ est le rapport d'aspect. Le diamètre des nanotubes que nous avons utilisé

dans les chapitres suivants était d'environ 1 nm à quelques nanomètres, et leurs longueurs variaient typiquement entre 500 nm et quelques micromètres. Leurs rapports d'aspect étaient donc très grand devant 1 ce qui nous permet de simplifier les équations 4.15 et d'écrire les coefficients de diffusion selon les axes longitudinal et perpendiculaire comme suit :

$$D_{\parallel} = \frac{k_B T \, ln\,(2\phi)}{2\pi\eta L} \quad \text{et} \quad D_{\perp} = \frac{k_B T \, ln\,(2\phi)}{4\pi\eta L} \quad \text{pour} \quad \phi \gg 1 \tag{4.16}$$

Le coefficient de diffusion $D_{\perp}$ est deux fois plus faible que le coefficient de diffusion $D_{\parallel}$. La longueur de l'ellipsoïde étant plus grande que le diamètre, la résultante des forces de frottement entre les particules de fluide et l'axe longitudinal est plus grande que celle qui s'applique sur la section perpendiculaire. Les mouvements perpendiculaires à l'axe sont donc moins grands que ceux parallèles à l'axe.

Les déplacements quadratiques moyens selon l'axe parallèle au nanotube $MSD_{\parallel}$ et perpendiculaire $MSD_{\perp}$ sont proportionnels aux coefficients de diffusion parallèle $D_{\parallel}$ et perpendiculaire $D_{\perp}$:

$$MSD_{\parallel}(\tau) = 2D_{\parallel} \cdot \tau \quad \text{et} \quad MSD_{\perp}(\tau) = 2D_{\perp} \cdot \tau \tag{4.17}$$

Notons que même si les nanotubes diffusent dans les trois dimensions de l'espace, dans cette thèse, nous mesurerons exclusivement la projection dans le plan image de la diffusion des nanotubes dans la limite de la profondeur de champ du microscope ($\sim$ 1 μm à 845 nm). Nous nous restreindrons donc à l'analyse de la diffusion dans un plan.

Les déplacements quadratiques moyens dans le plan ($\vec{x}$,$\vec{y}$) s'écrivent :

$$MSD_{xy} = 4D_{xy} \cdot \tau \tag{4.18}$$

Avec

$$D_{xy} = \frac{D_{\parallel} + D_{\perp}}{2}$$

Pour des grands rapports d'aspect, le coefficient de diffusion dans le plan peut donc s'écrire :

$$D_{xy} = \frac{3}{8} \frac{k_B T \, ln\,(2\phi)}{\pi\eta L} \tag{4.19}$$

Cette formule est celle utilisée dans le chapitre 3 (Section 3.2.6).

Nous pouvons également étudier les orientations du nanotube en fonction du temps. Selon le modèle de Perrin, le coefficient de diffusion rotationnelle d'un ellipsoïde plongé dans un fluide homogène s'écrit [127] :

$$D_\theta = \frac{k_B T}{\gamma_\theta} \quad \text{avec} \quad \gamma_\theta = 6\eta V G_\theta$$

où $V = \frac{4}{6}\pi L \frac{d^2}{4}$ est le volume de l'ellipsoïde et :

$$G_\theta = \frac{2}{3}\frac{\phi^4 - 1}{\phi}\left[\frac{2\phi^2 - 1}{\sqrt{\phi^2 - 1}}\, ln\left(\phi + \sqrt{\phi^2 - 1}\right) - \phi\right]^{-1} \tag{4.20}$$

Pour $\phi \gg 1$, l'équation 4.20 peut s'écrire :

$$D_\theta = 3\,\frac{k_B T\, ln\,(2\phi)}{\pi \eta L^3} \tag{4.21}$$

Dans le plan d'observation, la rotation θ correspond à un degré de liberté. Le déplacement quadratique moyen angulaire s'écrit donc :

$$MSD_\theta(\tau) = 2D_\theta \cdot \tau \tag{4.22}$$

Notons que la validité du modèle de Perrin a été étudiée expérimentalement sur des ellipsoïdes micrométriques diffusant dans l'eau en 2D par le groupe de Yodh [129].

Modèle de Broersma (cylindre) :

Le modèle de Broersma a été utilisé dans les travaux de Duggal et al. pour modéliser la diffusion des nanotubes de carbone plongés dans un fluide homogène [123]. Ce modèle décrit les propriétés de diffusion de cylindres plongés dans un fluide. La résultante des forces visqueuses est définie à partir de l'équation de Oseen qui constitue une variante de la loi de Stokes. L'équation d'Oseen prend en compte un terme supplémentaire dans l'expression de la force visqueuse qui dépend du nombre de Reynolds Re.

$$-m\alpha_v \vec{v} = 6\pi\eta R\vec{v}\left(1 + \frac{3}{8}Re\right) \quad \text{avec} \quad Re = \frac{\rho l\,|\vec{v_f}|}{\eta} \tag{4.23}$$

où ρ est la masse volumique du fluide et l correspond à la dimension caractéristique de l'écoulement fluide.

La force visqueuse dans l'équation d'Oseen est donc $1+\frac{3}{8}Re$ fois plus grande que dans l'équation de Stokes. Cependant, pour un ellipsoïde de rapport d'aspect égal à 500 diffusant dans de l'eau, le nombre de Reynolds est de l'ordre de 10^{-6} ce qui est très petit devant 1. Dans notre cas, nous pouvons donc considérer que les deux équations sont semblables.

Selon Broersma, pour un cylindre de longueur L et de diamètre d, les coefficients de

diffusion s'écrivent [124] [126] :

$$D_{\parallel} = \frac{k_B T \left(ln\left(\phi\right) + \nu_{\parallel}\right)}{2\pi\eta L} \quad , \quad D_{\perp} = \frac{k_B T \left(ln\left(\phi\right) + \nu_{\perp}\right)}{4\pi\eta L}$$

$$\text{et} \quad D_{\theta} = 3\,\frac{k_B T \left(ln\left(\phi\right) + \delta_{\perp}\right)}{\pi\eta L^3} \tag{4.24}$$

Où $\nu_{\parallel}$, $\nu_{\perp}$ et $\delta_{\perp}$ sont des facteurs correctifs prenant en compte la géométrie des extrémités des cylindres. Ils sont décomposés en puissances de $1/ln(2\phi)$ [124] :

$$\begin{aligned}
\nu_{\parallel} &= -0.114 - \frac{0.15}{ln(2\phi)} - \frac{13.5}{(ln(2\phi))^2} + \frac{37}{(ln(2\phi))^3} - \frac{22}{(ln(2\phi))^4} \\
\nu_{\perp} &= 0.866 - \frac{0.15}{ln(2\phi)} - \frac{8.l}{(ln(2\phi))^2} + \frac{18}{(ln(2\phi))^3} - \frac{9}{(ln(2\phi))^4} \\
\delta_{\perp} &= -0.446 - \frac{0.2}{ln(2\phi)} - \frac{16}{(ln(2\phi))^2} + \frac{63}{(ln(2\phi))^3} - \frac{62}{(ln(2\phi))^4}
\end{aligned} \tag{4.25}$$

Ces facteurs seraient valables pour $\phi > 4.6$.

Modèle de Tirado et Garcia de la Torre (cylindre) :

Le modèle de M. M. Tirado et J. Garcia de la Torre [130] [131] s'applique également aux cylindres. La force visqueuse est décrite par la loi de Stokes. En comparant le modèle de Broersma et celui de Tirado et al. dans le cas de petits fragments d'ADN, le modèle de Tirado a semblé être le plus approprié [126].

Dans ce modèle, M. M. Tirado et al. ont construit un cylindre à partir de l'assemblage d'anneaux qui sont eux-même constitués de petites sphères [132] (cf. Figure.4.2).

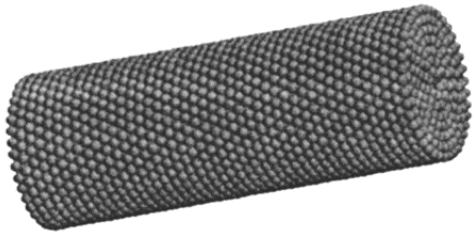

Figure 4.2 : *Modélisation d'un cylindre à partir de l'assemblage d'anneaux constitués de petites perles selon le mode B dans le modèle de Tirado et Garcia. Figure extraite de la référence [132].*

La limite continue a été obtenue en faisant tendre le volume des sphères vers 0. Les expressions des coefficients de diffusion sont les mêmes que dans le cas du modèle de Broersma mais les facteurs correctifs sont décomposés en puissances de $1/\phi$:

$$\nu_{\parallel} = -0.207 + 0.980/\phi - 0.133/\phi^2$$

$$\nu_\perp = 0.839 + 0.185/\phi - 0.233/\phi^2$$
$$\delta_\perp = -0.662 + 0.917/\phi - 0.055/\phi^2 \quad (4.26)$$

Ces formes fonctionnelles reproduisent bien les valeurs expérimentales dans le cas de la diffusion de l'ADN dans un fluide homogène pour $\phi < 30$. Pour $\phi > 30$, la valeur des coefficients de diffusion sont affectées par la flexibilité de l'ADN qui n'est pas prise en compte dans ce modèle [126].

Modèle de Happel et Brenner (ellipsoïde) :

Dans les travaux de M. M. Tirado, les auteurs ont également comparé leur modèle avec le modèle de Happel et Brenner [125]. Ce modèle est valable pour des cylindres et des ellipsoïdes. Dans ce modèle, une force de friction élémentaire est associée à chaque point du cylindre (ou de l'ellipsoïde). Cette force est à l'origine d'une composante de vitesse qui s'annule avec la vitesse de la particule à l'équilibre. Ils ont distingué le cas des cylindres où le diamètre est indépendant de la position sur l'axe longitudinal ($x_\parallel$) et le cas des ellipsoïdes où le diamètre varie en fonction de la position sur l'axe longitudinal. La force de friction totale peut être décomposée en puissance de $(x_\parallel/L)$. Les expressions des coefficients de diffusion sont les mêmes que dans le cas du modèle de Broersma. En négligeant les termes d'ordre 2 pour le rapport d'aspect dans l'expression de la force de friction, les facteurs correctifs pour un ellipsoïde valent : $\nu_\parallel = -0.5$, $\nu_\perp = 0.5$ et $\delta_\perp = -0.5$ [133].

Comparaison et limites des modèles dans le cas des nanotubes de carbone :

Pour chaque modèle, les auteurs ont pris en compte des géométries de cylindres ou d'ellipsoïdes. Nous allons maintenant comparer les modèles précédemment cités pour des objets rigides de grand rapport d'aspect. Pour cela, nous avons tracé le coefficient de diffusion dans le repère du laboratoire ($\vec{x}$,$\vec{y}$) pour un nanotube diffusant dans l'eau, de rapport d'aspect variant entre 10 et 1000.

Sur la Figure.4.3, nous pouvons voir que les modèles ne donnent pas exactement les mêmes coefficients de diffusion. La différence est particulièrement prononcée pour des rapports d'aspect inférieurs à 100 (cf. partie grise dans la Figure.4.3).

Le modèle de Happel et Brenner minimise le coefficient de diffusion tandis que le modèle de Perrin le maximise. Plus le rapport d'aspect augmente, plus les modèles convergent. L'écart relatif entre le modèle de Happel et Brenner et celui de Perrin est de l'ordre de 12.5% pour des nanotubes de rapport d'aspect égal à 100. Par la suite, nous serons amenés à calculer la viscosité des milieux dans lesquels diffusent les nanotubes. En termes de viscosité, l'écart relatif entre les modèles représente une incertitude moyenne de 0.1 mPa.s pour une viscosité de 1 mPa.s. Pour nos applications, cette incertitude est relativement faible. Comme les rapports d'aspect des nanotubes utilisés dans les chapitres 3 et 4 sont supérieurs à 100, nous avons

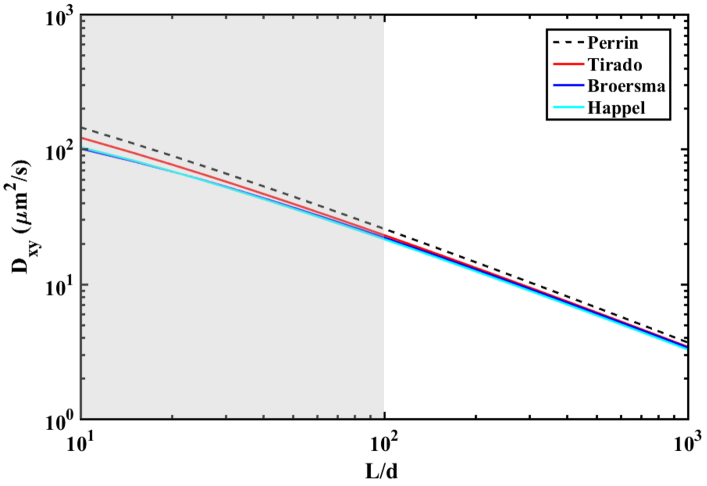

Figure 4.3 : *Coefficient de diffusions dans le plan (x, y) d'un objet uni-dimensionnel en fonction de son rapport d'aspect $\phi = L/d$ pour les différents modèles cités.*

considéré, pour plus de simplicité, que de telles différences étaient minimes par rapport aux autres incertitudes de mesure et nous utiliserons donc le modèle de Perrin décrivant la diffusion d'ellipsoïdes de très grand rapport d'aspect comme référence.

4.2 Diffusion de nano-objets dans les espaces complexes : Etat de l'art

Plusieurs modèles ont été développés pour reproduire théoriquement l'évolution du coefficient de diffusion d'objets plongés dans des espaces confinés en fonction de l'encombrement local moyen. Ces modèles peuvent être classés en différentes catégories selon les paramètres pris en compte (effets stériques, effets hydrodynamiques...). Nous avons choisi de ne pas faire une liste exhaustive des modèles existants. Nous allons simplement exposer dans les sections 4.2.2, 4.2.3 et 4.2.4 les modèles macroscopiques et microscopiques qui nous ont semblés les plus pertinents. Ces sections seront inspirées de la revue "Physical models of diffusion for polymer solutions" [134].

4.2.1 Les gels de polymères comme système modèle d'environnements complexes

Avant de présenter les différents modèles, nous allons introduire brièvement les gels d'agarose et leurs paramètres de structure connues. Les gels d'agarose sont des gels de polymères couramment utilisés comme système modèle pour étudier la diffusion de nano-objets dans des

espaces encombrés [135] [136] [137] [138]. Dans la partie 4.4, nous utiliserons également ce système modèle pour valider la méthodologie développée pour les nanotubes.

Les gels sont composés de brins de polymères en solutions. Lorsque la concentration en polymère est supérieure à la concentration critique (C $>$ C*) et que la température est inférieure à la température de transition vitreuse, les gels sont formés d'un enchevêtrement aléatoire de polymères reliés par des points de réticulation.

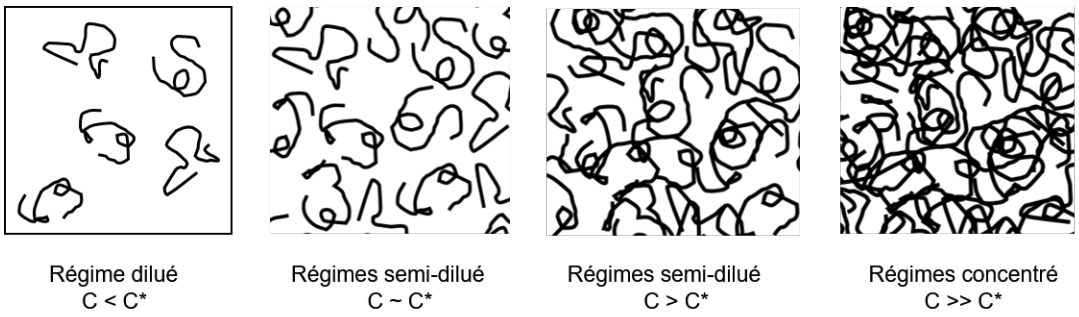

Figure 4.4 : *Schéma représentant les solutions de polymères en fonction de la concentration en polymère.*

Les enchevêtrements de polymères forment des canaux de différentes formes et de différentes tailles. Plus la concentration de polymères augmente, plus la distance entre les points de réticulation est faible. La taille moyenne de canaux ou pores présents dans les gels d'agarose a été mesurée entre autres par microscopie à force atomique ou diffusion de neutrons en fonction de la concentration en poudre d'agarose. Selon les études, les auteurs ont montré que la taille moyenne était proportionnelle à $C^{-\gamma}$ où $\gamma = 0.64$ [139], 0.59 [140] ou 0.76 [141]. La valeur de la puissance se situe entre celle prédite par le modèle d'Ogstön (0.5) pour de longues chaines rigides [142] et celle prédite par De Gennes (0.75) pour des chaines flexibles [143].

Cependant les tailles moyennes obtenues pour un gel de même concentration pourraient dépendre de plusieurs facteurs. En 1988, les travaux de T. K. Attwood et al. ont suggéré que la distribution spatiale des structures au sein d'un même gel n'était pas homogène [144]. Dans les travaux de M. Maaloum et al menés en 1998 [140], la taille moyenne des pores variaient entre 810 nm et 201 nm pour des gels de concentration variant entre 0.5% et 5% respectivement, avec des variations relatives d'environ 20%. Les auteurs ont montré que la taille moyenne des pores dépendait de la force ionique du solvant. En 2004, N. Fatin-Rouge et al. ont montré que la taille moyenne des pores pouvait dépendre également de la rapidité de gélification [145]. Dans la suite de ce travail (Section 4.4.2), nous utiliserons $\gamma = 0.76$ pour décrire la structure des gels d'agarose comme dans la référence [141].

4.2.2 Modèles d'analyse macroscopiques prenant en compte la tortuosité des espaces complexes

Les modèles de Maxwell-Fricke [146], de Mackie et Meares [147], d'Ogstön et al. [148] et de Johansson et al. [149] prennent en compte les effets d'obstruction pour rendre compte de la tortuosité éventuelle du milieu. Comme évoqué précédemment, ces modèles ont été développés pour rendre compte de la diffusion de molécules dans des gels d'agarose, mais aussi dans les gels de polymères constitués d'acide hyaluronique.

De manière générale, les effets d'obstruction sont caractérisés par une augmentation du chemin pris par les particules pour contourner les obstacles présents le long de leur trajectoire (cf. Figure.4.5). Plus l'environnement est complexe et tortueux, plus l'augmentation de chemin sera importante.

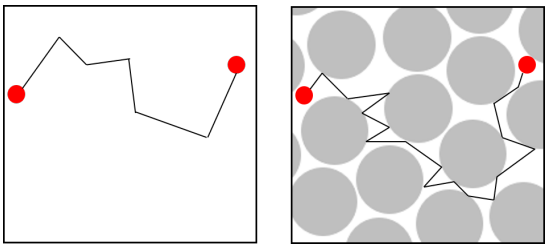

Figure 4.5 : *Schéma représentant l'augmentation du chemin pris par la particule pour contourner les obstacles et qui rend compte de la tortuosité du milieu.*

Dans le modèle de Maxwell-Fricke, le coefficient de diffusion dépend de la fraction volumique en polymère $\phi_v \sim$ C/100, et d'un facteur dépendant de la géométrie des molécules diffusantes. Le coefficient de diffusion macroscopique est proportionnel à ϕ_v^{-1}. Ce modèle a permis d'estimer une valeur "maximale raisonnable" du coefficient de diffusion macroscopique en présence d'obstacles. Ce modèle est valable pour l'étude de petites molécules de solvant dans des solutions de polymères diluées.

Le modèle de Mackie et Meares est basé sur la tortuosité du réseau. Ici, la tortuosité correspond à l'augmentation du chemin pris par la molécule diffusante pour contourner les obstacles. Le réseau fibreux a été modélisé par un arrangement cubique de fibres dont l'espacement n'est pas très hétérogène. Les auteurs ont montré que ce modèle reproduisait bien les données expérimentales pour de gels de concentration variant entre 0.1% et 0.5%, c'est à dire peu concentrés. Le coefficient de diffusion macroscopique est proportionnel à $\left(\frac{1-\phi_v}{1+\phi_v}\right)^2$. Ce modèle est valable pour des molécules de tailles similaires à la taille des monomères composant les fibres de polymère.

Le modèle de Johansson et al., appelé aussi "Théorie des sphères dures", prend également

en compte les effets stériques des obstacles. Ce modèle décrit la diffusion de sphères dans des réseau de gels constitués de cellules cylindriques [149]. Les auteurs ont montré que ce modèle reproduisait bien la diffusion de sphères dans des réseaux de polymères flexibles ou rigides. Dans ce modèle, le coefficient de diffusion macroscopique dépend de la fraction volumique ϕ_v, du rayon des particules diffusantes R_h, du rayon des fibres r_f. Dans leurs travaux, les auteurs ont montré que ce modèle reproduisait bien la diffusion de l'albumine dans l'acide hyaluronique avec des concentrations d'acide hyaluronique variant entre 0.4% et 0.6%, ce qui est peu concentré. Cependant, ce modèle ne serait pas valide pour décrire le mouvement brownien de molécules dont la taille varie entre 0.5 nm à 3 nm avec une longueur de persistance des fibres de polymère de 20 nm et un rayon de fibre de 0.5 nm [150].

Modèle macroscopique d'Ogstön et al. :

Dans la suite, nous nous intéresserons particulièrement au modèle d'Ogstön et al. qui décrit les processus de pénétration des objets dans des matrice de fibres d'orientations aléatoires [142] et qui fournit une expression analytique du coefficient de diffusion. Les auteurs ont montré que ce modèle était valide pour des solutions de polymères dans le régime dilué et le régime semi-dilué.

Ce modèle décrivait à l'origine les processus de sédimentation des protéines dans de l'acide hyaluronique entre autres [148]. En première approximation, les comportements de diffusion des protéines en fonction de la concentration en polymères pourraient être assimilés aux processus de sédimentation. Dans ce modèle, le coefficient de diffusion dépend de la taille du diffusant R_h, du rayon des fibres du polymère r_f et de la fraction volumique du polymère ϕ_v.

$$\frac{D}{D_\infty} = exp\left(-\frac{R_h}{r_f}\,\phi_v^{0.5}\right) \tag{4.27}$$

où D_∞ correspond au coefficient de diffusion des molécules dans un fluide homogène de même viscosité. Notons que le rayon d'une fibre d'agarose r_f a été estimé entre 4 - 3 nm [151] et 1.9 nm [152] en fonction des méthodes de mesures. Par la suite, nous avons choisi de manière arbitraire de prendre un rayon de fibre d'agarose égal à 1.9 nm.

Remarque :

D'autres modèles comme les modèles de Cuckier et al. [153], d'Altenberger et al. [154], de Phillies et al. [155] et de Gao et Fagerness [156] se basant sur les équations de Navier-Stokes hydrodynamiques sont arrivés à des formes fonctionnelles équivalentes à celle d'Ogstön pour le coefficient de diffusion macroscopique.

$$\frac{D}{D_\infty} = exp\left(-b\,\phi_v^p\right) \tag{4.28}$$

où b est un coefficient qui représenterait les interactions hydrodynamiques entre les fibres de

polymère et les molécules diffusantes et qui dépendrait de la taille des molécules diffusantes. Le coefficient p varierait entre 0.5 et 1 selon les modèles et dépendrait largement de la nature des polymères utilisés [157]. Cette forme fonctionnelle a été utilisée pour décrire la diffusion de protéines [155]. G. D. J. Phillie a suggéré que b devait être proportionnel à $\frac{R_h}{\sqrt{k}}$, où $\sqrt{k}$ correspond à la plus petite distance d'approche entre la molécule diffusante et les fibres de polymère appelée également longueur hydrodynamique d'écrantage [151].

4.2.3 Modèles d'analyse prenant en compte la tortuosité des espaces complexes et les interactions hydrodynamiques locales

Pour prendre en compte, non seulement la tortuosité mais aussi les effets hydrodynamiques locaux liés à la présence des parois proches des objets diffusants, nous allons présenter deux modèles : l'un macroscopique et l'autre microscopique.

Modèle macroscopique de E. M. Johnson et al. :

Ci-dessous, nous avons choisi de décrire le modèle de E. M. Johnson et al. menés en 1996 qui prend en compte les interactions stériques (tortuosité), notées $S(f)$ et les interactions hydrodynamiques, notées $F\left(\frac{R_h}{\sqrt{k}}\right)$. Dans ce modèle, le coefficient de diffusion macroscopique s'écrit comme le produit des deux interactions [158] :

$$\frac{D}{D_\infty} = F\left(\frac{R_h}{\sqrt{k}}\right) \cdot S(f) \tag{4.29}$$

où

$$F\left(\frac{R_h}{\sqrt{k}}\right) = \left[1 + \frac{R_h}{\sqrt{k}} + \frac{1}{3}\left(\frac{R_h}{\sqrt{k}}\right)^2\right]^{-1} \quad \text{avec} \quad \left(\frac{\sqrt{k}}{r_f}\right)^2 = -\frac{3}{20C}\left(ln\phi_v + 0.931\right) \tag{4.30}$$

et

$$S(f) = exp(-0.84\, f^{1.09}) \quad \text{avec} \quad f = \left(1 + \frac{R_h}{r_f}\right)^2 \phi_v \tag{4.31}$$

où r_f et R_h correspondent respectivement au rayon des fibres de polymères et des particules diffusantes. Nous pouvons reconnaître que le terme S a la même structure que les équations 4.27 et 4.28. Les auteurs ont suggéré que les coefficients 0.84 et 1.09 n'avaient pas de significations physiques et pourraient varier en fonction des systèmes étudiés (cf. *Remarque* précédente de la page 93).

Le terme de friction F provient d'une modification de l'équation de Darcy (Equation 4.32) décrivant l'écoulement d'un fluide dans un milieu poreux et prenant en compte la perméabilité

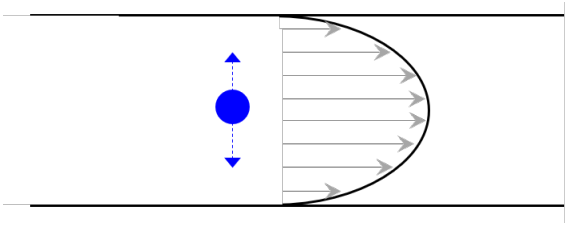

Figure 4.6 : *Schéma représentant l'effet de la présence des parois sur le profil de vitesse d'un écoulement fluide.*

du milieu [159]. Ce terme pourrait être compris qualitativement par un effet analogue à la forme du profil de vitesse d'un écoulement fluide entre les parois du gel (cf. Figure.4.6). Plus les parois seraient proches, plus les mouvements de la particule serait ralentis.

Ce modèle pourrait donc nous permettre de dé-corréler les effets de tortuosité due à la présence d'obstacles et les effets hydrodynamiques dûs aux dimensions des pores et à la géométrie des objets diffusants. Notons que, dans la référence [158], E. M. Johnson et al. n'ont pas utilisé l'équation 4.30 pour calculer $\sqrt{k}$ mais ils ont suggéré que ce terme correspondait à la perméabilité hydraulique. Expérimentalement, cette valeur a été mesurée en plaçant une membrane de gel d'épaisseur e connue dans un filtre à ultrafiltration. Une différence de pression ΔP a été appliquée sur la membrane et le débit Q a été mesuré en collectant et pesant le liquide filtré. La perméabilité a été calculée avec la formule de Darcy :

$$k \propto \frac{\eta_W Q e}{\Delta P} \tag{4.32}$$

où η_W correspond à la viscosité de l'eau. Les auteurs ont ensuite utilisé la perméabilité en absence de différence de pression (k_0) pour ajuster leur modèle sur leurs données expérimentales. Dans la partie 4.4.2, nous comparerons nos données expérimentales avec ce modèle. Pour cela, nous verrons que nous aurons besoin d'estimer les valeurs de perméabilité hydraulique de nos gels.

Modèle microscopique : diffusion anormale d'un objet individuel

Les modèles décrits ci-dessus sont des modèles de diffusion macroscopique qui découlent d'une analyse sur des échelles de temps longues et sur un ensemble de molécules. Ces modèles permettent d'obtenir une mesure d'ensemble du coefficient de diffusion des molécules dans les environnements confinés. Dans notre cas, nous souhaitons accéder aux caractéristiques locales de l'espace exploré par les nanotubes. Il nous faut donc relier les caractéristiques de diffusion d'un objet individuel aux modèles macroscopiques décrits ci-dessus. Nous proposons d'utiliser le modèle de diffusion anormale pour combiner l'analyse dynamique d'un objet individuel et les modèles macroscopiques décrits ci-dessus.

De manière générale, la diffusion d'un nano-objet individuel est dite anormale lorsque le

déplacement quadratique moyen n'est pas linéaire avec l'intervalle de temps [160], ce qui est le cas dans nos expériences. Ce phénomène a largement été observé et modélisé [161] pour décrire la diffusion de nano-objets dans les gels de polymères [145] [162] mais aussi dans les environnements biologiques tel que les cerveaux humains [163], les cerveaux de rats [164] et les cellules [165].

Dans le modèle de la diffusion anormale, le déplacement quadratique moyen MSD peut s'écrire sous la forme :

$$MSD(t) = \Gamma \cdot t^{\alpha} \tag{4.33}$$

où la puissance α peut varier entre 0.5 et 1. Lorsque $\alpha < 1$, la diffusion est anormale et les mouvements de la particule diffusante sont affectés par les obstacles présents dans les gels. Quand $\alpha = 1$, la diffusion peut être considérée comme libre (mouvements browniens).

Quand $\alpha > 1$, la diffusion est dite markovienne ce qui correspondrait à des trajectoires où certains déplacements sont très supérieurs au déplacements quadratiques moyens (processus de Markov-Levy). Le régime où $\alpha > 1$ est également observé lorsqu'une force extérieure de dérive ou d'entrainement intervient dans le processus de diffusion.

Tous les modèles présentés ci-dessus ont été construits pour des objets sphériques et/ou uni-dimensionnels de rayons hydrodynamiques variant entre 2 nm et 10 nm. Les longueurs des nanotubes que nous avons utilisés étaient supérieures à 500 nm, soit un rayon hydrodynamique supérieur à 10 nm. Nous chercherons donc par la suite à vérifier si ces approches peuvent être applicable au cas des nanotubes.

4.2.4 Impact de la flexibilité des nanotubes sur leur diffusion dans les espaces encombrés

La flexibilité des nanotubes a été observée par Duggal et al. dès 2006 [123]. Lorsqu'ils sont plongés dans un fluide, les nanotubes peuvent se courber sous l'effet de l'agitation thermique. Cette propriété dépend de la rigidité des nanotubes. De manière générale, la rigidité κ d'un matériau dépend du module d'Young E et du moment d'inertie I. Le moment d'inertie I prend en compte la géométrie de l'objet (longueur, diamètre) et la répartition spatiale de la matière (cylindre creux dans le cas des nanotubes). Dans le modèle théorique du cylindre creux continu de rayon R, la rigidité de courbure s'écrit :

$$\kappa = EI = \pi C_r \left(\frac{d}{2}\right)^3 \tag{4.34}$$

où C_r est la rigidité dans le plan d'un feuillet de graphène et dépend du module de Young.

La valeur théorique a été estimée *ab initio* et vaut environ 345 J/m^2 [166]. Expérimentalement, N. Fakhri et al. ont trouvé que la rigidité dans le plan était égale à 678 $\pm$ 22 J/m^2 [62]. Cette valeur a été calculée à partir des mesures de l'amplitude des modes de vibration de nanotubes individuels de différentes chiralités plongés dans des fluides homogènes de différentes viscosités. L'origine de la différence entre la valeur théorique et les valeurs expérimentales n'est pas encore comprise.

La longueur de persistance L_p des nanotubes correspond à la distance sur laquelle les fluctuations thermiques n'influencent pas la courbure du nanotube :

$$L_p = \frac{\kappa}{k_B T} \tag{4.35}$$

Les travaux de N. Fakhri et al. ont montré comme attendu par l'équation 4.34 que la longueur de persistance des nanotubes mono-paroi était proportionnelle au cube de leur diamètre [62] :

$$L_p \propto d^3 \tag{4.36}$$

La longueur de persistance varie entre 26 μm et 138 μm pour des nanotubes de diamètres variant entre 0.7 nm et 1.2 nm. Elle est de 26 μm pour des nanotubes de chiralité $(6, 5)$.

Un nanotube "long" ($L \gg L_p$) est considéré comme flexible tandis qu'un nanotube "court" ($L \ll L_p$) est considéré comme rigide. Lorsque $L \sim L_p$, le nanotube est dit semi-flexible. Cette caractéristique affecte les propriétés de diffusion des nanotubes dans les milieux encombrés.

En 2010, N. Fakhri et al. (Collaboration entre le groupe de Matteo Pasquali - Rice University et notre groupe) ont étudié les mouvements de diffusion de nanotubes semi-flexibles dans des gels d'agarose [18]. Lorsqu'un nanotube diffuse dans un espace encombré, comme dans un gel d'agarose, sa diffusion est impactée par sa flexibilité.

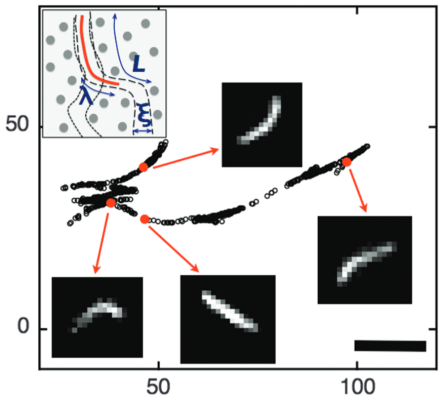

Figure 4.7 : *Reptation d'un nanotube de carbone de longueur L dans un gel d'agarose (1.5%). La barre d'échelle est de 5 μm. Cette figure est reproduite de la référence [18]*

La Figure.4.7 est extraite de ces travaux [18]. Cette figure montre les différentes courbures adoptées par le nanotube à différents instants de sa trajectoire. Sous les contraintes géométriques locales du réseau de pores, la courbure du nanotube change. Le caractère semi-flexible des nanotubes engendre un mouvement de reptation.

En traçant les déplacements quadratiques moyens parallèles ($MSD_{\parallel}$) et perpendiculaires ($MSD_{\perp}$) (cf. Figure.4.8), nous pouvons distinguer deux régimes de diffusion.

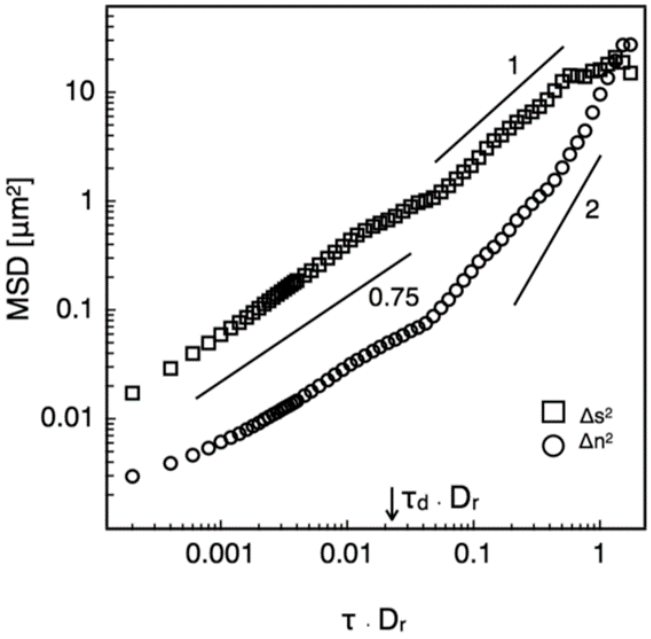

Figure 4.8 : *Déplacements quadratiques moyens perpendiculaires $MSD_{\perp}$ et parallèle $MSD_{\parallel}$ à l'axe du nanotube, notés Δn^2 et Δs^2 dans l'article, en fonction du temps τ (multiplié par la diffusion rotationnelle D_θ, notée D_r dans la référence) montrant les deux régimes de diffusion. Figure reproduite de la référence [18]*

Aux temps courts, le nanotube reste confiné et se courbe selon un mode de vibration dominant imposé par la géométrie locale du milieu. Aux temps longs, le nanotube se désengage et explore de nouveaux canaux. Le temps de désengagement, τ_d, correspond au temps que met le nanotube pour parcourir la longueur de déflexion λ_d. Cette longueur dépend de la taille des canaux ξ et de la longueur de persistance L_p :

$$\lambda_d = \left(L_p \xi^2\right)^{1/3} \tag{4.37}$$

Pour des temps inférieurs à τ_d, le $MSD_{\perp}$ est proportionnel à $\tau^{3/4}$. Cette dépendance est également attendue pour le $MSD_{\parallel}$. Pour des temps supérieurs à τ_d, le $MSD_{\perp}$ est proportionnel à τ tandis que le $MSD_{\parallel}$ est proportionnel à τ^2 pour "rattraper" la dépendance linéaire. En d'autres termes, aux temps courts, le mouvement des nanotubes est imposé par son orientation forcée par l'environnement et aux temps longs, le nanotube perd la mémoire de son orientation

initiale et la diffusion devient isotrope.

L'étude de la diffusion rotationnelle en fonction de la géométrie locale du réseau et de la longueur des nanotubes permet d'identifier les régimes pour lesquels les nanotubes sont considérés comme rigides ou semi-flexibles.

Nous pouvons voir sur la Figure.4.9 qu'en fonction du rapport L/λ_d, la diffusion rotationnelle dans les milieux encombrés obéit au modèle d'Odijk [167] ou au modèle de Doi [168].

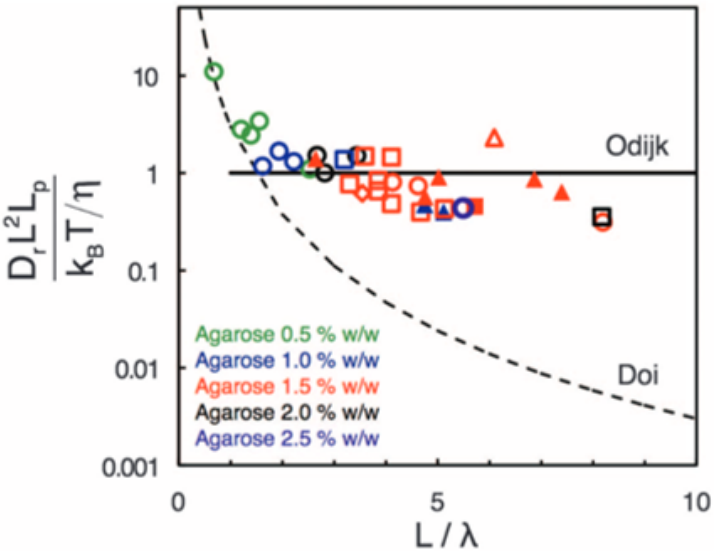

Figure 4.9 : *Diffusion rotationnelle D_θ (notée D_r dans la référence) des nanotubes en fonction du rapport entre la longueur des nanotubes et la longueur de déflexion λ_d (notée λ dans la référence). Figure reproduite de la référence [18]*

Dans le modèle d'Odijk, la diffusion rotationnelle est inversement proportionnelle à la longueur de persistance et est indépendante de la taille des pores :

$$D_\theta^{Odijk} = \frac{k_B T}{\eta L_p L^2} \tag{4.38}$$

Dans le modèle de Doi, les nanotubes "courts" (L $< \lambda_d$) sont considérés comme rigides. La diffusion rotationnelle dépend de la taille des pores et de la longueur des nanotubes :

$$D_\theta^{Doi} = \left(\frac{L}{\lambda_d}\right)^{-3} \cdot D_\theta^{Odijk} \tag{4.39}$$

Le tableau 4.1 regroupe les longueurs minimales typiques pour lesquelles les nanotubes suivent le régime d'Odijk et sont donc considérés comme semi-flexibles en fonction de la taille moyenne des canaux présents dans les gels d'agarose. Nous avons considéré ici les nanotubes $(6, 5)$ de diamètre 0.7 nm avec une longueur de persistance de 26 μm. Les longueurs

minimales ont été obtenues à partir du point d'intersection entre les deux modèles de diffusion rotationnelle et dépendent des dimensions des canaux.

Concentration des gels (%)	Taille moyenne des canaux ξ (μm)	Longueurs minimales pour lesquelles les nanotubes sont semi-flexibles (μm)
0.5	0.4	1.7
1	0.28	1.3
1.5	0.2	1.1
2	0.18	0.95
2.5	0.15	0.85

Table 4.1 : *Longueurs minimales pour lesquelles les nanotubes sont considérés comme semi-flexibles en fonction de la taille moyenne des canaux ξ présents dans les gels d'agarose.*

Ainsi ce serait dans les plus petites dimensions mesurées dans l'ECS de cerveaux vivants (Chapitre 3) et pour des nanotubes de longueur supérieure à 800 nm que les nanotubes peuvent être considéré comme semi-flexibles et que la diffusion est affectée par leur flexibilité. Dans nos expériences dans les cerveaux, les nanotubes utilisés avaient en général des longueurs inférieures à 800 nm.

4.3 Méthodologie proposée pour extraire la viscosité locale et la complexité d'un environnement complexe à partir de la diffusion d'un nanotube individuel

Dans cette partie, nous allons proposer une méthodologie pour mesurer les paramètres rhéologiques locaux d'espaces complexes et plus particulièrement, un paramètre de complexité et la viscosité *in situ* locale vue par les nanotubes.

Afin d'exposer notre méthodologie basée sur l'analyse de la diffusion anormale, nous allons présenter l'exemple de l'analyse de la trajectoire d'un nanotube arbitraire diffusant dans un gel d'agarose.

4.3.1 Détails expérimentaux

Dans cette expérience, nous avons utilisé des nanotubes encapsulés dans du sodium deoxycholate (DOC). Le diamètre des nanotubes encapsulé dans du DOC a été considéré égal à

1 nm car le DOC est plus compact que le PLPEG utilisé dans les cerveaux. La longueur des nanotubes a été calculée de la même manière que dans le chapitre 3 par un ajustement gaussien de la PSF des nanotubes. Pour fabriquer le gel d'agarose à 2% de concentration, nous avons mélangé la poudre d'agarose avec une solution contenant 0.1%m de DOC pour éviter que les nanotubes ne collent aux parois du gel. Le diamètre théorique des canaux était de 120 nm. La poudre d'agarose et la solution ont été chauffées jusqu'à ce que le mélange devienne transparent. De manière à comparer les mouvements des nanotubes à ceux de nano-sphères, les solutions de nanotubes et de nano-sphères faiblement concentrées ont été introduits simultanément dans le mélange avant gélification. Les échantillons de gels ont ensuite été montés de la même manière que dans le Chapitre 2. Les nanotubes ont été excités sur la transition KSB (845 nm, cf. Chapitre 2) et nous avons enregistré ses mouvements de diffusion avec un temps d'intégration de 20 ms.

4.3.2 Détermination du paramètre de complexité d'un gel d'agarose et de sa viscosité moyennés sur la trajectoire d'un nanotube individuel

Dans cette section, nous allons proposer deux méthodes d'analyse permettant d'extraire un paramètre de complexité des gels. Ce paramètre nous servira ensuite à calculer les viscosités locales du gel d'agarose.

Analyse de la trajectoire *via l'ajustement global* du déplacement quadratique moyen (MSD) :

Nous avons premièrement super-localisé le centroïde du nanotube (L = 940 nm) dans chaque image de la trajectoire comme dans le Chapitre 3. Nous avons ensuite calculé son déplacement quadratique moyen en 2D (MSD) en fonction des intervalles de temps. La Figure.4.10 montre la trajectoire du nanotube (10 000 localisations) ainsi que son MSD associé.

Nous pouvons voir sur la Figure.4.10.B que le MSD est sublinéaire ce qui est caractéristique d'une diffusion anormale. Plus l'intervalle de temps est grand, plus le nombre d'obstacles rencontrés par la particule diffusante est grand induisant ainsi une réduction du MSD par rapport à une variation linéaire. Le MSD peut être modélisé par une puissance de l'intervalle de temps τ^{α} :

$$MSD(\tau) = 4\Gamma \cdot \tau^{\alpha} = 4D_{\alpha}(\tau) \cdot \tau \quad \text{avec} \quad D_{\alpha}(\tau) = \Gamma \cdot \tau^{\alpha-1} \tag{4.40}$$

où $D_{\alpha}(\tau)$ correspond au coefficient de diffusion qui prend en compte les interactions entre le nanotube, le fluide et les parois du gel. Le terme α, parfois appelé "paramètre fractal", décrit la complexité de l'environnement dans lequel diffuse l'objet.

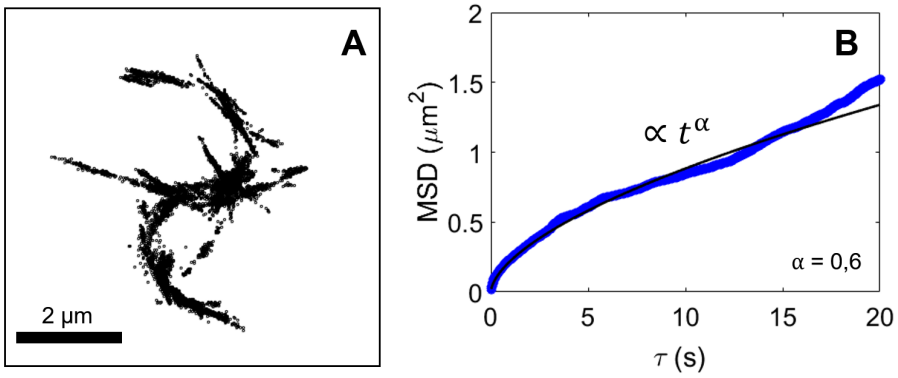

Figure 4.10 : *(A) Trajectoire d'un nanotube de longueur 940 nm diffusant dans un gel d'agarose de concentration 2% (10 000 localisations), (B) Déplacements quadratiques moyens en fonction de l'intervalle de temps pour le nanotube considéré (en bleu) et modélisation du MSD par une puissance τ^{α} (en noir).*

Si $\alpha = 1$, le mouvement peut être considéré comme libre et $D_{\alpha} = \Gamma = D_{Lin}$:

$$\Gamma = D_{Lin} = \frac{3}{8}\frac{k_B T}{\pi L \eta_{Lin}} ln\left(\frac{2L}{d}\right) \tag{4.41}$$

où D_{Lin} et η_{Lin} correspondent au coefficient de diffusion du nanotube et à la viscosité vue par le nanotube dans le cas où le MSD est linéaire avec l'intervalle de temps. Il s'agissait de l'hypothèse simplificatrice du Chapitre 3 appliquée pour des temps courts.

La complexité du milieu peut être définie comme $(1 - \alpha)$ avec $\alpha = 0.6$ dans notre exemple. En supposant que ce paramètre est constant tout au long de la trajectoire, et à partir des équations 4.40 et 4.41, nous pouvons définir *à chaque échelle de temps* la viscosité *in-situ*, $\eta_{\alpha}(\tau)$ vue par le nanotube qui permet comme nous allons le voir dans la section 4.4.2 de s'affranchir des effets liés à la tortuosité de l'environnement vue par le nanotube pendant l'échelle de temps considérée.

$$\tilde{\eta_{\alpha}}(\tau) = \frac{3}{8}\frac{k_B T}{\pi L D_{\alpha}(\tau)} ln\left(\frac{2L}{d}\right) \cdot (\tau)^{\alpha - 1} \tag{4.42}$$

Cette viscosité $\tilde{\eta}_{\alpha}$ est nommée viscosité par abus de langage mais ne possède pas les unités d'une viscosité. Pour les applications numériques, nous définissons donc la viscosité *in-situ* comme étant égale à :

$$\eta_{\alpha} = \frac{\tilde{\eta_{\alpha}}(\tau)}{(\tau = 1s)^{\alpha - 1}} \tag{4.43}$$

Cette viscosité η_{α} a les unités d'une viscosité. Elle dépend naturellement de la forme de l'objet et de ses interactions hydrodynamiques avec son environnement local mais aussi de

l'échelle de temps considérée.

Souhaitant réaliser cette analyse sur des temps courts, c'est à dire sans considérer la trajectoire globale mais différents instants le long de la trajectoire, les MSDs que nous devrons considérer seront bruités et un ajustement robuste par la Formule 4.40 serait délicat. Nous avons donc mis en place une méthode analytique pour extraire le paramètre α qui ne nécessite pas d'ajustement du MSD.

Analyse de la trajectoire *sans l'ajustement* du déplacement quadratique moyen :

Pour cela, nous avons analysé le MSD (cf. Figure.4.11) en calculant analytiquement les

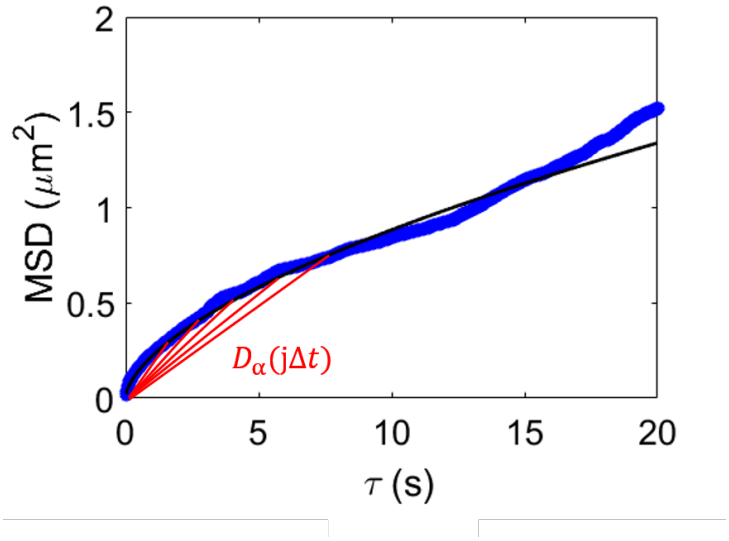

Figure 4.11 : *Déplacements quadratiques moyens en fonction de τ et calcul des pentes $D_\alpha(\tau)$ pour chaque intervalles de temps $\tau = j\Delta t$.*

valeurs de $D_\alpha(\tau)$ définit pour chaque intervalle de temps $\tau = j\Delta t$.

$$D_\alpha(j\Delta t) = \frac{MSD(j\Delta t)}{j\Delta t} \tag{4.44}$$

Selon l'équation 4.40, nous pouvons écrire la relation suivante :

$$\frac{D_\alpha(j\Delta t)}{D_\alpha(\Delta t)} = \frac{\Gamma_j}{\Gamma_{j=1}} j^{\alpha-1} \tag{4.45}$$

où Γ_j correspond au terme défini dans l'équation 4.41 et qui pourrait varier en fonction de l'intervalle de temps considéré ($\tau = j\Delta t$).

A partir de l'équation 4.45, nous pouvons écrire :

$$\alpha - 1 = ln\left(\frac{D_\alpha(j\Delta t)}{D_\alpha(\Delta t)}\frac{\Gamma_1}{\Gamma_j}\right)/ln(j) \tag{4.46}$$

Pour déterminer le paramètre α, nous avons d'abord calculé et tracé le logarithme du rapport entre $D_\alpha(j\Delta t)$ et $D_\alpha(\Delta t)$ pour chaque intervalle de temps $j\Delta t$ (cf. Figure.4.12.A). Le paramètre α correspond ainsi à la valeur de la pente de la courbe représenté sur la Figure.4.12.A. Cependant, cette courbe n'est pas strictement linéaire ce qui suggère que le paramètre α varie en fonction de l'intervalle de temps considéré. Cet effet peut être lié aux variations du paramètre Γ entre les deux intervalles de temps considérés.

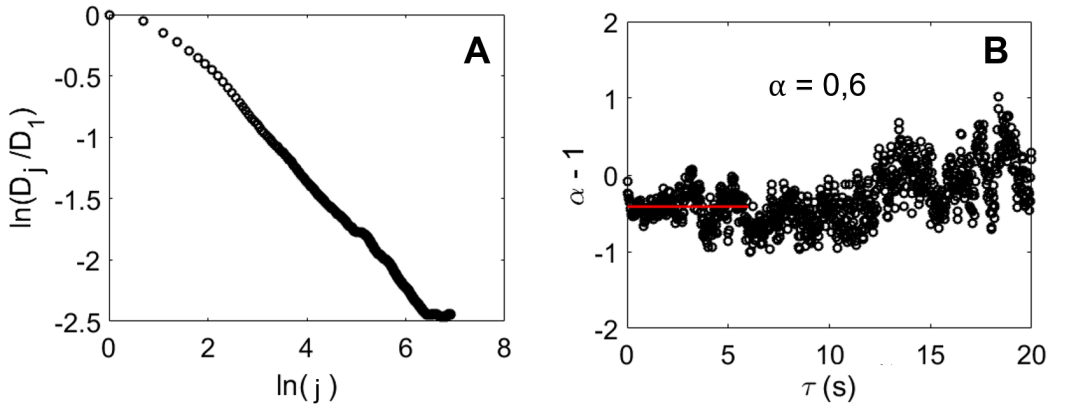

Figure 4.12 : *Méthode d'extraction du paramètre fractal α. (A) Courbe représentant le logarithme de l'équation 4.45, (B) Calcul des pentes de la Figure.A entre chaque intervalle de temps $\tau = X\Delta t$ et $\tau = (X+1)\Delta t$*

Pour extraire α en s'affranchissant des variations de Γ, nous avons ensuite calculé la pente de la courbe d'équation 4.46 :

$$\alpha - 1 = \frac{ln\left(\frac{D_\alpha((j+1)\Delta t)}{D_\alpha(\Delta t)}\right) - ln\left(\frac{D_\alpha(j\Delta t)}{D_\alpha(\Delta t)}\right)}{ln(j+1) - ln(j)} = \frac{\partial ln\left(\frac{D_\alpha(j\Delta t)}{D_\alpha(\Delta t)}\right)}{\partial ln(j)} \tag{4.47}$$

Les résultats de ce calcul sont montrés sur la Figure.4.12.B. La valeur de α ($= 0.6$) indiquée sur la Figure correspond à la valeur moyenne du coefficient sur 30% de la trajectoire. Ce pourcentage est communément admis dans les études statistiques de diffusion des objets dans des fluides et permet de ne pas considérer les valeurs pour lesquelles le nombre de points est trop faible.

Les valeurs du paramètre de complexité, α, obtenues avec l'ajustement global du MSD en τ^α (cf. Figure.4.10.B) ou avec l'équation 4.47 sans ajustement (cf. Figure.4.12.B) sont donc similaires. Pour la suite, la seconde méthode nous a semblé plus appropriée pour mesurer les viscosités locales car les paramètres Γ et α sont calculés analytiquement qui ne nécessite pas d'ajustement du MSD.

4.3.3 Détermination du paramètre de complexité d'un gel d'agarose et de sa viscosité localement le long de la trajectoire d'un nanotube individuel

Nous allons maintenant déterminer les viscosités locales et la complexité le long de la trajectoire du nanotube diffusant dans le gel d'agarose. Cela permettra de reconstruire des cartes de la viscosité locale du fluide contenu entre les enchevêtrements de fibres d'agarose.

4.3.3.1 Extraction du paramètre de complexité local

Pour cela, nous avons généré une fenêtre glissante de 12 points le long de la trajectoire (cf. Figure.4.13) pour calculer le MSD instantané en chaque point de la trajectoire.

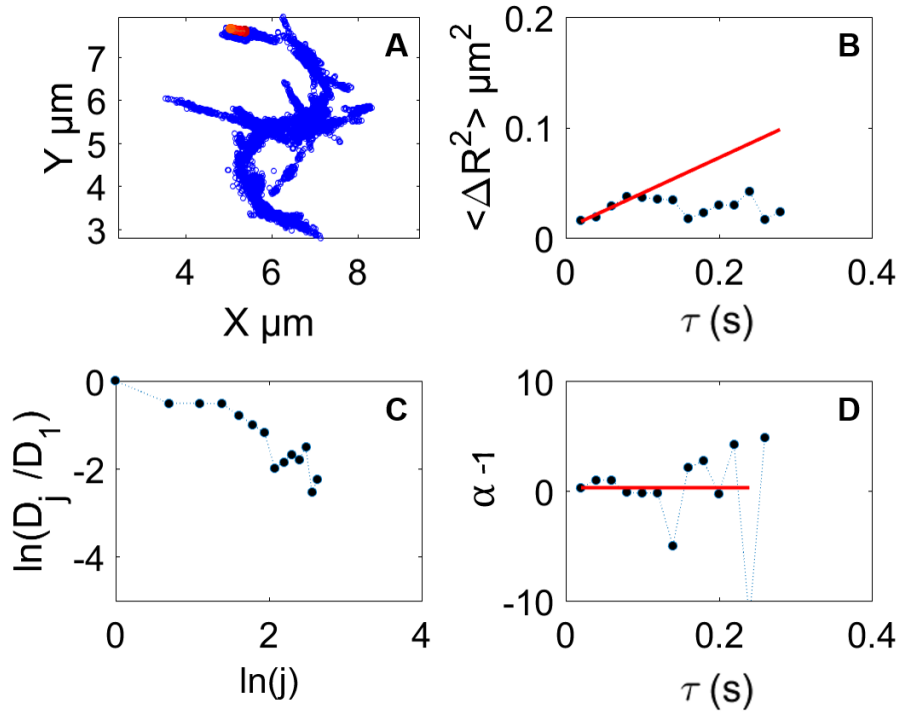

Figure 4.13 : *(A) Trajectoire du nanotube (bleu) et points considérés pour le calcul (dégradé de orange), (B) MSD instantané en fonction de l'intervalle de temps (noir) et ajustement linéaire (rouge), (C) Logarithme de l'équation 4.45, (D) Extraction du paramètre de complexité instantané.*

Les valeurs du paramètre α sont déterminée à partir des 6 premiers points du MSD soit $6\Delta t \sim 120$ ms (Equation 4.47).

A partir de cette analyse, nous avons dans un premier temps généré des cartes du paramètre de complexité (α) local obtenu. La Figure.4.14 montre l'exemple de cette carte pour

le nanotube considéré.

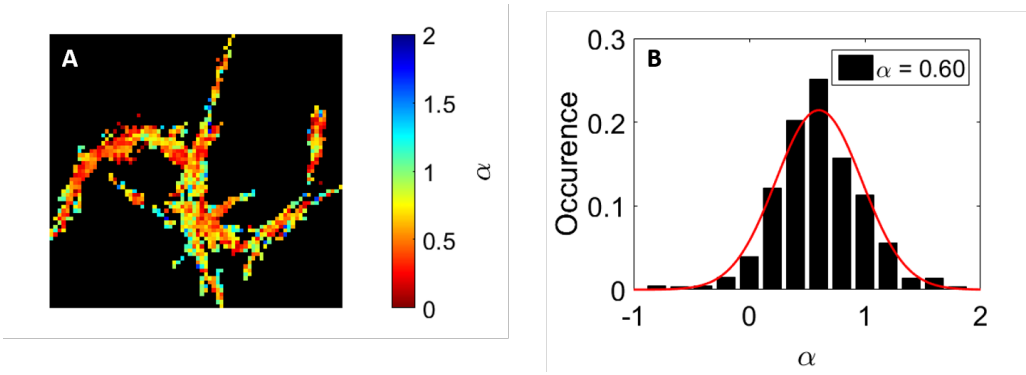

Figure 4.14 : *(A) Carte des paramètres α locaux, (B) Distribution des paramètres α au sein de la trajectoire considérée.*

Nous pouvons voir que le régime de diffusion du nanotube dépend des régions sondées (cf. Figure.4.14.A) et que la distribution du paramètre de complexité varie entre 0 et 1 (cf. Figure.4.14.B). Comme attendu, notons que la médiane de la distribution des paramètres α locaux (cf. Figure.4.14.B) est égale aux valeurs obtenues à partir de l'ensemble de la trajectoire ($\alpha = 0.6$ de la Section 4.3.2). Nous avons aussi tracé ce paramètre en fonction du temps sur la Figure.4.15. Chaque point de la figure correspond à une moyenne sur 6 points de la trajectoire.

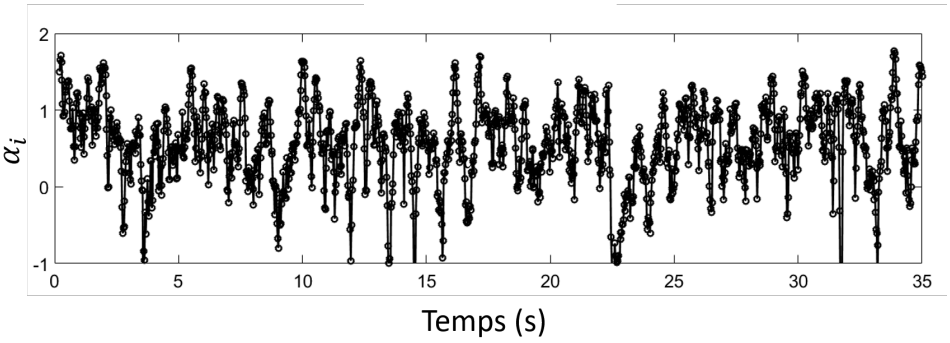

Figure 4.15 : *Oscillation du paramètre de complexité local en fonction du temps.*

Au cours du temps, le paramètre α varie ainsi entre les valeurs extrémales de la distribution précédente ce qui suggère que la diffusion du nanotube oscille entre une diffusion confinée ($0<\alpha<1$) et une diffusion libre ($\alpha = 1$). Occasionnellement, la diffusion contient des processus de Markov-Levy ($\alpha>1$) que nous interprétons comme des transitions entre un état confiné et un état libre. Les valeurs de α négatives quant à elles correspondraient au cas où le nanotube revient sur ses pas. En effet, les déplacements quadratiques moyens seraient dans ce cas plus petits pour des temps longs que pour des temps courts.

4.3.3.2 Calcul des viscosités *in situ* locales

A partir de la détermination du paramètre de complexité (α), nous pouvons maintenant calculer les viscosités locales *in situ* en utilisant l'équation 4.42 (page 102). Nous avons ici pris $\tau = 3\Delta t$, soit 25% du MSD instantané. En effet, cet intervalle de temps est identique à celui utilisé dans le Chapitre 3 qui correspond au temps caractéristique sur lequel le déplacement quadratique moyen perpendiculaire des nanotubes dans l'ECS de cerveau ne montre pas de plateau (cf. Figure.3.17). Nous les avons ensuite comparés aux valeurs de viscosités locales linéaires obtenues précédemment avec l'équation 4.41 et reconstruit des cartes de viscosité locales.

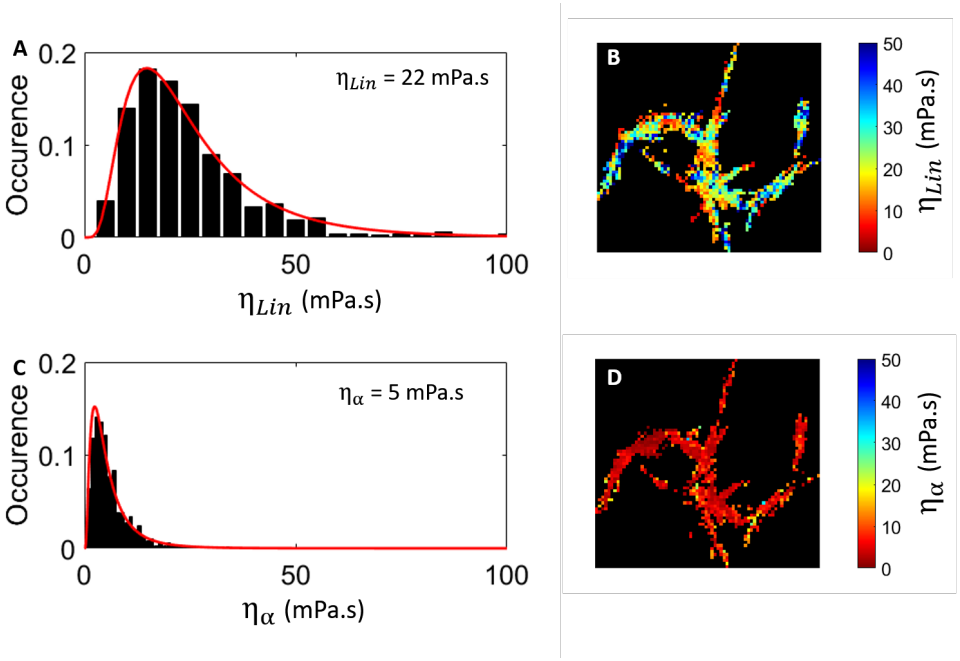

Figure 4.16 : *Distribution des viscosités locales linéaires (A) et in situ (C), Carte des viscosités linéaires (B) et in situ (D) vues par le nanotube.*

La Figure.4.16.A montre la distribution des viscosités linéaires locales obtenues avec le modèle de diffusion linéaire pour un nanotube. La Figure.4.16.C montre la distribution des viscosités *in situ* locales. La viscosité linéaire varie entre 1 mPa.s et 50 mPa.s alors que la viscosité *in situ* varie entre 1 mPa.s et 10 mPa.s. Les valeurs de viscosités dans la légende correspondent à la valeur médiane des viscosités locales. La courbe rouge correspond à un ajustement des histogrammes par une distribution LogNormale. Nous présentons également sur la Figure.4.16.B-D, les cartes locales des deux viscosités.

Comme attendu, l'analyse de complexité procure des viscosités locales, η_α, plus homogènes et plus faibles que l'analyse linéaire simpliste, η_{Lin} car cette dernière ne s'affranchit pas des effets de tortuosités (et hydrodynamiques). Dans ce contexte, η_α procure une valeur plus

réaliste de la viscosité locale vue par les nanotubes.

4.4 Validation du modèle d'analyse sur des gels d'agarose

Après avoir présenté la méthodologie sur un exemple, nous présentons dans cette partie une étude systématique en fonction de la concentration des gels d'agarose. Nous comparerons également les paramètres rhéologiques des gels obtenus en utilisant la diffusion des nanotubes et la diffusion de nano-sphères de 37 nm de diamètre et nous validerons notre méthodologie en se basant sur les modèles macroscopiques d'Ogstön et al. et de Johnson et al. (cf. Section 4.2.2 et 4.2.3).

4.4.1 Evolution du paramètre de complexité en fonction de la concentration des gels

La Figure.4.17 montre la médiane des paramètres de complexité α locaux obtenus pour les nanotubes et les nano-sphères en fonction de la concentration des gels. Les boites correspondent à l'ensemble des trajectoires avec la médiane totale en rouge, les 25 et 75 centiles en bleu et le maximum et minimum de l'ensemble de la distribution en noir.

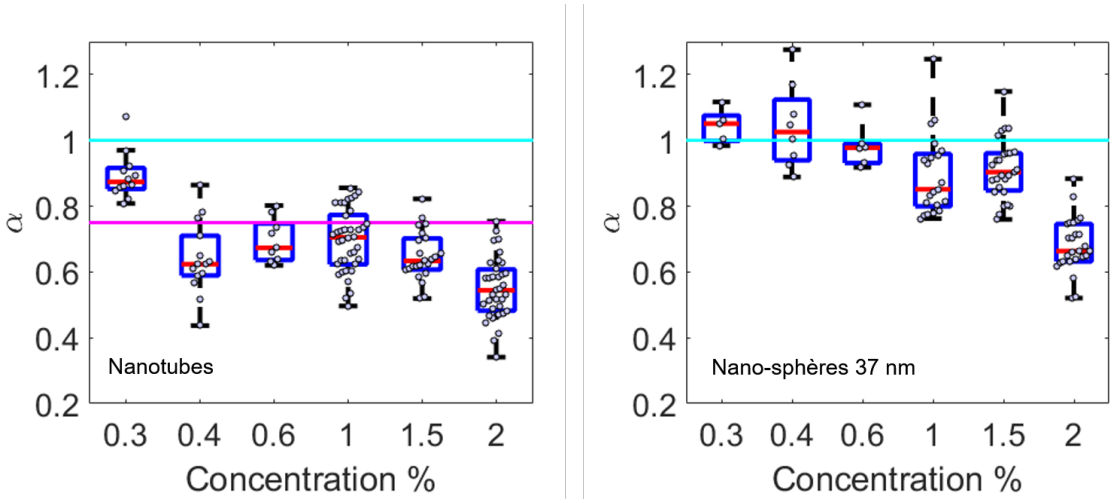

Figure 4.17 : *Evolution du paramètre α en fonction de la concentration en gel pour des nanotubes et des nano-sphères de 37 nm de diamètre.*

Pour les nanotubes, nous pouvons distinguer trois régimes. Quand α est proche de 1 (ligne de couleur cyan), la diffusion des nanotubes peut être considérés comme libre. Quand la concentration du gel augmente, le paramètre α diminue vers une valeur inférieure à 0.75

(ligne magenta). En réalité, le paramètre α dépend de la longueur des nanotubes et de la taille des canaux présents dans les gels (résultats non-montrés ici). Ce régime correspond au régime de reptation en accord avec les travaux de N. Fakhri et al. dans lequel les auteurs ont montré que pour des échelles de temps courtes, le MSD est proportionnel à $\tau^{0.75}$ [18]. Ce résultat valide l'approche développée pour extraire le paramètre α à partir de l'analyse des MSD instantanées (cf. Section 4.3.3) mais aussi à partir du MSD global. Ce résultat suggère également que les échelles de temps que nous avons considérées pour déterminer α et les viscosités *in situ* sont inférieures au temps de désengagement des nanotubes. Lorsque la concentration du gel est égale à 2%, le paramètre de complexité est proche de 0.5 ce qui suggère que le nanotube est confiné. Cette valeur pourrait correspondre au modèle de Rouse décrivant la diffusion de chaines dans les environnements encombrés au temps courts [169]. Il pourrait également correspondre à un régime intermédiaire où le rayon hydrodynamique des particules diffusantes est compris entre la longueur de corrélation des gels et le diamètre des tubes dans lesquels elles diffusent sur des temps caractéristiques compris entre le temps de relaxation des segments de polymères de tailles comparables à la taille des particules et le temps de relaxation des blobs [170].

Pour les nano-sphères, lorsque la concentration est inférieure ou égale à 1%, les mouvements de diffusion peuvent être considérés comme libres (α proche de 1). Quand la concentration est égale à 2%, les nano-sphères semblent fortement confinées ($\alpha \leq 0.75$).

De manière générale, il existe donc, dans nos expériences, 3 états possibles de diffusion pour les nanotubes (libre, reptation, confiné) et seulement 2 pour les nano-sphères (libre, confiné).

4.4.2 Evolution des viscosités linéaires et *in situ* en fonction de la concentration des gels

4.4.2.1 Evolution des viscosités locales déterminées avec des nano-sphères

Nous avons ensuite calculé les viscosités linéaires η_{Lin} et les viscosités *in situ* η_α pour chaque concentration et pour les nano-sphères (cf. Figure.4.18).

Nous voyons que plus la concentration en gel augmente, plus les viscosités linéaires et *in situ* augmentent.

Pour comprendre cette évolution, nous avons souhaité comparer ces résultats avec les modèles macroscopiques de E. M. Johnson et al. et d'Ogstön et al.. Pour cela, nous avons dû dans un premier temps estimer les valeurs théoriques de perméabilités hydrauliques (k) présentes dans les équations du modèle de E. M. Johnson et al. (cf. Equation 4.30 de la page 94).

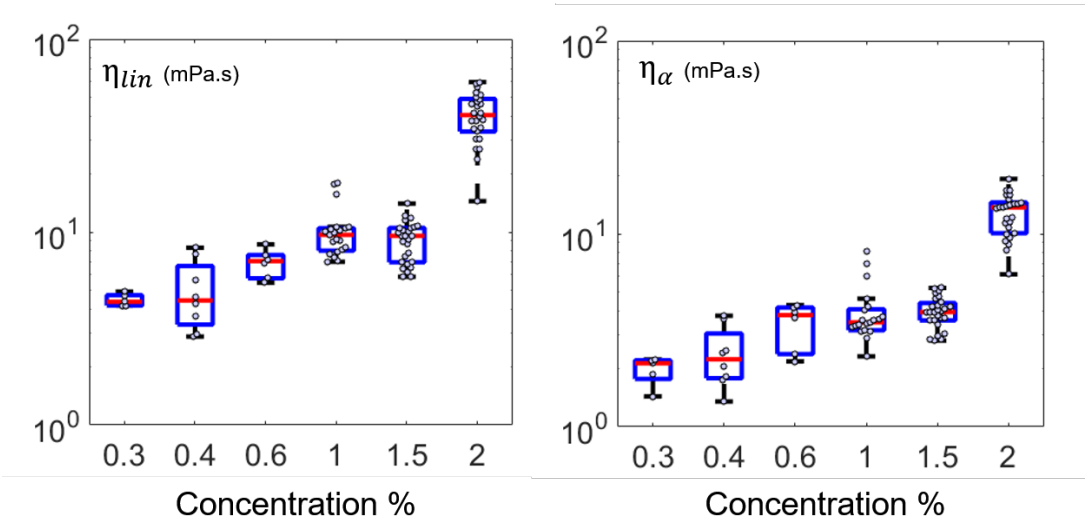

Figure 4.18 : *Evolution de la viscosité linéaire η_{Lin} et in situ η_{α} en fonction de la concentration en gel d'agarose pour les nano-sphères.*

Estimation des perméabilités hydrauliques à partir de la littérature :

Nous avons supposé que les valeurs de perméabilité hydrauliques dépendaient de la longueur de corrélation des gels. La longueur de corrélation théorique (ou rayon transversal des canaux) dépend de la concentration d'agarose :

$$\langle \xi_{theo} \rangle (nm) = \frac{77}{0.015^{-0.76}} \, \phi^{-0.76} \tag{4.48}$$

Cette formule *ad hoc* a été déterminée en prenant en compte la forme fonctionnelle de Nath et al. $\phi^{-0.76}$ [**nath_dynamics_2018**] et les valeurs tabulées dans les travaux de N. Fatin-Rouge ($\langle \xi \rangle = 77$ nm pour $\phi_v = 0.015$ [145]) et celles de T. K. Attwood et al. ($\langle \xi \rangle = 37$ nm pour $\phi_v = 0.04$ [144]). Nous pouvons noter que les valeurs expérimentales obtenues doivent dépendre des conditions de fabrication des gels.

En prenant comme référence les travaux de E. M. Johnson et al. [158], nous avons alors tracé la racine carrée des valeurs de perméabilité hydrauliques expérimentales de la référence [158] qui considère une différence de pression nulle ($\sqrt{k_0}$) en fonction de la longueur de corrélation théorique estimée des gels $\langle \xi_{theo} \rangle$ de la formule 4.48.

Dans la Figure.4.19, nous obtenons une variation linéaire que nous avons ajusté par une droite d'équation :

$$\sqrt{k_{0,theo}}(nm) = 0.5 \, \langle \xi_{theo} \rangle (nm) - 8 \tag{4.49}$$

A partir de cette équation, les valeurs de $\langle \xi_{theo} \rangle$ et $\sqrt{k_{0,theo}}$ que nous utiliserons sont regroupées dans le tableau 4.2.

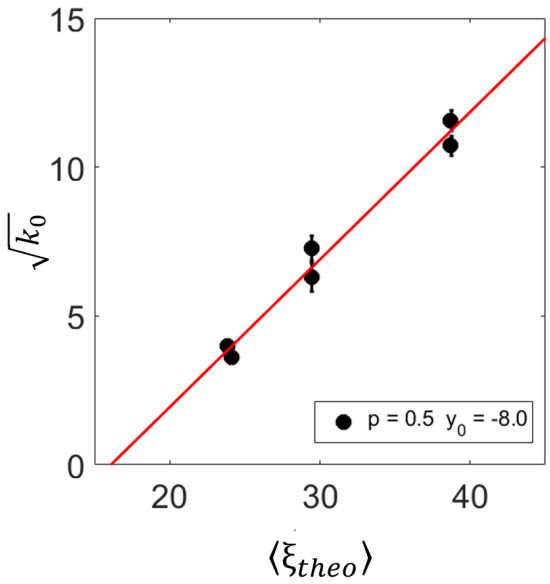

Figure 4.19 : *Ajustement des valeurs de perméabilités hydrauliques expérimentales en fonction de la longueur de corrélation théorique des gels.*

Concentration des gels (%m)	$\langle \xi_{theo} \rangle$ (nm)	$\sqrt{k_{0,theo}}$ (nm)
0.3	216	100
0.4	179	82
0.6	138	561
1	100	42
1.5	77	31
2	64	24

Table 4.2 : *Taille des canaux présents dans les gels et valeurs théoriques de perméabilités hydrauliques en fonction de la concentration des gels.*

Comparaison des valeurs de viscosités locales expérimentales avec les modèles macroscopiques :

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux valeurs de viscosités *in situ* locales. Pour cela, nous avons superposé la courbe théorique donnant les effets hydrodynamiques, F (Equations 4.19 et 4.30) sur les valeurs expérimentales de viscosités *in situ* η_α en prenant en compte les valeurs de perméabilités hydrauliques théoriques que nous avons estimées précédemment.

La courbe théorique tracée sur la Figure.4.20 correspond à l'équation suivante :

$$\eta_\alpha^{theo} = \frac{\eta_\infty}{F} \quad \text{avec} \quad \eta_\infty = \frac{k_B T}{6\pi R D_\infty} \tag{4.50}$$

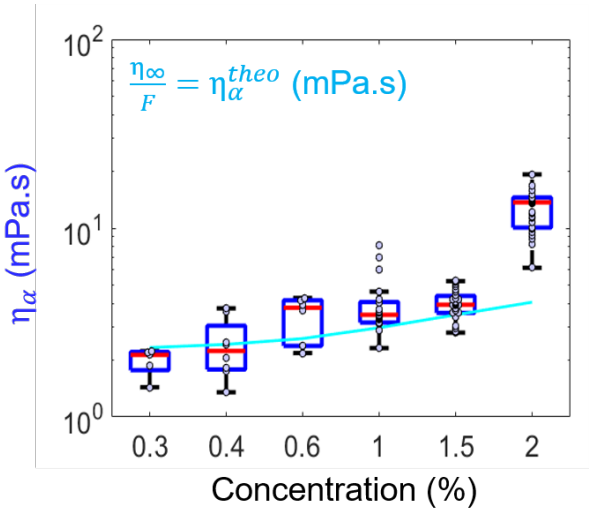

Figure 4.20 : *Evolution de la viscosité in situ η_α en fonction de la concentration en gel d'agarose pour les nano-sphères. Les viscosités in situ sont modélisées par les équations 4.30*

où η_∞ correspond à la viscosité intrinsèque des gels d'agarose qui devrait être égale à la viscosité du fluide utilisé pour fabriquer les gels. La viscosité de nos solutions contenant 0.1% de DOC a été préalablement mesurée à partir de la diffusion libre des nanotubes dans la solution et vaut $\eta_\infty = 1.5 \pm 0.7$ mPa.s. Nous pouvons voir sur la Figure.4.20 que l'évolution des effets hydrodynamiques théoriques en fonction de la concentration des gels est en accord avec nos points expérimentaux pour des concentrations inférieures à 2%. Pour une concentration de 2%, les valeurs des viscosités *in situ* expérimentales obtenues avec les billes sont supérieures à la valeur théorique.

Cet effet pourrait venir d'effets de piégeage des nano-sphères. En effet, le rapport entre les dimensions des canaux (2 $\xi_{theo} = 128$ nm) et le diamètre des nano-sphères (37 nm) est théoriquement d'environ 3.4. Cependant, ce rapport pourrait varier en raison d'une hétérogénéité des tailles des canaux et du diamètre des nano-sphères.

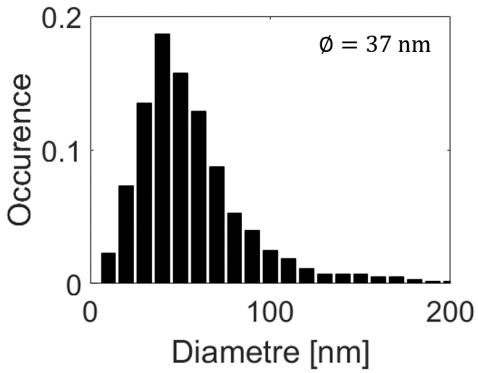

Figure 4.21 : *Histogramme des diamètres des nano-sphères FF8793 mesurés à partir de la diffusion des billes dans l'eau.*

En effet, nous pouvons voir sur la Figure.4.21 que la distribution du diamètre des nano-sphères mesurée à partir de la diffusion des billes dans de l'eau est large. La valeur la plus probable est de 37 nm (valeur prise dans les modèles) mais la médiane vaut 50 $\pm$ 11 nm. Le diamètre médian donné par le fabriquant est de 45 $\pm$ 7 nm.

Ce résultat suggère donc que la viscosité *in situ* calculée est bien reliée au paramètre F décrivant les effets hydrodynamiques dans le modèle de E. M. Johnson et al. lorsque le rapport $R/\sqrt{k}$ est grand.

Nous nous sommes également intéressés aux effets d'obstruction (S) induits par la tortuosité. A partir de l'équation 4.29 et de l'équation 4.50, nous pouvons écrire :

$$S = \frac{\eta_\alpha}{\eta_{Lin}} \tag{4.51}$$

Nous avons donc tracé les valeurs expérimentales de ce rapport en fonction de la concentration des gels (cf. Figure.4.22).

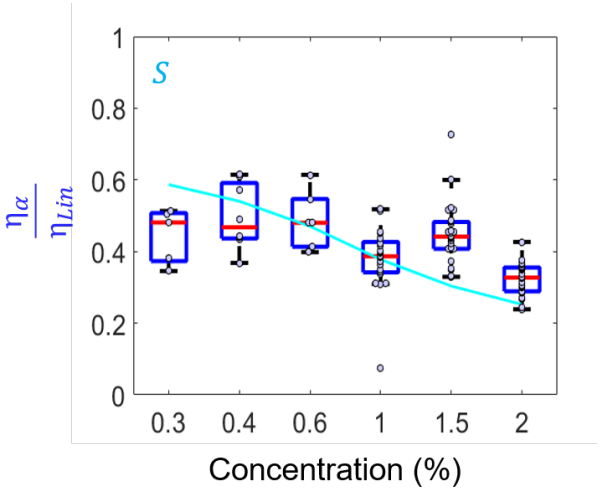

Figure 4.22 : *Evolution des effets d'obstruction pour les nano-sphères en fonction de la concentration des gels. La courbe de couleur cyan correspond à la courbe théorique dans le modèle d'Ogstön.*

Pour modéliser S, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'Ogstön car : 1) ce modèle ne dépend pas de paramètres numériques, 2) la dépendance des effets d'obstruction en fonction de la concentration est plus faible pour le modèle d'Ogstön ($S \propto exp\,(\phi^{0.5})$) que pour celui de Johnson ($S \propto exp\,(\phi)$) ce qui se rapproche le plus de nos expériences.

Nous pouvons voir, comme attendu, que les effets d'obstruction $\left(\frac{1}{S}\right)$ augmentent quand la concentration des gels augmente. Même si la courbe théorique (en cyan) ne reproduit pas fidèlement nos résultats expérimentaux, nous pouvons tout de même observer la même tendance et surtout la valeur moyenne de $S \sim 0.5$ qui reproduit bien nos observations.

Nous avons finalement tracé les viscosités linéaires théoriques combinant les effets d'obstruction du modèle d'Ogstön et les effets hydrodynamiques du modèle de Jonhson et al. (cf. Figure.4.23) pour les comparer aux mesures expérimentales de η_{Lin}. Théoriquement, la viscosité linéaire peut se ré-écrire comme suit :

$$\eta_{Lin}^{theo} = \frac{\eta_\infty}{F \cdot S} \tag{4.52}$$

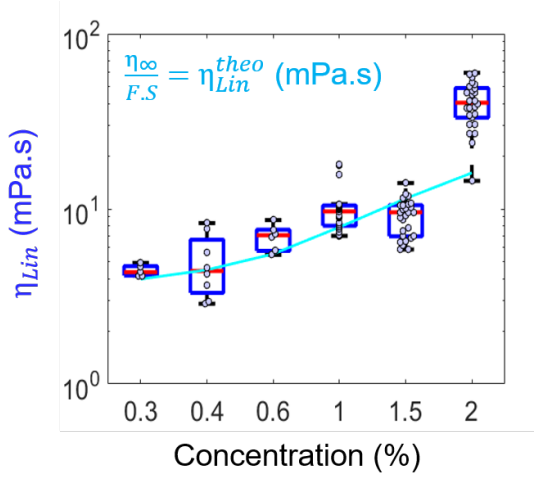

Figure 4.23 : *Evolution de la viscosité linéaire η_{Lin} en fonction de la concentration en gel d'agarose pour les nano-sphères. Les viscosités linéaires sont modélisées par l'équation 4.52*

Nous pouvons voir sur la Figure.4.23 que la courbe théorique des valeurs de viscosités linéaires ainsi définie reproduit bien les données expérimentales pour des concentration inférieures à 2%.

Nous avons donc considéré par la suite que le modèle d'Ogstön était pertinent pour modéliser les effets de tortuosité dans nos expériences. La tortuosité géométrique pourrait être définie comme étant égale à $\sqrt{1/S}$. Ce résultat vient valider la méthodologie développée dans ce chapitre pour extraire le paramètre de complexité local et les viscosités *in situ* locales.

4.4.2.2 Evolution des viscosités locales déterminées par l'utilisation de nanotubes

Nous avons procédé de la même manière avec les nanotubes. Nous avons tracé les viscosités linéaires et *in situ* obtenues avec la diffusion des nanotubes (cf. Figure.4.24).

Nous avons considéré que les nanotubes étaient rigides et que leur rayon hydrodynamique correspondait à celui d'ellipsoïdes [149] de grand rapport d'aspect. Quand $L/d \gg 1$, $R_h = \sqrt{\pi L d/4}$. Le rayon moyen expérimental calculé à partir de cette équation était de 33 nm.

Comme avec les nano-sphères, nous avons superposé les courbes théoriques sur les valeurs

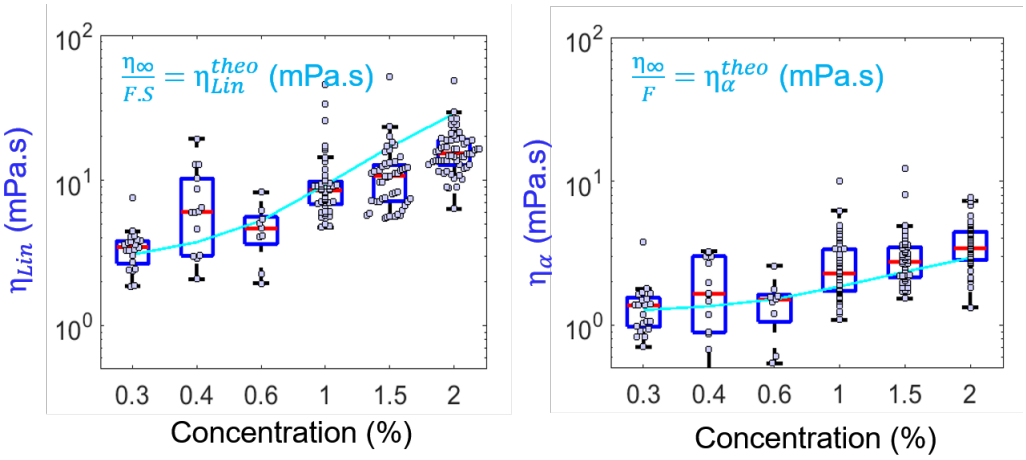

Figure 4.24 : *Evolution de la viscosité linéaire η_{Lin} et in situ η_α en fonction de la concentration en gel d'agarose pour les nanotubes. Les viscosités linéaires et in situ sont modélisées par les équations 4.52 et 4.50.*

expérimentales des viscosités *in situ*. Les courbes théoriques reproduisent remarquablement bien les données expérimentales obtenues à partir de l'analyse de la diffusion "anormale" instantanée sur toute l'échelle de concentrations des gels à la différence des nano-sphères qui pouvaient être piégées dans les gels les plus concentrés.

Nous avons également tracé l'évolution des effets d'obstruction en fonction de la concentration (cf. Figure.4.25).

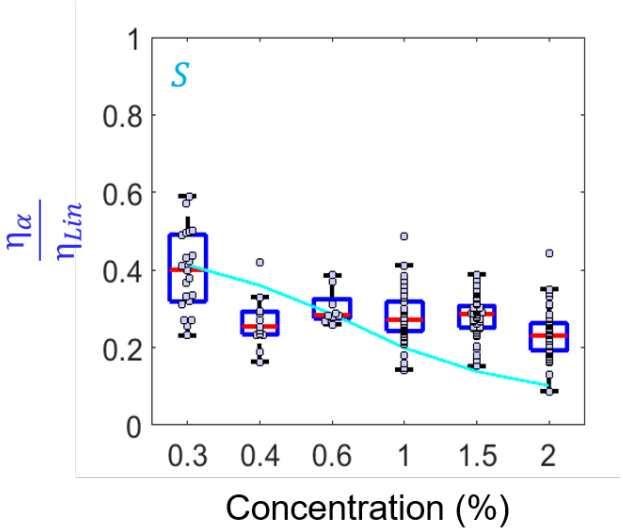

Figure 4.25 : *Evolution des effets d'obstruction en fonction de la concentration en gel d'agarose. La courbe cyan correspond au modèle d'Ogstön.*

Nous pouvons voir sur la Figure.4.25 que les effets d'obstruction augmentent quand la concentration augmente comme dans le cas des nano-sphères. La tendance de la courbe

théorique du modèle d'Ogstön reproduisent raisonnablement bien les données expérimentales. En conclusion, cette étude indique que les nanotubes accèdent effectivement à des espaces plus confinés que les nano-sphères et que leur diffusion est moins affectée par les effets de tortuosité ($S_{NT} < S_{nano-sphère}$) grâce à leur plus petits diamètres.

Remarque sur les déviations standards du paramètre de complexité α et de la viscosité in situ η_α :

Pour chaque trajectoire, la déviation standard du paramètre de complexité (α) et des viscosités *in situ* locales pourrait nous permettre de mesurer les hétérogénéités de structures et/ou de viscosité intrinsèque au sein de la trajectoire. Comme pour les applications biologiques, nous utiliserons uniquement la diffusion des nanotubes de carbone pour leur meilleure accessibilité (et propriétés de photoluminescence dans le proche infra-rouge), nous nous sommes intéressés principalement aux déviations standards obtenues avec les nanotubes.

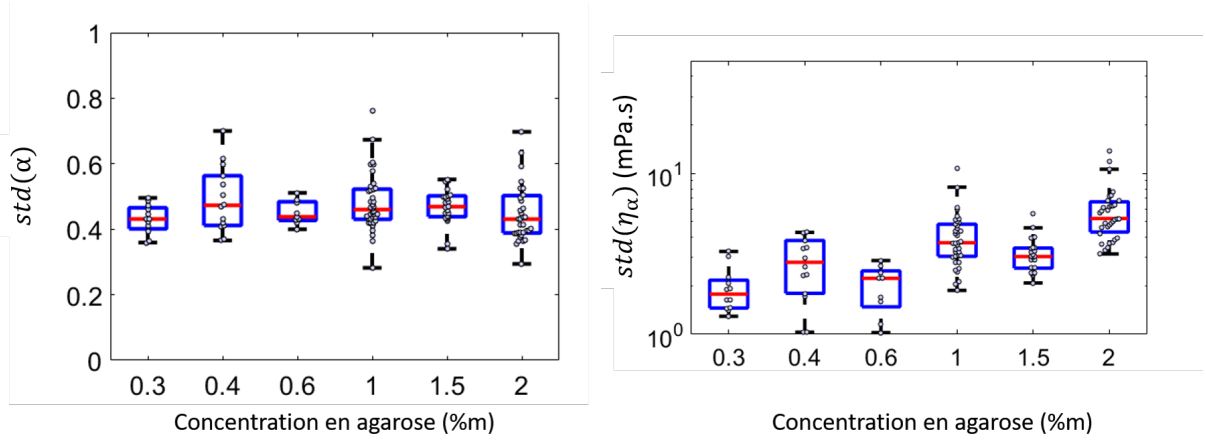

Figure 4.26 : *Déviation standard des paramètres α et des viscosités in situ obtenus avec la diffusion des nanotubes.*

Nous pouvons voir sur la Figure.4.26 que la déviation standard médiane du paramètre α est relativement constante et vaut 0.45. Elle peut néanmoins dépendre fortement des trajectoires considérée (interaction non-spécifique résiduelle nanotube-gel). La déviation standard des viscosités *in situ* varie quant à elle en fonction de la concentration. Sa valeur moyenne est de 5 mPa.s et sa valeur maximale est de 10 mPa.s pour un gel à 2%.

En comparant l'amplitude des distributions des valeurs de viscosités (cf. Figure.4.24) et de α (cf. Figure.4.17) et l'amplitude de la distribution de leur déviation standard (cf. Figure.4.26), nous pouvons voir que les amplitudes des distributions sont comparables ce qui suggère que l'ensemble des valeurs mesurées vérifient l'hypothèse ergodique.

Nous pouvons également noter que dans le cas des nano-sphères : 1) les déviations standards du paramètre de complexité local en fonction de la concentration ne sont pas constantes, 2) le nombre de points par trajectoire est plus faible. Ces deux informations nous ont également conforté dans notre choix d'utiliser les nanotubes de carbone pour sonder l'espace

extra-cellulaire de tranches de cerveaux.

4.4.2.3 Estimation de la viscosité intrinsèque du fluide contenu dans les gels

A partir de l'équation 4.50 de la page 112, nous pouvons calculer les viscosités intrinsèques du fluide contenu dans les gels. Pour les calculer, nous avons pris en compte ici les dimensions caractéristiques moyennes des interstices des gels estimées dans la Section 4.4.2.

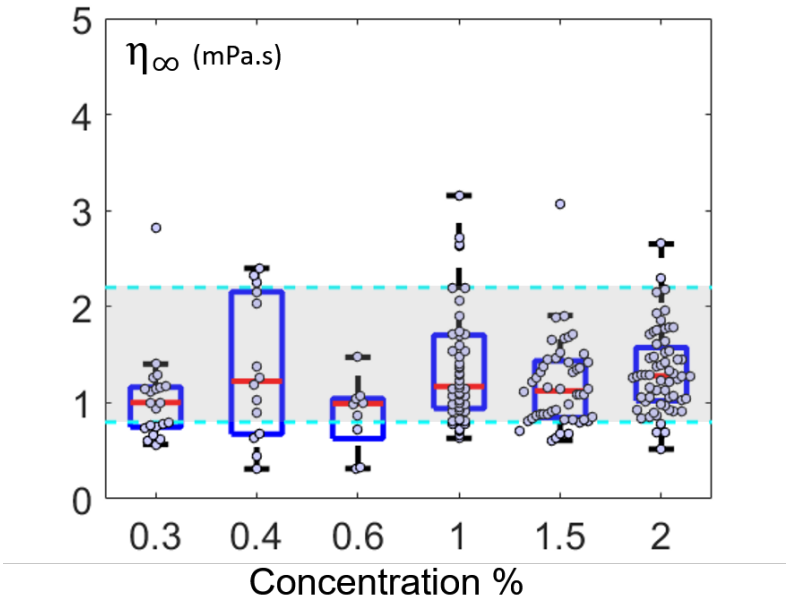

Figure 4.27 : *Viscosités intrinsèques du fluide contenu dans les gels obtenues à partir de la diffusion des nanotubes. Les lignes pointillées (cyan) correspondent à la viscosité des solutions de DOC :* $\eta_{\infty,0} = 1.5 \pm 0.7$ *mPa.s.*

Nous pouvons voir sur la Figure.4.27 que, comme attendu, la viscosité intrinsèque locale du fluide mesurée au sein des gels d'agarose varie peu en fonction de la concentration des gels. La zone grisée correspond à la viscosité des solutions de DOC ($\eta_{\infty,0} = 1.5 \pm 0.7$ mPa.s.) utilisés pour fabriquer les gels et mesurée à partir de la diffusion des nanotubes en absence de gel. Au vu des incertitudes de mesures, nous pouvons considérer que les valeurs des viscosités intrinsèques η_∞ obtenues dans les gels sont cohérentes avec celle obtenue dans du DOC en absence de gel. La dispersion des points pourrait venir de l'hétérogénéité des tailles de canaux ainsi que d'un effet de température. En effet, lors des expériences, la température pouvait varier entre 21°C et 25°C en fonction des échantillons.

En conclusion, les valeurs numériques des différents paramètres calculées et mesurées à partir de la diffusion des nanotubes dans les gels sont regroupée dans le tableau 4.3.

ϕ (%m)	ξ_{theo} (nm)	R_h (nm)	α	η_{Lin} (mPa.s)	η_α (mPa.s)	F	η_∞ (mPa.s)
0	∞	33					1.5 ± 0.7
0.3	260	36	0.87 ± 0.22	3.4	1.4 ± 0.6	0.76 ± 0.02	1.0 ± 0.3
0.4	210	30	0.6 ± 0.22	6.1	1.6 ± 1.0	0.75 ± 0.03	1.2 ± 0.4
0.6	155	40	0.67 ± 0.22	4.7	1.5 ± 0.9	0.59 ± 0.03	0.9 ± 0.2
1	104	32	0.71 ± 0.23	8.5	2.3 ± 1.4	0.52 ± 0.02	1.2 ± 0.4
1.5	77	32	0.63 ± 0.23	10.7	2.7 ± 1.4	0.42 ± 0.02	1.1 ± 0.4
2	62	27	0.54 ± 0.22	15.3	3.4 ± 2.1	0.37 ± 0.02	1.3 ± 0.2

Table 4.3 : *Récapitulatif des valeurs des différents paramètres pris en compte pour calculer la viscosité intrinsèque du fluide contenu dans les gels η_∞.*

Finalement, en connaissant la taille moyenne caractéristique des gels ou toute autre structure complexe (ξ) et à partir de la viscosité intrinsèque du fluide, η_∞, contenu au sein des structures, il est maintenat possible de modéliser la viscosité *in situ*, η_α, qui serait vue par des objets de différentes tailles et en particulier semblables à celle des molécules de l'ECS.

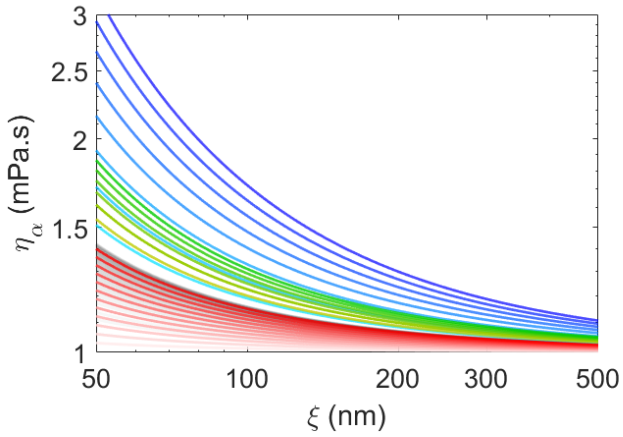

Figure 4.28 : *Viscosités in situ vues par différents nano-objets en fonction des dimensions caractéristiques : molécules de 1 à 10 nm (rouge), nanotubes de 400 à 900 nm de longueur (vert) et billes de 15 à 50 nm de diamètre (bleu) pour $\eta_\infty = 1$ mPa.s.*

La Figure.4.28 montre la viscosité *in situ* qui serait vue par des molécules sphériques dont le diamètre varie entre 1 nm et 10 nm (rouge), des nanotubes de 1 nm de diamètre et de longueur variant entre 400 nm et 900 nm (vert) et des billes de diamètre variant entre 15 nm et 40 nm (bleu) en fonction des dimensions caractéristiques des canaux dans lesquelles elles diffusent.

4.5 Extraction du paramètre de complexité et de la viscosité *in situ* locales au sein de l'espace extra-cellulaire de tissus de cerveaux vivants

Au vu de ces résultats, nous avons donc choisi d'utiliser le modèle de diffusion anormale pour mesurer la complexité et les viscosités locales *in situ* de l'espace extra-cellulaire vues par les nanotubes.

Dans cette partie, nous allons donc : (i) réanalyser les trajectoires de nanotubes de carbone diffusant dans l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats sains ou altérés chimiquement présentées dans le Chapitre 3 et (ii) analyser des données supplémentaires de nanotubes diffusant dans l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de souris sains et altérés dans le cadre d'un modèle de maladie de Parkinson, avec la méthodologie développée dans ce chapitre.

4.5.1 Caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats sains et altérés induites chimiquement

Paramètre de complexité local de l'ECS de tranches de cerveaux de rats sains et altérés chimiquement :

Nous avons présenté dans le Chapitre 3 l'étude de la diffusion de nanotubes pour analyser les dimensions et la viscosité linéaire de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats. Nous avions étudié des cerveaux sains et des cerveaux dont la matrice extra-cellulaire avait été altérée chimiquement *in vivo* par l'introduction d'une enzyme, la hyaluronidase qui digère l'acide hyaluronique. L'analyse du Chapitre 3 ne décorrélait pas les effets de tortuosité et hydrodynamiques et fournissait simplement la viscosité linéaire η_{Lin}. Nous allons maintenant réanalyser ces données avec le protocole présenté dans le début de ce chapitre pour obtenir la complexité et la viscosité *in situ* η_α.

La Figure.4.29 montre ainsi, les paramètres de complexité de l'ECS de cerveaux de rats dans les deux conditions considérées.

Nous pouvons voir que le paramètre de complexité (α) est plus grand pour les cerveaux dont la matrice à été altérée ce qui indiquerait que les mouvements de diffusion des nanotubes sont devenus plus libres. Ce résultat suggère que le degré de complexité de l'ECS altéré est plus faible suite à l'injection de l'enzyme qui a pour propriété de détruire la matrice extra-cellulaire.

De plus, la médiane de la déviation standard du paramètre fractal (std(α) en rouge) suggère qu'au sein d'une même trajectoire, les nanotubes diffusant dans les matrices altérées sondent des zones plus hétérogènes, c'est à dire avec des complexités plus variables que dans

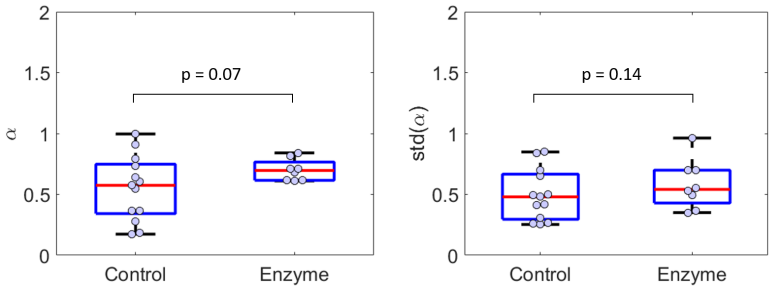

Figure 4.29 : *Paramètre de complexité de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rats sains et altérés chimiquement.*

le cas des matrices saines. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus dans le Chapitre 3 montrant l'apparition d'une deuxième population dans les coefficients de diffusion qui ont indiqué que l'enzyme altérait la matrice de manière locale et non-uniforme (cf. Figure.3.23).

Viscosités locales de l'ECS de tranches de cerveaux de rats sains et altérés chimiquement :

Nous avons ensuite calculé les viscosités linéaires et *in situ* de l'espace extra-cellulaire des tranches de cerveaux (cf. Figure.4.30.A-B). De manière évidente, les viscosités linéaires

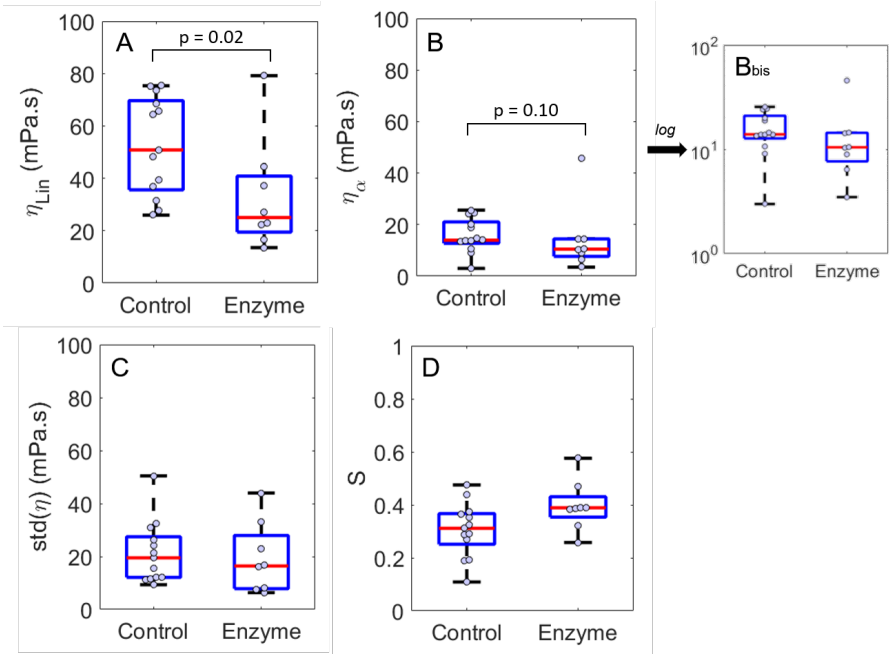

Figure 4.30 : *Distributions des valeurs médianes des viscosités linéaires (A) et in situ représentées en échelle linéaire (B) et en échelle logarithmique (Bbis) locales vues par les nanotubes obtenues chez les rats en fonction de l'altération. C) Déviations standards des viscosités in situ. D) Contributions des effets d'obstruction (S).*

et *in situ* de l'ECS de cerveaux intacts sont plus grandes que celles des matrices altérées ($\eta_{Lin} > \eta_{\alpha}$) dû à une forte tortuosité dans les cerveaux. Les déviations standards des viscosités

in situ au sein de chaque trajectoire (cf. Figure.4.30.C) sont supérieures à $\sim$ 10 mPa.s ce qui est supérieur à la valeur maximale obtenue dans les gels d'agarose. Ces valeurs suggèrent que les dimensions locales et/ou les viscosités intrinsèques locales varient fortement au sein d'une même trajectoire. Notons que les effets d'obstruction (S, cf. Figure.4.30.D) sont plus grands pour les matrices saines que pour les matrices altérées ce qui suggère que la tortuosité géométrique ($\sim \sqrt{1/S}$) est plus grande dans les matrices saines. Comme ce paramètre évolue dans le même sens que le paramètre α, nous choisirons par la suite de ne pas le représenter pour éviter les redondances.

A partir de l'analyse dynamique de la distribution des déplacements au carré (DSD) présentée dans le Chapitre 3, nous connaissons les plus petites dimensions caractéristiques moyennes de l'espace extra-cellulaire pour les matrices saines et altérées. Nous avons donc pu calculer les viscosités intrinsèques (η_∞) de l'espace extra-cellulaire des tranches de cerveaux de rats en faisant l'approximation d'utiliser les valeurs moyennes des dimensions. Les valeurs numériques sont regroupées dans le tableau 4.4.

	ξ (nm)	α	η_{Lin}	η_α	η_∞ mPa.s
Matrices saines	150 ± 40	0.57 ± 0.26	51	14.0 ± 6.6	3.6 ± 0.9
Matrices altérées	270 ± 60	0.70 ± 0.09	25	10.5 ± 13.2	3.5 ± 2.4

Table 4.4 : *Récapitulatif des valeurs numériques prises en compte pour calculer la viscosité intrinsèque (η_∞) du fluide contenu dans l'ECS de cerveaux de rats.*

En supposant que les dimensions locales sont homogènes pour chaque trajectoire considérée, ces résultats suggèrent que les viscosités intrinsèques moyennes de l'espace extra-cellulaire sont similaires pour les matrices saines et altérées. Ils suggèrent également que (i) l'hétérogénéité du paramètre de complexité est plus petite dans les matrices altérées que dans les matrices saines et que (ii) l'hétérogénéité des viscosités intrinsèques est plus grande dans les matrices altérées que dans les matrices saines. Cela pourrait provenir de l'approximation forte d'utiliser une taille moyenne des dimensions de l'ECS qui est plus hétérogène dans le cas des matrices altérées (cf. Figure.4.29 à droite).

L'effet de l'enzyme est donc de réduire la tortuosité moyenne du cerveau et non d'en changer la viscosité intrinsèque moyenne. Le résultat est raisonnable car dans un cerveau sain, l'acide hyaluronique agit comme un réseau et non comme un constituant soluble du fluide de l'ECS. Dans un cerveau altéré chimiquement, les résultats suggèrent que l'acide hyaluronique serait, dans certaines régions, dissout dans le fluide contenu dans l'espace extra-cellulaire. Il n'est pas non plus exclu que d'autres mécanismes entre en jeu dans l'hétérogénéité des

viscosités intrinsèques moyennes.

Ce travail est encore en cours. Il s'agira par la suite de prendre en compte les dimensions caractéristiques *locales* de l'ECS tout au long de la trajectoire et non des valeurs moyennes pour quantifier plus précisément les variations de viscosités intrinsèques. Nous pouvons noter que dans ces expériences et avec le modèle de diffusion anormale, les viscosités intrinsèques obtenues ne sont pas égales à la viscosité du fluide cérébrospinal qui a été estimé à des valeurs étonnamment faibles entre 0.7 mPa.s et 1 mPa.s selon les conditions expérimentales [118] mais sont légèrement supérieures.

4.5.2 Caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de souris sains et dans un modèle de la maladie de Parkinson

Nous avons récemment utilisé la même méthode pour étudier les caractéristiques de l'espace extra-cellulaire du cerveau dans un autre système, à savoir, des souris saines et des souris servant de modèle de maladie de Parkinson. Nous ne rentrerons pas dans les détails de cette nouvelle expérience, mais nous en donnerons les grandes lignes pour nous concentrer sur les analyses à partir du protocole décrit dans ce chapitre.

Protocole expérimental :

Pour ces expériences, nous avons utilisé 16 souris mâles C57BL/6J (Charles River), agées de 10 semaines. Les expériences ont été approuvées par l'instance "Animal Care and Use Commitee" de l'Université de Bordeaux/CNRS (Licence APAFIS : 5520-2016052514328805"). Les expériences ont été conduites avec Chiara Paviolo, post-doctorante dans le groupe et en collaboration avec le groupe de E. Bezard et plus particulièrement avec Fédérico Soria, post-doctorant au sein de l'Institut des Maladies Neurodégénératives (CNRS UMR 5293, Bordeaux, France). La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative qui serait induite par une forme mal-repliée d'alpha-synucléine. La forme "normale" de cette protéine n'induirait pas de dégradation de la matrice extra-cellulaire.

Nous avons choisi dans cette thèse de ne pas décrire en détail les protocoles de préparation des échantillons qui ont été réalisés par F. Soria. Cependant, nous pouvons considérer schématiquement que nous étudions les propriétés rhéologiques de cerveaux de souris dans trois conditions physiopathologiques : des cerveaux sains (Contrôle), des cerveaux dans lesquels nous avons injecté une forme normale de l'alpha-synucléine (NLB) et des cerveaux dans lesquels nous avons injecté la forme mal-repliée (LB). L'alpha-synucléine normale et mal-repliée ont été prélevées sur des patients atteints de la forme sporadique de la maladie de Parkinson. Les différentes formes ont été purifiées par un gradient de sucrose [171] [172] et soniquées.

Nous avons ensuite injecté les nanotubes dans le ventricule latéral 4 mois après l'inoculation de l'alpha-synucléine. Les souris ont été sacrifiées 2 heures après l'injection des nanotubes par dislocation cervicale et l'imagerie a été réalisée dans des conditions similaires à celles des cerveaux de rats (cf. Section 3.2.1 du Chapitre 3) en ajustant cependant la composition de l'ACF pour les souris.

Paramètre de complexité de l'ECS de cerveaux de souris :

La Figure.4.31 montre les distributions du paramètre de complexité obtenu pour chaque condition.

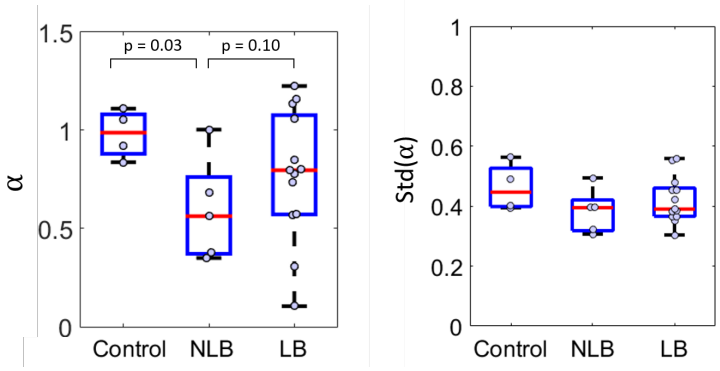

Figure 4.31 : *Paramètre de complexité de l'espace extra-cellulaire de cerveaux de souris en fonction des altérations induites.*

Nous observons que le paramètre de complexité dans les cerveaux sains est de l'ordre de 1 ce qui suggère que les nanotubes ont des mouvements de diffusion quasi-libres. Pour les animaux auxquels on a injecté la forme non-malade de l'alpha-synucléine (NLB), le paramètre de complexité est de l'ordre de 0.58. Notre interprétation est que l'ajout de cette substance induirait une inflammation des tissus et la prolifération des astrocytes ce qui pourrait expliquer que la complexité de l'espace extra-cellulaire ait augmenté. Pour les cerveaux auxquels on a injecté l'alpha-synucléine malade (LB), le paramètre de complexité est légèrement supérieur à celui des NLB. Ce résultat suggère que la complexité des cerveaux malades a diminué en moyenne et cela s'accompagne d'une plus grande hétérogénéité des valeurs de α observés.

Les résultats d'analyses histologiques réalisées par nos collaborateurs de l'IMN, ont suggéré que la forme toxique d'alpha-synucléine activait les microglies du cerveau qui induisait une dégradation de la matrice extra-cellulaire qui se traduirait par une diminution de la complexité. Cette observation serait donc en accord avec les résultats présentés sur la Figure.4.31.

Notons que les médianes des déviations standards du paramètre de complexité (cf. Figure.4.31 à droite et en rouge) pour les cerveaux NLB et LB sont légèrement inférieures à celle des cerveaux contrôle et les écarts sont de l'ordre de ceux obtenus avec les gels d'agarose (cf. Figure.4.26, $std(\alpha) \simeq 0.45$). Ce résultat suggère que les complexités locales vues par les

nanotubes au sein d'une même trajectoire ne sont pas très hétérogènes.

Viscosités de l'ECS de cerveaux de souris en fonction des altérations induites :

Nous avons également mesuré les viscosités linéaires et *in situ* locales dans l'ECS de cerveaux de souris (cf. Figure.4.32).

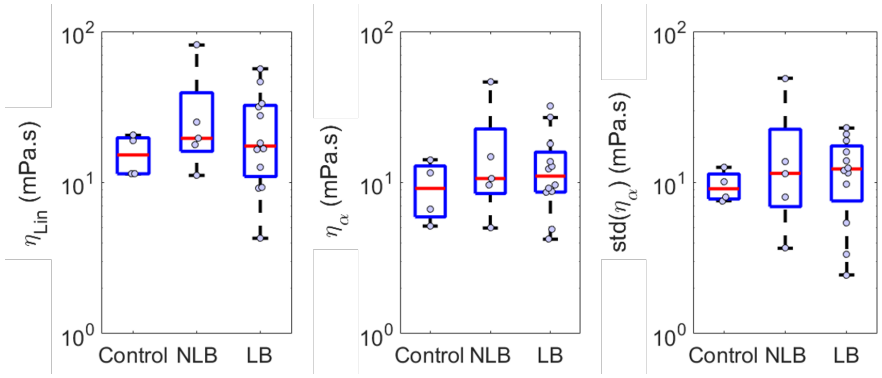

Figure 4.32 : *Distributions des viscosités linéaires et in situ locales vues par les nanotubes obtenues chez les souris en fonction de l'altération.*

Les viscosités linéaires et *in situ* médianes vues par les nanotubes (lignes rouges) sont du même ordre de grandeur quelles que soient les conditions expérimentales mais avec des variabilités beaucoup plus importantes dans les conditions LB et NLB. De plus, les valeurs de viscosités varient plus fortement pour les souris LB. Ces observations recoupent, comme attendu, celles présentées pour le paramètre α. Par ailleurs, la forte hétérogénéité de la viscosité *in situ* dans les conditions NLB et LB est encore plus évidente au sein d'une même trajectoire comme indiqué par l'analyse de la déviation standard ($std(\alpha)$) de la Figure.4.32.

Ces résultats sont encourageants et d'autres expériences sont en cours pour confirmer ces résultats.

4.5.3 Cartes de viscosités *in situ* locales de l'ECS de cerveaux vivants qui seraient vues par des molécules sub-micrométriques de différentes tailles

Au cours de ce chapitre, nous avons vu qu'il était possible de mesurer et analyser la viscosité vue par un nanotube dans un espace complexe η_α et d'extraire la viscosité intrinsèque du fluide qui le compose η_∞. Ceci a été rendu possible car les paramètres de tortuosité et les paramètres hydrodynamiques ont été décorrélés (S et F). Il est donc maintenant possible de générer les cartes de viscosité pour des nano-objets de tailles arbitraire diffusant dans l'ECS de cerveau (neurotransmetteurs, protéines...).

Pour cela, nous avons dans un premier temps généré la carte des paramètres de complexité α locaux à partir de la trajectoire d'un nanotube (cf. Figure.4.33).

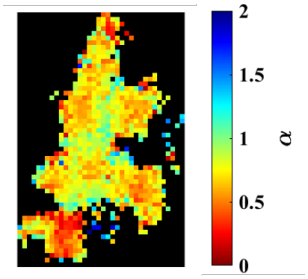

Figure 4.33 : *Exemple de carte représentant le paramètre de complexité au sein de l'ECS d'un rat sain. Les dimensions de cette figure sont de 1.5 μm × 1.7 μm.*

Pour cette trajectoire la valeur médiane du paramètre α local était de 0.71 ± 0.13 ce qui suggère que ce nanotube était la plupart du temps confiné ($\alpha < 0.75$) mais avec de fortes variations locales comme nous pouvons le voir sur la Figure.4.33.

Nous avons ensuite calculé les valeurs médianes des viscosités linéaires, *in situ* et intrinsèque. Pour calculer la viscosité intrinsèque, nous avons supposé que les dimensions caractéristiques *locales* étaient constantes et égale à 150 nm. Les valeurs médianes et les déviations standards pour cette trajectoire sont regroupées dans le tableau 4.5.

	η_{Lin} (mPa.s)	η_{α} (mPa.s)	η_{∞} (mPa.s)
Valeurs médianes	21.3 ± 10.2	9.3 ± 3.2	2.4 ± 0.8

Table 4.5 : *Récapitulatif des valeurs médianes de viscosités locales linéaires, in situ et intrinsèques au sein de l'ECS d'un cerveau de rat sain.*

Afin de rendre compte de l'hétérogénéité locale des propriétés de l'espace extra-cellulaire de cerveaux, nous avons ensuite représentée les cartes de viscosités linéaires et *in situ* locales (cf. Figure.4.34.A-B). Comme attendu, les valeurs de viscosités *in situ* locales sont nettement plus faibles que les viscosités linéaires.

La Figure.4.35.A montre maintenant la carte des viscosités locales intrinsèques η_{∞} en considérant que les dimensions caractéristiques locales sont constantes, et les Figure.4.35.B-D montrent des cartes de viscosités *in situ* locales qui seraient vues par des molécules de 5 nm, 20 nm et 40 nm de diamètre. L'échelle de couleur sur la Figure.4.35 est 10 fois plus petite que celle de la Figure.4.34. Comme attendu, plus la tailles des molécules augmente, plus les viscosités *in situ* locales augmentent. Cette méthodologie pourrait ainsi s'avérer très prometteuse pour étudier les propriétés de diffusion des différents constituants de l'ECS du cerveau.

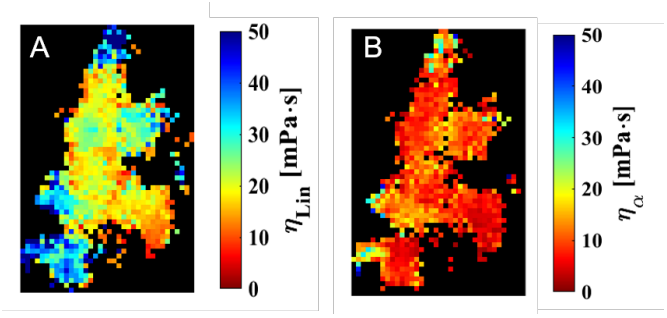

Figure 4.34 : *Exemple de cartes montrant les viscosités locales linéaires, in situ et intrinsèques de l'ECS d'un cerveau de rat sain. Les dimensions de chaque carte sont de 1.5 μm × 1.7 μm.*

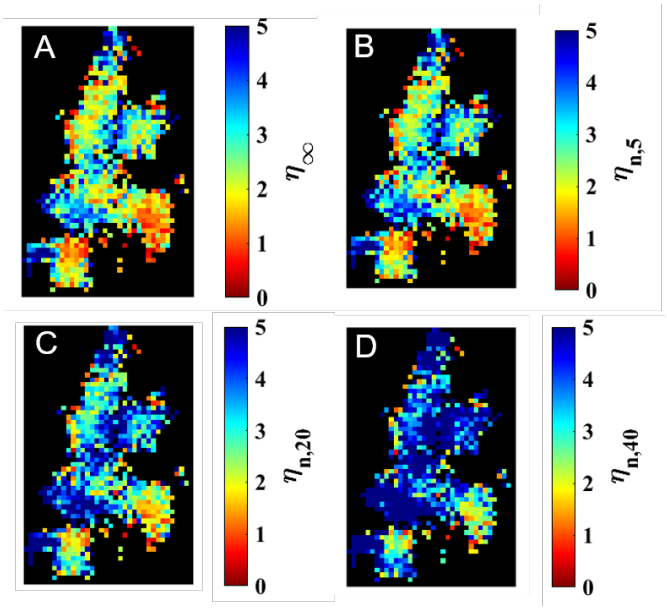

Figure 4.35 : *Exemple de cartes montrant les viscosités locales in situ de l'ECS d'un cerveau de rat sain qui seraient vues par des molécules de 5 nm, 20 nm et 40 nm de diamètre. Les dimensions de chaque carte sont de 1.5 μm × 1.7 μm.*

Remarquons que pour aller plus loin dans l'analyse fine des viscosités vues par des molécules de tailles arbitraires, il nous faudra utiliser les dimensions caractéristiques *locales* de l'ECS. Ceci sera possible grâce aux cartes super-résolues présentées au Chapitre 3.

Quelques pistes pour aller plus loin :

La principale limite du modèle développé dans ce chapitre est que les valeurs des α sont dégénérées pour des concentrations en gel variant de 0.4% à 1%, c'est à dire lorsque le nanotube fait des mouvements de reptation ($\alpha = 0.75$). Cette dégénérescence ne nous permet pas de mesurer les dimensions locales caractéristiques avec ce modèle dans le régime de reptation. Pour pallier à ce problème, il pourrait être intéressant d'utiliser les valeurs de α en

fonction de du rapport $\frac{L}{\xi}$ pour lever la dégénérescence et/ou d'utiliser la diffusion rotationnelle des nanotubes dans le régime de Doi.

Il pourrait également être intéressant d'utiliser les valeurs de α négatives qui pourraient correspondre au cas où les nanotubes reviennent sur leurs pas sur les échelles de temps considérés ($\sim$ 300 ms) pour révéler les cul-de-sacs rencontrés par le nanotube (cf. Figure.4.36).

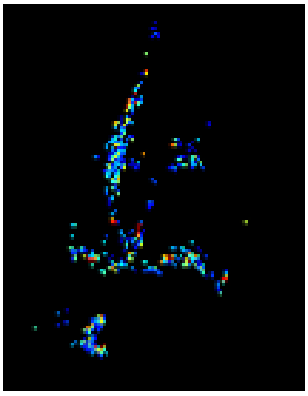

Figure 4.36 : *Exemple de carte montrant les sites où le paramètre α est négatif. Les dimensions de cette carte sont de 1.5 μm × 1.7 μm.*

Résumé de la procédure pour extraire les paramètres rhéologiques

Pour mesurer les paramètres rhéologiques des milieux complexes, nous nous sommes servis du modèle de diffusion anormal des nano-objets. Dans ce modèle, le déplacement quadratique moyen (MSD) est sub-linéaire en fonction de l'intervalle de temps τ et peut être ajusté par la forme fonctionnelle τ^{α}.

Pour calculer les paramètres rhéologiques sur des intervalles de temps courts et donc localement, la première étape consiste à extraire le paramètre de complexité α grâce à l'équation 4.47. Connaissant α, il est maintenant possible de calculer la viscosité *in situ*, η_{α} grâce à l'équation 4.43. Cette viscosité *in situ* contient les effets hydrodynamiques F (Equation 4.30) et les effets visqueux, η_{∞}. Elle dépend du rayon hydrodynamique des nano-objets ($R_h = \sqrt{\pi L d/4}$ pour les nanotubes) et des dimensions locales ξ. A partir de la connaissance de ξ mesuré dans le Chapitre 3 à l'aide de l'analyse dynamique des DSD (Equation 3.3), nous pouvons estimer les effets hydrodynamiques F et calculer la viscosité intrinsèque du fluide contenu dans les canaux présents dans les réseaux (Equation 4.50).

4.6 Bilan du Chapitre 4

Nous avons exposé dans ce Chapitre différents modèles de diffusions de nano-objets de forme sphérique et cylindrique dans des fluides homogènes et dans les espaces encombrés

comme les gels d'agarose et l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rongeurs.

Nous avons vu dans un premier temps que la diffusion des nanotubes dans un fluide homogène pouvait être modélisé par celle d'objets cylindriques. Pour des nanotubes considérés comme rigides et de grands rapports d'aspect, les modèles de diffusion couramment utilisés dans la littérature convergent avec des écarts relatifs inférieurs à 10%. Nous avons utilisé ici le modèle de Perrin et al. dont la forme fonctionnelle est la plus simple.

Nous avons également vu que les nanotubes peuvent se mouvoir dans les espaces encombrés même si leurs dimensions caractéristiques locales sont inférieures à la longueur des nanotubes.

Dans le Chapitre précédent, nous avions mesuré la viscosité linéaire de l'ECS de cerveaux de rats. Comme nous l'avons vu, cette viscosité dépendrait de la viscosité intrinsèque du fluide contenu entre les obstacles mais aussi de la densité d'obstacle rencontrés. Pour décorréler les effets dus aux obstacles (augmentation du chemin pris par les molécules pour contourner les obstacles) et les effets dus à la viscosité, nous nous sommes servis du modèle de diffusion "anormale".

Ce modèle nous a permis de mesurer le paramètre de complexité (α) et la viscosité *in situ* des milieux vue par les nanotubes. En comparant les résultats expérimentaux obtenus à partir de la diffusion de billes et de nanotubes dans les gels d'agarose et les modèles de diffusion déjà existants dans la littérature, nous avons conclu que la viscosité *in situ* pourrait être modélisée par la contribution des forces visqueuses décrites dans le modèle de Johnson et al. [158]. Ce modèle de diffusion macroscopique permet de séparer la contribution hydrodynamique et la contribution stérique (tortuosité) dans les coefficients de diffusion des nano-objets.

A partir des résultats obtenus pour les viscosités linéaires et *in situ*, nous avons vu que dans notre cas, les effets stériques pouvaient être modélisés par le modèle d'Ogstön [148]. Cette observation a suggéré que le modèle de diffusion "anormale" des nano-objets dans les espaces encombrés permettait de s'affranchir de l'augmentation de chemin pris par les objets dû à la présence des obstacles.

Nous avons ensuite appliqué l'analyse dynamique de la diffusion "anormale" des nanotubes à l'espace extra-cellulaire de cerveaux de rongeurs intacts. Ce travail est encore en cours et les résultats numériques sont susceptibles d'être affinés. De manière générale, nous avons vu que lorsque la matrice extra-cellulaire est dégradée chimiquement ou pathologiquement, le paramètre de complexité moyen variait tandis que la viscosité *in situ* moyenne vue par les nanotubes n'était pas significativement différente. Cependant, les déviations standards des viscosités sont très grandes ce qui montrerait que les propriétés rhéologiques locales sont très hétérogènes.

En connaissant les dimensions caractéristiques locales moyennes au sein de chaque trajectoire, nous avons modélisé la viscosité *in situ* locale qui serait vue par des molécules de tailles

($\leq$ 10 nm) semblables à celles de neuro-transmetteurs ou autres molécules de l'ECS.

Il pourrait être intéressant, par la suite, d'utiliser des nanotubes dont le rayon hydrodynamique est similaire à celui de petites molécules. De cette façon, les viscosités *in situ* vues par ces nanotubes et celles qui seraient vues par de petites molécules seraient similaires. Il faudrait pour cela disposer de nanotubes de carbone photoluminescents ultra-courts. Cela fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 5

Génération de nanotubes de carbone ultra-courts luminescents par localisations des excitons

L'utilisation de nanotubes ultra-courts ($L < 100$ nm) dont la taille s'approche de celle des molécules de l'ECS pourrait être très utile pour mesurer les propriétés rhéologiques locales en complément des études présentées dans les chapitres précédents. Cependant, nous allons voir que de tels nanotubes ultra-courts ne sont pas intrinsèquement photoluminescents car ils seraient alors plus petits que la longueur de diffusion des excitons ($L_e \sim 100$ nm).

Nous allons présenter dans ce chapitre comment nous avons pu générer pour la première fois des nanotubes ultra-courts photoluminescents. Cette stratégie est basée sur l'introduction de défauts luminescents agissant comme des centres émetteurs localisés. Nous présenterons également une étude au niveau du tube individuel utilisant la microscopie de super-résolution pour révéler la position de localisation des excitons sur ces sites émetteurs avec des résolutions sub-longueur d'onde.

5.1 Etat de l'art

5.1.1 Photoluminescence des nanotubes en fonction de leur longueur

Le taux de luminescence des nanotubes dépend entre autres de la durée de vie des excitons qui peut être affectée par la présence de défauts de structure [52] ou d'impuretés introduites lors de la synthèse des nanotubes. Les bouts des nanotubes sont en général particulièrement riches en défauts luminescents générés par exemple lors des étapes de sonication pour les encapsuler. Les nanotubes que nous étudions sont ainsi en général des nanotubes dont les extrémités sont "ouvertes" [56]. En étudiant l'intensité de photoluminescence de solutions de nanotubes triés par longueur, T. Hertel et al. ont montré que plus la longueur des nanotubes diminuait plus le rendement quantique et donc la luminescence diminuait [66] (cf. Figure.5.1.A). Ce résultat a suggéré que les bouts des nanotubes possédaient bien des défauts de structure qui induisent une recombinaison non-radiative des excitons limitant fortement l'intensité de photoluminescence. Nous pouvons noter qu'aucune mesure de luminescence n'a été réalisée pour des nanotubes de longueur inférieure à 200 nm (cf. Figure.5.1.A).

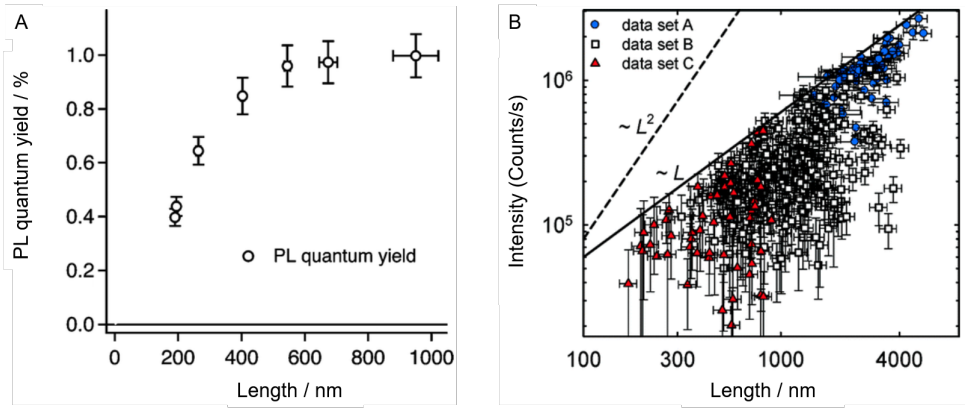

Figure 5.1 : *A) Efficacité quantique de solutions de nanotubes suspendus en fonction de leur longueur, B) Intensité de photoluminescence de nanotubes de carbone individuels en fonction de leur longueur. Figures reproduites des références [66] et [173]*

Une étude reportant un résultat similaire a également été réalisée sur des nanotubes individuels et a montré que l'intensité maximale de photoluminescence était linéaire avec la longueur des nanotubes [173] (cf. Figure.5.1.B).

En combinant l'imagerie par absorption modulée et l'imagerie de fluorescence, Laura Oudjedi et al. ont montré au sein de notre groupe que la longueur des nanotubes mesurée sur les images d'absorption était plus grande que celle mesurée sur les images de fluorescence [47] (cf. Figure.5.2). La différence entre ces deux mesures provient de la longueur de diffusion des

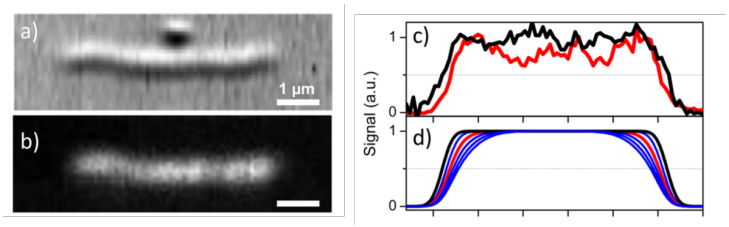

Figure 5.2 : *A) Image d'un nanotube individuel obtenue par microscopie confocale d'absorption modulée, B) Image du même nanotube obtenue par microscopie confocale de fluorescence, C) Profils d'intensité correspondants à l'image par absorption modulée (noir) et fluorescence (rouge), D) Profils d'intensité simulés prenant en compte la longueur de diffusion des excitons L_e. La ligne rouge correspond au meilleur ajustement avec $L_e = 120$ nm. Figure reproduite de la référence [47].*

excitons L_e : sur une distance égale à la longueur de diffusion des excitons, les bouts des nanotubes ne sont pas visibles par microscopie de fluorescence. Ce résultat est en accord avec l'absence de mesures d'intensité de photoluminescence pour des nanotubes de longueur inférieure à 200 nm dans les études précédentes. De ce fait, un nanotube ultra-court de longueur inférieure ou égale à $\sim L_e$ ne sera pas intrinsèquement luminescent. Nous allons voir que si nous sommes capables de piéger les excitons sur des sites localisés situés sur les parois des nanotubes, nous pourrons rendre luminescents les nanotubes ultra-courts.

5.1.2 Défauts luminescents dans les nanotubes de carbone

Récemment, il y a eu un fort engouement pour la génération de sites de luminescence localisés sur les nanotubes. L'origine de cette localisation provient de l'introduction de défauts sp^3 le long des nanotubes. Nous pouvons citer les travaux des groupes de R. B. Weisman [92], S. Doorn [174], Y. Miyauchi [175] et Y. Wang [176] qui ont utilisé différentes stratégies comme le dopage par des atomes d'oxygène ou l'ajout de fonctions aryle sur la structure des nanotubes [177] [176]. Ces fonctionnalisations covalentes créent une hybridation sp^3 qui perturbe localement les propriétés électroniques du réseau initialement hybridé sp^2. La fonctionnalisation crée ainsi un état localisé optiquement permis et dont l'énergie de l'exciton "brillant" de plus basse énergie E_{11}^* est inférieure à celle de l'exciton libre d'énergie E_{11} (cf. Figure.5.3.A). La Figure.5.3.A-B montre que l'intensité de photoluminescence des nanotubes fonctionnalisés est nettement augmentée par rapport à celle des nanotubes non-fonctionnalisés et que la longueur d'onde d'émission est décalée vers l'infra-rouge (cf. Figure.5.3.A'-B'). Le décalage en énergie dépend de la chiralité des nanotubes et des fonctions chimiques utilisées [176] [179].

Selon l'hypothèse actuelle, suite à une excitation sur une transition optique permise, un exciton libre est créé. Cet exciton diffuse le long du nanotube. La présence des fonctions chimiques induits une modification des propriétés électroniques locales des nanotubes créant

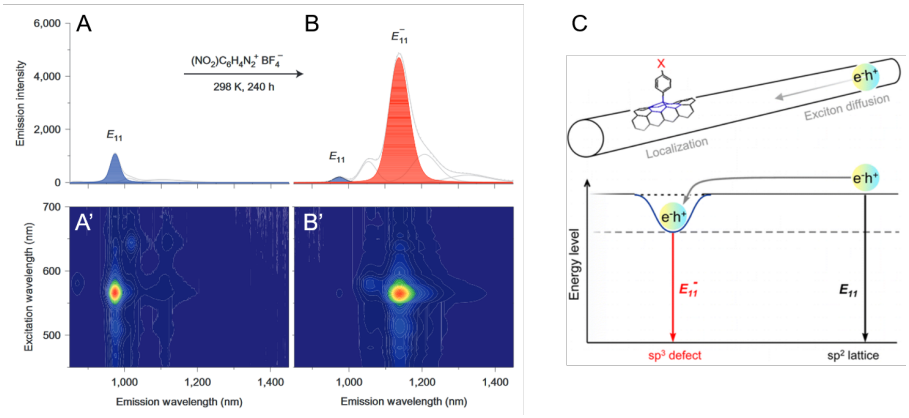

Figure 5.3 : *A) Spectre de photoluminescence et A') Carte d'excitation de la photoluminescence pour des nanotubes non-fonctionnalisés, B) Spectre de photoluminescence et B') Carte d'excitation de la photoluminescence pour les mêmes nanotubes après la fonctionnalisation, C) Modèle de piégeage des excitons E_{11}^* sur les sites de défauts. Figure reproduite des références [176] et [178]*

un puit de potentiel dans lequel l'exciton créé peut se piéger et se re-combiner radiativement en émettant un photon d'énergie E_{11}^*. La Figure.5.3.C résume ce mécanisme.

Dans ce contexte, nous avons postulé que l'introduction de défauts luminescents sur des nanotubes ultra-courts devrait les rendre luminescents. Le travail présenté ici a été réalisé en collaboration avec le groupe de YuHuang Wang (Université du Maryland) pour la partie fonctionnalisation.

5.2 Nanotubes ultra-courts luminescents

5.2.1 Préparation des nanotubes ultra-courts

Les nanotubes utilisés pour cette étude proviennent d'un travail réalisé par Z. Gao en 2015 au sein du groupe et qui visait à étudier les propriétés d'absorption des nanotubes ultra-courts [180].

La poudre de nanotubes (30 mg) a été mélangée à 10 ml de solution d'eau Milli-Q contenant 0.3% de DOC (sodium Deoxycholate). La dispersion des nanotubes dans la solution a été réalisée à l'aide d'une sonication pulsée de type sonde à une puissance de 45 W pendant 5 heures. La durée de l'impulsion était de 0.5 s et le délai entre les impulsions était de 0.2 s. Pour cette étape, le récipient a été placé dans un bain de glace pour limiter l'augmentation de température qui pourrait dégrader le DOC. Après la sonication, l'échantillon a été centrifugé pendant 30 minutes à 3500 r.p.m. (1300 g, Eppendorf Centrifuge 5804 R) pour enlever les agrégats et autres matériaux non-solubles. Le surnageant (9 ml) a été collecté et dilué dans 20 ml d'une solution contenant 0.3% de DOC. Après la dilution, l'échantillon a été centrifugé

deux fois pendant 2 heures à 45000 r.p.m. (184000 g, Beckman Coulter) pour enlever les agrégats et les catalyseurs. Le surnageant a été collecté et les nanotubes ont été triés par longueurs grâce à une ultracentrifugation à gradient de densité.

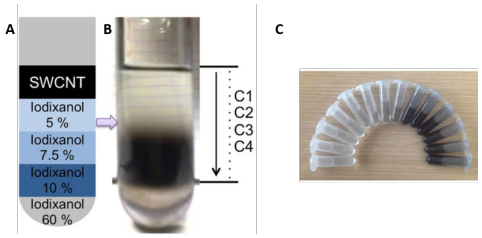

Figure 5.4 : *A) Gradient de densité contenant de l'iodixanol à différentes concentrations, B) Distribution des nanotubes après l'ultracentrifugation à gradient de densité, C) Echantillons des nanotubes triés par longueurs. Figure reproduite de la référence [180]*

Le gradient de densité a été fabriqué à partir de quatre couches successives de solutions contenant 60%, 10%, 7.5% et 5% d'iodixanol (OptiPrep, Sigma-Aldrich). La solution de nanotubes a été déposée sur le gradient de densité et a été centrifugé à 184 000 g pendant 3 heures à une température de 4°C. Après l'ultracentrifugation, les nanotubes de différentes longueurs étaient distribués le long du gradient de densité (cf. Figure.5.4.B). Les nanotubes ont ensuite été délicatement collectés par fraction de 0.9 - 1 ml (cf. Figure.5.4.C). Pour faciliter la conservation et maintenir l'équilibre chimique, la concentration en DOC a été augmentée à 1%. Les échantillons de nanotubes triés ont été stockés à 4°C.

Pour notre étude, nous avons choisi une fraction ayant une longueur médiane inférieure à 50 nm. La distribution des longueurs de ces nanotubes a été mesurée par imagerie AFM (*Atomic Force Microscopy*) sur 88 nanotubes et par imagerie photo-thermique sur 472 nanotubes [180].

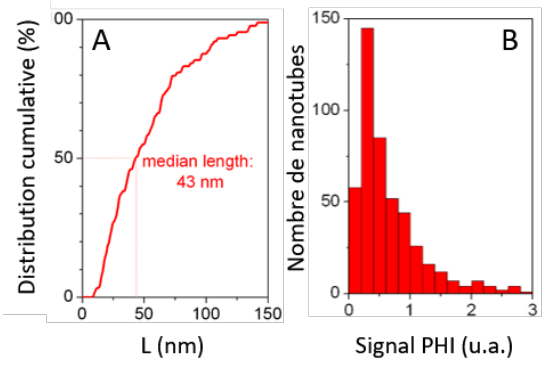

Figure 5.5 : *A) Distribution des longueurs des nanotubes mesurés par AFM, B) Histogramme des signaux obtenus par imagerie photo-thermique (PHI)*

La Figure.5.5.A montre que la longueur médiane des nanotubes était précisément de 43 nm. Le signal photo-thermique (PHI) provenant de nanotubes dispersés est proportionnel à

l'absorption de la lumière par les nanotubes qui est également proportionnelle à la longueur des nanotubes. La distribution du signal PHI sur la Figure.5.5.B indique que la distribution des longueurs est principalement uni-modale (en accord avec les longueurs mesurées par AFM) et donc que les nanotubes sont bien individualisés.

5.2.2 Fonctionnalisation des nanotubes ultra-courts

La fonctionnalisation des nanotubes a été réalisée par Y. Piao et M. Kim, membres de l'équipe de YuHuang Wang basée à l'Université du Maryland.

Les nanotubes sélectionnés précédemment ont été re-suspendus dans une solution contenant 1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) et du D_2O. Ils ont ensuite été fonctionnalisés avec des groupes hexyl perfluorés -$(CF_2)_5CF_3$ [179]. Pour cela, les nanotubes ont été mélangés à 7.6 mM de $NaHCO_3$ (EMD chemicals, HPLC grade) et 0.16%v de CH_3CN (Acros organics, HPLC grade, 99%). Du $Na_2S_2O_4$ (3.6 mM, Sigma Aldrich, 85%) a ensuite été ajouté sous agitation magnétique à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

5.2.3 Photoluminescence des nanotubes ultra-courts

5.2.3.1 Mesures d'ensemble

Les cartes d'excitation de la photoluminescence (PLE) des nanotubes avant et après la fonctionnalisation (cf. Figure.5.6) ont ensuite été réalisées. Les échantillons ont été excités avec une source Xenon (450 W) dispersée par deux réseaux monochromateurs. La largeur des fentes d'excitation et d'émission était de 10 nm. La photoluminescence des solutions de nanotubes a été collectée à l'aide d'un spectro-fluoromètre NanoLog (HORIBA Jobin Yvon) muni d'un détecteur InGaAs refroidi. La carte PLE des nanotubes avant la fonctionnalisation

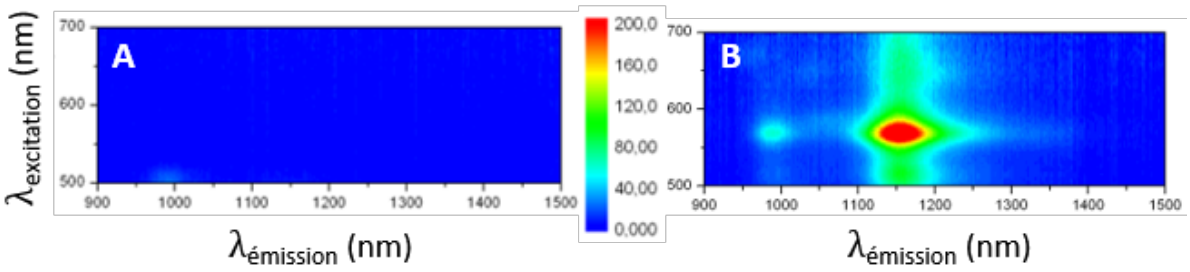

Figure 5.6 : *Cartes PLE des nanotubes usCNT (A) et des nanotubes f-usCNT (B).*

(usCNT, cf. Figure.5.6.A) ne montre pas de signal perceptible comme attendu car la longueur de ces nanotubes ($\sim$ 43 nm) est inférieure à la longueur de diffusion des excitons ($\sim$ 100 nm).

La Figure.5.6.B indique que la fonctionnalisation rend les nanotubes ultra-courts (f-usCNT) photoluminescents avec un pic de photoluminescence principal très intense centré autour de 1160 nm E_{11}^* et un pic secondaire autour de 985 nm E_{11}. Nous chercherons à expliquer l'origine du pic secondaire dans la section.5.2.3.3.

Pour s'assurer que la photoluminescence ne provenait pas des fonctions chimiques ajoutées, nous avons mesuré les spectres d'absorption des nanotubes avant (usCNT) et après la fonctionnalisation (f-usCNT) (cf. Figure.5.7). Les spectres ont été réalisés directement après la préparation des échantillons. Ils ont été enregistrés à l'aide d'un spectro-photomètre Lambda 1050 UV-vis-NIR (Perkin Elmer) équipé d'un tube photomultiplicateur et d'un détecteur InGaAs. Les spectres d'absorption montrent un pic centré autour de 985 nm E_{11} ce qui suggère que la majorité des nanotubes présents dans nos échantillons étaient de chiralité $(6,5)$ et qui confirme que la forte photoluminescence à l'énergie E_{11}^* ne provient pas des fonctions chimiques mais bien des états localisés sur les sites de défauts luminescents dans le modèle de piégeage des excitons (cf. Figure.5.3).

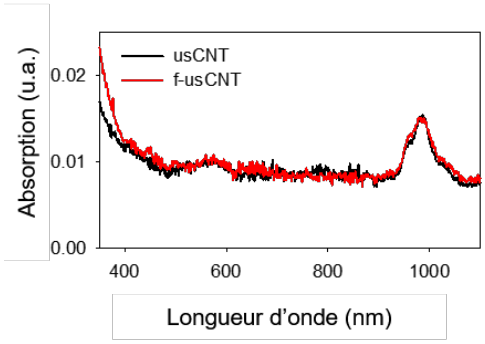

Figure 5.7 : *Spectres d'absorption des nanotubes usCNT (en noir) et f-usCNT (en rouge).*

5.2.3.2 Mesures sur des nanotubes individuels

Pour savoir si la photoluminescence des nanotubes ultra-courts pouvait être détectée à l'échelle du nanotube individuel, nous avons ensuite mesuré les signaux de photoluminescence des nanotubes par microscopie de fluorescence avant et après fonctionnalisation. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un microscope inversé équipé d'un objectif à huile d'ouverture numérique 1.4 et de grossissement X60 (cf. Figure.5.8). Les échantillons de nanotubes non-fonctionnalisés et fonctionnalisés ont été excités en champ large avec un laser continu émettant à 568 nm (Coherent Saphirre) sur la transition S_{22} des nanotubes $(6,5)$ à une intensité d'excitation de 0.5 kW/cm^2. La polarisation du laser était circulaire pour exciter de façon équivalente les nanotubes qui étaient dispersés sur des lamelles de microscope et qui avaient

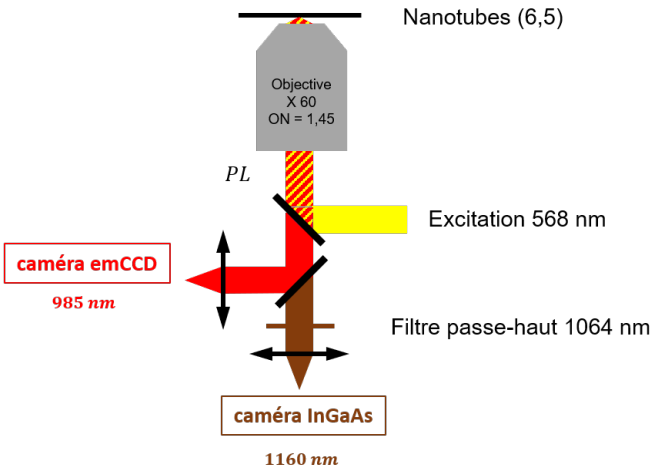

Figure 5.8 : *Montage expérimental de fluorescence utilisé pour caractériser les nanotubes ultra-courts.*

des orientations aléatoires. Les nanotubes non-fonctionnalisés ont été imagés à l'aide d'une caméra visible ProEM CCD (spectre de détection : 300 - 1000 nm). Comme le montre la Figure.5.6, la longueur d'onde de photoluminescence principale des nanotubes fonctionnalisés ($\lambda_{émis} > 1000$ nm) ne peut pas être détectée à l'aide de la caméra visible ProEM CCD. Nous avons donc également utilisé une caméra infra-rouge (XEVA 1.7 320 TE3, spectre de détection : 800 - 1700 nm). Nous avons placé un filtre passe-haut (RazorEdge 1064, Semrock) devant la caméra infra-rouge pour sélectionner uniquement la photoluminescence venant du pic principal E_{11}^{*}. Les deux caméras ont été montées sur deux bras de détection séparés par un cube séparateur 50/50.

La Figure.5.9 montre un exemple typique des signaux obtenus pour les nanotubes non-fonctionnalisés et fonctionnalisés.

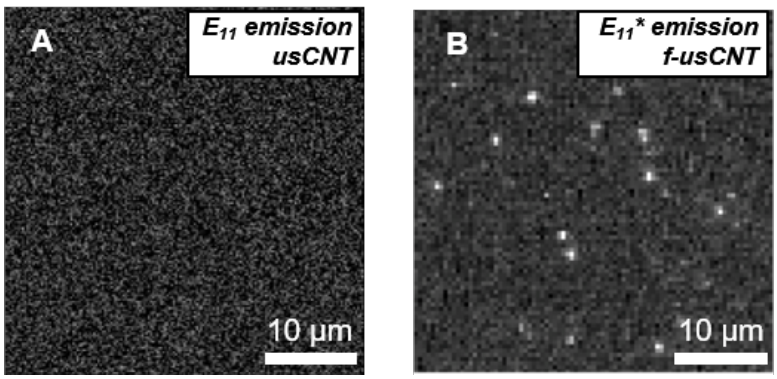

Figure 5.9 : *Images typiques en microscopie de fluorescence de nanotubes usCNT (A) et de nanotubes f-usCNT (B) excités à 568 nm.*

La photoluminescence des nanotubes fonctionnalisés est directement visible à l'échelle individuelle (cf. Figure.5.9.B). Le temps d'intégration utilisé pour imager les nanotubes fonc-

tionnalisés était de 100 ms et de plusieurs secondes pour les nanotubes non-fonctionnalisés.

Nous avons ensuite tracé la distribution des intensités de photoluminescence des nanotubes

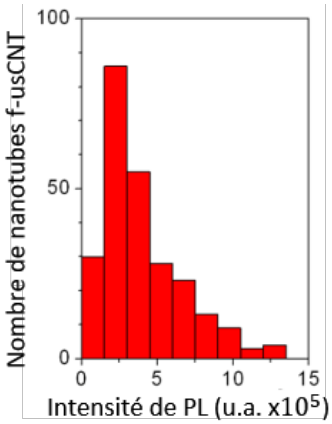

Figure 5.10 : *Distribution des intensités de photoluminescence des nanotubes f-usCNT.*

fonctionnalisés pour 265 nanotubes (cf. Figure.5.10). Cette distribution est uni-modale ce qui suggère que les signaux de photoluminescence enregistrés correspondent aux signaux provenant de nanotubes individuels et non de paquets de nanotubes. Nous pouvons donc conclure que nous avons obtenu pour la première fois des nanotubes ultra-courts luminescents et de surcroit, avec une efficacité de photoluminescence suffisante pour les détecter au niveau du tube individuel.

5.2.3.3 Origine de la photoluminescence à l'énergie E_{11}

Nous nous sommes intéressés à l'origine du pic de photoluminescence à l'énergie E_{11} apparu sur la Figure.5.6.B et qui n'était pas présente avant la fonctionnalisation.

Pour savoir si la photoluminescence à l'énergie E_{11} pouvait être colocalisée avec la photoluminescence à l'énergie E_{11}^* provenant des mêmes nanotubes, nous avons simultanément enregistré la photoluminescence des nanotubes fonctionnalisés sur les deux caméras avec des temps d'intégration de 200 ms.

Sur la Figure.5.11, la première et deuxième colonne correspondent aux signaux de photoluminescence détectés sur la caméra infra-rouge et la caméra visible. Les tailles des pixels sur les deux caméras ne sont pas égales. Nous avons donc eu besoin de redimensionner la taille des pixels des images obtenues sur la caméra visible en interpolant les images bi-linéairement à l'aide du Plugin "Scale" de ImageJ. La troisième colonne correspond donc à l'image redimensionnée obtenue sur la caméra visible. La dernière colonne correspond à la superposition des images obtenues sur la caméra infra-rouge et des images redimensionnées obtenues sur la caméra visible.

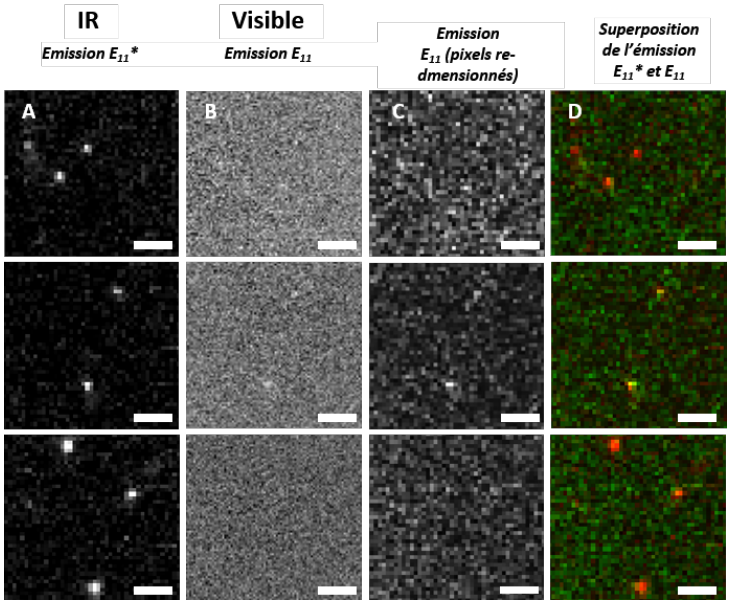

Figure 5.11 : *A) Images de nanotubes f-usCNT détectés sur la caméra IR (A) et sur la caméra visible (B), C) Images de la colonne B redimensionnées, D) Superposition des colonnes A et C. L'échelle est de 5 µm.*

Sur la ligne 2, nous observons deux légers signaux sur la caméra visible. En superposant les images obtenues sur la caméra visible et infra-rouge, nous voyons que les signaux sont colocalisés.

Comme les signaux peuvent être localisés sur les mêmes nanotubes, nous avons supposé que la génération d'excitons piégés pouvait participer au retour de fluorescence à partir d'exciton non piégés. Nous avons alors envisagé trois scénarios.

Hypothèse du dépiégeage thermique des excitons "localisés" :

Nous avons supposé dans un premier temps que le signal pouvait provenir du dépiégeage thermique des excitons piégés au niveau des états localisés de défauts (cf. Figure.5.12).

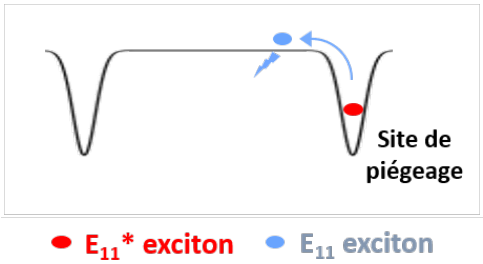

Figure 5.12 : *Mécanisme de dépiégeage thermique des excitons "localisés".*

Sous l'effet thermique, l'énergie de l'exciton peut migrer d'un niveau d'énergie bas vers un niveau d'énergie plus haut induisant un dépiégeage de l'exciton qui a une probabilité

non nulle de se recombiner radiativement et émettre un photon d'énergie E_{11}. Pour valider cette hypothèse, nous avons donc étudié l'influence de la température sur les spectres de photoluminescence (cf. Figure.5.13.A).

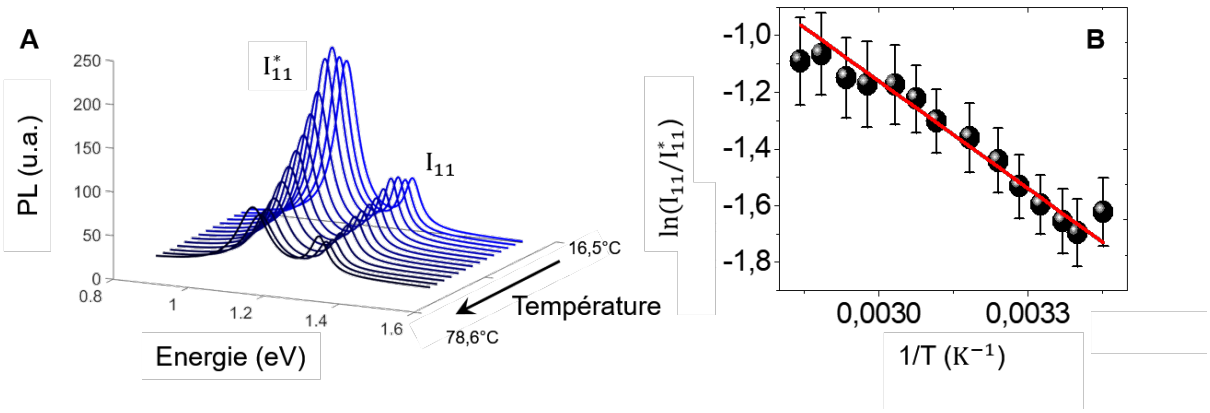

Figure 5.13 : *A) Spectre de photoluminescence en fonction de la température, B) Courbe de van't Hoff des nanotubes f-usCNT.*

Nous avons obtenu que plus la température augmentait, plus le pic de photoluminescence provenant des excitons piégés diminuait. Cette dépendance pourrait être dû au dépiégeage des excitons sous l'effet thermique. Le rapport entre la population d'exciton qui se sont dépiégés et celle d'excitons qui sont restés piégés est proportionnel au rapport des intensités $\frac{I_{11}^*}{I_{11}}$ dans le modèle d'analyse de van 't Hoff.

$$\frac{I_{11}^*}{I_{11}} \propto exp(-\Delta E_{thermique}/k_B T) \tag{5.1}$$

où les intensités I_{11}^* et I_{11} correspondent à l'amplitude des pics modélisés par des profils de Voigt.

L'énergie nécessaire au dépiégeage des excitons $\Delta E_{thermique}$ correspond à la pente de la Figure.5.13.B, appelée aussi courbe de van't Hoff. Dans notre étude, cette énergie vaut 109 meV. Comme attendu, cette valeur est plus faible que la différence d'énergie optique E_{11}^* - E_{11} qui vaut 183 meV. Cette différence peut être comprise en termes d'énergie de réorganisation vibrationnelle au niveau des sites de défauts [178].

A partir de cette analyse, nous pouvons calculer le pourcentage d'excitons pouvant être dépiégés thermiquement qui est égal à $exp(-\Delta E_{thermique}/k_B T)$ et vaut 2% à température ambiante. Ce pourcentage ne reflète pas le rapport des intensités des pics à l'énergie E_{11}^* et E_{11} sur la carte PLE de la Figure 5.6.B ($\sim$ 25%).

Nous avons donc supposé que d'autres mécanismes pouvaient entrer en jeu comme le "state filling" des états qui correspond à une saturation du remplissage des états excitoniques.

Ce mécanisme limiterait le piégeage des excitons sur les défauts et augmenterait ainsi l'intensité de photoluminescence I_{11}.

Hypothèse du "state filling" des états à l'origine de la photoluminescence E_{11} :

Les travaux de M. Iwamura et al. [181] réalisés sur des nanotubes comportant des sites de défauts localisés ont montré que l'intensité de photoluminescence en fonction de l'intensité d'excitation provenant de sites de défauts saturait plus vite que la photoluminescence provenant d'états excitoniques "libres". La recombinaison radiative des excitons au niveau des défauts serait très lente ($\sim 10^{-2}$ ps^{-1}) par rapport au taux de piégeage des excitons ($\sim 10^{-1}$ ps^{-1}) [175] ce qui favoriserait le remplissage des états quantiques locaux dans la structure 0-D des défauts jusqu'au point où tous les états localisés sont remplis ce qui laisserait la possibilité d'avoir des excitons libres pouvant se recombiner radiativement.

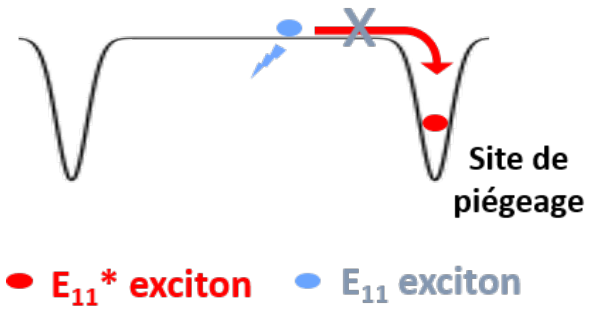

Figure 5.14 : *Modèle de "state filling" des états localisés sur les sites de défauts.*

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc mesuré les intensités de photoluminescence en fonction de l'intensité d'excitation pour nos échantillons de nanotubes. Pour cela, nous avons utilisé des nanotubes dispersés sur des lamelles de microscope. Nous avons premièrement étudié les f-usCNT (cf. Figure.5.15.A) en enregistrant leur photoluminescence sur la caméra infra-rouge.

Comme les nanotubes ultra-courts (usCNT) ne sont pas intrinsèquement visibles par microscopie de fluorescence, nous avons choisi d'utiliser des nanotubes de 120 nm de longueur moyenne (CNT) issus de la même préparation que les nanotubes ultra-courts pour comparer les intensités de saturation. Nous avons enregistré le signal de photoluminescence de CNTs individuels à 985 nm à l'aide de la caméra visible (cf. Figure.5.15.B). Les temps d'intégration étaient de 200 ms pour les deux caméras. Nous avons excité les nanotubes sur la transition S_{22} (568 nm) et le faisceau laser était polarisé circulairement. La Figure.5.15 montre l'évolution moyennée de la photoluminescence en fonction de l'intensité laser pour 8 nanotubes f-usCNT et 12 nanotubes CNT. Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard du signal

pour tous les nanotubes.

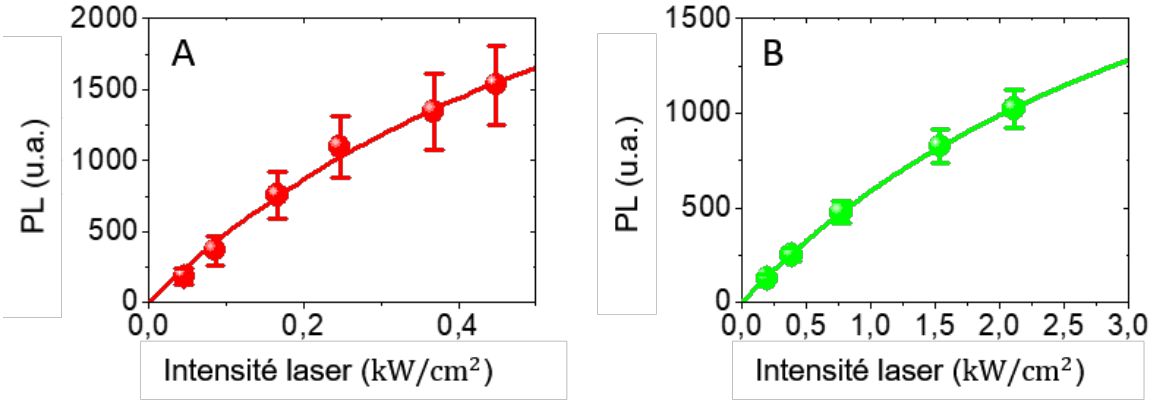

Figure 5.15 : *Evolution de l'intensité de photoluminescence des nanotubes f-usCNT à 1160 nm (A) et CNT à 985 nm (B) en fonction de l'intensité laser.*

Nous avons ensuite ajusté ces courbes par des courbes de saturation d'équation suivante :

$$PL = S\,\frac{I/I_{sat}}{1 + I/I_{sat}} \tag{5.2}$$

où S est l'amplitude du signal et I_{sat}, l'intensité de saturation. L'intensité de saturation des f-usCNT était de 0.8 kW/cm^2 et celle des CNT était de 4.3 kW/cm^2. L'intensité de saturation est donc plus faible pour des nanotubes fonctionnalisés que pour des nanotubes non-fonctionnalisés. Ces résultats sont en accord avec les travaux cités dans le début de cette section ce qui suggère que le "state filling" des états sur les sites de défauts peut participer effectivement dans notre étude à l'observation de l'apparition du signal de photoluminescence à l'énergie E_{11} pour les nanotubes ultra-courts fonctionnalisés.

Conclusion :

Il est fortement probable que les deux scénarios (dépiégeage thermique et "state filling") exposés précédemment puissent se produire simultanément. Il n'est pas non plus exclu que les défauts créent une barrière de potentiel qui limiterait le piégeage des excitons sur les sites de défauts et qui augmenterait la probabilité qu'un exciton reste "libre" (cf. Figure5.16.C). Une telle éventualité a été prédite pour d'autres types de défauts [182] et cette barrière de potentiel dépend fortement du type de fonction chimique utilisée. En conclusion, nous avons résumé les trois modèles sur la Figure.5.16.

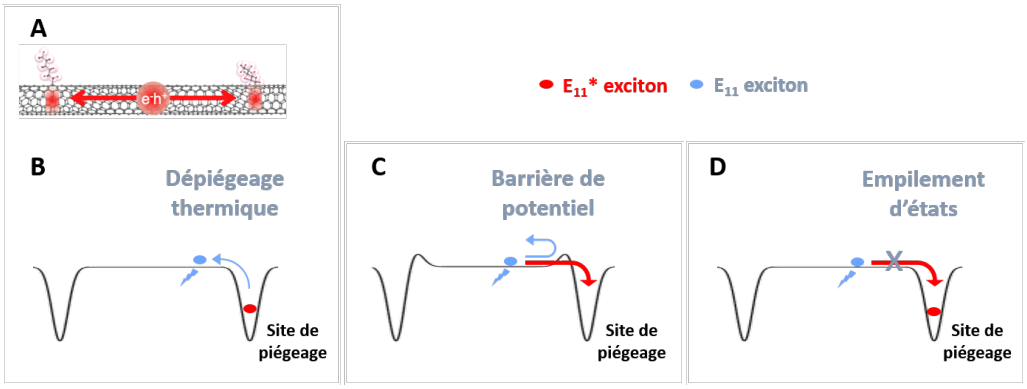

Figure 5.16 : *A) Schéma d'un nanotube comportant deux défauts, B) Modèle de dépiégeage thermique des excitons, C) Présence d'une barrière énergétique empêchant le piégeage des excitons, (D) Modèle de "state filling" dans le puit de potentiel des défauts.*

5.3 Super-localisation des sites de photoluminescence

Nous nous sommes ensuite intéressés à la densité de défauts présents sur les nanotubes ultra-courts. Sachant que la limite de diffraction à 1160 nm est de $1.22\lambda/N.A. \sim 500$ nm et que la longueur médiane des nanotubes est inférieure à 50 nm, pour résoudre la localisation des sites luminescents sur les nanotubes ultra-courts, nous avons dû utiliser une technique de microscopie de super-résolution. Nous avons vu au Chapitre 3 différentes stratégies pour la microscopie de super-résolution. Ici, nous avons adapté la méthode basée sur la localisation de molécules individuelles qui a précédemment permis de révéler entre autres la courbure sub-longueur d'onde des nanotubes de carbone [51].

5.3.1 Génération et observation du clignotement des nanotubes

Afin d'appliquer la méthode de super-résolution basée sur la localisation d'émetteurs individuels (tels que PALM, STORM, PAINT par exemple), il est nécessaire de faire clignoter les sites luminescents pour les individualiser. Nous avons donc dû générer un clignotement des nanotubes. Pour cela, nous les avons dispersés directement sur une lamelle de microscope préalablement nettoyée dans un plasma cleaner. Les nanotubes situés à la surface de la lamelle clignotaient grâce à la présence de charges de surface interagissant avec le nanotube et empêchant ou non l'émission de photoluminescence. Ce comportement a déjà été reporté dans la littérature avec des nanotubes longs fonctionnalisés [174]. Nous avons enregistré le signal de photoluminescence en fonction du temps sur la caméra infra-rouge avec un temps d'intégration de 200 ms. La Figure.5.17 montre des exemples de profils de clignotement pour quatre nanotubes. Le temps d'enregistrement était supérieur à 3 minutes.

Les profils montrent la présence de plusieurs niveaux de photoluminescence bien identi-

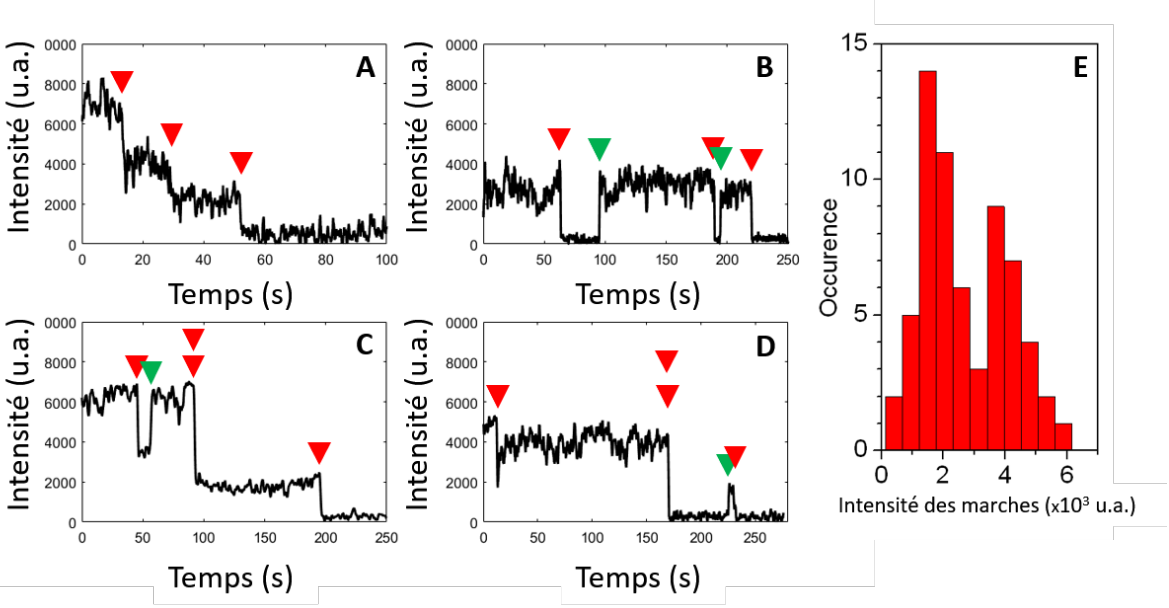

Figure 5.17 : *Signaux de photoluminescence de quatre nanotubes en fonction du temps (A-D). Les triangles rouges (verts) représentent les marches négatives (positives) unitaires, E) Histogramme de l'amplitude des marches. Le temps d'intégration pour chaque image est de 200 ms.*

fiables au sein des nanotubes individuels. Nous avons ensuite tracé l'histogramme de l'amplitude des marches (N = 64) sur la Figure.5.17.E. Nous pouvons voir que la distribution est bimodale. Le rapport d'intensité de photoluminescence entre les deux pics de la distribution vaut 1.8 (proche de 2). Ce résultat indique que les nanotubes ultra-courts possèdent plusieurs centres émetteurs et qu'ils se comportent comme des émetteurs individuels. Le premier pic correspondrait à l'intensité d'un site luminescent et le second pic proviendrait du clignotement de deux sites simultanément comme on peut le voir sur les profils de la Figure.5.17.C et D.

5.3.2 Localisation super-résolue des sites de photoluminescence

Nous allons maintenant décrire la procédure utilisée pour localiser précisément la position de ces sites émetteurs.

Pour chaque profil, nous avons moyenné environ 15 images avant et après les marches observées (pour augmenter le rapport signal sur bruit) dont l'amplitude correspond à un seul clignotement (cf. Figure.5.18). Nous avons ensuite soustrait ces images et pris la valeur absolue pour obtenir l'image correspondant à l'intensité de photoluminescence qui proviendrait d'un site luminescent individuel qui a clignoté. Nous avons ensuite utilisé le Plugin GDSC SMLM dans ImageJ pour ajuster ce signal par une gaussienne circulaire et ainsi obtenir la position du site luminescent avec une précision "super-résolue" [9]. La Figure.5.18 résume les étapes de calculs.

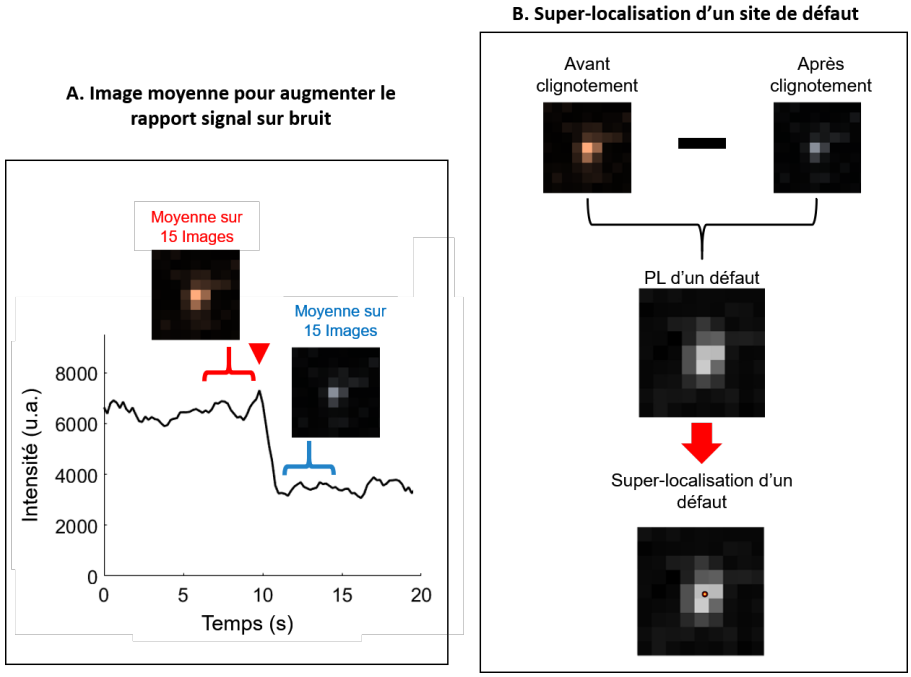

Figure 5.18 : *Super-localisation des sites de défauts à partir des profils de photoluminescence.*

La précision de localisation a été calculée à partir de la formule de Mortensen [183]. Elle dépend du nombre de photon venant du signal (S_i) et ceux venant du bruit (B_r). Elle dépend également du gain de la caméra ($G = 20$ e$^-$/ADU), de la taille des pixels ($a = 490$ nm/pxl) et de la largeur à mi-hauteur de la gaussienne σ utilisé pour l'ajustement. La précision de localisation est donnée par la formule suivante :

$$Precision = 2\sqrt{2Var_x} \tag{5.3}$$

$$\text{où} \quad Var_x = \frac{\sigma_a^2}{s}\left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi\sigma_a^2 b^2}{sa^2}\right)$$

$$\text{avec } \sigma_a^2 = \sigma^2 + \frac{a^2}{12}, \quad s = \frac{S_i}{G} \quad et \quad b = \frac{B_r}{G}$$

Pour visualiser les différentes étapes de calcul nécessaires à la construction des cartes super-résolues des sites luminescents, nous allons prendre l'exemple d'un nanotube. La Figure.5.19.A correspond à l'image brute moyennée sur tout le film du nanotube considéré. A partir des différentes marches présentes sur le profil de clignotements, nous avons obtenu plusieurs localisations. La Figure.5.19.B correspond à l'ensemble des localisations représentées par des gaussiennes circulaires et dont les largeurs à mi-hauteur sont égales à la moyenne des précisions de localisation obtenues pour chaque localisation (Equation 5.3).

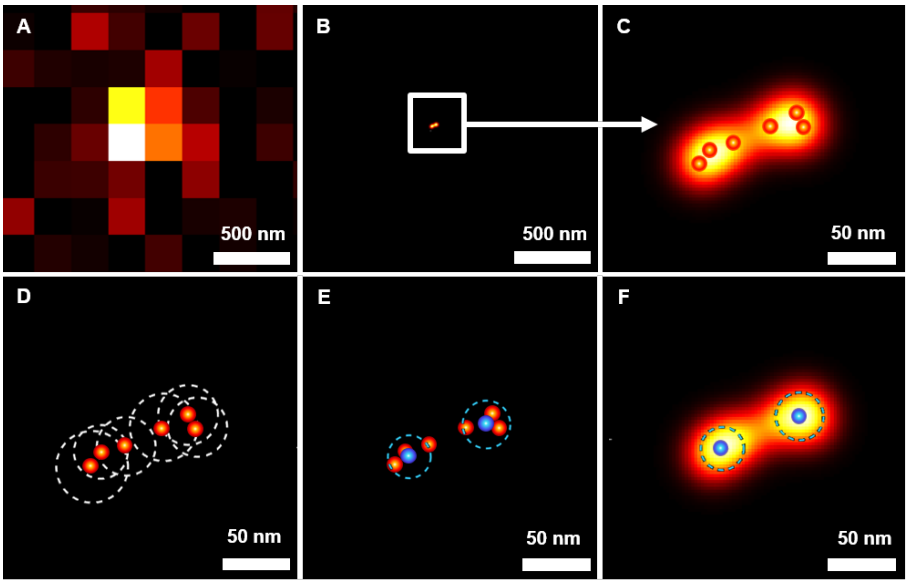

Figure 5.19 : *Regroupement des localisations selon le critère de Rayleigh. A) Image brute d'un nanotube, B) Image reconstruite à partir des localisations, C) Image B agrandie montrant les localisations (points rouges) et leur précision moyenne représentée par des gaussiennes 2D, D) Localisations en rouge et critère de Rayleigh (cercles blancs), E) Regroupement des localisations (bleu) et leur précision moyenne (cercles), F) Superposition de l'image reconstruite B et de la localisation des sites de défauts luminescents (bleu).*

La Figure.5.19.C correspond à un grossissement de la Figure.5.19.B. Les localisations obtenues avec l'ajustement dans ImageJ sont représentées par des points rouges. Il est possible que statistiquement nous détections plusieurs fois le même site luminescent clignotant. Afin de rendre compte de cette possibilité, nous avons représenté chaque localisation avec sa propre précision (en ligne pointillée sur la Figure.5.19.D).

Lorsque la distance entre deux localisations était inférieure à l'une des deux valeurs de précisions, nous avons considéré que la luminescence provenait d'un seul site ou deux sites indiscernables par notre analyse. Pour appliquer cela, nous avons compté le nombre de points contenus dans chaque cercle pointillé. Nous avons ensuite considéré les cercles qui contenaient un maximum de points. La localisation des sites luminescents correspond au barycentre des points (localisations initiales) contenus dans chaque cercle (en bleu sur la Figure.5.19.E). Nous avons également recalculé notre précision de pointée moyenne (cercles pointillés bleus) en prenant en compte le nombre de points $\#$.

$$< Precision >= 2\sqrt{2Var'_x} \quad \text{et} \quad Var'_x = \frac{< Var_x >}{\sqrt{\#}} \tag{5.4}$$

Nous avons finalement représenté les sites luminescents en superposant leur localisation et leur précision (en bleu sur la Figure.5.19.F) sur l'image des gaussiennes circulaires initialement générée pour la Figure.5.19.C.

Nous avons répété cette analyse pour tous les nanotubes en ne sélectionnant que les nanotubes dont la distance maximale entre tous les sites luminescents est inférieure à 100 nm pour exclure la possibilité que plusieurs nanotubes soient présents dans la tâche d'Airy du microscope. La Figure.5.20.A-E montre les résultats obtenus pour 5 nanotubes. Notre précision moyenne sur toutes les localisations recalculées et pour l'ensemble des nanotubes était de 22 nm.

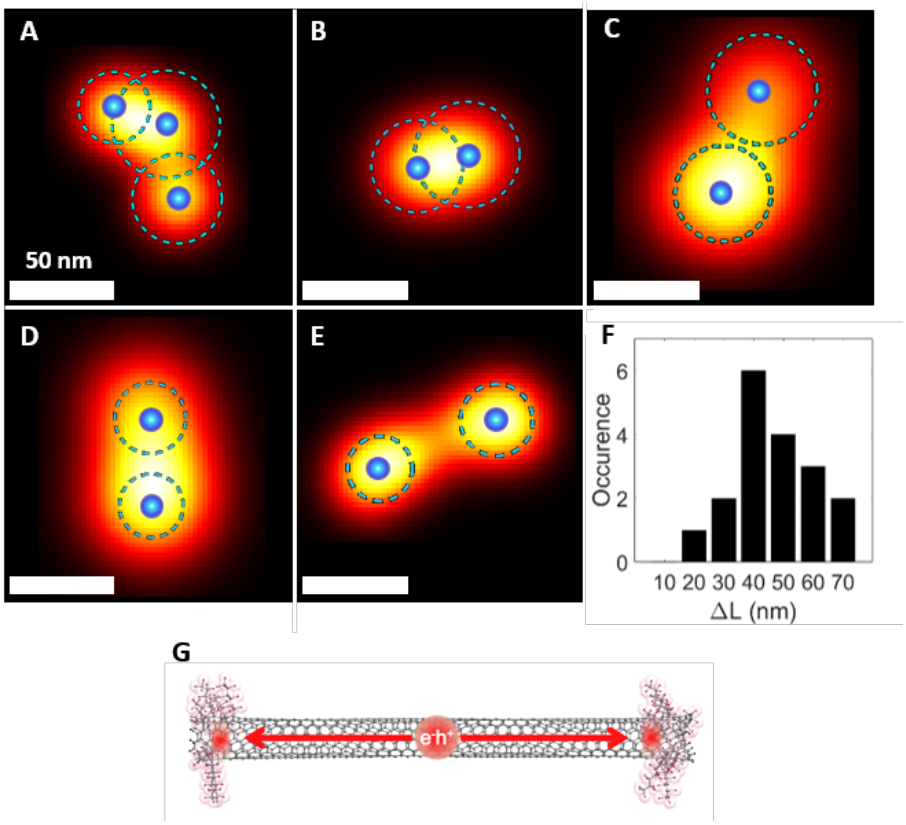

Figure 5.20 : *A-E) Superposition des images reconstruites à partir des localisations extraites des profils et de la position finale des sites de défauts pour 5 nanotubes, F) Distribution de la longueur minimale entre deux sites de défauts luminescents, G) Schéma d'un nanotube fonctionnalisé. La fonctionnalisation est privilégiée sur les bouts du nanotube diminuant ainsi le taux de recombinaison non-radiatif.*

Ces images montrent directement la localisation des sites luminescents avec une précision inférieure à la longueur de diffusion des excitons "libres".

Pour tous ces nanotubes, nous avons finalement calculé la distance minimale ΔL entre deux sites luminescents (cf. Figure.5.20.F). La valeur moyenne de cette distance était de 47 $\pm$ 17 nm (N = 13). Cette valeur est très proche de la longueur moyenne des nanotubes obtenue par imagerie AFM ($< L > = 43$ nm) ce qui suggère que la fonctionnalisation serait favorisée sur les bouts des nanotubes (cf. Figure.5.20.G). Cette hypothèse est cohérente avec les travaux de Y. Zhang et al. qui ont suggéré que l'alkylation se faisait propagativement à partir des sites

de défauts déjà présents avant la fonctionnalisation [184], c'est à dire, préférentiellement sur les bouts des nanotubes ultra-courts. L'alkylation sur les bouts des nanotubes empêcherait les processus de recombinaison non-radiatifs normalement présents sur des nanotubes non-fonctionnalisés. Le travail de ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la référence [185].

5.4 Bilan du Chapitre 5

Dans ce chapitre, nous avons vu que la fonctionnalisation des nanotubes avec des fonctions chimiques adéquates permet de rendre luminescents des nanotubes ultra-courts qui ne sont pas intrinsèquement luminescents.

Les excitons 1-D sont piégés sur les sites de défauts 0-D luminescents qui seraient préférentiellement localisés sur les bouts des nanotubes. Il s'agit de la première réalisation de nanotubes ultra-courts photoluminescents.

L'induction du clignotement des nanotubes nous a permis de super-localiser les sites luminescents par une méthode de super-résolution avec une précision d'environ 25 nm. Les résultats suggèrent que les sites luminescents se comportent comme des émetteurs indépendants ce qui pourrait être intéressant dans le développement d'émetteur de photons uniques pour l'information quantique [186]. De plus, les propriétés optiques et géométriques de ces nanotubes pourraient être avantageuses pour l'imagerie biologique. En effet, leur photo-stabilité autour de 1160 nm se situe dans la deuxième fenêtre de transparence des tissus ce qui pourrait augmenter le signal détecté et donc permettre de sonder l'espace extra-cellulaire de cerveaux à des profondeurs plus importantes. De plus, des études préliminaires ont suggéré que ces nanotubes pouvaient également être excité sur la transition S_{11} à 985 nm qui se situe également dans une fenêtre de transparence des tissus avec des intensités d'excitation 5 fois plus petites. Cette longueur d'onde d'excitation pourrait permettre de diminuer les signaux d'auto-fluorescence éventuels et la faible intensité d'excitation pourrait limiter l'augmentation de température au niveau de l'échantillon.

Conclusions et Perspectives

Dans cette thèse, nous avons présenté comment les nanotubes pouvaient être utilisés pour sonder des environnements biologiques encombrés et révéler leur architecture aux échelles nanométriques. Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'espace extracellulaire du cerveau, dont nous avons défini des paramètres structuraux et rhéologiques comme ses dimensions locales, un paramètre de complexité de l'environnement sondé (tortuosité) et la viscosité in situ locale vue par les nanotubes.

Pour arriver à ce résultat, il est nécessaire d'utiliser des complexes nanotubes-tensioactifs biocompatibles. A partir de la littérature, nous avons identifié certains tensioactifs potentiellement biocompatibles pour réaliser nos expériences. Nous avons premièrement réalisé des tests de cytotoxicité et prolifération cellulaire et nous avons estimé le degré d'interactions non-spécifiques entre les nanotubes et les cellules. Puis nous avons vu que le phospholipide polyéthylène glycol (PLPEG) n'affectait pas de manière significative les taux de prolifération et la viabilité des cellules. L'estimation du degré d'interaction non-spécifique a suggéré que les complexes "nanotubes – PLPEG" interagissaient très peu avec cellules ce qui a motivé notre choix pour la suite de cette thèse.

Grâce à la richesse des propriétés optiques des nanotubes il est possible de les exciter à différentes longueurs d'onde (sur la transition S_{11}, sur une transition assistée par phonons KSB, ou par un mécanisme d'up-conversion). Nous avons comparé quantitativement ces possibilités pour optimiser la détection des nanotubes dans les échantillons biologiques épais tout en préservant les conditions nécessaires à l'intégrité tissulaire. Pour cela, nous avons premièrement mesuré l'efficacité de photoluminescence des nanotubes en fonction des longueurs d'onde d'excitation. Nous avons vu que la transition optique S_{11} (568 nm) était la plus efficace, suivie de la transition assistée par phonons (KSB, 845 nm) et de l'excitation par up-conversion (1064 nm). Nous avons ensuite mesuré l'intensité des signaux de photoluminescence des nanotubes au sein d'une tranche de cerveau de rats fixée. Nous avons observé comme attendu que l'auto-fluorescence des tissus limitait le rapport signal sur bruit lors d'une excitation à 568 nm. Plus la longueur d'onde d'excitation augmente, plus les signaux d'auto-fluorescence diminuent. Les rapports signal sur bruit à 845 nm et à 1064 nm

étaient de 25 pour un nanotube $(6,5)$ à 50 μm de profondeur excité à une intensité de 0.7 kW/cm^2 et 23 kW/cm^2 respectivement. Cela valide la possibilité de détecter efficacement la photoluminescence des nanotubes en profondeur dans les tissus. En raison de la multiplicité des composants constituant un tissu biologique, les tissus absorbent plus ou moins la lumière en fonction des longueurs d'onde d'illumination. Cela peut donc induire une augmentation locale de la température au sein d'un échantillon soumis à une illumination laser. Grâce à la connaissance des efficacités de photoluminescence des nanotubes excités aux longueurs d'onde d'intérêt et en prenant en compte les propriétés optiques des tissus à ces longueurs d'onde, nous avons modélisé les augmentations de température de l'échantillon. Nous avons obtenu que l'excitation de la photoluminescence de nanotube $(6,5)$ individuels sur la transition assistée par phonon (KSB) n'induisait pas d'augmentation de la température notable ($\Delta T <$ 1°C) contrairement à l'excitation par up-conversion ($\Delta T >$ 15°C). Nous pouvons noter que ce résultat dépend fortement de l'efficacité de photoluminescence pour les longueurs d'onde considérées et dépend donc de la chiralité des nanotubes individuels considérés.

Nous avons ensuite présenté une étude révélant que dans des tissus biologiques, la diffusion des nanotubes est très singulière à cause de leur géométrie unidimensionnelle. Leur petit diamètre leur permet d'explorer efficacement les espaces encombrés et leur grande longueur régule leur diffusion. Grâce à cette exploration efficace et à l'application d'une technique de microscopie de super-résolution basée sur le suivi de molécules individuelles, nous avons mesuré les dimensions caractéristiques de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rats vivantes. Des analyses dynamiques et statiques nous ont permis d'estimer les dimensions caractéristiques moyennes autour de 150 nm $\pm$ 40 nm. Ce résultat est très similaire aux mesures effectuées par microscopie électronique sur des tranches de cerveaux cryo-fixées. Cela indique et confirme que les dimensions de l'ECS de cerveaux vivants sont effectivement plus grandes que ce que l'on n'imaginait auparavant.

En analysant finement les propriétés de diffusion des nanotubes, nous avons alors pu estimer les propriétés rhéologiques de l'espace extra-cellulaire des cerveaux étudiés. En combinant des modèles macroscopiques et microscopiques de la littérature, nous avons proposé une analyse dynamique de la diffusion "anormale" des nanotubes permettant d'introduire un paramètre de complexité local et d'estimer les viscosités *in situ* locales vues par les nanotubes diffusant dans les espaces complexes, en s'affranchissant des effets de tortuosité du milieu. De plus, en prenant en compte les effets hydrodynamiques, notre analyse a permis d'extraire les viscosités intrinsèques locales du fluide présent au sein de ces structures complexes. L'approche a été validée en étudiant expérimentalement la diffusion de nanotubes dans des gels d'agarose dans lesquels la viscosité intrinsèque du fluide a été retrouvée indépendamment de la taille des canaux présents dans les gels.

Nous avons ensuite appliqué cette méthodologie pour analyser la diffusion des nanotubes dans l'ECS de cerveaux de rats et de souris. Les résultats obtenus pour des matrices saines et des matrices altérées indiquent que les nanotubes permettent de détecter des modifications locales de la matrice extra-cellulaire. Nous concluons que si nous connaissons les dimensions caractéristiques locales de l'ECS, il nous sera possible de modéliser les viscosités *in situ* qui seraient vues, non pas par des nanotubes, mais par des molécules dont les tailles seraient similaires à celles de molécules messagères présentes intrinsèquement ou administrées au sein de l'ECS.

Pour ce faire, il serait intéressant de corréler les images super-résolues avec les mesures de viscosités locales. Une autre stratégie pourrait être d'utiliser la polarisation du faisceau excitateur pour obtenir une mesure locale du coefficient de diffusion rotationnelle dans le régime de Doi et donc estimer dynamiquement les dimensions caractéristiques locales.

Tous les nanotubes luminescents utilisés dans cette thèse (et dans la littérature) ont des longueurs supérieures à la centaine de nanomètres. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir utiliser des nanotubes ultra-courts pour assurer un continuum de dimensions avec les nanoparticules sphériques. Cependant, les nanotubes ultracourts ne sont pas intrinsèquement luminescents. Nous avons donc exposé dans cette thèse une stratégie permettant de les rendre luminescents. Nous avons fonctionnalisé les nanotubes par liaisons covalentes afin de créer des états de défauts sp^3 localisés où les excitons peuvent être piégés et avoir une probabilité de se recombiner radiativement pour émettre un photon. En mesurant les propriétés de luminescence de ces nanotubes fonctionnalisés à l'échelle du nanotube individuel, nous avons révélé que les nanotubes pouvaient émettre simultanément à l'énergie intrinsèque E_{11} et à l'énergie E_{11}^* liée aux défauts. Pour expliquer ce résultat, nous avons proposé différents mécanismes qui pourraient avoir lieu simultanément comme le dépiégeage thermique des excitons, la présence d'une barrière de potentielle limitant l'efficacité de piégeage des excitons et le "state filling" des états localisés. Grâce à l'induction de clignotement des nanotubes fonctionnalisés, nous avons alors super-localisé les sites luminescents avec une précision moyenne inférieure à 25 nm. Les résultats ont suggéré que la fonctionnalisation avait préférentiellement lieu sur des sites de défauts structuraux déjà présents comme sur les bouts des nanotubes.

Pour des nanotubes de 50 nm de longueur, le rayon hydrodynamique pris en compte dans les modèles de diffusion serait de l'ordre de 15 nm ce qui est proche de la taille des molécules naturellement présentes dans l'ECS. La contribution des forces visqueuses et des forces stériques dans les coefficients de diffusion seraient donc très similaires. Cette caractéristique pourraient donc en faire de bons candidats pour mesurer directement les viscosités *in situ* locales vues par de petites molécules circulant dans l'ECS. De plus, la fonction d'étalement de ces nanotubes pourrait être assimilée à celle d'objets sphériques. Cette particularité pour-

rait permettre en outre de mesurer les viscosités locales dans les 3 dimensions de l'espace, en implémentant la méthode d'imagerie SELFI (SELF - Interference) développée au sein du groupe basée sur l'auto-interférence du signal de luminescence [115].

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse et en particulier l'analyse de la diffusion "anormale" instantanée des nanotubes individuels luminescents pourrait être appliquée à différents systèmes pour détecter des changements structurels et/ou de compositions du fluide contenu dans l'ECS de cerveaux ou d'autres organes comme par exemple 1) durant la morphogénèse ou 2) au cours de l'évolution de certaines maladies dans lesquelles l'espace extra-cellulaire joue un rôle important ou 3) à la suite de l'administration de médicaments. Il pourrait particulièrement être utile pour étudier les modifications de l'ECS lors de la formation des tumeurs. En effet, le volume de l'espace extracellulaire au sein des mélanomes peut varier entre $\sim 5\%$ et 70% [187] du volume total de l'amas cellulaire.

Bibliographie

[1] L. Xie, H. Kang, Q. Xu, M. J. Chen, Y. Liao, M. Thiyagarajan, J.ohn O'Donnell, D. J. Christensen, C. Nicholson, J. J. Iliff, T. Takano, R. Deane et M. Nedergaard. « Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain ». en. In : *Science* 342.6156 (2013), p. 373-377 (cf. p. i, 55).

[2] V. Berezin, P. S. Walmod, M. Filippov et A. Dityatev. « Chapter 15 - Targeting of ECM molecules and their metabolizing enzymes and receptors for the treatment of CNS diseases ». In : *Progress in Brain Research*. Sous la dir. d'Alexander Dityatev, Bernhard Wehrle-Haller et Asla Pitkänen. T. 214. Brain Extracellular Matrix in Health and Disease. Elsevier, 2014, p. 353-388 (cf. p. i, 55).

[3] A. Lehmenkühler, E. Syková, J. Svoboda, K. Zilles et C. Nicholson. « Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis ». In : *Neuroscience* 55.2 (1993), p. 339-351 (cf. p. i, 55).

[4] R. Di Corato, F. Gazeau, C. Le Visage, D. Fayol, P. Levitz, F. Lux, D. Letourneur, N. Luciani, O. Tillement et C. Wilhelm. « High-Resolution Cellular MRI : Gadolinium and Iron Oxide Nanoparticles for in-Depth Dual-Cell Imaging of Engineered Tissue Constructs ». In : *ACS Nano* 7.9 (2013), p. 7500-7512 (cf. p. i).

[5] S. Surti, J.S. Karp, A.E. Perkins, C.A. Cardi, M.E. Daube-Witherspoon, A. Kuhn et G. Muehllehner. « Imaging performance of a-PET : a small animal PET camera ». en. In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 24.7 (2005), p. 844-852 (cf. p. i).

[6] S. Tammas-Williams, H. Zhao, F. Léonard, F. Derguti, I. Todd et P. B. Prangnell. « XCT analysis of the influence of melt strategies on defect population in Ti–6Al–4V components manufactured by Selective Electron Beam Melting ». In : *Materials Characterization* 102 (2015), p. 47-61 (cf. p. i).

[7] S. R. Meikle, F. J. Beekman et Rose. « Complementary molecular imaging technologies : High resolution SPECT, PET and MRI ». en. In : *Drug Discovery Today : Technologies* 3.2 (2006), p. 187-194 (cf. p. i).

[8] D. B. Williams et C. Barry Carter. « The Transmission Electron Microscope ». en. In : *Transmission Electron Microscopy*. Springer, Boston, MA, 1996, p. 3-17 (cf. p. ii).

[9] A. G. Godin, B. Lounis et L. Cognet. « Super-resolution Microscopy Approaches for Live Cell Imaging ». In : *Biophysical Journal* 107.8 (2014), p. 1777-1784 (cf. p. ii, 58, 59, 145).

[10] Y. Jiang, Z. Chen, Y. Han, P. Deb, H. Gao, S. Xie, P. Purohit, M. W. Tate, J. Park, S. M. Gruner, V. Elser et D. A. Muller. « Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution ». en. In : *Nature* 559.7714 (2018), p. 343-349 (cf. p. ii).

[11] R. L. Schultz, E. A. Maynard et D. C. Pease. « Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum ». en. In : *American Journal of Anatomy* 100.3 (), p. 369-407 (cf. p. ii, 56).

[12] N. Korogod, C. CH Petersen et G. W Knott. « Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation ». In : *eLife* 4 () (cf. p. ii, 56, 67, 68, 75).

[13] Va Levin, Jd Fenstermacher et Cs Patlak. « Sucrose and inulin space measurements of cerebral cortex in four mammalian species ». en. In : *American Journal of Physiology-Legacy Content* 219.5 (1970), p. 1528-1533 (cf. p. ii, 57).

[14] S. Hrabětová, J. Hrabe et C. Nicholson. « Dead-Space Microdomains Hinder Extracellular Diffusion in Rat Neocortex during Ischemia ». en. In : *The Journal of Neuroscience* 23.23 (2003), p. 8351-8359 (cf. p. iii, 58).

[15] S. Hrabětová et C. Nicholson. « Contribution of dead-space microdomains to tortuosity of brain extracellular space ». In : *Neurochemistry International*. Role of Non-synaptic Communication in Information Processing 45.4 (2004), p. 467-477 (cf. p. iii, 58).

[16] L. Tao et C. Nicholson. « Maximum geometrical hindrance to diffusion in brain extracellular space surrounding uniformly spaced convex cells ». In : *Journal of Theoretical Biology* 229.1 (2004), p. 59-68 (cf. p. iii, 58).

[17] K. Zheng, T. P. Jensen, L. P. Savtchenko, J. A. Levitt, K. Suhling et D. A. Rusakov. « Nanoscale diffusion in the synaptic cleft and beyond measured with time-resolved fluorescence anisotropy imaging ». en. In : *Scientific Reports* 7.1 (2017) (cf. p. iii, 58).

[18] N. Fakhri, F. C. MacKintosh, B.Lounis, L. Cognet et M. Pasquali. « Brownian Motion of Stiff Filaments in a Crowded Environment ». en. In : *Science* 330.6012 (2010), p. 1804-1807 (cf. p. iv, 18, 61, 97-99, 109).

[19] G. Che, B. B. Lakshmi, C. R. Martin, E. R. Fisher et Rodney S. Ruoff. « Chemical Vapor Deposition Based Synthesis of Carbon Nanotubes and Nanofibers Using a Template Method ». In : *Chemistry of Materials* 10.1 (1998), p. 260-267 (cf. p. 2).

[20] C. Journet, W. K. Maser, P. Bernier, A. Loiseau, M. Lamy de la Chapelle, S. Lefrant, P. Deniard, R. Lee et J. E. Fischer. « Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique ». en. In : *Nature* 388.6644 (1997), p. 41972 (cf. p. 2, 3, 5).

[21] A. Thess, R. Lee, P.Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. Hee Lee, S. Gon Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tománek, J. E. Fischer et R. E. Smalley. « Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes ». en. In : *Science* 273.5274 (1996), p. 483-487 (cf. p. 2, 3).

[22] P. Nikolaev, M. J Bronikowski, R. K. Bradley, F. Rohmund, D. T Colbert, K. A Smith et R. E Smalley. « Gas-phase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide ». In : *Chemical Physics Letters* 313.1 (1999), p. 91-97 (cf. p. 2).

[23] J. Liu, S. Fan et H. Dai. « Recent Advances in Methods of Forming Carbon Nanotubes ». en. In : *MRS Bulletin* 29.4 (2004), p. 244-250 (cf. p. 2).

[24] M. Cinke, J. Li, B. Chen, A. Cassell, L. Delzeit, J. Han et M. Meyyappan. « Pore structure of raw and purified HiPco single-walled carbon nanotubes ». In : *Chemical Physics Letters* 365.1 (2002), p. 69-74 (cf. p. 2).

[25] D. E. Resasco, W. E. Alvarez, F. Pompeo, L. Balzano, J. E. Herrera, B. Kitiyanan et A. Borgna. « A Scalable Process for Production of Single-walled Carbon Nanotubes (SWNTs) by Catalytic Disproportionation of CO on a Solid Catalyst ». en. In : *Journal of Nanoparticle Research* 4.1-2 (2002), p. 131-136 (cf. p. 2, 3).

[26] C. D. Scott, S. Arepalli, P. Nikolaev et R. E. Smalley. « Growth mechanisms for single-wall carbon nanotubes in a laser-ablation process ». en. In : *Applied Physics A* 72.5 (2001), p. 573-580 (cf. p. 3).

[27] A. H. Castro Neto, F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov et A. K. Geim. « The electronic properties of graphene ». In : *Reviews of Modern Physics* 81.1 (2009), p. 109-162 (cf. p. 4).

[28] C. Thomsen, S. Reich et J. Maultzsch. « Carbon Nanotubes—Basic Concepts and Physical Properties ». en. In : *ChemPhysChem* 5.12 (2004), p. 1914-1915 (cf. p. 6, 9).

[29] J. W. Mintmire, B. I. Dunlap et C. T. White. « Are fullerene tubules metallic ? » In : *Physical Review Letters* 68.5 (1992), p. 631-634 (cf. p. 10, 12).

[30] J. W. Mintmire et C. T. White. « Universal Density of States for Carbon Nanotubes ». In : *Physical Review Letters* 81.12 (1998), p. 2506-2509 (cf. p. 10).

[31] R. Saito, G. Dresselhaus et M. S. Dresselhaus. « Trigonal warping effect of carbon nanotubes ». In : *Physical Review B* 61.4 (2000), p. 2981-2990 (cf. p. 12).

[32] R. B. Weisman et S. M. Bachilo. « Dependence of Optical Transition Energies on Structure for Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Suspension : An Empirical Kataura Plot ». In : *Nano Letters* 3.9 (2003), p. 1235-1238 (cf. p. 12).

[33] M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman et R. E. Smalley. « Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes ». en. In : *Science* 297.5581 (2002), p. 593-596 (cf. p. 12, 16, 19, 21, 22).

[34] S. M. Bachilo, M. S. Strano, C. Kittrell, R. H. Hauge, R. E. Smalley et R. B. Weisman. « Structure-Assigned Optical Spectra of Single-Walled Carbon Nanotubes ». en. In : *Science* 298.5602 (2002), p. 2361-2366 (cf. p. 12, 16).

[35] N. Hamada, S. Sawada et A. Oshiyama. « New one-dimensional conductors : Graphitic microtubules ». In : *Physical Review Letters* 68.10 (1992), p. 1579-1581 (cf. p. 12).

[36] R. Saito, M. Fujita, G. Dresselhaus et M. S Dresselhaus. « Electronic structure of chiral graphene tubules ». In : *Applied Physics Letters* 60.18 (1992), p. 2204-2206 (cf. p. 12).

[37] T. Ando. « Excitons in Carbon Nanotubes ». en. In : *Journal of the Physical Society of Japan* 66.4 (1997), p. 1066-1073 (cf. p. 12).

[38] J. Maultzsch, R. Pomraenke, S. Reich, E. Chang, D. Prezzi, A. Ruini, E. Molinari, M. S. Strano, C. Thomsen et C. Lienau. « Exciton binding energies in carbon nanotubes from two-photon photoluminescence ». In : *Physical Review B* 72.24 (2005), p. 241402 (cf. p. 12).

[39] V. Perebeinos, J. Tersoff et P. Avouris. « Scaling of Excitons in Carbon Nanotubes ». In : *Physical Review Letters* 92.25 (2004), p. 257402 (cf. p. 12).

[40] G. Bastard. « Superlattice band structure in the envelope-function approximation ». In : *Physical Review B* 24.10 (1981), p. 5693-5697 (cf. p. 13).

[41] E. B. Barros, R. B. Capaz, A. Jorio, G. G. Samsonidze, A. G. Souza Filho, S. Ismail-Beigi, C. D. Spataru, S. G. Louie, G. Dresselhaus et M. S. Dresselhaus. « Selection rules for one- and two-photon absorption by excitons in carbon nanotubes ». In : *Physical Review B* 73.24 (2006), p. 241406 (cf. p. 14).

[42] S. Berciaud, L.Cognet et B. Lounis. « Luminescence Decay and the Absorption Cross Section of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *Physical Review Letters* 101.7 (2008), p. 077402 (cf. p. 14, 17, 44).

[43] O. N. Torrens, M. Zheng et J. M. Kikkawa. « Energy of K-Momentum Dark Excitons in Carbon Nanotubes by Optical Spectroscopy ». In : *Physical Review Letters* 101.15 (2008), p. 157401 (cf. p. 15).

[44] R. B. Weisman, S. Ghosh et S. M. Bachilo. « Advanced sorting of single-walled carbon nanotubes by nonlinear density-gradient ultracentrifugation ». En. In : *Nature Nanotechnology* 5.6 (2010), p. 443 (cf. p. 15, 17).

[45] J. Hwang, H. H. Gommans, A. Ugawa, H. Tashiro, R. Haggenmueller, K. I. Winey, J. E. Fischer, D. B. Tanner et A. G. Rinzler. « Polarized spectroscopy of aligned single-wall carbon nanotubes ». In : *Physical Review B* 62.20 (2000), R13310-R13313 (cf. p. 15).

[46] Y. Miyauchi, M. Oba et S. Maruyama. « Cross-polarized optical absorption of single-walled nanotubes by polarized photoluminescence excitation spectroscopy ». In : *Physical Review B* 74.20 (2006), p. 205440 (cf. p. 15).

[47] L. Oudjedi, A. N. G. Parra-Vasquez, A. G. Godin, L. Cognet et B. Lounis. « Metrological Investigation of the (6,5) Carbon Nanotube Absorption Cross Section ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 4.9 (2013), p. 1460-1464 (cf. p. 16, 18, 132, 133).

[48] J. G. Duque, M. Pasquali, L. Cognet et B. Lounis. « Environmental and Synthesis-Dependent Luminescence Properties of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 3.8 (2009), p. 2153-2156 (cf. p. 17, 22).

[49] L. Cognet, D. A. Tsyboulski, J.-D. R. Rocha, C. D. Doyle, J. M. Tour et R. B. Weisman. « Stepwise Quenching of Exciton Fluorescence in Carbon Nanotubes by Single-Molecule Reactions ». en. In : *Science* 316.5830 (2007), p. 1465-1468 (cf. p. 17, 18).

[50] J. G. Duque, L. Cognet, A. Nicholas G. Parra-Vasquez, N. Nicholas, H. K. Schmidt et M. Pasquali. « Stable Luminescence from Individual Carbon Nanotubes in Acidic, Basic, and Biological Environments ». In : *Journal of the American Chemical Society* 130.8 (2008), p. 2626-2633 (cf. p. 17, 23, 25).

[51] L. Cognet, D. A. Tsyboulski et R. B. Weisman. « Subdiffraction Far-Field Imaging of Luminescent Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *Nano Letters* 8.2 (2008), p. 749-753 (cf. p. 17, 144).

[52] T. Gokus, L. Cognet, J. G. Duque, M. Pasquali, A. Hartschuh et B. Lounis. « Mono- and Biexponential Luminescence Decays of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 114.33 (2010), p. 14025-14028 (cf. p. 17, 132).

[53] S. M. Santos, B. Yuma, S. Berciaud, J. Shaver, M. Gallart, P. Gilliot, L. Cognet et B. Lounis. « All-Optical Trion Generation in Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *Physical Review Letters* 107.18 (2011), p. 187401 (cf. p. 17).

[54] J. J. Crochet, J. G. Duque, J. H. Werner, B. Lounis, L. Cognet et S. K. Doorn. « Disorder Limited Exciton Transport in Colloidal Single-Wall Carbon Nanotubes ». In : *Nano Letters* 12.10 (2012), p. 5091-5096 (cf. p. 17, 18).

[55] B. Yuma, S. Berciaud, J. Besbas, J. Shaver, S. Santos, S. Ghosh, R. B. Weisman, L. Cognet, M. Gallart, M. Ziegler, B. Hönerlage, B. Lounis et P. Gilliot. « Biexciton, single carrier, and trion generation dynamics in single-walled carbon nanotubes ». In : *Physical Review B* 87.20 (2013), p. 205412 (cf. p. 17).

[56] S. Cambré, S. M. Santos, W. Wenseleers, A. R. T. Nugraha, R. Saito, L. Cognet et B. Lounis. « Luminescence Properties of Individual Empty and Water-Filled Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 6.3 (2012), p. 2649-2655 (cf. p. 17, 132).

[57] J. G. Duque, L. Oudjedi, J. J. Crochet, S. Tretiak, B. Lounis, S. K. Doorn et L. Cognet. « Mechanism of Electrolyte-Induced Brightening in Single-Wall Carbon Nanotubes ». In : *Journal of the American Chemical Society* 135.9 (2013), p. 3379-3382 (cf. p. 17).

[58] Y.-Z. Ma, L. Valkunas, S. L. Dexheimer, S. M. Bachilo et G. R. Fleming. « Femtosecond Spectroscopy of Optical Excitations in Single-Walled Carbon Nanotubes : Evidence for Exciton-Exciton Annihilation ». In : *Physical Review Letters* 94.15 (2005), p. 157402 (cf. p. 17).

[59] V. Perebeinos et P. Avouris. « Phonon and Electronic Nonradiative Decay Mechanisms of Excitons in Carbon Nanotubes ». In : *Physical Review Letters* 101.5 (2008), p. 057401 (cf. p. 17).

[60] J. Crochet, M.Clemens et T. Hertel. « Quantum Yield Heterogeneities of Aqueous Single-Wall Carbon Nanotube Suspensions ». In : *Journal of the American Chemical Society* 129.26 (2007), p. 8058-8059 (cf. p. 18).

[61] L. J. Carlson, S. E. Maccagnano, M. Zheng, J. Silcox et T. D. Krauss. « Fluorescence Efficiency of Individual Carbon Nanotubes ». In : *Nano Letters* 7.12 (2007), p. 3698-3703 (cf. p. 18).

[62] N. Fakhri, D. A. Tsyboulski, L. Cognet, R. Bruce Weisman et Pasquali. « Diameter-dependent bending dynamics of single-walled carbon nanotubes in liquids ». en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.34 (2009), p. 14219-14223 (cf. p. 18, 97).

[63] M. S. Strano, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. J. O'Connell, E. H. Haroz, J. Hubbard, M. Miller, K. Rialon, C. Kittrell, S. Ramesh, R. H. Hauge et R. E. Smalley. « Reversible, Band-Gap-Selective Protonation of Single-Walled Carbon Nanotubes in Solution ». In : *The Journal of Physical Chemistry B* 107.29 (2003), p. 6979-6985 (cf. p. 18).

[64] G. Dukovic, B. E. White, Z. Zhou, F. Wang, S. Jockusch, M. L. Steigerwald, T. F. Heinz, R. A. Friesner, N. J. Turro et L. E. Brus. « Reversible Surface Oxidation and Efficient Luminescence Quenching in Semiconductor Single-Wall Carbon Nanotubes ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.46 (2004), p. 15269-15276 (cf. p. 18).

[65] Anni J. Siitonen, Dmitri A. Tsyboulski, Sergei M. Bachilo et R. Bruce Weisman. « Surfactant-Dependent Exciton Mobility in Single-Walled Carbon Nanotubes Studied by Single-Molecule Reactions ». In : *Nano Letters* 10.5 (2010), p. 1595-1599 (cf. p. 18).

[66] T. Hertel, S. Himmelein, T. Ackermann, D. Stich et J. Crochet. « Diffusion Limited Photoluminescence Quantum Yields in 1-D Semiconductors : Single-Wall Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 4.12 (2010), p. 7161-7168 (cf. p. 18, 132).

[67] D. M. Harrah et A. K. Swan. « The Role of Length and Defects on Optical Quantum Efficiency and Exciton Decay Dynamics in Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 5.1 (2011), p. 647-655 (cf. p. 18).

[68] A. Ishii, M. Yoshida et Y. K. Kato. « Exciton diffusion, end quenching, and exciton-exciton annihilation in individual air-suspended carbon nanotubes ». In : *Physical Review B* 91.12 (2015), p. 125427 (cf. p. 18).

[69] B. S. Reddy, T. Narasawa, J. H. Weisburger et E. L. Wynder. « Promoting Effect of Sodium Deoxycholate on Colon Adenocarcinomas in Germfree Rats ». en. In : *JNCI : Journal of the National Cancer Institute* 56.2 (1976), p. 441-442 (cf. p. 19).

[70] L. Dong, K. L. Joseph, C. M. Witkowski et M. M. Craig. « Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants ». en. In : *Nanotechnology* 19.25 (2008), p. 255702 (cf. p. 19).

[71] S. M. Moghimi, A. J. Andersen, S. H. Hashemi, B. Lettiero, D. Ahmadvand, A. C. Hunter, T. L. Andresen, I. Hamad et J. Szebeni. « Complement activation cascade triggered by PEG–PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes : The challenges ahead ». In : *Journal of Controlled Release*. Nanomedicine and Drug Delivery (NanoDDS'09) 146.2 (2010), p. 175-181 (cf. p. 22, 24).

[72] G. Hong, S. Diao, A. L. Antaris et H. Dai. « Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy ». In : *Chemical Reviews* 115.19 (2015), p. 10816-10906 (cf. p. 22, 23, 25).

[73] D. W. Schaefer, J. Zhao, J. M. Brown, D. P. Anderson et D. W. Tomlin. « Morphology of dispersed carbon single-walled nanotubes ». In : *Chemical Physics Letters* 375.3 (2003), p. 369-375 (cf. p. 22).

[74] A. Huczko, H. Lange, E. Całko, H. Grubek-Jaworska et P. Droszcz. « Physiological Testing of Carbon Nanotubes : Are They Asbestos-Like ? » In : *Fullerene Science and Technology* 9.2 (2001), p. 251-254 (cf. p. 23).

[75] P. Cherukuri, S. M. Bachilo, S. H. Litovsky et R. B. Weisman. « Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.48 (2004), p. 15638-15639 (cf. p. 23, 32).

[76] K. Welsher, Z. Liu, S. P. Sherlock, J. Tucker Robinson, Z. Chen, D. Daranciang et H. Dai. « A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice ». In : *Nature nanotechnology* 4.11 (2009), p. 773-780 (cf. p. 23, 25).

[77] J. Pauwels, J. Hoogmartens et A. Van Schepdael. « Application of carbon nanotubes for in-capillary incubations with cytochrome P450 enzymes ». en. In : *ELECTROPHORESIS* 31.23-24 (2010), p. 3867-3873 (cf. p. 23).

[78] B. D. Holt, P. A. Short, A. D. Rape, Yu-li Wang, M. F. Islam et K. N. Dahl. « Carbon Nanotubes Reorganize Actin Structures in Cells and ex Vivo ». In : *ACS Nano* 4.8 (2010), p. 4872-4878 (cf. p. 24).

[79] G. Hong, J. C. Lee, J. T. Robinson, U. Raaz, L. Xie, N. F. Huang, J. P. Cooke et H. Dai. « Multifunctional *in vivo* vascular imaging using near-infrared II fluorescence ». En. In : *Nature Medicine* 18.12 (2012), p. 1841 (cf. p. 24).

[80] M. L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C. R. Davis, N. Wong Shi Kam, P. Chu, Z. Liu, X. Sun, H. Dai et S. S. Gambhir. « A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice ». En. In : *Nature Nanotechnology* 3.4 (2008), p. 216 (cf. p. 24).

[81] U. Ziegler et P. Groscurth. « Morphological Features of Cell Death ». In : *Physiology* 19.3 (2004), p. 124-128 (cf. p. 26).

[82] P. Cherukuri, C. J. Gannon, T. K. Leeuw, H. K. Schmidt, R. E. Smalley, S. A. Curley et R. B. Weisman. « Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence ». en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.50 (2006), p. 18882-18886 (cf. p. 32).

[83] Z. Gao*, N. Danné*, A. G. Godin, B. Lounis et L. Cognet. « Evaluation of Different Single-Walled Carbon Nanotube Surface Coatings for Single-Particle Tracking Applications in Biological Environments ». en. In : *Nanomaterials* 7.11 (2017), p. 393 (cf. p. 34).

[84] S. L. Jacques. « Optical properties of biological tissues : a review ». en. In : *Physics in Medicine & Biology* 58.11 (2013), R37 (cf. p. 35, 48, 49).

[85] L. Shi, L. A. Sordillo, A. Rodríguez-Contreras et R. Alfano. « Transmission in Near-Infrared Optical Windows for Deep Brain Imaging ». In : *Journal of biophotonics* 9.1-2 (2016), p. 38-43 (cf. p. 35).

[86] N. Akizuki, S. Aota, S. Mouri, K. Matsuda et Y. Miyauchi. « Efficient near-infrared up-conversion photoluminescence in carbon nanotubes ». en. In : *Nature Communications* 6 (2015), ncomms9920 (cf. p. 36, 38, 40, 45).

[87] G. Soavi, A. Grupp, A. Budweg, F. Scotognella, T. Hefner, T. Hertel, G. Lanzani, A. Leitenstorfer, G. Cerullo et D. Brida. « Below-gap excitation of semiconducting single-wall carbon nanotubes ». en. In : *Nanoscale* 7.43 (2015), p. 18337-18342 (cf. p. 36).

[88] S. Aota, N. Akizuki, S. Mouri, K. Matsuda et Y.Miyauchi. « Upconversion photoluminescence imaging and spectroscopy of individual single-walled carbon nanotubes ». en. In : *Applied Physics Express* 9.4 (2016), p. 045103 (cf. p. 36-38).

[89] A. G. Godin, Juan A. Varela, Z. Gao, N. Danné, J. P. Dupuis, B. Lounis, L. Groc et L. Cognet. « Single-nanotube tracking reveals the nanoscale organization of the extracellular space in the live brain ». en. In : *Nature Nanotechnology* 12.3 (2017), p. 238-243 (cf. p. 46, 68, 72, 75).

[90] Juan A. Varela, J. P. Dupuis, L. Etchepare, A. Espana, L. Cognet et L. Groc. « Targeting neurotransmitter receptors with nanoparticles in vivo allows single-molecule tracking in acute brain slices ». In : *Nature Communications* 7 (2016) (cf. p. 46, 62).

[91] J. V Frangioni. « In vivo near-infrared fluorescence imaging ». In : *Current Opinion in Chemical Biology* 7.5 (2003), p. 626-634 (cf. p. 47).

[92] S. Ghosh, S. M. Bachilo, R. A. Simonette, K. M. Beckingham et R. B. Weisman. « Oxygen Doping Modifies Near-Infrared Band Gaps in Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotubes ». en. In : *Science* 330.6011 (2010), p. 1656-1659 (cf. p. 48, 133).

[93] Z. Srebro et A. Macińska. « Cytochemical demonstration of ferric iron and fluorescence microscopy observations on 'Gomori positive' glia grownin vitro ». In : *Brain Research* 42.1 (1972), p. 53-58 (cf. p. 48).

[94] G. A. Wagnieres, W. M. Star et B. C. Wilson. « In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications ». en. In : *Photochemistry and Photobiology* 68.5 (1998), p. 603-632 (cf. p. 48).

[95] J. S. O'Brien et E. Lois Sampson. « Lipid composition of the normal human brain : gray matter, white matter, and myelin ». en. In : *Journal of Lipid Research* 6.4 (1965), p. 537-544 (cf. p. 48).

[96] H. McIlwain et H. S. Bachelard. « Biochemistry and the central nervous system ». English. In : (1972) (cf. p. 48).

[97] G. H. Beaven et E. R. Holiday. « Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids ». In : *Advances in Protein Chemistry*. Sous la dir. de M. L. Anson, K. Bailey et J. T. Edsall. T. 7. Academic Press, 1952, p. 319-386 (cf. p. 48).

[98] T. E. Cooper et G. J. Trezek. « Correlation of thermal properties of some human tissue with water content ». eng. In : *Aerospace Medicine* 42.1 (1971), p. 24-27 (cf. p. 51).

[99] N. Danné, A. G. Godin, Z. Gao, J. A. Varela, L. Groc, B. Lounis et L. Cognet. « Comparative Analysis of Photoluminescence and Upconversion Emission from Individual Carbon Nanotubes for Bioimaging Applications ». In : *ACS Photonics* 5.2 (2018), p. 359-364 (cf. p. 52).

[100] E. Syková et C. Nicholson. « Diffusion in Brain Extracellular Space ». In : *Physiological Reviews* 88.4 (2008), p. 1277-1340 (cf. p. 55).

[101] R. K. Margolis et R. U. Margolis. « Nervous tissue proteoglycans ». en. In : *Experientia* 49.5 (1993), p. 429-446 (cf. p. 55).

[102] E. Ruoslahti. « Brain extracellular matrix ». en. In : *Glycobiology* 6.5 (1996), p. 489-492 (cf. p. 55).

[103] G. Brückner, W. Härtig, J. Kacza, J. Seeger, K. Welt et K. Brauer. « Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter ». en. In : *Journal of Neurocytology* 25.1 (1996), p. 333-346 (cf. p. 55).

[104] D. C. Pease et R. F. Baker. « Sectioning Techniques for Electron Microscopy Using a Conventional Microtome ». en. In : *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 67.4 (1948), p. 470-474 (cf. p. 56).

[105] R. W. G. Wyckoff et J. Z. Young. « The Motorneuron Surface ». In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 144.917 (1956), p. 440-450 (cf. p. 56).

[106] J. Dubochet, M. Adrian, J.J. Chang, J.C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall et P. Schultz. « Cryo-electron microscopy of vitrified specimens ». en. In : *Quarterly Reviews of Biophysics* 21.2 (1988), p. 129-228 (cf. p. 56).

[107] J. Frank, P. Penczek, R. Grassucci et S. Srivastava. « Three-dimensional reconstruction of the 70S Escherichia coli ribosome in ice : the distribution of ribosomal RNA. » en. In : *The Journal of Cell Biology* 115.3 (1991), p. 597-605 (cf. p. 56).

[108] C. Nicholson et J. M. Phillips. « Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. » In : *The Journal of Physiology* 321.1 (1981), p. 225-257 (cf. p. 57).

[109] C. Nicholson et L. Tao. « Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging ». In : *Biophysical Journal* 65.6 (1993), p. 2277-2290 (cf. p. 57).

[110] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz et H. F. Hess. « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». en. In : *Science* 313.5793 (2006), p. 1642-1645 (cf. p. 58).

[111] M. Fernández-Suárez et A. Y. Ting. « Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells ». en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9.12 (2008), p. 929-943 (cf. p. 58).

[112] B. O. Leung et K. C. Chou. « Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology , Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology ». en. In : *Applied Spectroscopy* 65.9 (2011), p. 967-980 (cf. p. 58).

[113] N. T. Urban, K. I. Willig, S. W. Hell et U. V. Nägerl. « STED Nanoscopy of Actin Dynamics in Synapses Deep Inside Living Brain Slices ». In : *Biophysical Journal* 101.5 (2011), p. 1277-1284 (cf. p. 59).

[114] J. Demmerle, C. Innocent, A. J. North, G. Ball, M. Müller, E. Miron, A. Matsuda, I. M. Dobbie, Y. Markaki et L. Schermelleh. « Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy ». en. In : *Nature Protocols* 12.5 (2017), p. 988-1010 (cf. p. 59).

[115] P. Bon, J. Linarès-Loyez, M. Feyeux, K. Alessandri, B. Lounis, P. Nassoy et L.Cognet. « Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations ». en. In : *Nature Methods* 15.6 (2018), p. 449-454 (cf. p. 59, 154).

[116] J. Tønnesen, V. V. G. Krishna Inavalli et U. Valentin Nägerl. « Super-Resolution Imaging of the Extracellular Space in Living Brain Tissue ». In : *Cell* 172.5 (2018), 1108-1121.e15 (cf. p. 60).

[117] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford et H. Dai. « Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery ». In : *ACS Nano* 1.1 (2007), p. 50-56 (cf. p. 66).

[118] I. G. Bloomfield, I. H. Johnston et L. E. Bilston. « Effects of Proteins, Blood Cells and Glucose on the Viscosity of Cerebrospinal Fluid ». Anglais. In : *Pediatric Neurosurgery* 28.5 (1998), p. 246-251 (cf. p. 73, 122).

[119] H. L. Brydon, R. Hayward, W. Harkness et R. Bayston. « Physical properties of cerebrospinal fluid of relevance to shunt function. 1 : The effect of protein upon CSF viscosity ». In : *British Journal of Neurosurgery* 9.5 (1995), p. 639-644 (cf. p. 73).

[120] L. Lapčík, L. Lapčík, S. De Smedt, J. Demeester et P. Chabreček. « Hyaluronan : Preparation, Structure, Properties, and Applications ». en. In : *Chemical Reviews* 98.8 (1998), p. 2663-2684 (cf. p. 73).

[121] R. Brown. « XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants ; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies ». In : *The Philosophical Magazine* 4.21 (1828), p. 161-173 (cf. p. 82).

[122] A. Einstein. « On the Motion of Small Particles Suspended in Liquids at Rest Required by the Molecular-Kinetic Theory of Heat ». In : 17 (1905), p. 549-560 (cf. p. 82).

[123] R. Duggal et M. Pasquali. « Dynamics of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes in Water by Real-Time Visualization ». In : *Physical Review Letters* 96.24 (2006), p. 246104 (cf. p. 84, 87, 96).

[124] S. Broersma. « Viscous force and torque constants for a cylinder ». In : *The Journal of Chemical Physics* 74.12 (1981), p. 6989-6990 (cf. p. 84, 88).

[125] H. Brenner. « Rheology of a dilute suspension of axisymmetric Brownian particles ». In : *International Journal of Multiphase Flow* 1.2 (1974), p. 195-341 (cf. p. 84, 89).

[126] M. M.Tirado, C. L. Martínez et J. García de la Torre. « Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Application to short DNA fragments ». In : *The Journal of Chemical Physics* 81.4 (1984), p. 2047-2052 (cf. p. 84, 88, 89).

[127] F. Perrin. « Mouvement brownien d'un ellipsoide - I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoidales ». fr. In : *Journal de Physique et le Radium* 5.10 (1934), p. 497-511 (cf. p. 85, 86).

[128] Y. Han, A. Alsayed, M. Nobili et A. G. Yodh. « Quasi-two-dimensional diffusion of single ellipsoids : Aspect ratio and confinement effects ». In : *Physical Review E* 80.1 (2009), p. 011403 (cf. p. 85).

[129] Y. Han, A. M. Alsayed, M. Nobili, Zhang, Lubensky et A. G. Yodh. « Brownian Motion of an Ellipsoid ». en. In : *Science* 314.5799 (2006), p. 626-630 (cf. p. 87).

[130] M. M. Tirado et J. García de la Torre. « Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders ». en. In : *The Journal of Chemical Physics* 71.6 (1979), p. 2581-2587 (cf. p. 88).

[131] M. M. Tirado et J. García de la Torre. « Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders ». en. In : *The Journal of Chemical Physics* 73.4 (1980), p. 1986-1993 (cf. p. 88).

[132] A. Ortega et J. Garcia de la Torre. « Hydrodynamic properties of rodlike and disklike particles in dilute solution ». In : *The Journal of Chemical Physics* 119.18 (2003), p. 9914-9919 (cf. p. 88).

[133] J. Happel et H. Brenner. *Low Reynolds number hydrodynamics*. Sous la dir. de R. J. Moreau. T. 1. Mechanics of fluids and transport processes. Dordrecht : Springer Netherlands, 1981 (cf. p. 89).

[134] L Masaro et X. X Zhu. « Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids ». In : *Progress in Polymer Science* 24.5 (1999), p. 731-775 (cf. p. 90).

[135] D. S. G. Hu et K. J. N. Chou. « Kinetics of water swelling and development of porous structure in ionic poly(acrylonitrile-acrylamide-acrylic acid) hydrogels ». In : *Polymer* 37.6 (1996), p. 1019-1025 (cf. p. 91).

[136] B. A. H. Smith et M. V. Sefton. « Permeability of a heparin–polyvinyl alcohol hydrogel to thrombin and antithrombin III ». en. In : *Journal of Biomedical Materials Research* 22.8 (1988), p. 673-685 (cf. p. 91).

[137] M. B. Wisnudel et J. M. Torkelson. « Small-Molecule Probe Diffusion in Polymer Solutions : Studies by Taylor Dispersion and Phosphorescence Quenching ». In : *Macromolecules* 29.19 (1996), p. 6193-6207 (cf. p. 91).

[138] A. C. van Asten, W. Th Kok, R. Tijssen et H. Poppe. « Characterization of thermal diffusion of polystyrene in binary mixtures of THF/dioxane and THF/cyclohexane ». en. In : *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics* 34.2 (1996), p. 283-295 (cf. p. 91).

[139] N. Pernodet, M.Maaloum et B. Tinland. « Pore size of agarose gels by atomic force microscopy ». en. In : *ELECTROPHORESIS* 18.1 (), p. 55-58 (cf. p. 91).

[140] M. Maaloum, N. Pernodet et B. Tinland. « Agarose gel structure using atomic force microscopy : Gel concentration and ionic strength effects ». en. In : *ELECTROPHORESIS* 19.10 (1998), p. 1606-1610 (cf. p. 91).

[141] P. Nath, R. Mangal, F. Kohle, S. Choudhury, S. Narayanan, U. Wiesner et L. A. Archer. « Dynamics of Nanoparticles in Entangled Polymer Solutions ». In : *Langmuir* 34.1 (2018), p. 241-249 (cf. p. 91).

[142] A. G. Ogston. « The spaces in a uniform random suspension of fibres ». en. In : *Transactions of the Faraday Society* 54 (1958), p. 1754 (cf. p. 91, 93).

[143] P.-G. de Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. en. Google-Books-ID : ApzfJ2LYwGUC. Cornell University Press, 1979 (cf. p. 91).

[144] T. K. Attwood, B. J. Nelmes et D. B. Sellen. « Electron microscopy of beaded agarose gels ». en. In : *Biopolymers* 27.2 (1988), p. 201-212 (cf. p. 91, 110).

[145] N. Fatin-Rouge, K. Starchev et J. Buffle. « Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels ». In : *Biophysical Journal* 86.5 (2004), p. 2710-2719 (cf. p. 91, 96, 110).

[146] H. Fricke. « A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems I. The Electric Conductivity of a Suspension of Homogeneous Spheroids ». In : *Physical Review* 24.5 (1924), p. 575-587 (cf. p. 92).

[147] J. S. Mackie et P. Meares. « The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane I. Theoretical ». en. In : *Proc. R. Soc. Lond. A* 232.1191 (1955), p. 498-509 (cf. p. 92).

[148] A. G. Ogston, B. N. Preston et J. D. Wells. « On the transport of compact particles through solutions of chain-polymers ». en. In : *Proc. R. Soc. Lond. A* 333.1594 (1973), p. 297-316 (cf. p. 92, 93, 128).

[149] L. Johansson et J.-E. Löfroth. « Diffusion and interaction in gels and solutions. 4. Hard sphere Brownian dynamics simulations ». In : *The Journal of Chemical Physics* 98.9 (1993), p. 7471-7479 (cf. p. 92, 93, 114).

[150] L. Johansson, C. Elvingson et J. E. Loefroth. « Diffusion and interaction in gels and solutions. 3. Theoretical results on the obstruction effect ». en. In : *Macromolecules* 24.22 (1993), p. 6024-6029 (cf. p. 93).

[151] A. Pluen, P. A. Netti, R. K. Jain et D. A. Berk. « Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels : Comparison of Linear and Globular Configurations ». In : *Biophysical Journal* 77.1 (1999), p. 542-552 (cf. p. 93, 94).

[152] M. Djabourov, A. H. Clark, D. W. Rowlands et S. B. Ross-Murphy. « Small-angle x-ray scattering characterization of agarose sols and gels ». en. In : *Macromolecules* 22.1 (1989), p. 180-188 (cf. p. 93).

[153] R. I. Cukier. « Diffusion of Brownian spheres in semidilute polymer solutions ». en. In : *Macromolecules* 17.2 (1984), p. 252-255 (cf. p. 93).

[154] A. R. Altenberger, M. Tirrell et J. S. Dahler. « Hydrodynamic screening and particle dynamics in porous media, semidilute polymer solutions and polymer gels ». en. In : *The Journal of Chemical Physics* 84.9 (1986), p. 5122-5130 (cf. p. 93).

[155] G. D. J. Phillies. « Universal scaling equation for self-diffusion by macromolecules in solution ». en. In : *Macromolecules* 19.9 (1986), p. 2367-2376 (cf. p. 93, 94).

[156] P. Gao et P. E. Fagerness. « Diffusion in HPMC Gels. I. Determination of Drug and Water Diffusivity by Pulsed-Field-Gradient Spin-Echo NMR ». en. In : *Pharmaceutical Research* 12.7 (1995), p. 955-964 (cf. p. 93).

[157] R. E. Cameron, M. A. Jalil et A. M. Donald. « Diffusion of Bovine Serum Albumin in Amylopectin Gels Measured Using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy ». en. In : *Macromolecules* 27.10 (1994), p. 2708-2713 (cf. p. 94).

[158] E. M. Johnson, D. A. Berk, R. K. Jain et W. M. Deen. « Hindered diffusion in agarose gels : test of effective medium model ». In : *Biophysical Journal* 70.2 (1996), p. 1017-1023 (cf. p. 94, 95, 110, 128).

[159] H. C. Brinkman. « A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles ». en. In : *Flow, Turbulence and Combustion* 1.1 (1949), p. 27 (cf. p. 95).

[160] R. Metzler et J. Klafter. « The random walk's guide to anomalous diffusion : a fractional dynamics approach ». In : *Physics Reports* 339.1 (2000), p. 1-77 (cf. p. 96).

[161] P. A. Netz et T. Dorfmüller. « Computer simulation studies of anomalous diffusion in gels : Structural properties and probe-size dependence ». In : *The Journal of Chemical Physics* 103.20 (1995), p. 9074-9082 (cf. p. 96).

[162] D.S. Banks et C. Fradin. « Anomalous Diffusion of Proteins Due to Molecular Crowding ». In : *Biophysical Journal* 89.5 (2005), p. 2960-2971 (cf. p. 96).

[163] E. Özarslan, P. J. Basser, T. M. Shepherd, P. E. Thelwall, B. C. Vemuri et S. J. Blackband. « Observation of anomalous diffusion in excised tissue by characterizing the diffusion-time dependence of the MR signal ». In : *Journal of Magnetic Resonance* 183.2 (2006), p. 315-323 (cf. p. 96).

[164] F. Xiao, J. Hrabe et S. Hrabetova. « Anomalous Extracellular Diffusion in Rat Cerebellum ». English. In : *Biophysical Journal* 108.9 (2015), p. 2384-2395 (cf. p. 96).

[165] M. Baum, F. Erdel, M. Wachsmuth et K. Rippe. « Retrieving the intracellular topology from multi-scale protein mobility mapping in living cells ». en. In : *Nature Communications* 5 (2014), p. 4494 (cf. p. 96).

[166] K. N. Kudin, G. E. Scuseria et B. I. Yakobson. « C2F, BN, and C nanoshell elasticity from ab initio computations ». In : *Physical Review B* 64.23 (2001), p. 235406 (cf. p. 97).

[167] T. Odijk. « The statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers ». In : *Macromolecules* 16 (1983), p. 1340-1344 (cf. p. 99).

[168] M. Doi. « Rotational relaxation time of rigid rod-like macromolecule in concentrated solution ». en. In : *Journal de Physique* 36.7-8 (1975), p. 607-611 (cf. p. 99).

[169] F.-T. Chien, P.-K. Lin, W. Chien, C.-H. Hung, M.-H. Yu, C.-F. Chou et Y.-L. Chen. « Crowding-facilitated macromolecular transport in attractive micropost arrays ». en. In : *Scientific Reports* 7.1 (2017) (cf. p. 109).

[170] L.-H. Cai, S. Panyukov et M. Rubinstein. « Mobility of Nonsticky Nanoparticles in Polymer Liquids ». en. In : *Macromolecules* 44.19 (2011), p. 7853-7863 (cf. p. 109).

[171] A. Recasens, B. Dehay, J. Bové, I. Carballo-Carbajal, S. Dovero, A. Pérez-Villalba, P.-O. Fernagut, J. Blesa, A. Parent, C. Perier, I. Fariñas, J. A. Obeso, E. Bezard et M. Vila. « Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys ». en. In : *Annals of Neurology* 75.3 (2014), p. 351-362 (cf. p. 122).

[172] A. Recasens et B. Dehay. « Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease ». In : *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (2014) (cf. p. 122).

[173] T. K. Cherukuri, D. A. Tsyboulski et R. B. Weisman. « Length- and Defect-Dependent Fluorescence Efficiencies of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 6.1 (2012), p. 843-850 (cf. p. 132).

[174] N. F. Hartmann, S. Ebru Yalcin, L. Adamska, E. H. Hároz, X. Ma, S. Tretiak, H. Htoon et S. K. Doorn. « Photoluminescence imaging of solitary dopant sites in covalently doped single-wall carbon nanotubes ». en. In : *Nanoscale* 7.48 (2015), p. 20521-20530 (cf. p. 133, 144).

[175] Y. Miyauchi, M. Iwamura, S. Mouri, T. Kawazoe, M. Ohtsu et K. Matsuda. « Brightening of excitons in carbon nanotubes on dimensionality modification ». En. In : *Nature Photonics* 7.9 (2013), p. 715 (cf. p. 133, 142).

[176] Y. Piao, B. Meany, L. R. Powell, N. Valley, H. Kwon, G. C. Schatz et Y. Wang. « Brightening of carbon nanotube photoluminescence through the incorporation of sp^3 defects ». en. In : *Nature Chemistry* 5.10 (2013), p. 840-845 (cf. p. 133, 134).

[177] N. F. Hartmann, K. A. Velizhanin, E. H. Haroz, Mijin Kim, X. Ma, Y.H. Wang, H. Htoon et S. K. Doorn. « Photoluminescence Dynamics of Aryl sp3 Defect States in Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 10.9 (2016), p. 8355-8365 (cf. p. 133).

[178] M. Kim, L. Adamska, N. F. Hartmann, H. Kwon, J. Liu, K. A. Velizhanin, Y. Piao, L. R. Powell, B. Meany, S. K. Doorn, S. Tretiak et Y. Wang. « Fluorescent Carbon Nanotube Defects Manifest Substantial Vibrational Reorganization ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 120.20 (2016), p. 11268-11276 (cf. p. 134, 141).

[179] H. Kwon, Al'ona Furmanchuk, M. Kim, B. Meany, Y. Guo, G. C. Schatz et Y. Wang. « Molecularly Tunable Fluorescent Quantum Defects ». In : *Journal of the American Chemical Society* 138.21 (2016), p. 6878-6885 (cf. p. 133, 136).

[180] Z. Gao, L. Oudjedi, R. Faes, F. Moroté, C. Jaillet, P. Poulin, B. Lounis et L. Cognet. « Optical detection of individual ultra-short carbon nanotubes enables their length characterization down to 10 nm ». en. In : *Scientific Reports* 5 (2015), p. 17093 (cf. p. 134, 135).

[181] M. Iwamura, N. Akizuki, Y. Miyauchi, S. Mouri, J. Shaver, Z. Gao, L. Cognet, B. Lounis et K. Matsuda. « Nonlinear Photoluminescence Spectroscopy of Carbon Nanotubes with Localized Exciton States ». In : *ACS Nano* 8.11 (2014), p. 11254-11260 (cf. p. 142).

[182] X. Ma, L. Adamska, H. Yamaguchi, S. E. Yalcin, S. Tretiak, S. K. Doorn et H. Htoon. « Electronic Structure and Chemical Nature of Oxygen Dopant States in Carbon Nanotubes ». In : *ACS Nano* 8.10 (2014), p. 10782-10789 (cf. p. 143).

[183] K. I. Mortensen, L. Stirling Churchman, J. A. Spudich et H. Flyvbjerg. « Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy ». en. In : *Nature Methods* 7.5 (2010), p. 377-381 (cf. p. 146).

[184] Y. Zhang, N. Valley, A. H. Brozena, Y. Piao, X. Song, G. C. Schatz et YH Wang. « Propagative Sidewall Alkylcarboxylation that Induces Red-Shifted Near-IR Photoluminescence in Single-Walled Carbon Nanotubes ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 4.5 (2013), p. 826-830 (cf. p. 149).

[185] N. Danné, M. Kim, A. G. Godin, H. Kwon, Z. Gao, X. Wu, N. F. Hartmann, S. K. Doorn, B. Lounis, Y.H. Wang et L. Cognet. « Ultrashort Carbon Nanotubes That Fluoresce Brightly in the Near-Infrared ». In : *ACS Nano* 12.6 (2018), p. 6059-6065 (cf. p. 149).

[186] X. He, N. F. Hartmann, X. Ma, Y. Kim, R. Ihly, J. L. Blackburn, W. Gao, J. Kono, Y. Yomogida, A. Hirano, T. Tanaka, H. Kataura, H. Htoon et S. K. Doorn. « Tunable room-temperature single-photon emission at telecom wavelengths from sp^3 defects in carbon nanotubes ». en. In : *Nature Photonics* 11.9 (2017), p. 577-582 (cf. p. 149).

[187] I. Jakobsen, H. Lyng, O. Kaalhus et E. K. Rofstad. « MRI of human tumor xenografts in vivo : Proton relaxation times and extracellular tumor volume ». In : *Magnetic Resonance Imaging* 13.5 (1995), p. 693-700 (cf. p. 154).

Résumé :

Le cerveau est composé principalement de neurones qui assurent la communication neuronale et de cellules gliales qui jouent un rôle de soutien et de protection du réseau neuronal. L'espace extra-cellulaire correspond à l'espace qui existe entre toutes ces cellules ce qui représente environ 20% du volume total du cerveau. Son organisation est complexe et il y circule les neurotransmetteurs et de nombreuses autres molécules nécessaire au bon fonctionnement du cerveau et à la communication neuronale optimale. Ainsi, il se modifie au cours de l'âge, l'apprentissage ou lors de maladies neuro-dégénératives. Cependant, ses dimensions et sa viscosité locales restent encore mal-connues. Pour appréhender ces paramètres clés, dans cette thèse, nous avons développé une stratégie basée sur le suivi de nanotubes de carbone individuels luminescents. Nous avons appliqué cette approche à la mesure des propriétés structurelles et visqueuses de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rongeurs vivantes à l'échelle nanométrique. L'organisation du manuscrit est la suivante. Après une introduction des propriétés de photoluminescence des nanotubes de carbone, nous y présentons l'étude nous ayant permis de sélectionner le protocole optimal d'encapsulation des nanotubes pour réaliser nos applications biologiques. Nous y présentons également une étude quantitative décrivant l'augmentation de température de l'échantillon sous l'effet d'irradiations lasers à différentes longueurs d'ondes et permettant de détecter des nanotubes individuels dans une tranche de cerveau. Grâce à une analyse fine des propriétés singulières de diffusion des nanotubes de carbone dans les espaces complexes, nous présentons ensuite la stratégie mise en place pour reconstruire des cartes super-résolues (i.e. avec des résolutions sous la limite de diffraction) de la morphologie de l'espace extracellulaire. Nous montrons également que deux propriétés locales de cet espace peuvent être extraites : un paramètre de complexité propre aux structures (tortuosité) et la viscosité *in situ* du fluide vue par les nanotubes. Cela nous a conduit à proposer une méthodologie permettant de modéliser la viscosité *in situ* qui serait vue, non pas par les nanotubes, mais par toute molécule de tailles arbitraire pour simuler celles intrinsèquement présentes ou administrées dans le cerveau pour des traitements pharmacologiques. Enfin, nous présentons une stratégie permettant de rendre luminescents des nanotubes de carbone ultra-courts qui ne sont pas intrinsèquement luminescents et dont leur utilisation pourrait constituer une approche complémentaire pour mesurer la viscosité locale de l'ECS.

Mots clés : Nanotubes de carbone, suivi d'objets individuels, microscopie de super-résolution, neurosciences, espace extra-cellulaire du cerveau, diffusion

Abstract :

The brain is mainly composed of neurons which ensure neuronal communication and glial cells which play a role in supporting and protecting the neural network. The extracellular space corresponds to the space that exists between all these cells and represents around 20 $\%$ of the whole brain volume. In this space, neurotransmitters and other molecules circulate in to ensure optimal neuronal functioning and communication. Its complex organization which is important to ensure proper functioning of the brain changes during aging, learning or neurodegenerative diseases. However, its local dimensions and viscosity are still poorly known. To understand these key parameters, in this thesis, we developed a strategy based on the tracking of single luminescent carbon nanotubes. We applied this strategy to measure the structural and viscous properties of the extracellular space of living rodent brains slices at the nanoscale. The organization of the manuscript is as follows. After an introduction of the photoluminescence properties of carbon nanotubes, we present the study that allowed us to select the optimal nanotube encapsulation protocol to achieve our biological applications. We also present a quantitative study describing the temperature increase of the sample when laser irradiations at different wavelengths are used to detect single nanotubes in a brain slice. Thanks to a fine analysis of the singular diffusion properties of carbon nanotubes in complex environments, we then present the strategy set up to reconstruct super-resolved maps (i.e. with resolution below the diffraction limit) of the brain extracellular space morphology. We also show that two local properties of this space can be extracted : a structural complexity parameter (tortuosity) and the fluid's *in situ* viscosity seen by the nanotubes. This led us to propose a methodology allowing to model the viscosity *in situ* that would be seen, not by the nanotubes, but by any molecule of arbitrary sizes to simulate those intrinsically present or administered in the brain for pharmacological treatments. Finally, we present a strategy to make luminescent ultra-short carbon nanotubes that are not intrinsically luminescent and whose use could be a complementary approach to measure the local viscosity of the extracellular space of the brain.

Keywords : Carbon nanotubes, single particles tracking, super-resolution microscopy, neurosciences, brain extra-cellular space, diffusion

Résumé :

Le cerveau est composé principalement de neurones assurant la communication neuronale et de cellules gliales jouant un rôle de soutien et de protection du réseau neuronal. L'espace extra-cellulaire correspond à l'espace entre toutes ces cellules et représente environ 20% du volume total du cerveau. Son organisation est complexe et il y circule les neurotransmetteurs et de nombreuses molécules nécessaires au bon fonctionnement du cerveau. Ainsi, il se modifie au cours de l'âge, l'apprentissage ou lors de maladies neuro-dégénératives. Néanmoins, ses dimensions et sa viscosité locales sont encore mal-connues. Pour appréhender ces paramètres clés, dans cette thèse, nous avons développé une stratégie basée sur le suivi et l'imagerie de super-résolution de nanotubes de carbone individuels luminescents. Nous avons appliqué cette approche à la mesure des propriétés structurelles et visqueuses de l'espace extra-cellulaire de tranches de cerveaux de rongeurs vivantes à l'échelle nanométrique.

Mots clés : Nanotubes de carbone, suivi d'objets individuels, microscopie de super-résolution, neurosciences, espace extra-cellulaire du cerveau, diffusion

---

Abstract :

The brain is mainly composed of neurons which ensure neuronal communication and glial cells which play a role in supporting and protecting the neural network. The extracellular space corresponds to the space that exists between all these cells and represents around 20 % of the whole brain volume. In this space, neurotransmitters and other molecules circulate in to ensure optimal neuronal functioning and communication. Its complex organization which is important to ensure proper functioning of the brain changes during aging, learning or neurodegenerative diseases. However, its local dimensions and viscosity are still poorly known. To understand these key parameters, in this thesis, we developed a strategy based on the tracking and super-resolution imaging of single luminescent carbon nanotubes. We applied this strategy to measure the structural and viscous properties of the extracellular space of living rodent brains slices at the nanoscale.

Keywords : Carbon nanotubes, single particles tracking, super-resolution microscopy, neurosciences, brain extra-cellular space, diffusion