



HAL
open science

Mesure de température sans contact, en temps réel et à l'échelle cellulaire, par photoluminescence de nanoparticules de sulfure d'argent

Lise Abiven

► **To cite this version:**

Lise Abiven. Mesure de température sans contact, en temps réel et à l'échelle cellulaire, par photoluminescence de nanoparticules de sulfure d'argent. Matériaux. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS027 . tel-04458724

HAL Id: tel-04458724

<https://theses.hal.science/tel-04458724>

Submitted on 15 Feb 2024

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.



Sorbonne Université

ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE ET CHIMIE DES MATERIAUX (ED 397)

Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (UMR 7574, Sorbonne Université)

Laboratoire Matière et Système Complexes (UMR 7057, Université de Paris)

**Mesure de température sans contact, en temps réel et à
l'échelle cellulaire, par photoluminescence de
nanoparticules de sulfure d'argent**

THESE DE DOCTORAT DE PHYSIQUE ET CHIMIE DES MATERIAUX

PRÉSENTÉE PAR **LISE ABIVEN**

Soutenance prévue le **14 février 2022** devant le Jury composé de :

Mme Claire Mangeney	Professeure	Rapporteur
Mme Hélène Serier Brault	Maitre de Conférences	Rapporteur
M. Luís Carlos	Professeur	Examinateur
M. Stéphane Roux	Professeur	Examinateur
M. Thomas Pons	Chargé de recherche	Examinateur
Mme Corinne Chanéac	Professeure	Directrice de thèse
Mme Florence Gazeau	Directrice de Recherche	Co-directrice de thèse
M. Bruno Viana	Directeur de Recherche	Examinateur

Remerciements

Je tiens à remercier mes directrices de thèse, **Corinne Chanéac** et **Florence Gazeau**, de m'avoir permis de me lancer dans l'aventure du doctorat sur un sujet passionnant et interdisciplinaire, à la frontière entre la chimie des matériaux, l'optique des solides et la biologie. Mes travaux de recherche ont été financés par le fonds européen H2020 (projet NanoTBTech H2020-FETOPEN-1-2016-2017 - Grant Agreement: 801305). Corinne et Florence, merci pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces trois années, pour votre bienveillance et vos conseils. Grâce à vous, j'ai eu la chance de pouvoir suivre mon intuition scientifique et de satisfaire ma curiosité. Par ailleurs, je vous remercie de m'avoir permis de participer au séminaire « Valoriser la recherche en nanosciences par la création d'entreprise », puis d'intégrer la promotion FCE21 de la filière Centrale Entrepreneurs.

Je remercie **Bruno Viana** de m'avoir permis d'accéder aux locaux et au matériel expérimental de Chimie Paris pour réaliser les expériences de nanothermométrie.

J'adresse tous mes remerciements aux membres de mon jury de thèse, **Hélène Brault**, **Claire Mangeney**, **Thomas Pons**, **Stéphane Roux** et **Luís Carlos**. Merci pour le temps que vous avez accordé à la lecture de mon manuscrit et pour la discussion très enrichissante que nous avons eue ensemble lors de la soutenance.

Au cours de ce doctorat, j'ai eu la chance de partager mon temps entre trois laboratoires : le LCMCP (Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris), le MSC-Med (Matière et Système Complexes) et l'IRCP (Institut de Recherche de Chimie Paris). J'ai eu le plaisir de rencontrer et de partager mon quotidien au laboratoire avec des chercheurs et des doctorants passionnés. Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu des discussions scientifiques passionnantes. **Alban Ferrier**, **Nao Harada**, **Éloïse Lafitte-Houssat**, **Kelly Aubertin**, **Jeanne Volatron**, **Thomas Guilbert**, **Markus Sutta**, **Daniel Jaque** : un grand merci pour votre enthousiasme, vos conseils et vos questions ayant contribué à l'avancée de mes travaux.

Merci à **Christian Bonhomme** et **François Ribot**, l'équipe de direction du LCMCP de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et offert des conditions de travail optimales.

Un grand merci à **Hélène Gervais**, **Corinne Pozzo**, **Diana Lesueur** et **Simon Dadoun** : votre soutien sans faille sur le plan admiratif, logistique et informatique est très précieux.

Je remercie **Patrick Le Griel** (MET), **Isabelle Génois** (MEB), **Sandra Casale** (EDX) pour le temps que vous avez pris pour réaliser des clichés de microscopie sur mes échantillons. Merci également à **Carlos Brites** et **Miguel Hernández** pour les mesures de rendement quantique.

Thomas Lecuyer et **Sonia Becharef**, je vous remercie pour la culture cellulaire que vous avez réalisée pour les expériences de nanothermométrie. Je remercie également **Jean-François Engrand** de m'avoir aidée sur le couplage entre le dispositif d'hyperthermie magnétique et le dispositif optique. **Quentin Morelle** et **Florent Moreau**, merci de m'avoir accompagnée sur les deux projets de machine learning et d'avoir mis, avec enthousiasme, votre expertise au service du projet.

Merci également à **Anikitos Garofalakis** et **Lise Laumonier** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser des expériences dans le cadre de la conception du dispositif d'imagerie opérant dans le proche infrarouge pour la nanothermométrie.

Sabrina Benbaabali, un grand merci pour ton implication dans les travaux que tu as réalisés dans le cadre de ton stage de fin d'études en synthèse de matériaux. Tes grandes qualités humaines (empathie, écoute, générosité) et professionnelles (rigueur, courage et dynamisme) ont rendu les 6 mois passés à tes côtés fantastiques.

Mathilde Chaboud, merci pour tes conseils en salle d'optique et les discussions passionnées sur nos pratiques sportives. Merci également pour ton optimisme, ton dynamisme et le soutien que tu m'as apporté.

Victor Castaing, Estelle Glais, Alba Nicolas-Boluda, Alice Balfourier vos travaux de thèse m'ont profondément inspiré. Je vous remercie pour la qualité de votre travail et pour les discussions qui nous avons partagées.

Un grand merci aux doctorants du LCMCP : j'ai passé de superbes moments en votre compagnie (théâtre, resto, ciné, escape game ...). **Camille C., Vivianne, Cyprien, Corentin, Jérémy, Camille F. Rhune, Rémi, Victoire, Chloé, Maxime...** Je tiens à remercier tout particulièrement **Mélissa Richard, Jérémy Sum, Corentin Eschenbrenner et Rémi André** pour le support technique et pour votre présence rassurante le jour de la soutenance.

Merci à mes coachs et à mes amis de **Issy Triathlon**. Merci pour vos encouragements et votre énergie positive et communicative. Vive le sport !

Merci à **Valérie, Michel, Anne et Ella** pour votre joie de vivre. C'est un réel plaisir de partager mon quotidien avec vous à la coloco.

Pau, Vio, Chloé, Math, Gwlad, Lulu : mes amies de toujours, avec qui j'ai grandi et partagé des moments inoubliables. Merci d'être toujours là pour moi et d'avoir fait le déplacement de Brest et de Nantes pour assister à ma soutenance. Votre présence m'a permis de trouver l'énergie de donner le meilleur de moi-même.

Merci à ma **marraine, mes tantes, mes oncles, mes cousines et mes cousins** pour votre soutien et votre amour.

Merci à mon petit frère, **Nico**, je suis admirative et inspirée par ta passion et ton courage.

Merci à **mes parents** de m'avoir appris à ne jamais mettre de limites à mes rêves. Merci de m'avoir laissé développer mon intuition et de n'avoir jamais bridé mes ambitions. Merci d'avoir toujours suivi mes choix, sans jamais douter de mes capacités à atteindre mes objectifs. Je me sens privilégiée d'avoir, grâce à vous, grandi dans un environnement ouvert d'esprit et rempli d'amour. C'est ce terreau fertile qui me donne l'envie et la confiance de toujours me fixer de nouveaux objectifs et d'œuvrer pour les atteindre. Papa et maman, merci de m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Je vous aime.

À toutes les personnes qui ont assisté à ma soutenance de thèse ou qui ont pensé à moi ce jour-là, un **GRAND MERCI !**

Lise

Table des matières

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

I. LES NANOMATÉRIAUX POUR LE VIVANT	2
I.1. Définitions	2
I.2. La réactivité de surface des nanoparticules	3
I.3. Le cycle de vie des nanoparticules métalliques au sein du vivant	4
II. DU LABORATOIRE DE RECHERCHE JUSQU’AU LIT DU MALADE	8
II.1. La recherche translationnelle	8
II.2. Le développement réglementaire	8
II.3. Le succès d’une société de biotechnologie	10
II.4. La France peut-elle devenir un leader européen dans le domaine de l’innovation en santé ?	11
III. MESURER LA TEMPERATURE LOCALE AU SEIN DU VIVANT	13
III.1. Justification du besoin	13
III.2. L’hyperthermie thérapeutique comme traitement adjuvant contre les cancers	13
III.3. Les instruments disponibles pour mesurer la température	16
IV. LES PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LA NANOTHERMOMETRIE DE PHOTOLUMINESCENCE	18
IV.1. La structure électronique des nanomatériaux	18
IV.2. Les photoluminescences	20
IV.3. Photoluminescence et température	21
V. CAHIER DES CHARGES D’UN NANOTHERMOMETRE POUR LE VIVANT	25
V.1. Prérequis	25
V.2. Absorption et émission du nanothermomètre	25
V.3. Rendement quantique	26

V.4. Sensibilité thermique	26
V.5. Pour conclure	27
VI. PRESENTATION DES ETUDES MENEES DANS LE CADRE DE CETTE THESE	28
VI.1. Rappel du cadre applicatif de la thèse	28
VI.2. Synthèse et évaluation de nanocristaux de sulfure d'argent pour la nanothermométrie de photoluminescence appliquée au vivant	28
VI.3. Nanothermométrie et hyperthermie magnétoinduite	29
VI.4. Nanothermométrie et interaction lumière-matière	29
CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET EVALUATION DE NANOCRISTAUX D'Ag₂S PAR LA NANOTHERMOMETRIE	
I. LE NANOCRISTAL DE SULFURE D'ARGENT POUR LA NANOTHERMOMETRIE DE PHOTOLUMINESCENCE APPLIQUEE AU VIVANT	32
I.1. Choix du nanothermomètre	32
I.2. Le cycle de vie des sulfures d'argent au sein des systèmes biologiques	33
I.3. Les propriétés optiques des nanoparticules de sulfure d'argent	34
I.4. Critère de performance du nanothermomètre Ag₂S	36
II. LES PROPRIETES PHYSICOCIMIQUES DU NANOCRISTAL SEMI-CONDUCTEUR DE SULFURE D'ARGENT	38
II.1. Les phases cristallines du sulfure d'argent	38
II.2. Les propriétés de photoluminescence	41
III. SYNTHETISER DES NANOPARTICULES DE SULFURE D'ARGENT	44
III.1. Les stratégies de synthèses possibles	44
III.2. La synthèse aqueuse de nanocristaux semi-conducteurs d'Ag₂S	44

IV. CHOIX EXPERIMENTAUX POUR LA SYNTHÈSE DE SULFURE D'ARGENT DEVELOPPEE DANS CE TRAVAIL DE THESE	47
IV.1. La stratégie de synthèse	47
IV.2. La méthode de chauffage	48
IV.3. Le ligand de synthèse	52
IV.4. Le pH du milieu réactionnel	53
IV.5. Description des expériences	54
V. CARACTERISATIONS PHYSICOCHIMIQUES DES MATERIAUX	56
V.1. Morphologies des particules	56
V.2. Composition chimique	62
V.3. Propriétés optiques	64
VI. EVALUATION DE LA PERFORMANCE DES NANOTHERMOMETRES CANDIDATS Ag_2S-11MUA	67
VI.1. Description de l'étude	67
VI.2. Choix du paramètre de photoluminescence pour la nanothermométrie avec Ag_2S -11MUA	68
VI.3. Les mécanismes de photoluminescence des nanothermomètres candidats	74
VII. SELECTION DU NANOTHERMOMETRE DE REFERENCE	78
VIII. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'Ag_2S-PEG	79
VIII.1. Stratégie expérimentale	79
VIII.2. Caractérisation physicochimique des matériaux	80
VIII.3. Évaluation d' Ag_2S -PEG-[5 ; 15] pour la nanothermométrie	82
IX. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES Ag_2S-DTDTPA	83
IX.1. Stratégie expérimentale	83
IX.2. Caractérisations physicochimiques des matériaux	84
IX.3. Évaluation d' Ag_2S -DTDTPA pour la nanothermométrie	88

CHAPITRE 3 : NANOTHERMOMETRIE ET HYPERTHERMIE MAGNETOINDUITE

I. ETAT DE L'ART	91
I.1. Les principes fondamentaux de l'hyperthermie magnétoinduite	91
I.2. Le couplage Nanothermomètre - source de chaleur dans la littérature	93
II. PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE	95
II.1. Objectifs	95
II.2. Matériel expérimental	95
II.3. Étalonnage du nanothermomètre	97
II.4. Programmes d'excitation	99
III. MESURES DE TEMPERATURES LOCALES EN SUSPENSION AQUEUSE	101
III.1. Description du système nanothermomètre-nanosource de chaleur	101
III.2. Programme d'excitation n°1	106
III.3. Programme d'excitation n°2	110
III.4. Synthèse des résultats	114
IV. MESURES DE TEMPERATURES LOCALES EN MILIEU CELLULAIRE	116
IV.1. Description de l'expérience	116
IV.2. Résultats	118
IV.3. Pour conclure	125
V. ANALYSE CRITIQUE DES RESULTATS PRESENTES DANS CE CHAPITRE	126
V.1. Les résultats de l'étude	126
V.2. Les limites de l'étude	126

CHAPITRE 4 : NANOTHERMOMETRIE ET INTERACTION LUMIERE-MATIERE

I. NANOTHERMOMETRIE ET INTERACTIONS LUMIERE-MATIERE	131
I.1. Contexte	131
I.2. L'interaction entre la lumière et la matière	131
I.3. L'interaction entre la lumière et les tissus biologiques	133
I.4. Un nanothermomètre est-il toujours fiable ?	137
II. MODELISATION DE L'ABSORPTION DE L'EAU	139
II.1. Description de l'expérience	139
II.2. Résultats et discussions	140
II.3. Calcul des coefficients d'absorption de l'eau	142
III. INTERACTIONS LUMIERE MATIERE ET ROBUSTESSE DE LA MESURE DE TEMPERATURE	144
III.1. Démarche expérimentale	144
III.2. Étude de cas 1	146
III.3. Étude de cas 2	149
III.4. Pour conclure	151
IV. PROPOSITIONS DE CHANGEMENT DE PARADIGME POUR LA MESURE DE TEMPERATURE PAR PHOTOLUMINESCENCE DES SULFURES D'ARGENT	152
IV.1. Exploitation de la loi de Beer-Lambert	152
IV.2. Modèle de prédiction en température et en profondeur	157
IV.3. Pour conclure	162
V. L'INTERACTION ENTRE LA LUMIERE ET LES TISSUS BIOLOGIQUES COMME OUTIL DE DIAGNOSTIC	163

VI. TRANSILLUMINATION TISSULAIRE : CLASSIFICATION FOIE-CERVEAU GRACE A LA PHOTOLUMINESCENCE DES SULFURES D'ARGENT	165
VI.1. Choix expérimentaux	165
VI.2. Résultats et discussions	167
VI.3. Pour conclure	168
VII. ANALYSE DE POTENTIEL APPLICATIF DE LA DISCRIMINATION TISSULAIRE PAR TRANSILLUMINATION GRACE AUX SULFURES D'ARGENT	169
CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE	
I. NOTRE DEMARCHE	173
II. RESULTATS	173
III. PERSPECTIVES DE TRAVAIL	175
POSTFACE	177
VALORISATION SCIENTIFIQUE	179
BIBLIOGRAPHIE	183
ANNEXES	191

Avant-propos

D'après **Frédérique VIDAL**, ministre de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation¹ : « L'innovation en santé représente [...] une condition essentielle de notre résilience et de notre souveraineté. Elle porte une triple promesse : des citoyens mieux soignés, des entreprises plus compétitives, pour un pays mieux préparé aux défis futurs. Ce défi est immense, mais nous avons la chance de pouvoir compter en France sur deux atouts maîtres : un écosystème HealthTech foisonnant, agile, engagé et une recherche académique d'excellence, capable de fournir aux entreprises le supplément de créativité qui fera toute la différence »

Le monde qui nous entoure et l'état de nos connaissances sont en perpétuelle évolution. Nous assistons à une croissance technologique impressionnante : nanotechnologies, biotechnologies, informatique, sciences cognitives, intelligence artificielle... Néanmoins, nous restons régis par les lois de la nature, à la merci de virus et de bouleversements climatiques. Dans un environnement aussi dynamique, je souhaite m'investir professionnellement dans le développement d'innovations technologiques au service de la santé des citoyens, tout en mesurant en permanence l'impact environnemental, économique et sociétal des activités auxquelles je participe.

En 2017, avant de me lancer dans l'aventure du doctorat, j'intègre le cursus *Ingénierie et Santé* proposé à l'École de Mines de Saint-Étienne. Les cours que je suis pendant cette année de spécialisation en école d'ingénieur sont dispensés sur le site de l'Hôpital Nord, le CHU de la ville. La proximité avec les médecins me permet de saisir l'opportunité d'aller au bloc opératoire pour assister à des interventions chirurgicales et de collaborer avec un chirurgien thoracique sur le développement d'un poumon artificiel, dans le cadre de mon stage de fin d'études. Je réalise alors que j'ai un rôle à jouer au sein de l'écosystème de la santé. Je découvre un secteur d'activité fascinant et à la recherche de solutions techniques pour améliorer la prise en charge des patients. Après mes études d'ingénieur, je ressens l'envie de comprendre les étapes du développement des innovations pour la santé, du laboratoire de recherche, jusqu'au lit du malade (**chapitre 1**). Je m'oriente vers la thèse pour participer activement aux phases de développement préliminaires d'une technologie biomédicale. En 2018, je choisis de rejoindre les laboratoires du Pr **Corinne CHANEAC** à Sorbonne Université du Dr **Florence GAZEAU** à l'Université de Paris. Je suis séduite par l'interdisciplinarité et la richesse des ressources que mes directrices de thèse m'offrent. L'aventure de la thèse a été, pour moi, très riche et propice au développement de mes compétences intellectuelles et émotionnelles.

Ce manuscrit détaille les travaux de recherche que j'ai menés entre novembre 2018 et février 2022, dans le cadre de ma thèse de doctorat en physique et chimie des matériaux. Ils sont organisés autour de trois thématiques à la frontière entre la chimie des matériaux, l'optique des solides et la biologie. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit porte sur le développement d'un nanothermomètre basé sur la photoluminescence de nanoparticules de sulfure d'argent pour mesurer la température en temps réel et à l'échelle cellulaire au sein de milieux biologiques. Le manuscrit est organisé de la manière suivante :

¹ <http://www.france-biotech.fr/wp-content/uploads/2021/02/pano-2020-final.pdf>

Une introduction générale (chapitre 1) : Tout d'abord, l'impact sociétal des innovations thérapeutiques basées sur les nanosciences est étudié. Ensuite, le cahier des charges d'un nanothermomètre destiné à des applications biologiques est établi.

Trois chapitres de résultats expérimentaux : Tout d'abord, le développement d'une voie de synthèse ainsi qu'une étude d'optimisation de nanocristaux d'Ag₂S pour la nanothermométrie de photoluminescence appliquée au vivant seront présentés (**chapitre 2**). Ensuite, nous utilisons le nanothermomètre Ag₂S optimisé pour sonder la température au voisinage de nanosphères de maghémite dans le cadre d'expérience d'hyperthermie magnétoinduite (**chapitre 3**). Enfin, nous proposons une étude métrologique de la mesure de température effectuée grâce au nanothermomètre Ag₂S, ainsi qu'un changement de paradigme concernant le traitement du signal de photoluminescence pour la nanothermométrie (**chapitre 4**).

Une conclusion générale (chapitre 5) : Elle dresse un bilan de mes trois années de thèse et donne quelques pistes de réflexion destinées à mes successeurs pour continuer le projet.

Pour compléter le développement principal, **six annexes** sont proposées :

- A. Méthodes expérimentales
- B. Méthodes de traitement des données
- C. Informations complémentaires
- D. Pour approfondir notre compréhension des mécanismes de photoluminescence
- E. Nanothermométrie et Hyperthermie in vivo
- F. La nanoplateforme Ag₂S-DTDTPA- γ -Fe₂O₃^{nanofleurs}

Introduction générale

Partie 1 – Le développement de nanomatériaux pour le secteur de la Santé

I. Les nanomatériaux pour le vivant

I.1. Définitions

I.1.a. Les nanomatériaux

Depuis une dizaine d'années, les nanomatériaux connaissent un véritable essor au sein des laboratoires académiques et industriels. Ce succès peut s'expliquer par leur grande réactivité de surface et à l'émergence de nouvelles propriétés électromagnétiques et optiques, par exemple, par rapport au matériau à l'état massif. Une nanoparticule est un objet dont au moins une des dimensions est comprise² entre 1 nm et 100 nm. La famille des nanoparticules est très vaste (figure I-1) et offre un large catalogue de propriétés. Grâce aux nanoparticules, nous avons à notre disposition une infinité de stratégies possibles pour concevoir sur mesure un matériau répondant à un cahier des charges donné.

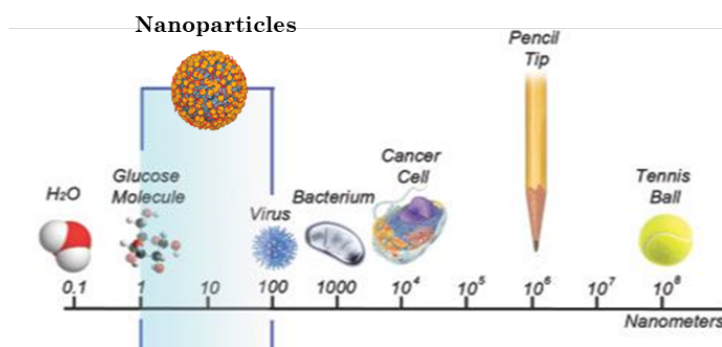


Figure I-1 : Échelle de tailles pour situer les nanoparticules par rapport à différents objets chimiques, biologiques et du quotidien. *Standard ISO TS/27687*

Les propriétés des nanoparticules et leurs interactions avec l'environnement dans lequel elles évoluent dépendent de leur origine, de leur composition et de leur morphologie. Les nanoparticules ont des origines variées. Elles peuvent être formées de manière naturelle (vésicules extracellulaires, magnétosomes) ou issues de l'activité humaine (NHtheraguix produit des nanoparticules contenant du gadolinium pour amplifier les effets de la radiothérapie). En termes de composition, le cœur des nanoparticules peut être organique ou inorganique. Au niveau de la surface des nanoparticules, il est possible de faire croître une coquille de phase différente de celle cœur ou de greffer des molécules organiques conférant au nanomatériau des propriétés intéressantes pour répondre au cahier des charges de l'application visée. Par exemple, dans le cadre du développement d'un nanomatériau pour une application biomédicale, l'état de surface est un paramètre clé à considérer dans les études de biodistribution [1]. Un des critères du cahier des charges des nanoparticules développées pour le vivant est d'avoir un temps de circulation long dans le système sanguin. Plus le temps de circulation des nanoparticules dans le système sanguin est long, plus les nanoparticules ont une probabilité élevée d'atteindre leur cible et d'avoir l'action qui a motivé leur développement. Pour répondre à ce critère, il est courant de décorer les nanoparticules avec des molécules de polyéthylène glycol (PEG) [2], [3]. En termes de morphologie, les nanoparticules peuvent être en forme de feuillet, de fibre, de sphère, de bâtonnet, d'étoile ou de cube [4], [5]. Lorsque le développement d'un nanomatériau vise une application biomédicale, la forme et la taille des nanoparticules sont des paramètres clés à étudier lors des études de toxicité [6].

² Définition de l'Union International de Chimie Pure et Appliquée, IUPAC

I.1.b. Le vivant

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle de tous les organismes vivants. Les cellules ont des dimensions de l'ordre de 10 à 30 μm (figure I-1). Un être vertébré est composé de plus de 200 types de cellules différentes, organisées les unes par rapport aux autres pour former les tissus et les organes. La cellule biologique a une structure complexe isolée du milieu extracellulaire grâce à une membrane. En fonction de leurs propriétés (organisation spatiale, charge) et de leur composition, le transport membranaire de molécules ou d'ions à travers la membrane plasmique, peut avoir lieu. Le milieu intracellulaire est composé de différents organites distribués au sein du cytoplasme. Parmi les organites les plus importants, nous pouvons citer le noyau contenant les chromosomes. Les chromosomes sont constitués d'ADN et portent toute l'information génétique de la cellule. Les mitochondries génèrent l'énergie permettant à la cellule de fonctionner. Les lysosomes contiennent des enzymes capables de dégrader de nombreuses molécules biologiques qui sont utiles au fonctionnement de la cellule. Les êtres vivants sont soumis à de nombreuses perturbations biologiques, enzymatiques, chimiques et thermiques. Pour résister à ces perturbations, le milieu intracellulaire est en perpétuel équilibre avec le milieu extracellulaire entourant les cellules. Ce processus de régulation s'appelle l'homéostasie.

I.2. La réactivité de surface des nanoparticules

I.2.a. L'interface entre les nanoparticules et leur environnement ...

À volume égal, la réactivité des nanoparticules est bien plus importante que le même matériau à l'état massif. En effet, dans le cas des nanomatériaux, le rapport surface/volume est plus élevé que pour les matériaux à l'état massif. Considérons deux systèmes, le premier est une particule de 1 μm de rayon et le second est constitué de 2 millions de nanoparticules de 5 nm de rayon. Ces deux systèmes correspondent à un volume de matière équivalent. En revanche, la surface totale de l'interface système-milieu est 60 plus grande pour le système 2 que pour le système 1.

	<i>Le système 1</i> $r = 1.10^{-6} \text{ m}$	<i>Une particule du système 2</i> $r = 5.10^{-9} \text{ m}$
Surface (m^2)	1.10^{-11}	3.10^{-16}
Volume (m^3)	1.10^{-18}	5.10^{-25}
Rapport surface/volume	10^7	10^9

I.2.b. ... Un support privilégié pour mener des actions spécifiques à l'échelle cellulaire

Grâce à leur petite taille et à leur grande réactivité de surface, les nanoparticules sont des leviers d'action très efficaces dans les réactions biologiques. En effet, toute la machinerie cellulaire est basée sur des processus de reconnaissance de surface [7], [8]. Les nanoparticules peuvent donc facilement interagir avec l'environnement biologique grâce à des processus de reconnaissance de protéines, par exemple.

Prenons l'exemple d'une nanoparticule naturellement présente dans notre environnement : un virus. Un virus est environ 100 fois plus petit qu'une cellule humaine. Dans le cas des coronavirus, les protéines S localisées en surface de l'agent pathogène peuvent se fixer à des récepteurs cellulaires (Figure I-2). Ces récepteurs cellulaires sont spécifiques de la composition et de la conformation spatiale de la protéine S. La protéine S permet donc au virus de cibler des cellules précises et d'être internalisée par la cellule ciblée. Une fois à l'intérieur de la cellule, le « virus père » est reproduit par

la cellule infectée en plusieurs « virus fils » qui iront à leur tour contaminer les cellules voisines. Une nanoparticule peut donc contrôler et déclencher des mécanismes cellulaires ³.

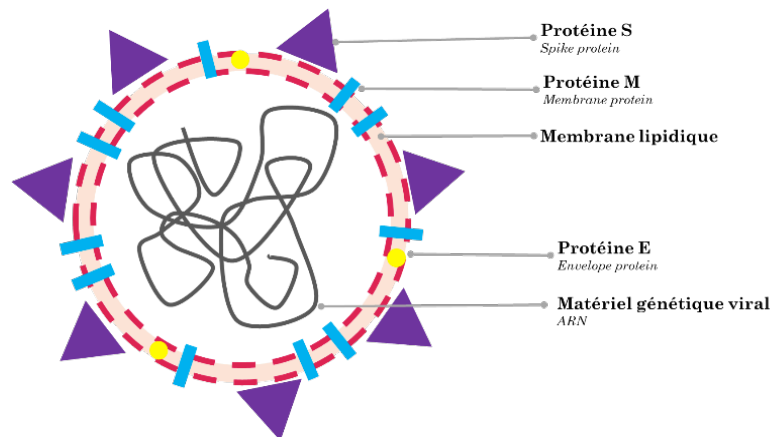


Figure I-2 : Schéma d'un virus avec ses principales composantes. Les protéines S se trouvent à la surface des coronavirus. Elles sont spécifiques de certains récepteurs cellulaires et permettent au virus de pénétrer à l'intérieur des cellules ciblées⁴.

Prenons maintenant l'exemple de nanocomposés obtenus grâce à la chimie de synthèse. L'adénosine est une molécule hydrophile avec des propriétés intéressantes pour aider la récupération motrice des personnes ayant subi un infarctus. Néanmoins, elle est très rapidement métabolisée et cela constitue un frein à son efficacité en clinique [9]. Les études *in-vitro* et *in-vivo* réalisées en 2014 par Gaudin *et al.* ont montré que le couplage de l'adénosine avec une nanoparticule lipidique de squalène lui permet d'avoir une meilleure interaction avec le système neurovasculaire [9]. La molécule d'adénosine est pharmacologiquement plus efficace lorsqu'elle est greffée à la surface d'une nanoparticule que lorsqu'elle est injectée seule au patient. La récupération motrice des patients recevant le composé adénosine-squalène pourrait ainsi être accélérée par rapport à ceux recevant l'adénosine seule.

I.3. Le cycle de vie des nanoparticules métalliques au sein du vivant

I.3.a. L'action des nanoparticules sur le vivant : la toxicité

Les facteurs de toxicité cellulaire

Dans cette section, nous étudions la toxicité des nanoparticules métalliques. Pour rendre compte de la toxicité des métaux, la spéciation et la dose sont deux facteurs clés. La spéciation d'un élément correspond à la forme physico-chimique sous laquelle il est présent dans le milieu d'étude (degré d'oxydation, formation de complexes). La spéciation d'un élément dépend du pH et de la composition du milieu (présence de ligands, d'espèces redox) et présente un lien direct avec la toxicité du composé [10]. Par exemple, lorsque des ions libres entrent dans les compartiments intracellulaires, ces derniers constituent une des formes métalliques les plus toxiques [10]. Des mécanismes de défense existent pour prévenir l'augmentation de la concentration intracellulaire d'un métal au-delà du seuil létal pour la cellule [11][12]. Par exemple, lorsque des ions métalliques de cuivre (II) (Cu^{2+}) sont présents en trop grande quantité dans le milieu extracellulaire de microalgues vertes, ils sont chélatés par certains ligands pouvant être sécrétés par les cellules. Une fois chélaté, l'ion Cu^{2+} ne peut plus pénétrer dans la cellule [11].

³ Citation d'un article dont je suis l'auteure, publié dans le journal The Conversation en Mars 2020 : <https://theconversation.com/ces-savons-qui-font-la-peau-au-virus-134414>

⁴ Illustration extraite d'un article dont je suis l'auteurice, publié dans le journal The Conversation en Mars 2020 : <https://theconversation.com/ces-savons-qui-font-la-peau-au-virus-134414>

Les mécanismes de toxicité cellulaire

La cytotoxicité des nanoparticules est leur capacité à détruire les cellules de l'organisme. Elle peut résulter de l'adsorption des nanoparticules sur la membrane lipidique des cellules. En effet, la présence des nanoparticules au niveau de la surface des cellules peut modifier la morphologie, les propriétés mécaniques ou même détruire la membrane cellulaire [13]. Par ailleurs, la toxicité des nanoparticules inorganiques peut être liée à leur interaction avec des molécules endogènes (protéines, ADN, ARN), perturbant l'activité de ces dernières. Les ions métalliques issus de la dissolution des nanoparticules inorganiques peuvent, par exemple, modifier la conformation spatiale des protéines en se liant aux groupements thiols des acides aminés qui la composent. Or, la fonction biologique d'une protéine est déterminée par sa composition et son organisation tridimensionnelle dans l'espace. L'interaction entre l'ion métallique et la protéine dénature donc la protéine [14]. Enfin, la toxicité des nanoparticules inorganiques peut résulter du stress oxydant causé par les métaux. Ce stress oxydant est engendré par l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais, ROS pour Reactive Oxygen Species), comme H_2O_2 , $\bullet OH$ ou $O_2\bullet^-$. Les ROS interviennent dans différents processus cellulaires de signalisation ou de défense. Les espèces biologiques régulent leur production de ROS par des mécanismes antioxydants afin de maintenir la valeur cible du potentiel redox. Certaines protéines sont sensibles au potentiel redox et n'assurent plus leur fonction lorsque ce dernier s'éloigne de la valeur d'équilibre. De plus, la synthèse d'ARN peut être perturbée par les variations de potentiel redox au sein de la cellule. Ainsi, l'augmentation de ROS pouvant être provoquée par la présence de nanoparticules inorganiques nuit au bon déroulement de la machinerie cellulaire [15].

I.3.b. L'action du vivant sur les nanoparticules

La biodistribution

La biodistribution des nanoparticules correspond à la répartition des nanoparticules au sein des organes d'un modèle biologique donné après leur injection dans l'organisme. Elle est impactée par les propriétés physico-chimiques des nanoparticules comme la forme, la taille ou la charge de surface [1]. Lorsqu'un être vivant reçoit une injection de nanoparticules par voie intraveineuse, elles circulent dans le sang pendant un temps plus ou moins long. Elles sont ensuite progressivement éliminées. L'élimination des nanoparticules de la circulation sanguine peut résulter des trois processus suivants (figure I-3). Premièrement, les nanoparticules peuvent être captées par le foie et la rate. Ces organes appartiennent au système réticulo-endothélial dont une des fonctions est la destruction de corps étrangers. Les nanoparticules capturées par le foie peuvent diffuser dans la bile puis être éliminées de l'organisme par les fèces (élimination par voie biliaire). Les nanoparticules peuvent également diffuser dans les urines en passant par les reins, lorsque leur diamètre hydrodynamique n'est pas trop grand (typiquement inférieur à 8 nm pour les nanoparticules d'or) [6]. Enfin, l'accumulation des nanoparticules au sein des environnements tumoraux est favorisée par la porosité de la paroi des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs. Cette dernière est plus poreuse que celle des vaisseaux sanguins irriguant des tissus sains. Ce processus est appelé effet EPR (**E**nhanced **P**ermeability **R**etention). Dans le cas du ciblage actif, la biodistribution des nanoparticules est contrôlée en greffant à la surface des nanoparticules, des molécules, des protéines ou des anticorps ciblant des récepteurs cellulaires spécifiques⁵. Le ciblage actif a pour objectif d'accumuler localement les nanoparticules au sein d'un tissu cible comme les tissus cancéreux par exemple. En général, nous cherchons à ce que les nanoparticules ne soient pas éliminées trop rapidement du système sanguin. Pour cela, l'état de surface des nanoparticules a un rôle majeur. Plus le temps de circulation des nanoparticules dans le système

⁵ Précédemment, nous avons présenté les coronavirus. Les protéines S situées à la surface des coronavirus, leur permettent d'atteindre les cellules cibles pour y être internalisés et reproduits. Au laboratoire, il est possible de reproduire artificiellement ce mode de ciblage actif pour des nanoparticules métalliques.

sanguin est long, plus les nanoparticules ont une probabilité élevée d'atteindre leur cible et d'avoir l'action qui a motivé leur développement.

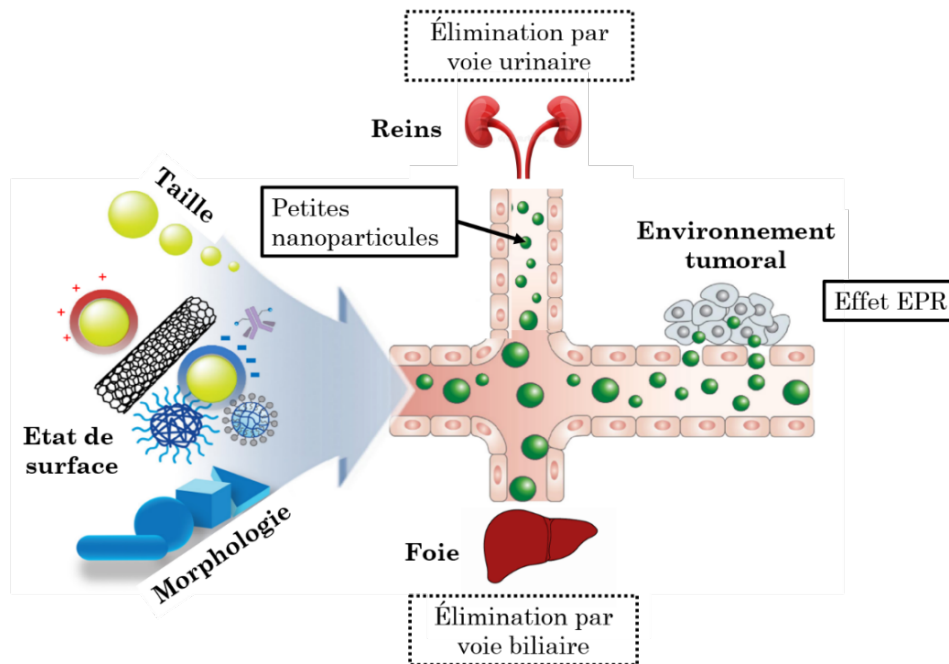


Figure I-3 : Illustration de plusieurs mécanismes d'élimination des nanoparticules de la circulation sanguine. Ce schéma adapté à partir de celui proposé dans l'étude de Kim *et al.* [1]

L'internalisation cellulaire

Les nanoparticules sont internalisées dans les cellules par endocytose. Parmi les différents mécanismes d'endocytose, nous pouvons citer la phagocytose opérée par les macrophages pour détruire les corps étrangers (virus, bactéries) de l'organisme. Les différents mécanismes d'endocytose ne sont pas décrits en détail dans ce manuscrit de thèse.

Les nanoparticules internalisées par endocytose se retrouvent à l'intérieur de compartiments cellulaires appelés endosomes. Au cours du processus d'endocytose, les conditions à l'intérieur des endosomes évoluent (figure I-4). Les endosomes deviennent des lysosomes, caractérisés par un environnement acide et oxydant. Les lysosomes contiennent également des enzymes, les hydrolases acides, pouvant dégrader les composés indésirables pour la cellule. L'environnement acide et oxydant du lysosome peut dénaturer l'état de surface des nanoparticules métalliques, favoriser leur dissolution et changer la spéciation des éléments. Il est donc important de connaître la stabilité des nanoparticules au sein d'un environnement acide et oxydant pour analyser les risques de toxicité une fois que les nanoparticules seront internalisées dans les cellules.

L'étude de la toxicité des nanoparticules et de leur capacité à être éliminées de l'organisme est complexe, et parfois contre-intuitive. Certaines nanoparticules métalliques, comme les nanoparticules d'or, sont décrites comme étant inertes en milieu biologique. A priori, elles peuvent donc être stockées indéfiniment à l'intérieur des lysosomes. Pourtant, en 2019, Alice Balfourier *et al.* ont montré qu'il y aurait un métabolisme de dégradation commun entre les sels d'or et les nanoparticules d'or. En suivant l'évolution des nanoparticules d'or pendant 6 mois dans le milieu cellulaire, elle a observé la présence de produits de dégradation prenant la forme de nanofeuillets d'or. Ces nanofeuillets ont déjà été observés chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, traités avec de l'or ionique [16].

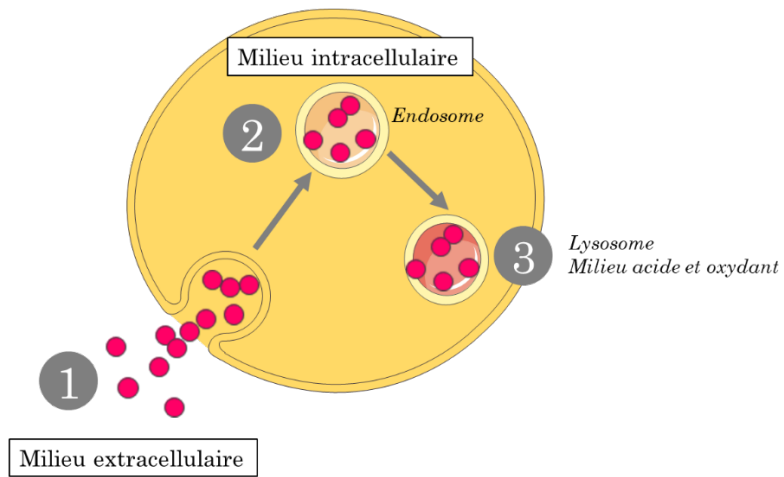


Figure I-4 : Schéma simplifié de l'endocytose. (1) Les nanoparticules sont absorbées du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. (2) Les nanoparticules se retrouvent dans des compartiments cellulaires appelés endosomes. (3) Ces endosomes deviennent des lysosomes chargés de dégrader les nanoparticules. L'environnement lysosomal est un milieu acide et oxydant.

II. Du laboratoire de recherche jusqu'au lit du malade

II.1. La recherche translationnelle

Le ministère des Solidarités et de la Santé définit la recherche translationnelle comme une « *activité aux interfaces entre recherches fondamentale et clinique* »⁶. C'est une démarche vertueuse puisque, d'une part, les médecins ont la connaissance des besoins du terrain. Ils permettent d'établir un cahier des charges technique en accord avec la réalité de la clinique et orientent les travaux de recherche de manière à maximiser leurs impacts sociétaux. D'autre part, selon Jacques Lewiner : « *La recherche est le lieu de l'innovation disruptive* ». Les chercheurs peuvent donc apporter de nouvelles pistes technologiques à explorer pour les patients en impasse thérapeutique.

D'un côté, la recherche translationnelle permet de faire émerger des technologies médicales innovantes. De l'autre, les sociétés de Biotechnologie⁷ (Biotech) accompagnent ces innovations dans leur développement industriel et réglementaire pour permettre aux citoyens d'accéder à de nouvelles stratégies de soin. Selon le rapport annuel publié en 2021 par France Biotech⁸, 30% des sociétés de biotechnologies françaises développent des traitements contre le cancer. Certaines d'entre elles sont axées sur le développement de nanomédicaments. Les nanoparticules sont très intéressantes pour élaborer de nouvelles stratégies de soin, en thérapie ou en diagnostic. En effet, elles permettent de délivrer de manière contrôlée et ciblée, une quantité importante de principes actifs. Ainsi, dans certains cas, les nanomédicaments améliorent le rapport bénéfice/risque des médicaments en augmentant leur efficacité et leur biodisponibilité au niveau du tissu cible, sans augmenter les doses à administrer au patient.

II.2. Le développement réglementaire

II.2.a. Démontrer la sécurité et l'efficacité

Une formulation simple ainsi qu'une production reproductible et possible à grande échelle, sont des prérequis pour le lancement du développement réglementaire d'un nanomédicament. Le produit doit être fiable et disponible en grande quantité pour les essais précliniques et cliniques. Les essais cliniques sont menés pour démontrer la sécurité et l'efficacité d'un médicament (figure II-1). Trois phases d'essais cliniques doivent être effectuées avant de déposer un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) auprès des autorités réglementaires. Il s'agit de la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis et de l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM) en France. La phase IV des essais cliniques est réalisée après la mise sur le marché du médicament pour étudier les effets indésirables à grande échelle. En oncologie, la France participe à 19 % des essais cliniques menés dans le monde, se plaçant au second rang mondial, derrière l'Espagne.

⁶ <https://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/recherche-et-innovation/l-innovation-et-la-recherche-clinique/appels-a-projets/article/programme-de-recherche-translationnelle-prt>

⁷ Selon la chambre de commerce et d'industrie, les Biotechs sont « *des entreprises dont l'activité s'appuie sur les biotechnologies. Les biotechnologies se définissent aujourd'hui, comme l'ensemble des méthodes et des techniques utilisant des composants du vivant (molécules, cellules, organismes...) pour rechercher, modifier ou produire des substances chimiques ou des éléments d'origine végétale, animale ou microbienne* ».

⁸ <http://www.france-biotech.fr/wp-content/uploads/2021/02/pano-2020-final.pdf>

Pour mémoire	Nombre de patients requis	Durée	But
• Phase I	20 à 100	Plusieurs mois	Evaluer la sécurité du médicament et estimer sa dose maximale
• Phase II	100 à 200	Plusieurs mois à 2 ans	Tolérance à court terme et surtout efficacité
• Phase III	500 à 1000	1 à 4 ans	Evaluation et comparaison des bénéfices / risques du nouveau traitement à ceux apportés par un médicament précédemment homologué dans la pathologie
• Phase IV	Plusieurs milliers	1 à 4 ans	Tolérance et recherche des effets indésirables

Figure II-1 : Typologie des essais cliniques⁹ (Source : LEEM)

II.2.b. Différentes stratégies de développement réglementaire

Nanobiotix (fondée en 2003 par Laurent Lévy) et NH Theraguix (co-fondée en 2015 par Géraldine Le Duc) sont deux startups développant des nanoparticules pour amplifier les effets de la radiothérapie. NH Theraguix a fait le choix, dès le début du processus réglementaire, de classer son produit AguiX®, dans la famille des médicaments. La société Nanobiotix a, quant à elle, initié le processus de développement réglementaire de son produit NBTXR3®, en le classant dans la famille des dispositifs médicaux implantables de classe III (plus haut niveau de risque). Le développement réglementaire d'un dispositif médical de classe III et d'un médicament implique les mêmes garanties en termes de sécurité pour le patient. En 2019, Nanobiotix a obtenu le marquage CE pour son produit dans le cadre du traitement du sarcome des tissus mous. Théoriquement, Nanobiotix peut donc commercialiser son produit au sein de l'Union européenne pour cette indication thérapeutique. Néanmoins, la classification du produit en tant que dispositif médical implique d'effectuer une injection intra tumorale et d'extraire par voie chirurgicale la tumeur, avec les nanoparticules, après le traitement par radiothérapie. La procédure thérapeutique autorisée par le marquage CE ne permettrait pas le traitement des cancers profonds ou non localisés, représentant un marché 10 fois plus grand (1,2Md\$) que celui des sarcomes des tissus mous (155M\$). C'est la raison pour laquelle, Nanobiotix ne commercialisera pas son produit tout de suite. La société vise aujourd'hui, un enregistrement de NBTXR3® en tant que médicament. Dans ce cadre réglementaire, les nanoparticules peuvent être injectées par voie intraveineuse au patient. Nanobiotix est actuellement au début des essais cliniques de phase III pour le traitement des cancers de la tête et du cou et en phase I pour le cancer du poumon¹⁰.

⁹ <https://www.leem.org/chantier-1-un-acces-des-patients-linnovation-le-plus-precoce-possible>

¹⁰ <https://www.nanobiotix.com/fr/press-release/nanobiotix-annonce-une-mediane-de-survie-globale-de-181-mois-pour-41-patients-evaluables-ages-et-fragiles-de-la-partie-expansion-de-letude-102-de-phase-i-dans-le-hnscc-evaluant-nbtxr3-ac/>

II.3. Le succès d'une société de biotechnologie

II.3.a. Impact sociétal

Un nouvel espoir pour les patients en impasse thérapeutique

Les sociétés en biotechnologie (Biotechs) peuvent apporter un nouvel espoir pour les patients en impasse thérapeutique. Par exemple, l'entreprise NH Theraguix¹¹ a été cofondée en 2015, par Géraldine Le Duc (actuelle directrice générale) et Olivier Tillement (Inventeur de la technologie et chercheur à l'Institut Lumière Matière à Lyon). La société développe des nanoparticules de gadolinium, Aguix®, permettant d'amplifier les effets de la radiothérapie sans augmenter la dose de rayonnement administrée au patient. Ces nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse, ont une taille inférieure à 5 nm et sont visibles par IRM. Camille Verry, oncologue-radiothérapeute au CHU Grenoble-Alpes, s'est intéressé à cette technologie, car il n'avait aucune stratégie thérapeutique à proposer à ses patients atteints de métastases cérébrales multiples. Camille Verry initie sa collaboration avec NH Theraguix dès la création de l'entreprise, en 2015. Il mène les essais précliniques dans le cadre de sa thèse de Sciences. Convaincu par le potentiel de la technologie, il réalise ensuite les essais cliniques de phase I en France et participe, aujourd'hui, aux essais cliniques de phase II aux États-Unis¹².

Valoriser les ressources d'un territoire

Les Biotechs peuvent aussi être un moyen de faire rayonner les richesses d'un territoire. Par exemple, la société Torskal¹³, fondée en 2015 par Anne-Laure Morel, exploite un procédé de production de nanoparticules d'or où tous les réactifs mis en jeu sont extraits de plantes médicinales poussant sur l'île de la Réunion. Le début des essais cliniques de phase I pour la photothérapie des mélanomes cutanés est prévu fin 2021 en France.

II.3.b. Impact économique

Les Biotechs valorisent des travaux issus de la recherche académique et mettent sur le marché des technologies de rupture. Cela se caractérise d'une part, par un temps de développement long, au cours duquel les entreprises ne génèrent, en général, pas de chiffre d'affaires. Le délai moyen d'accès au marché d'un nouveau médicament est de 11,5 ans¹⁴. D'autre part, les Biotechs nécessitent des besoins financiers conséquents. Par exemple, les dépenses mensuelles de NH Theraguix en 2020 s'élèvent à plusieurs centaines de milliers d'euros. Pour cette société, le premier poste de dépenses correspond à la production des nanoparticules et le second, aux essais cliniques. Les charges liées à la masse salariale arrivent en troisième position¹⁵. Le coût global du développement d'un nouveau médicament est de l'ordre du milliard d'euros.

¹¹ <https://nhtheraguix.com/>

¹² <https://anchor.fm/cooperer-en-sante/episodes/3--Geraldine-LE-DUC--Camille-VERY---La-force-du-projet--ce-moment-l--Nous-tions-des-chercheurs-avec-des-horizons-diverses--Personne-ne-peut-monter-un-projet--comme-celui-ci-tout-seul-e18kf5s>

¹³ <https://www.torskal.com/>

¹⁴ <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>

¹⁵ <https://anchor.fm/cooperer-en-sante/episodes/3--Geraldine-LE-DUC--Camille-VERY--Deuxieme-partie---La-creation-dentreprise-est-le-moyen-daller-vers-des-financements-plus-consquents--permettant-de-passer-du-prclinique-au-clinique-e1aog9d>

La création d'entreprise est un moyen permettant le financement du développement industriel et réglementaire de technologies de rupture. Il existe plusieurs étapes de financement qui vont servir la vie de l'entreprise. Il y a tout d'abord la phase de « seed » pour des montants de l'ordre du million d'euros puis les séries A et B pour des montants de l'ordre de la 10^{ème} de millions d'euros. Les levées de fond sont effectuées pour financer des activités bien précises de l'entreprise et lui permettre de se développer sainement. Ces activités peuvent être, par exemple, la structuration de l'entreprise, la production à grande échelle, les essais cliniques. Il existe plusieurs leviers que l'on peut actionner pour lever des fonds. Ils peuvent être publics avec la BPI (Banque Public d'Investissement) ou privés avec les Business Angels, les fonds d'investissement, l'entrée en bourse. L'investissement est un risque que les investisseurs prennent au regard du potentiel de retour sur investissement. Dans le cas des Biotechs, le risque est relatif au développement de la technologie et non au marché. Si la technologie parvient à être mise sur le marché, son impact sociétal sera tel que les retombées économiques seront très importantes pour les investisseurs.

II.4. La France peut-elle devenir un leader européen dans le domaine de l'innovation en santé ?

Beaucoup de sociétés développant des innovations médicales sont créées à partir de résultats issus de la recherche publique et consacrent plus de la moitié de leurs dépenses à la R&D¹⁶. Les activités de recherche sur les technologies pour la santé devraient encore s'intensifier dans les prochaines années puisqu'en juin 2021, l'état français a annoncé un plan d'investissement de 8 milliards d'euros pour que notre pays devienne un leader européen dans le domaine de l'innovation en santé¹⁷. Le succès d'une société de biotechnologie visant une application chez l'Homme témoigne, d'une part, de travaux de recherche académique d'excellence sur le plan scientifique et d'autre part, de la volonté de construire une aventure collaborative incluant des chercheurs, des médecins et des industriels, au-delà des frontières et des disciplines, jusqu'à la mise à disposition des innovations médicales pour les patients.

En 2021, dans le monde, plus de 1200 brevets existent sur des nanoparticules pour le traitement des cancers,¹⁸ mais seulement neuf nanomédicaments sont commercialisés toutes indications confondues (LEEM, 2019). Ainsi, pour permettre aux citoyens d'accéder à plus d'innovation médicale issue des nanosciences, nous devrions, selon moi, penser globalement les innovations et leur impact sociétal dès les premières phases de recherche grâce à un cadre de dialogue entre les industriels, les chercheurs et les médecins.

Pour mettre en place ce cadre de dialogue, il est important de ne pas perdre de vue que les professionnels de santé ont une vocation : soigner. Ils évaluent en permanence les bénéfices et les risques pour le patient et adaptent leurs actes en conséquence. La complexité du secteur de la santé (résultant, entre autres, de la diversité des acteurs et de la gestion permanente de l'urgence) le rend peu enclin au changement. Trouver les ressources (temps, argent, disponibilité mentale) pour s'investir dans une collaboration avec des chercheurs et des ingénieurs sur des projets ayant une visée à long terme peut donc paraître irréalisable. Néanmoins, d'après le Professeur Olaf Mercier, chirurgien thoracique à l'hôpital Marie Lannelongue : « *L'avenir de la médecine passe par le mariage médecin-ingénieur* ». Le monde médical est en attente d'innovation pour améliorer les soins délivrés aux patients. Il est temps de faire bouger les lignes et que nous - chercheurs, ingénieurs et professionnels de santé - apprenions à travailler ensemble. Je souhaite participer à cette aventure.

¹⁶ <http://www.france-biotech.fr/wp-content/uploads/2021/02/pano-2020-final.pdf>

¹⁷ [L'Etat dévoile un plan de plusieurs milliards d'euros pour la recherche et l'innovation \(lemonde.fr\)](#)

¹⁸ D'après une recherche de brevets déposés dans tous les pays du monde, effectuée sur EspaceNet le 27 octobre 2021 avec les mots clés « « nanoparticle AND treat* AND cancer »

Introduction générale

Pour contribuer à préparer un terrain propice à la collaboration en santé, j'ai créé le podcast¹⁹ « **Coopérer en Santé** ». Je pars à la rencontre de binômes médecin-chercheur pour échanger autour de leurs histoires de collaboration en santé. Le témoignage est utilisé pour démontrer la valeur créée par la communication et la collaboration ; et mettre en lumière des conseils pratiques pour faire naître et entretenir des projets à succès en santé. D'un point de vue personnel, les personnes que j'invite sur le podcast m'apprennent beaucoup sur l'écosystème de la santé en France. Cette section de chapitre a été écrite en grande partie grâce à eux. Par ailleurs, depuis 3 ans, dans le cadre de cette thèse, je me forme aux spécificités (financement, temps de développement) du monde de la recherche. J'ai choisi un sujet de thèse à la frontière entre trois disciplines : la chimie des matériaux, l'optique des solides et la biologie. J'ai perçu, dans la diversité des besoins et enjeux de mon projet de thèse, une opportunité pour développer mon adaptabilité et mon agilité d'esprit (« jongler » avec les notions scientifiques) ainsi que mes compétences en gestion de projet. Je vous présente, dans la suite de cette introduction générale, les différentes notions scientifiques auxquelles j'ai fait appel dans le cadre de ma thèse.

¹⁹ Il est disponible grâce au lien suivant : <https://anchor.fm/cooperer-en-sante>

Partie 2 : La nanothermométrie de photoluminescence pour mesurer la température au sein du vivant dans le cadre de l'hyperthermie thérapeutique

III. Mesurer la température locale au sein du vivant

III.1. Justification du besoin

Accéder à une mesure de température locale ouvre la voie à de nouvelles connaissances sur les mécanismes cellulaires. En effet, toutes les réactions biochimiques régissant la machinerie cellulaire ont un lien avec la température [17] [18] [19]. Ainsi, une simple mesure de température locale peut servir de diagnostic précoce de maladies. En effet, les anomalies de distribution en température locale sont des marqueurs de l'inflammation. Dans le cas des cancers, les microenvironnements tumoraux possèdent une activité métabolique plus importante que les tissus sains. La température des tissus tumoraux est donc plus élevée que celle des tissus sains [20]. Par ailleurs, dans le champ applicatif de l'hyperthermie thérapeutique, une mesure de température locale permettrait d'induire une élévation de température douce et contrôlée à l'échelle cellulaire et de maîtriser l'impact des nanosources de chaleur sur le microenvironnement tumoral [21]. À terme, il serait alors possible de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques moins invasives pour les patients, en contrôlant les conséquences biologiques associées aux élévations de température induites par les nanosources de chaleur au sein des milieux biologiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse.

III.2. L'hyperthermie thérapeutique comme traitement adjuvant contre les cancers

III.2.a. Le microenvironnement tumoral

D'après l'OMS, dans le monde, chaque année, 10 millions de personnes sont diagnostiqués de cancers et 6 millions décèdent des suites de la maladie. Un cancer est une maladie de l'environnement tumoral et du système immunitaire. Les tumeurs présentent une grande hétérogénéité histologique. Leur composition, leur structure et leurs propriétés mécaniques dépendent fortement du patient et du type de cancer et ont une grande influence sur la réponse de la tumeur aux traitements anticancéreux. Il existe des tumeurs liquides et des tumeurs solides. Les tumeurs liquides touchent les cellules sanguines. Elles sont donc dispersées dans tout l'organisme. Au contraire, les tumeurs solides sont localisées. Les carcinomes et les sarcomes sont deux types de tumeurs solides, représentant plus de 90% des cancers humains²⁰. Les carcinomes (cancers du sein, poumon, prostate) affectent les épithéliums²¹. Les sarcomes (cancers de l'os, du cartilage) touchent des tissus conjonctifs²².

Le microenvironnement tumoral est immunosuppresseur. Les macrophages associés aux tumeurs sont de type M2. Ils expriment des cytokines pouvant supprimer l'immunité antitumorale et promouvoir la croissance tumorale. Ils peuvent également supprimer le recrutement et l'activation des lymphocytes T. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) participent à la production de collagène réticulé qui augmente la rigidité de la matrice extracellulaire des tumeurs solides. Les cellules cancéreuses se divisent de façon anarchique et incontrôlable : elles prolifèrent au détriment de l'organisme. En théorie, la porosité des vaisseaux sanguins irriguant les environnements tumoraux permet l'accumulation spontanée de nanoparticules circulant dans le système sanguin au sein des tumeurs par effet EPR. Néanmoins, certaines tumeurs solides sont peu vascularisées et très rigides²³ [22]. La

²⁰ <https://www.cancer.be/le-cancer/jeunes-et-cancer/les-cancers/les-types-de-cancers>

²¹ Les épithéliums recouvrent les parois de nos organes. Les épithéliums peuvent être de revêtement (comme la peau) ou glandulaire (capable de synthétiser une substance).

²² Les tissus conjonctifs soutiennent ou lient les organes.

²³ Grâce à l'élastographie, il est d'ailleurs possible de discriminer un tissu sain d'un tissu tumoral grâce à des mesures d'élasticité tissulaire. Une rigidité tissulaire supérieure à 40 kPa est caractéristique de tissus tumoraux

structure et les propriétés mécaniques des tumeurs peuvent constituer une barrière physique difficilement franchissable pour les nanoparticules, mais également pour les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T. Les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire jouent donc un rôle important dans la sensibilité du microenvironnement tumoral aux traitements contre le cancer [23].

III.2.b. Agir sur l'environnement tumoral grâce à des nanosources de chaleur

Les nanosources de chaleur augmentent la réponse des tumeurs aux traitements contre le cancer ...

L'hyperthermie est un traitement adjuvant prometteur dans le cadre des thérapies contre le cancer [24] [25]. Une stratégie étudiée pour moduler l'environnement tumoral est l'induction de points chauds à l'échelle cellulaire (figure III-1). Des nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse ou localement au sein de la tumeur. Ces nanoparticules deviennent des sources de chaleur lorsqu'elles sont excitées par une source lumineuse, un champ magnétique ou des ultrasons. L'élévation de température locale engendre des modifications structurales et de composition au sein du microenvironnement tumoral. Par exemple, dans une étude d'Alba Nicolás-Boluda publiée en 2020, des nanofleurs de maghémite sont préférentiellement internalisées par les fibroblastes associés au cancer (CAF). Ces cellules sont en partie responsables de l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire des tumeurs solides. En les ciblant et en induisant une élévation de température locale intracellulaire, il est possible de détruire ces cellules et de réduire la rigidité du microenvironnement tumoral [26]. La diminution de la rigidité du microenvironnement tumoral augmente la sensibilité des tumeurs aux traitements contre le cancer couramment employés en clinique comme la chimiothérapie ou la radiothérapie [25].

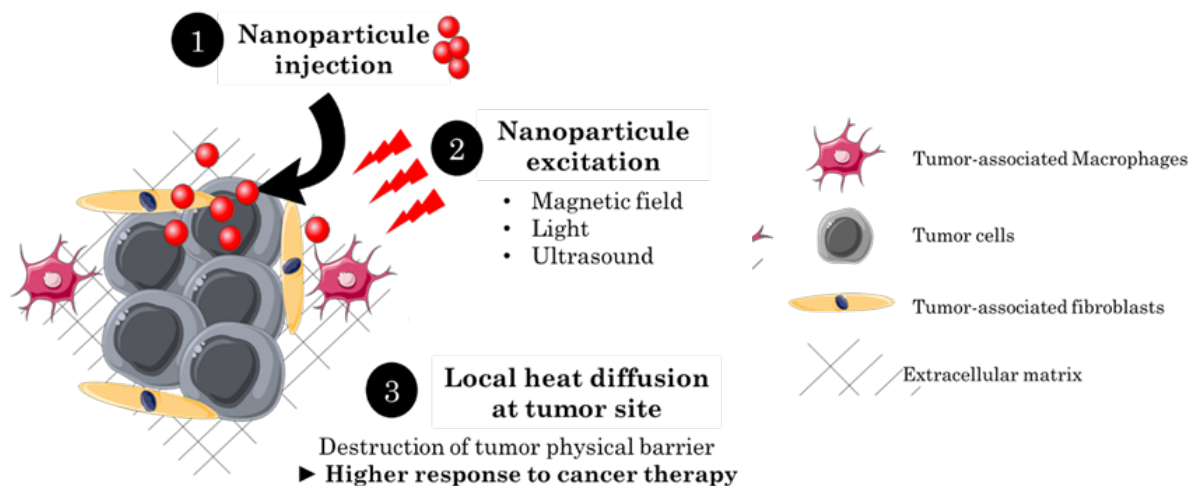


Figure III-1 : Composition simplifiée du microenvironnement tumoral et principe d'action de l'hyperthermie thérapeutique (Schéma adapté [25])

... mais les mécanismes d'action ne sont pas compris

Les conséquences biologiques résultant de l'action des nanosources de chaleur au sein du microenvironnement tumoral résultent de leur composition, de leurs propriétés mécaniques et de leur localisation [27] [28] [16]. Par ailleurs, la densité de nanoparticules au sein des lysosomes, la distance entre les nanoparticules et la membrane lysosomale ou encore les modifications morphologiques du lysosome consécutif à l'absorption des nanoparticules sont des éléments cruciaux à étudier pour comprendre le mode d'action des sources de chaleur sur le microenvironnement tumoral [27].

Des études montrent que les conséquences biologiques d'une élévation de température locale ne peuvent pas être prédites par des mesures de température globales effectuées au sein du milieu grâce à un thermocouple ou à une caméra thermique [21] [29]. Par exemple, un traitement d'hyperthermie magnétoinduite appliqué à un échantillon cellulaire contenant des nanoparticules de magnétique en faible quantité induit la mort cellulaire sans augmenter la température globale du milieu [29]. Un taux élevé de mortalité cellulaire a également été reporté, sans élévation de température globale, lorsque les cellules contiennent des assemblages de nanocristaux de magnétite et sont soumises à un programme d'excitation optique [21]. Par ailleurs, des modifications dans la structure de matrices de collagène (tendon d'agneau) contenant des nanosources de chaleurs soumises à une excitation optique (laser 808 nm) sont observées en microscopie à deux photons sans qu'une élévation de température à la surface de l'échantillon soit détectée avec une caméra thermique [21]. Ces conséquences biologiques pourraient pourtant être expliquées par des échanges thermiques s'effectuant localement entre les nanoparticules et le milieu biologique. Pour comprendre comment les nanosources de chaleur agissent sur le microenvironnement tumoral, nous devons sonder la température en temps réel et à l'échelle cellulaire.

III.2.c. Cahier des charges d'un thermomètre pour l'hyperthermie thérapeutique

Afin de contribuer à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques mettant en jeu l'hyperthermie, il est aujourd'hui crucial d'étudier les élévations de température induites localement au sein des cellules et des tissus biologiques. Pour satisfaire les besoins de la communauté travaillant sur l'hyperthermie thérapeutique, le thermomètre utilisé doit être sensible aux variations de température de l'ordre de 0,1°C et avoir une grande résolution spatiale ($< 10 \mu\text{m}$) afin de mesurer la température locale à l'échelle cellulaire. L'instrument doit également posséder une grande résolution temporelle pour détecter des fluctuations en température rapides ayant lieu au sein des milieux biologiques. Par ailleurs, la mesure de température ne doit pas être invasive pour un organisme vivant. La lésion, et donc l'inflammation provoquée par un geste invasif engendrerait une élévation de température pouvant biaiser les résultats de l'expérience. Enfin, l'instrument doit être facilement accessible pour des essais précliniques. Son temps de disponibilité doit être important et son coût compatible avec l'argent disponible dans le cadre des financements ANR et européens pour l'achat d'instruments expérimentaux (~100 k€).

Nous l'avons vu, les mesures de température actuellement effectuées dans le cadre des projets de recherche sur l'hyperthermie ne permettent pas d'expliquer les conséquences biologiques associées aux élévations de température au sein des tissus biologiques [21]. Afin d'en comprendre les raisons, passons en revue les caractéristiques des principaux instruments actuellement utilisés dans la littérature.

III.3. Les instruments disponibles pour mesurer la température

III.3.a. Le thermocouple

La mesure de température effectuée grâce au thermocouple est basée sur des effets thermoélectriques. Les thermocouples sont simples d'utilisation et précis sur une large gamme de température (tableau III-1). En revanche, leur utilisation pour mesurer la température au sein de tissus biologiques nécessite une incision. Cet acte invasif provoque des lésions tissulaires et peut constituer un biais pour l'étude réalisée. Le thermocouple est une mesure de température ponctuelle.

Tableau III-1 : Caractéristiques du thermocouple

Résolution spatiale	≈100 μm
Résolution temporelle	≈0,1 s
Résolution en température	0.1 °C
Accès à la température locale	Il est nécessaire d'introduire par voie chirurgicale la sonde pour atteindre la zone d'intérêt. Les lésions tissulaires peuvent biaiser les résultats de l'étude.
Invasivité de la méthode	
Coût financier	Ordre de grandeur du prix à l'achat : 100 €

III.3.b. La caméra thermique

La caméra thermique permet de réaliser une mesure de température sans contact, mais seulement en surface du système étudié. Cette méthode est basée sur la mesure de rayonnement infrarouge d'un objet par rapport à celui émis par un corps noir parfait (modélisé par la loi de Planck). Le rayonnement mesuré par la caméra ne dépend pas uniquement de la température de l'objet sondé. Il dépend aussi de la distance entre l'objet et la caméra, de l'humidité et de la température de l'atmosphère. Les caméras thermiques ne permettent pas une mesure absolue, mais permettent de mettre en évidence les changements rapides de température (tableau III-2).

Tableau III-2 : Caractéristiques de la caméra thermique

Résolution spatiale	≈10 μm
Résolution temporelle	≈1 ms
Résolution en température	0,1 °C
Accès à la température locale	Seule la mesure de température de surface est possible. Lorsque la zone d'intérêt est en profondeur dans les tissus, la mesure de température locale est impossible.
Invasivité de la méthode	Pas de lésions des tissus biologiques induites par cette méthode de mesure de température.
Coût financier	Ordre de grandeur du prix à l'achat : 1 000 €

III.3.c. L'IRM de température

L'IRM (imagerie par résonance magnétique) de température permet de cartographier précisément en température une zone tissulaire. Cette méthode de mesure de température repose sur la dépendance entre la fréquence de résonance du proton et la température (tableau III-3). Dans les tissus biologiques à forte teneur en eau, la fréquence de résonance du proton varie de 0,01 ppm par degré Celsius [30]. L'IRM de température permet une mesure non invasive avec une très bonne résolution spatiale. Néanmoins, le temps d'acquisition du cliché IRM est relativement long, ce qui représente un frein important pour la mesure de température en temps réel. De plus, le coût d'utilisation des machines d'IRM est très élevé. Elles sont, par ailleurs, peu disponibles pour les études précliniques puisqu'elles sont principalement utilisées en clinique pour les patients.

Tableau III-3 : Caractéristiques de l'IRM de température

Résolution spatiale	≈1 μm
Résolution temporelle	Dépend du temps d'accumulation des images. Plus la résolution spatiale est grande, plus le temps d'accumulation est long.
Résolution en température	< 0,1 °C
Accès à la température locale	Possible grâce à la dépendance en température de la fréquence de résonance du proton.
Invasivité de la méthode	Pas de lésions des tissus biologiques induites par cette méthode de mesure de température
Coût financier	Forfait horaire prestation plateforme Hôpital européen Georges Pompidou : 250 €

III.3.d. Bilan

Aucun des trois instruments décrits ci-dessus ne valide les besoins des chercheur(e)s travaillant sur l'hyperthermie thérapeutique et les variations de température locales associées aux milieux biologiques (tableau III-4). Un nouvel instrument doit être développé ! C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Nous avons choisi de développer un moyen, instrumental et méthodologique, pour la mesure de température locale basée sur **la photoluminescence des nanomatériaux**.

Tableau III-4 : Analyse multicritère des thermomètres qu'il est actuellement possible d'utiliser pour les études d'hyperthermie thérapeutique. Les croix rouges marquent les critères de notre cahier des charges non validés par les instruments. Un nouvel instrument doit être développé.

	Cahier des charges	Thermocouple	Caméra thermique	IRM de température
Résolution spatiale	< 10 μm	X	OK	OK
Résolution temporelle	0,1 s	OK	OK	X
Résolution en température	0,1 °C	OK	OK	OK
Mesure de température locale ?	OUI	X	X	OK
Mesure invasive ?	NON	X	OK	OK
Coût financier	< 100 k€	OK	OK	X

IV. Les principes fondamentaux de la nanothermométrie de photoluminescence

IV.1. La structure électronique des nanomatériaux

Lorsqu'un matériau a une taille nanométrique, les électrons qui le composent ne peuvent pas prendre n'importe quelle valeur d'énergie. La discrétisation des niveaux énergétiques ayant lieu à l'échelle nanométrique, confère à la matière des propriétés physicochimiques différentes de celles du matériau massif.

IV.1.a. Notion de fonction d'onde

En mécanique classique, un point matériel est décrit par sa position en fonction du temps. C'est la trajectoire. En physique quantique, l'approche adoptée est probabiliste. Nous repérons un point matériel par une fonction à valeur complexe, appelée fonction d'onde, $\Psi(x, y, z)$. La probabilité qu'un point matériel donné soit situé dans l'intervalle $[x_1, x_2]$ s'écrit :

$$P(x_1, x_2, t) = \int_{x_1}^{x_2} |\Psi(x, y)|^2 dx$$

IV.1.b. Structure électronique des molécules

Le puit de potentiel décrit une situation où une particule est confinée. C'est par exemple le cas d'un électron au voisinage d'un atome. Une nanoparticule peut être vue comme une molécule isolée composée d'un nombre fini d'atomes. Elle peut donc être considérée comme un puit de potentiel où les électrons sont confinés. Lorsqu'une particule est dans un puit de potentiel, l'énergie ne peut pas prendre n'importe quelle valeur. Elle ne peut prendre que des valeurs discrètes. Pour comprendre l'évolution de la structure électronique de la matière lors du passage de l'état massif à l'échelle nanométrique, il est intéressant de se pencher, dans un premier temps, sur la structure électronique des molécules.

Les orbitales atomiques - Considérons le système de l'électron d'un atome gravitant autour du noyau. Lorsque nous nous plaçons dans le cadre de la chimie quantique, la fonction d'onde décrivant le comportement ondulatoire de l'électron est appelée orbitale atomique (OA). Chaque électron de l'atome est décrit par une OA et est caractérisée par les trois nombres quantiques n, l, m_l . Chaque OA est associée une énergie orbitale monoélectronique $E_{n,l}$.

Les orbitales moléculaires - Deux atomes A et B se lient chimiquement pour former une molécule lorsque la nouvelle entité A-B est plus stable que les deux atomes pris séparément. La liaison chimique entre les deux atomes résulte des interactions entre leurs électrons. Dans le cas de la molécule²⁴, le caractère ondulatoire de chaque électron est décrit par une fonction d'onde appelée orbitale moléculaire (OM). Une OM est une combinaison linéaire des orbitales atomiques (CLOA) des atomes constituant la molécule. Il y a recouvrement entre deux OA lorsqu'elles ont des énergies orbitales proches et des éléments de symétrie en commun. Pour simplifier le problème, nous ne considérons pas toutes les OA, mais seulement les OA de valence. En effet, ce sont les électrons de valence qui participent aux liaisons chimiques. La combinaison de deux OA conduit toujours à la formation de deux OM d'énergie différente. L'OM de plus basse énergie est la plus stable : il s'agit de l'OM liante. L'OM de plus haute énergie est moins stable : il s'agit de l'OM anti-liante. Conformément à la règle de Klechkowski, les électrons dont les OA participent à la formation d'OM

²⁴ On se place dans l'approximation de Born-Oppenheimer : on considère seulement le mouvement des électrons. Tous les atomes de la molécule sont supposés immobiles.

vont se répartir sur les OM de plus basse énergie. Ces OM correspondent généralement aux orbitales liantes. L'OM de plus haute énergie peuplée d'électron(s) est appelée la Haute Occupée (HO). Les orbitales anti-liantes restent majoritairement vides. L'OM de plus basse énergie non peuplée d'électron est appelée la Basse Vacante (BV).

IV.1.c. La discrétisation des niveaux d'énergie de la matière à l'échelle nanométrique

Dans le cas d'un matériau massif, les niveaux d'énergie sont continus. En revanche, lorsqu'un matériau a une taille nanométrique, les électrons qui le composent ne peuvent pas prendre n'importe quelle valeur d'énergie. Nous parlons alors de discrétisation des niveaux énergétiques (figure IV-1). C'est pour cette raison que, à l'échelle nanométrique, la matière adopte des propriétés physicochimiques différentes de celles du matériau massif.

Illustration qualitative - Nous l'avons vu, une OM est une combinaison linéaire des orbitales atomiques (CLOA) des atomes constituant la molécule. Le nombre d'OM d'une molécule augmente donc avec le nombre d'atomes qui la compose. Plus le nombre d'OM est grand, plus ces dernières ont des énergies proches. Lorsque les OM sont extrêmement rapprochées et nombreuses. Les valeurs d'énergie que peut prendre un électron ne sont plus discrètes : elles deviennent continues. Nous parlons de bandes d'énergie. Elles sont séparées par un gap d'énergie, appelé bande interdite. Un cristal à l'état massif peut être vu comme une macromolécule, composée d'un nombre infini d'atomes. Le nombre d'OM est très important : les niveaux d'énergie sont continus. Un nanocristal peut, quant à lui, être vu comme une molécule, composée d'un nombre fini d'atomes. Les niveaux d'énergie sont discrets.

Illustration quantitative - Calculons l'ordre de grandeur de la différence d'énergie entre les deux premiers niveaux d'énergie que peuvent prendre un électron (échelle atomique) et une bille (échelle macroscopique). Nous avons :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = 3 \frac{\pi^2 \hbar^2}{2mL^2}$$

Avec \hbar , la constante de Dirac, telle que : $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ avec $h \sim 6.10^{-34} \text{ J. s}$ soit $\hbar \sim 1.10^{-34} \text{ J. s}$

Pour un électron de masse $m_{e^-} \sim 10^{-30} \text{ kg}$, confinée à l'échelle atomique $L \sim 10^{-10} \text{ m}$. L'application numérique donne $\Delta E \sim 10^2 \text{ eV}$.

Pour une bille de masse $m_b \sim 10^{-2} \text{ kg}$, enfermée dans une boîte $L \sim 1 \text{ m}$. L'application numérique donne $\Delta E \sim 10^{-66} \text{ eV}$. L'écart entre les deux premiers niveaux d'énergie que peut prendre la bille est extrêmement faible. À l'échelle macroscopique, on ne voit pas la discrétisation des niveaux d'énergie.

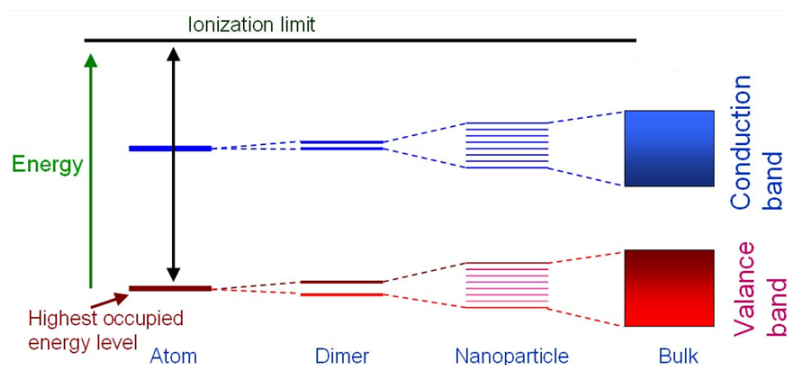


Figure IV-1 : Illustration simplifiée des niveaux énergétiques d'objets existant à différentes échelles. Pour faire le lien avec les termes utilisés plus haut, la bande de valence (BV) correspond à la haute occupée et la bande de conduction (BC) correspond à la basse vacante

IV.2. Les photoluminescences

IV.2.a. Définitions

La lumière peut être considérée à la fois comme une onde électromagnétique et comme une particule : le photon. C'est la dualité onde-particule. Le photon est associé à une énergie et à une longueur d'onde, telles que :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Avec : } \begin{array}{l} h \text{ Constante de Planck } (h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}) \\ \nu \text{ Fréquence } (\text{s}^{-1}) \\ c \text{ Célérité de la lumière } (3 \cdot 10^8 \text{ m. s}^{-1}) \\ \lambda \text{ Longueur d'onde } (\text{m}) \end{array}$$

Lorsqu'une nanoparticule, un ion ou une molécule est excitée optiquement, les photons interagissent avec les électrons du composé. La collision entre le photon et l'électron permet à l'électron d'absorber ou de diffuser (nous en parlerons dans le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse) une partie de l'énergie du photon incident. Lorsqu'un électron absorbe de l'énergie, il peut passer d'un état fondamental à un état excité. Après une durée, appelée temps de vie, l'énergie absorbée par l'électron est dissipée pour permettre son retour à l'état fondamental. Cette dissipation d'énergie peut avoir lieu sous forme de transferts radiatifs ou non radiatifs. La relaxation non radiative s'effectue par vibration moléculaire ou diffusion de chaleur. Elle est favorisée pour des transitions de faible énergie (figure IV-2). La photoluminescence est un processus de relaxation radiatif, c'est-à-dire qu'il est associé à une émission de photon. Un composé photoluminescent émet donc spontanément de la lumière lorsqu'il est soumis à une source d'excitation optique.

Il existe plusieurs mécanismes de photoluminescence. Par exemple, les lacunes d'azote (nitrogen-vacancy NV) présentes dans le diamant sont à l'origine d'un signal de photoluminescence. Dans le cas de l'oxyde de zinc $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$, c'est le métal de transition Cr (III) qui est responsable de l'émission de lumière. L'ion Cr^{3+} possède deux niveaux émetteurs ${}^4\text{T}_2$ and ${}^2\text{E}$, en équilibre thermique (figure 8) [31]. Lorsque le temps de vie de photoluminescence est inférieur à la nanoseconde, nous parlons de fluorescence. Nous parlons de phosphorescence lorsque le temps de vie est supérieur à la nanoseconde. Cependant, certains mécanismes de photoluminescence ont des temps de vie bien plus longs. Les composés persistants sont comparables à des condensateurs optiques : ces matériaux ont la capacité d'emmagasiner une certaine quantité d'énergie et de la restituer sous forme de lumière sur des durées pouvant atteindre plusieurs jours. Le phénomène de luminescence persistante est le résultat d'une série de piégeage et de dépiégeage rendus possibles par l'introduction de défauts dans la matrice [32].

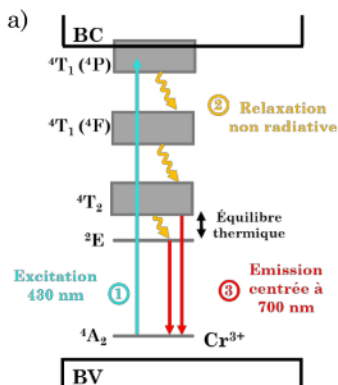


Figure IV-2 : Représentation schématique des niveaux de l'ion Cr^{3+} dans la matrice ZnGa_2O_4 [31]

IV.2.b. Cas des nanocristaux semi-conducteurs

Un nanocristal semi-conducteur²⁵ se comporte comme un isolant si on ne lui apporte pas d'énergie. En revanche, s'il est soumis à une excitation optique (d'énergie $E=h\nu \geq E_g$) les électrons peuvent franchir la bande interdite (de largeur E_g) en se déplaçant de la bande de valence BV à la bande de conduction BC (figure IV-1). Dans ce cas, un électron quitte la BV pour occuper la BC, laissant un trou dans la BV. L'électron étant chargé négativement, le trou porte donc une charge positive afin que le semi-conducteur reste globalement neutre. Ces deux charges opposées s'attirent et se comportent comme s'ils ne formaient qu'une seule entité particulière que l'on appelle exciton. L'électron reste dans la bande de conduction pendant sa durée de vie. Passé cette durée, il est attiré par le trou et se recombine avec ce dernier. L'exciton disparaît et le semi-conducteur dissipe l'énergie qu'il avait absorbée pour retourner à son état fondamental. Cette dissipation d'énergie se fait par transitions radiatives (émission de lumière) ou non radiatives. Le mécanisme de photoluminescence qui vient d'être décrit pour un nanocristal semi-conducteur est un modèle simplifié. En pratique, des défauts dans la structure des composés peuvent donner lieu à des transitions radiatives d'énergie $E < E_g$. Les mécanismes de photoluminescence propre au nanocristal semi-conducteur de sulfure d'argent (Ag_2S) seront étudiés dans le **chapitre 2** de ce manuscrit.

IV.3. Photoluminescence et température

IV.3.a. Définitions

Le spectre de photoluminescence (PL) est caractéristique de la température de cœur du matériau photoluminescent. Nous l'avons vu, lorsqu'un matériau est excité, celui-ci peut se désexciter par voie radiative ou par voie non radiative. La dépendance du signal de photoluminescence à la température repose sur les mécanismes de photoluminescence propres au composé photoluminescent. Elle peut être décrite par le suivi des paramètres de luminescence en fonction de la température. L'intensité totale d'émission, le rapport d'intensité, la position spectrale et la largeur spectrale sont des exemples de paramètres de photoluminescence résolus en longueur d'onde (figure IV-3). Le temps de vie est quant à lui un paramètre de PL résolu en temps (figure IV-3 e). En pratique, la température est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage la reliant à un paramètre de photoluminescence mesuré grâce à un détecteur adapté. Il est important de préciser, à ce stade, que d'autres effets que celui de la température peuvent induire une variation des paramètres de photoluminescence. C'est le cas, par exemple de la réabsorption interne de la photoluminescence par le composé émetteur lui-même, du phénomène de dégradation photo-induite, des interactions lumière-matière (ceci fera l'objet du chapitre 4) ou encore des réglages du dispositif expérimental [33]. L'étalonnage d'une nanosonde de température doit donc être réalisé avec précautions. L'exploitation de l'intensité de photoluminescence, de la position et de la

²⁵ Le nanocristal semi-conducteur fait l'objet du chapitre 2 de ce manuscrit

largeur spectrale présente beaucoup d'inconvénients sur le plan expérimental. En pratique, ces paramètres de photoluminescence sont très peu utilisés pour déterminer la température des composés photoluminescents. Nous allons tout de suite en comprendre les raisons.

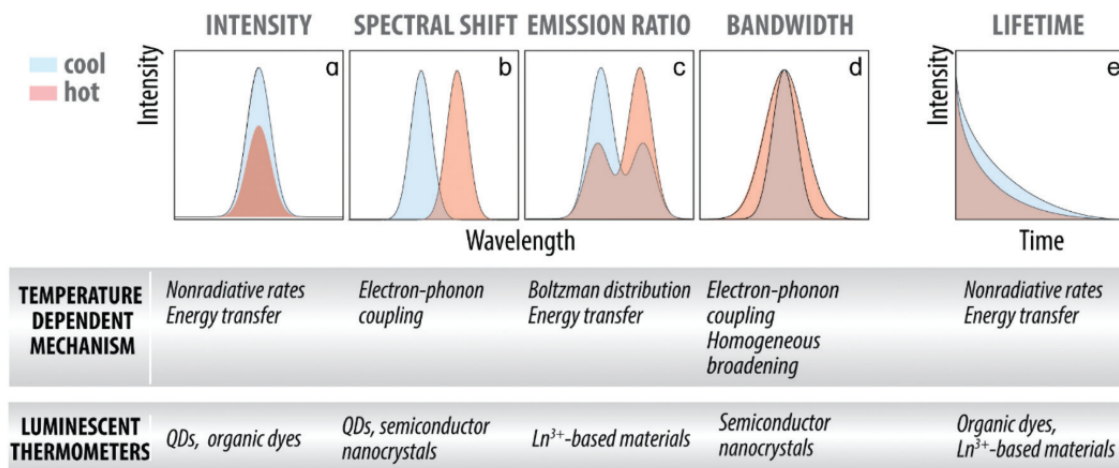


Figure IV-3 : Illustration de l'évolution des différents paramètres de photoluminescence en fonction de la température. Les mécanismes de dépendance de la photoluminescence à la température ainsi que les types de composés au sein desquels se produisent ces mécanismes sont également renseignés. [33]

IV.3.b. Les paramètres de photoluminescence

Intensité d'émission

Lorsqu'un électron est à l'état excité, la transition radiative²⁶ n'est pas le seul mode de désexcitation possible. La dissipation d'énergie peut également se faire par voie non radiative, c'est-à-dire sous forme de chaleur ou d'effets vibrationnels. Quand la température augmente, la probabilité de transition non radiative augmente [34]. D'après le théorème de la conservation d'énergie, l'augmentation des transitions non radiatives engendre la diminution des transitions radiatives. Cela se traduit par une diminution du nombre de photon émis par seconde lorsque la température augmente. L'augmentation de température induit donc une extinction de l'intensité d'émission de photoluminescence qui est définie par l'intégrale : $I(T) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} i(\lambda, T) d\lambda$

Avantages	Grande variation d'intensité de PL pour une petite variation de T dans une gamme de température donnée [35] [36]
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Dépendant de la concentration et du pH [33] • Dépendant de l'alignement du montage optique • Sensible aux propriétés optiques du milieu (absorption, diffusion) [37]

²⁶ Dissipation d'énergie par émission de photons

Position spectrale

La position spectrale, $\lambda_{SP}(T)$, est la longueur d'onde pour laquelle l'intensité de photoluminescence est maximale à une température donnée. Elle est déterminée par la différence énergétique, $\Delta E(T)$, des niveaux impliqués dans la transition électronique à l'origine de la luminescence. La position spectrale est définie par :

$$\lambda_{SP}(T) = \frac{hc}{\Delta E(T)}$$

λ_{SP}	Longueur d'onde (m) – Position spectrale
h	Constante de Planck ($h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s)
c	Célérité de la lumière ($3 \cdot 10^8$ m. s ⁻¹)
ΔE	Différence énergétique des niveaux impliqués dans la transition radiative (J)

Avantages	Indépendant de la concentration et du pH
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Faible variation de position spectrale pour une petite variation de T• Dépendent de l'état de surface• Sensible aux propriétés optiques du milieu (absorption, diffusion) [37]

Largeur spectrale

L'augmentation de la température d'un matériau luminescent entraîne une augmentation de la densité de phonons. Un phonon est un mode de vibration du réseau d'atomes formant un solide cristallin. Lorsque la densité de phonon augmente, la bande d'émission de photoluminescence s'élargit [34]. Au voisinage de la température ambiante, il y a une relation linéaire entre la largeur de bande et la température [34].

Avantages	Indépendant de la concentration et du pH
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Faible variation de largeur spectrale pour une petite variation de T• Sensible aux propriétés optiques du milieu (absorption, diffusion) [37]

IV.3.c. Temps de vie

Après un pulse d'excitation (laser ou LED), l'expression de la variation d'intensité de photoluminescence I au cours du temps fait intervenir une constante de temps τ . Elle est tel que :

$$I(t) = I_0 e^{-(t/\tau)}$$

La constante de temps τ est appelée temps de vie. Le temps de vie correspond au temps que met l'intensité d'émission I à décroître de $1/e$ (si on suppose que le déclin est mono-exponentiel) par rapport à la valeur initiale I_0 . Au sein de communauté de la nanothermométrie, le temps de vie est présenté comme étant un paramètre de photoluminescence à haut potentiel pour le déploiement de la nanothermométrie, car il dépend moins des interactions lumière-matière que les paramètres extraits du spectre de photoluminescence.

Avantages	<ul style="list-style-type: none">• Indépendant de la concentration et du pH [38]• Indépendant de l'alignement du montage optique [38]
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Coûts élevés des détecteurs opérationnels pour des matériaux ayant des temps de vie inférieurs à $1 \mu\text{s}$• Nécessite une source d'excitation pulsée• Le déclin de luminescence mono-exponentiel est un cas idéal. Dans la littérature, on retrouve de nombreux exemples montrant des déclins d'allure multiexponentielle, il est alors plus difficile de remonter à la valeur du temps de vie de photoluminescence [38] [37].

Rapport d'intensité

Le rapport d'intensité est un paramètre intéressant, car nous pouvons suivre l'évolution du signal de photoluminescence avec la température sans dépendre de la concentration de l'émetteur. De plus, pour la mesure d'un rapport d'intensité, le signal est intégré sur deux plages de longueurs d'onde. Nous perdons donc moins d'informations que lorsque nous mesurons la position spectrale, pour laquelle une seule valeur de longueur d'onde est extraite du signal de photoluminescence. Pour définir le rapport d'intensité, nous devons sélectionner les bornes en longueurs d'onde de deux intégrales : celle du numérateur et du dénominateur. **Le rapport d'intensité est le paramètre de photoluminescence avec lequel nous allons travailler dans ce travail de thèse.**

Avantages	Indépendant de la concentration, du pH et de la photostabilité
Inconvénients	Ce paramètre est sensible aux propriétés optiques du milieu (absorption, diffusion)

V. Cahier des charges d'un nanothermomètre pour le vivant

V.1. Prérequis

Trois critères du cahier des charges sont posés en prérequis. Tout d'abord, le nanothermomètre doit être **biocompatible**. Il ne doit pas induire de cytotoxicité. Ensuite, le nanothermomètre doit être **photo-stable**. Une irradiation prolongée ne doit pas induire une dégradation du composé ou altérer ses propriétés de luminescence [34]. Enfin, la mesure de température doit être **réversible et répétable**. Il est possible d'évaluer ces critères en effectuant des cycles de montée et de descente en température. Au cours des cycles, plus les valeurs du paramètre de photoluminescence sont proches, plus le caractère réversible-répétable du nanothermomètre est satisfaisant [34].

V.2. Absorption et émission du nanothermomètre

Il existe trois fenêtres de transparences biologiques. La première se situe entre 650 nm et 950 nm, la deuxième entre 1000 nm et 1350 nm, et la troisième entre 1500 nm et 1800 nm. Ces fenêtres correspondent à des intervalles de longueurs d'onde pour lesquels les coefficients d'absorption et de diffusion des tissus biologiques sont minimisés. La profondeur de pénétration de la lumière au sein des tissus biologiques est plus importante pour les longueurs d'onde appartenant aux fenêtres de transparence des tissus biologiques que pour celles en dehors de ces intervalles. De plus, la profondeur de pénétration de la lumière au sein des tissus biologiques augmente avec la longueur d'onde [39]. En effet, lorsque l'isothiocyanate de fluorescéine émettant dans la première fenêtre des tissus biologiques (520 nm) est utilisée pour marquer le cancer de l'ovaire chez l'homme, la limite de détection du signal de photoluminescence *in-vivo* est de 1 mm [40]. La limite de détection du signal émis par des sondes émettant dans la deuxième fenêtre des tissus biologiques est supérieure à ce seuil de 1 mm. En effet, les nanocristaux de sulfure d'argent (1200 nm) permettent d'imager le système vasculaire de la souris [41] [42]. Leur signal est également détecté à travers la boîte crânienne de souris grâce à une caméra d'imagerie opérant dans le proche infrarouge [43]. La troisième fenêtre de photoluminescence des tissus biologiques n'est pas à privilégier, car l'eau présente une bande d'absorption intense à 1400 nm. Les principes fondamentaux des interactions lumière-matière seront détaillés dans le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse.

Dans le cadre de notre étude, nous souhaitons travailler avec un nanothermomètre **absorbant dans la première ou dans la deuxième fenêtre des tissus biologiques et émettant dans la seconde fenêtre des tissus biologiques.**

V.3. Rendement quantique

Le rendement quantique (QY) renseigne sur l'efficacité d'émission d'un composé photoluminescent. Il est défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés (équation 1). Le rendement quantique est un critère de performance pour une sonde photoluminescente.

$$QY = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}} \quad (i)$$

Le rendement quantique peut aussi s'écrire en fonction du taux de recombinaison radiative (k_r) et non radiative (k_{nr}) par l'équation 2.

$$QY = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (ii)$$

D'après l'équation (ii), le rendement quantique est d'autant plus grand que k_{nr} est faible. Or, plus un composé émet à des longueurs d'onde élevées, plus la différence énergétique entre les niveaux impliqués dans la transition radiative est faible et plus on favorise la désexcitation par voie non radiative. Dans la section précédente, nous avons établi un critère important du cahier des charges d'un nanothermomètre pour le vivant : le composé doit émettre dans la deuxième fenêtre des tissus biologiques, dans le proche infrarouge. Il faut donc faire un compromis. Dans la littérature, la performance de nanoparticules de sulfure d'argent décorées d'albumine (sérum de bovin) présentant un rendement quantique de l'ordre de 1% a été démontrée pour l'imagerie ciblée du cancer *in-vivo* [44]. Il est donc possible, *in-vivo*, de détecter un signal de photoluminescence exploitable, provenant de sondes ayant un rendement quantique inférieur à 10% et émettant dans le proche infrarouge [45] [46].

Dans le cadre de notre application, nous souhaitons travailler avec un composé ayant **un rendement quantique de l'ordre de 10% à température ambiante**. Plus la température interne de la sonde de température augmente, plus son rendement quantique diminue. Dans le cadre de nos expériences de nanothermométrie, nous souhaitons avoir un rapport signal/bruit permettant l'exploitation du signal pour une température interne de la sonde de température comprise entre 25°C et 60°C.

V.4. Sensibilité thermique

Dans la section précédente, nous avons défini le rendement quantique comme étant un critère de performance pour une sonde photoluminescence. Le deuxième critère de performance est la sensibilité thermique relative (S_r , exprimé en $\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$) définie, en fonction du paramètre de photoluminescence considéré (Δ), par la relation (iii):

$$S_r = \frac{1}{\Delta} \left| \frac{\partial \Delta}{\partial T} \right| \quad (iii)$$

Contrairement à la sensibilité thermique absolue (iv), la sensibilité thermique relative permet de comparer les performances de nanothermomètres en utilisant des paramètres de photoluminescence différents. En plus de la nature du composé, la sensibilité thermique relative dépend de la température et du paramètre de photoluminescence considéré.

$$S = \left| \frac{\partial \Delta}{\partial T} \right| \quad (iv)$$

Dans le cadre de notre étude, nous souhaitons travailler avec un composé (et un paramètre de photoluminescence) ayant **une sensibilité thermique supérieure à 1%·°C⁻¹** dans la gamme de **température allant de 35°C à 55°C**. Le seuil de cytotoxicité d'exposition à la température pour les cellules se situant entre 43°C et 45°C [47], nous travaillerons avec des températures proches de ce seuil.

V.5. Pour conclure

La nanothermométrie de photoluminescence présente des avantages concurrentiels par rapport aux thermomètres actuellement disponibles pour mesurer la température au sein du vivant (tableau 10). Tout d'abord, l'utilisation de nanoparticules pour la mesure de température n'induit pas de lésions des tissus biologiques. L'injection des nanoparticules peut se faire par voie intraveineuse ou par injection locale au niveau de la zone tissulaire étudiée. La mesure de température peut ensuite être effectuée sans contact grâce à un détecteur (annexe A.I.2) opérant dans la fenêtre d'émission des nanoparticules.

Ensuite, l'information en température obtenue grâce à un nanothermomètre nous renseigne sur sa température de cœur, caractéristique de la configuration électronique du nanothermomètre à un instant donné. Nous pouvons remonter de manière indirecte, à la température au voisinage de la sonde de température, grâce aux équations de diffusion de la chaleur et aux capacités calorifiques du nanomatériau et du milieu environnant. En théorie, grâce à la nanothermométrie, il est donc possible de réaliser une mesure de température avec une grande résolution spatiale et temporelle. Néanmoins, il est important de préciser qu'en pratique, la résolution spatiale et temporelle d'un nanothermomètre est limitée par le détecteur utilisé pour la mesure de photoluminescence. Par ailleurs, la résolution en température du nanothermomètre dépend de la sensibilité à la température du nanothermomètre qu'il faudra calculer et du paramètre de photoluminescence sélectionné. Ainsi, un nanothermomètre ne peut pas être défini seulement par sa formulation. Afin de décrire entièrement un nanothermomètre, nous devons connaître :

- La composition du nanomatériau et son mécanisme de photoluminescence
- Le paramètre de photoluminescence et sa sensibilité à la température
- Le détecteur et sa résolution spatiale et temporelle.

Enfin, le coût de la nanothermométrie correspond au coût de production des nanoparticules et au coût d'achat détecteur de photoluminescence. L'ordre de grandeur d'une caméra d'imagerie opérant dans la seconde fenêtre des tissus biologiques est d'environ 100 k€. Une caméra hyperspectrale et un monochromateur valent 32 k€. Ces sommes peuvent être couvertes par des financements ANR et Européens (exemple du projet NanoTBTech).

Tableau V-1 : Analyse multicritères pour les nanothermomètres photoluminescents

	Cahier des charges	Nanothermomètre photoluminescent
Résolution spatiale	< 10 μm	OK
Résolution temporelle	0,1 s	OK
Résolution en température	0,1 °C	OK
Mesure de température locale ?	OUI	OK
Mesure invasive ?	NON	OK
Coût financier	< 100 k€	OK

VI. Présentation des études menées dans le cadre de cette thèse

VI.1. Rappel du cadre applicatif de la thèse

L'hyperthermie thérapeutique consiste à induire des points chauds, localement au sein du microenvironnement tumoral, grâce des nanosources de chaleur activables « à distance » par un champ magnétique, électromagnétique ou grâce à des ultrasons [48]. L'élévation de température locale permet de réduire la rigidité tissulaire empêchant les cellules immunitaires et les agents thérapeutiques de pénétrer au sein du microenvironnement tumoral. Néanmoins, la température mesurée globalement au sein du milieu (grâce à un thermocouple ou à une caméra thermique) ne permet pas d'expliquer les conséquences biologiques (apoptose, modification des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire) observées dans certaines études mettant en jeu l'hyperthermie [21]. Afin de comprendre comment les nanosources de chaleurs agissent sur le microenvironnement tumoral, il nous semble crucial d'étudier les élévations de température induites localement au sein des tissus biologiques.

VI.2. Synthèse et évaluation de nanocristaux de sulfure d'argent pour la nanothermométrie de photoluminescence appliquée au vivant

Dans travail de thèse, le composé photoluminescent que nous avons choisi d'optimiser pour la nanothermométrie est le nanocristal semi-conducteur de sulfure d'argent Ag_2S . Ce choix a été effectué grâce au cahier des charges que nous avons détaillé dans le tableau 11.

Tableau VI-1 : Analyse multicritères pour le choix du composé photoluminescent qui sera utilisé comme nanothermomètre dans ce travail de thèse

	Cahier des charges
Biocompatibilité ?	OUI
Photo-stabilité ?	OUI
Répétabilité et réversibilité ?	OUI
Absorption	700 – 1000 nm
Émission	1000 – 1300 nm
Rendement quantique	~ 10%
Sensibilité thermique relative entre 35°C et 55°C	>1%.°C⁻¹

Tout d'abord, nous avons mis au point une méthode de production de nanoparticule d' Ag_2S en veillant à son impact environnemental. La stratégie de production des nanoparticules d' Ag_2S que nous avons développée prend en compte les enjeux économiques (économie d'énergie), sociaux (sécurité), et écologiques (économie d'atomes) relatifs aux principes de la chimie verte. Les nanoparticules de sulfure d'argent précipitent directement dans l'eau sous l'effet d'un court chauffage micro-onde (5min). Ce chauffage microonde est effectué après la mise en contact des deux sels précurseurs d'argent et de soufre, tous deux bons-marchés, et d'un agent surfactant. La voie de synthèse des Ag_2S que nous avons développée présente un avantage majeur en termes de gestion des coûts (financier et temps). En effet, contrairement aux synthèses d' Ag_2S en voie organique couramment décrites dans la littérature [49], nos matériaux sont « prêts à l'emploi », en une seule étape, grâce à l'utilisation d'un surfactant biocompatible et hydrophile.

Ensuite, nous avons étudié l'influence des paramètres de synthèse sur la morphologie, la composition et les propriétés optiques des nanoparticules obtenues. Cette étude nous a permis de proposer un mécanisme de formation pour les nanoparticules d'Ag₂S que nous avons synthétisées en voie aqueuse ainsi que des mécanismes pouvant être à l'origine de leur photoluminescence.

Enfin, nous avons sélectionné les paramètres de synthèse maximisant les critères de performance des nanothermomètres. Ces critères de performances sont le rendement quantique et la sensibilité thermique. Nous avons choisi d'étalonner notre nanothermomètre de référence en utilisant un rapport d'intensité. Ce paramètre de photoluminescence présente l'avantage d'être indépendant de la concentration du composé photoluminescent. Un autre choix intéressant aurait été de sélectionner le temps de vie comme paramètre de photoluminescence. Néanmoins, le temps de vie du sulfure d'argent est de l'ordre de la nanoseconde et nous n'avons pas accès à un détecteur adapté à cette fenêtre temporelle [50].

VI.3. Nanothermométrie et hyperthermie magnétoinduite

Le nanothermomètre optimisé dans ce travail (par rapport au rendement quantique et à la sensibilité thermique relative) a été utilisé pour mesurer, en temps réel, la température locale au voisinage de nanoparticules de maghémite (γ -Fe₂O₃) en milieux aqueux et cellulaire, au cours d'un programme d'excitation optique et magnétique. Les nanoparticules de maghémite (γ -Fe₂O₃) étaient disponibles en grande quantité au laboratoire [51]. Le but de notre travail n'était pas d'optimiser le pouvoir de chauffe des nanosources de chaleur. Notre étude montre, entre autres, que la température à la surface des sources de chaleur est 30°C plus élevée que la température globale mesurée en suspension aqueuse. Ce travail a été rendu possible grâce à un investissement conséquent, en termes de temps et d'énergie, dans la conception instrumentale d'un dispositif permettant de réaliser simultanément l'excitation magnétoinduite des nanoparticules de γ -Fe₂O₃ et la détection du signal de photoluminescence des Ag₂S pour la nanothermométrie.

VI.4. Nanothermométrie et interaction lumière-matière

Dans ce travail de thèse, la métrologie de la mesure de température grâce aux nanosondes d'Ag₂S a une place centrale. Le signal de photoluminescence exploité pour la nanothermométrie est caractéristique de la température, mais il dépend aussi de l'épaisseur et des propriétés optiques du milieu traversé par les photons. Par exemple, l'eau, principal constituant des tissus biologiques, présente une bande d'absorption centrée à 1200 nm. Cette bande d'absorption se situe dans la fenêtre d'émission des Ag₂S. Lorsque les nanoparticules émettrices de photons sont dans un environnement composé d'eau, nous retrouvons la signature de l'absorption de l'eau, dans le spectre de photoluminescence des nanothermomètres. Cette déformation spectrale complexifie le processus de mesure de température effectuée à partir du spectre de photoluminescence.

Dans ce travail, nous proposons une méthode originale de traitement des spectres de photoluminescence émis par les nanoparticules d'Ag₂S, basée sur un modèle de Machine Learning. Cette méthode de traitement des spectres de photoluminescence prend en compte une quantité d'informations plus importantes que le rapport d'intensité p_1 . Grâce à ce changement de paradigme vis-à-vis du traitement des données de photoluminescence pour la nanothermométrie, nous montrons qu'il est possible d'aboutir à une mesure de température fiable dans un milieu absorbant (eau).

Par ailleurs, nous avons pris le temps d'étudier un nouveau potentiel applicatif pour les nanoparticules de sulfure d'argent : la classification tissulaire par transillumination. Les interactions lumière-matière représentent une opportunité pour accéder à un grand nombre d'informations sur les tissus biologiques et ce travail pourrait initier le développement d'une nouvelle méthode de diagnostic de pathologies.

Chapitre 2

Synthèse et évaluation de nanocristaux de sulfure d'argent

Le chapitre 2 est composé de trois parties. **Tout d'abord (sections I à III)**, nous vérifions que le matériau sélectionné pour ce travail de thèse, le nanocristal semi-conducteur d'Ag₂S, valide tous les critères du cahier des charges d'un nanothermomètre destiné à des applications biologiques établis dans le chapitre 1. **Ensuite (sections III à VII)**, nous proposons une voie de synthèse de sulfure d'argent rapide et à faible coût. Les nanoparticules sont obtenues en une seule étape et directement stables en milieu aqueux. Elles sont enrobées d'acide 11-mercaptopdécanoïque. Nous étudions l'effet de deux paramètres de synthèse sur la morphologie et les propriétés optiques des nanoparticules obtenues. Nous sélectionnons le nanothermomètre de référence (qui sera utilisé dans les chapitres 3 et 4), en considérant la sensibilité thermique et le rendement quantique comme critères de sélection. **Enfin**, nous testons notre synthèse de sulfure d'argent en voie aqueuse avec deux nouveaux ligands : le polyéthylène glycol méthyl éther thiol (6 kda) (**section VIII**) et le DTDTPA (dithiolated diethylenetriamine pentaacetic acid) (**section IX**).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec **Sabrina Benbabaali**, dans le cadre de son stage de fin d'études.

Partie 1 : Le nanocristal semi-conducteur d'Ag₂S

I. Le nanocristal de sulfure d'argent pour la nanothermométrie de photoluminescence appliquée au vivant

I.1. Choix du nanothermomètre

Une preuve de concept démontrant la possibilité d'utiliser les nanocristaux semi-conducteurs de sulfure d'argent comme sonde de température *in-vivo* a déjà été publiée dans la littérature. Dans les travaux de Del Rosa *et al.*, des nanothermomètres d'Ag₂S ont été injectés chez la souris pour suivre en temps réel la réponse intracérébrale lorsqu'un stress thermique est induit par injection d'alcool isopropyl. Après l'injection de la substance, une diminution de température de 3°C est mesurée grâce aux nanoparticules photoluminescentes injectées dans le cerveau [43]. Le nanocristal semi-conducteur de sulfure d'argent est un matériau très prometteur [43], [52], [53] qui valide tous les critères du cahier des charges établis pour une sonde photoluminescente destinée à la nanothermométrie (tableau I-1). En effet, des études déjà publiées dans la littérature nous apportent un socle de connaissances solides sur la synthèse de sulfure d'argent, leurs propriétés optiques, la toxicité et la biodistribution des nanoparticules d'Ag₂S *in-vivo*. Dans ce travail de thèse, nous partons de ces bases théoriques pour construire notre stratégie de développement de nanothermomètres basée sur la photoluminescence de nanoparticules d'Ag₂S.

Tableau I-1 : Analyse multicritères pour le choix du composé Ag₂S comme nanothermomètre pour ce travail de thèse

	Cahier des charges	Ag₂S
Biocompatibilité ?	OUI	OK
Photostabilité ?	OUI	OK
Répétabilité et réversibilité ?	OUI	OK
Absorption	700 – 1000 nm	OK
Émission	1000 – 1300 nm	OK
Rendement quantique	~ 10%	OK
Sensibilité thermique relative entre 35°C et 55°C	>1%.°C⁻¹	OK

I.2. Le cycle de vie des sulfures d'argent au sein des systèmes biologiques

I.2.a. Études de toxicité *in-vitro*

Dans le chapitre 1, nous avons décrit les mécanismes de toxicité des nanoparticules inorganiques. D'après les études publiées dans la littérature, les nanoparticules de sulfure d'argent présentes dans le compartiment extracellulaire ne semblent pas induire de dommage au niveau de la membrane cellulaire [54].

Lorsque des cellules saines humaines (293-T) ou cancéreuses humaines (CFPAC-1, cancer du pancréas) sont exposées à des nanoparticules de sulfure d'argent enrobées de glutathion²⁷, aucune réduction significative de la viabilité des cellules n'est observée jusqu'à une dose de 200 µg/ml [54] [55]. Cette concentration correspond au dosage de l'élément argent internalisé dans les cellules sous forme de sulfure d'argent et mesurée *a posteriori* par ICP-MS [54]. Des études ont démontré le caractère cytotoxique de l'argent sous sa forme métallique (nanoparticules d'argent) ou ionique (Ag^+). Ce métal est d'ailleurs utilisé comme additif dans les pansements pour les brûlures ou les plaies, mais aussi dans les textiles (chaussettes) pour les rendre antibactériens. Le très faible produit de solubilité de la phase Ag_2S ($K_s = 6,3 \times 10^{-50}$) prévient le relargage des ions toxiques Ag^+ au sein des systèmes biologiques [42]. La phase Ag_2S est stable en milieu biologique du fait de l'énergie de liaison élevée entre les atomes argent et soufre ($200 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ainsi, le relargage des ions Ag^+ n'est pas favorisé, que ce soit dans les compartiments extracellulaires ou intracellulaires. Le pH acide au sein des endosomes n'engendre pas d'augmentation de la toxicité des nanocristaux de sulfure d'argent internalisés dans les cellules. Par ailleurs, les nanoparticules internalisées dans les cellules n'induisent pas de rupture d'équilibre de leur potentiel redox. La présence des nanocristaux d' Ag_2S au sein des cellules ne soumet pas ces dernières à un stress oxydant important [54]. En outre, il est judicieux de rappeler ici que la nature du ligand de surface joue également un rôle majeur dans la toxicité induite par les nanoparticules d' Ag_2S . Les résultats donnés dans cette section concernent les nanoparticules enrobées d'une molécule biocompatible : le glutathion. En fonction du type de ligand présent en surface, les nanoparticules pourraient avoir une plus grande affinité avec la membrane cellulaire (et risquer de l'endommager) ou induire un stress oxydant plus grand vis-à-vis de la cellule. [13]

I.2.b. Études *in-vivo*

Biodistribution in vivo du sulfure d'argent

Les nanoparticules de sulfure d'argent enrobées de polyéthylène glycol ($\text{Ag}_2\text{S}@PEG$) peuvent s'accumuler dans une tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability Retention) après avoir été injectées par voie intraveineuse. Une étude menée en 2012 montre qu'après une injection d' $\text{Ag}_2\text{S}@PEG$ à 15 mg/kg, le taux de rétention des nanoparticules dans la tumeur (atteignant un maximum 10h après l'injection) est suffisant pour détecter un signal avec un rapport signal / bruit permettant d'imager la tumeur²⁸ [41]. Une autre étude, publiée en 2020, propose d'effectuer un double revêtement au méthoxy-polyéthylène glycol pour augmenter le taux de rétention intratumoral des $\text{Ag}_2\text{S}@PEG$, injectés par voie intraveineuse à 8mg/kg [2].

En dehors de l'accumulation intratumorale, la pharmacocinétique *in-vivo* des nanocristaux de sulfure d'argent a été étudiée dans plusieurs travaux [41] [42]. 24h après injection, chez la souris, d' Ag_2S enrobées de Polyéthylène Glycol par voie intraveineuse, les nanoparticules sont présentes avec un taux de rétention supérieur à 20% de la dose injectée par gramme de tissus (dosage ICP-MS) dans le foie, la rate, le cœur et les poumons (tableau I-2). Après une semaine (168h), la quantité de nanoparticules

²⁷ Le glutathion est une molécule endogène. C'est un tripeptide, composé de trois acides aminés : le glutamate, la cystéine et la glycine. Il intervient dans le transport de l'hydrogène.

²⁸ Nous rappelons que l'absence de toxicité a été démontrée jusqu'à une dose de 30 mg de Ag_2S / kg [42].

présentes dans le cœur et les poumons a fortement diminué passant sous la barre des 5% ID/g (*% ID/g pour percentage of the injected dose (ID) per gram of tissue*). En revanche, les nanoparticules ne sont pas éliminées du foie et de la rate [41]. D'après la littérature, les nanoparticules de sulfure d'argent enrobées de polyéthylène glycol sont éliminées principalement par voie biliaire [41] [42].

Tableau I-2 : La concentration en nanoparticules dans les tissus (% ID/g) mesurée par spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) effectuée sur les organes prélevés sur une première souris, 24h après injection des nanoparticules, et une deuxième souris, 168h après injection des nanoparticules par voie intraveineuse (veine de la queue) [41].

	Foie	Rate	Cœur	Poumons
24h post-injection (%ID/g)	35	20	30	55
168h post injection (%ID/g)	20	20	5	5

Toxicité in vivo du sulfure d'argent

L'injection d'Ag₂S enrobées de polyéthylène glycol ne provoque pas de toxicité chez le modèle murin pour des doses allant jusqu'à 30 mg.kg⁻¹. [42]. Après l'injection (à 30 mg/kg) de nanoparticules de sulfure d'argent enrobées de polyéthylène glycol dispersées dans le PBS, la toxicité des nanoparticules chez les souris est suivie pendant deux mois. Ce suivi est réalisé grâce à des analyses de sang biochimiques et hématologiques ainsi que des examens histologiques post-mortem. Par exemple, les taux de globules blancs et rouges ont été dosés à intervalle de temps régulier au cours des deux mois d'expérience. Cette étude montre qu'il n'y a pas de différence significative concernant la mesure des marqueurs de toxicité entre le groupe contrôle (pas d'injection de nanoparticules à t=0) et les animaux ayant reçu une dose de 30 mg.kg⁻¹ (à t=0) [42].

I.3. Les propriétés optiques des nanoparticules de sulfure d'argent

I.3.a. Une sonde activable dans la première fenêtre de transparence des tissus biologiques

Les nanoparticules d'Ag₂S absorbent dans la première et la deuxième fenêtre des tissus biologiques. D'après la littérature, les sulfures d'argent peuvent être excités, *in-vivo*, pour des expériences d'imagerie optique. En revanche, nous pouvons noter des différences importantes vis-à-vis de l'irradiance avec laquelle l'animal (modèle murin) est illuminé. Il y a un facteur 47 entre la plus faible et la plus forte irradiance reportée dans la littérature traitant d'études avec le sulfure d'argent pour l'imagerie optique ou la nanothermométrie *in-vivo*. L'irradiance est la densité de puissance de la source d'excitation. Elle dépend de la puissance de la source d'excitation et de la distance entre la source d'excitation et la zone irradiée. D'après la norme sécurité laser (**IEC 60825-1:2014**), pour l'être humain, l'irradiance maximale limitant le risque de brûlure est de 200 mW.cm⁻² [37]. À notre connaissance, aucun seuil maximal n'est fixé pour les animaux. Dans la littérature, certains auteurs justifient le niveau de sécurité de l'expérience pour l'animal par la norme internationale écrite pour les humains, alors que d'autres dépassent le seuil de sécurité [43] (tableau I-3). Il est donc important d'avoir une sonde avec un rendement quantique élevé pour réduire au maximum la densité de puissance de la source d'excitation et limiter le risque de brûlure pour l'animal.

Tableau I-3 : Études des conditions d'irradiation employées dans la littérature pour des expériences in vivo avec des nanoparticules de sulfure d'argent

Excitation	Longueur d'onde	Irradiance	Référence
Laser	808 nm	330 mW.cm ⁻²	[41]
Laser	808 nm	220 mW.cm ⁻²	[37]
Laser	808 nm	780 mW.cm ⁻²	[43]
Laser	800 nm	45 mW/cm ⁻²	[50]

I.3.b. Une sonde émettant dans deuxième fenêtre de transparence des tissus biologiques

Les nanocristaux d'Ag₂S émettent dans une large gamme de longueurs d'onde, allant de 500 nm [56] à 1400 nm [57]. L'émission du sulfure d'argent recouvre donc la première et la deuxième fenêtre de transparence des tissus biologiques. Du *et al.* [58] ont synthétisé des nanoparticules de sulfure d'argent dans l'eau en utilisant le glutathion comme surfactant. Les nanoparticules produites mesurent entre 1,7 nm et 3,7 nm et émettent entre 622 nm et 724 nm. Jiang *et al.* [56] ont effectué leur synthèse à 145°C dans l'éthylène glycol en utilisant l'acide 3-mercaptopropionique comme surfactant. En jouant sur le temps de chauffage, l'équipe a produit des particules de tailles contrôlées allant de 1,5 nm à 7,4 nm. Les particules émettent à des longueurs d'onde allant de 510 nm à 1221 nm (Tableau I-4). Des nanocristaux ont été synthétisés dans l'eau à 30°C en utilisant le BSA (Bovine Albumine Serum) comme agent de surface [57]. Les nanoparticules obtenues mesurent de 1,6 nm à 6,8 nm. Elles émettent entre 1050 nm et 1374 nm (tableau I-4). Dans le cadre de notre étude, nous souhaitons produire **des nanoparticules émettant dans la seconde fenêtre de transparence des tissus biologiques entre 1000 nm et 1350 nm**. Au regard des données collectées dans la littérature (tableau I-4), les nanoparticules de sulfure d'argent valident ce critère du cahier des charges. Par ailleurs, le **tableau I-4** montre qu'il n'y a pas de lien évident entre la taille des nanoparticules produites dans la littérature et leur longueur d'onde d'émission. Ceci questionne sur la véritable composition des particules synthétisées et l'origine de la luminescence.

Tableau I-4 : Taille et longueurs d'onde d'émission de nanoparticules de sulfure d'argent reportées dans la littérature

Taille min	$\lambda_{\text{taille min}}$	Taille max	$\lambda_{\text{taille max}}$	Référence
1,7 nm	622 nm	3,7 nm	724 nm	[58]
1,5 nm	510 nm	7,4 nm	1221 nm	[56]
1,6 nm	1050 nm	6,8 nm	1374 nm	[57]
2,4 nm	828 nm	3,1 nm	1050 nm	[59]
1,8 nm	612 nm	6,12 nm	820 nm	[60]
2,6 nm	687 nm	3,7 nm	1096 nm	[61]
4,1 nm	1060 nm	9,8 nm	1060 nm	[62]
1,48 nm	548 nm	6.12 nm	820 nm	[60]

I.4. Critère de performance du nanothermomètre Ag₂S

I.4.a. Rendement quantique de l'ordre de 10%

Le rendement quantique des nanoparticules de sulfure d'argent dépend de la voie de synthèse (solvant, temps, température) et de l'état de surface des nanoparticules. Dans la littérature, nous trouvons des nanoparticules de sulfure d'argent avec également une grande diversité de rendements quantiques. Ils sont compris entre 0,96% [63] et 27% [64]. Les valeurs sont listées dans le **tableau I-5**. Deux méthodes expérimentales existent pour mesurer le rendement quantique [65]. La première est relative à un échantillon référence, la seconde est absolue. La mesure relative de rendement quantique est basée sur la comparaison du spectre d'émission de l'échantillon étudié avec celui d'un échantillon référence (dont le rendement quantique est connu). Les deux spectres d'émission sont obtenus dans les mêmes conditions expérimentales grâce à un détecteur conventionnel de photoluminescence. Ce dernier ne détecte pas tous les photons émis par les échantillons. La fraction de photons détectés dépend de la taille de l'ouverture numérique d'excitation, de l'angle solide de détection, et des propriétés optiques des échantillons (coefficients d'absorption et de diffusion). Ainsi, afin d'effectuer une mesure relative de rendement quantique fiable, les coefficients d'absorption de l'échantillon étudié et de l'échantillon référence doivent être proches et connus précisément à la longueur d'onde d'excitation.

Tableau I-5 : Rendement quantique de nanoparticules de sulfure d'argent présentant des états de surface différents et obtenues par voie de synthèse aqueuse ou organique

Voie de synthèse	État de surface	Rendement quantique	Méthode de mesure	Référence
Structures simples				
Aqueuse	Acide 3-mercaptopropionique	4,4 % – 14 %	Relative <i>Rhodamine 6G</i>	[60]
Aqueuse	Acide 2-Mercaptopropionique	7 % - 17 %	Relative <i>LDS 798</i>	[59]
Aqueuse	Cystéine	27 %	Relative <i>Quinine</i>	[64]
Aqueuse	Multidentate polymer	14,2 % – 16,4 %	Relative <i>ICG</i>	[61]
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	15,5 %	Relative <i>IR-26</i>	[41] [66]
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	2,3 %	Absolue	[50]
Aqueuse	Polyéthylène glycol	2,3 %	Relative <i>IR-26</i>	[2]
Aqueuse	Glutathion	1 % – 2 %	Relative <i>ICG</i>	[63]
Aqueuse	Albumine (sérum humain)	1,3 %	Relative <i>IR-26</i>	[62]
Aqueuse	Albumine (sérum de bovin)	0.8 % - 1,8 %	Absolue	[44]
Structures cœur/coquille				
Aqueuse	Coquille : ZnS Ligand : Acide Tioglyclic	5,3 %	Relative <i>ICG</i>	(Karimipour et al. 2017)
Organique	Coquille : AgCl Ligand : octadecylamine	11 %	Absolue	[68]
Organique	Coquille : SiO ₂ Ligand : Dodecanthiol	19 % - 22,7%	Relative <i>ICG</i>	[60]

Dans la littérature, nous trouvons des mesures relatives de rendement quantique, effectuées pour les nanoparticules de sulfure d'argent, en utilisant plusieurs échantillons de référence, tels que la quinine [64], l'indocyanine green (ICG) [61] ou la rhodamine [60]. Il faut donc prendre des précautions pour comparer les données de la littérature. Dans le cadre de la mesure absolue de rendement quantique, une sphère intégrante est utilisée. Ce dispositif expérimental permet la détection des photons émis par un échantillon dans toutes les directions de l'espace. Il permet de comparer directement, pour l'échantillon étudié, le nombre de photons émis au nombre de photons absorbés, sans avoir besoin d'échantillon référence. Cette méthode de mesure permet une comparaison plus fiable de la performance des nanoparticules de sulfure d'argent déjà étudiées dans la littérature. Le rendement quantique absolu le plus élevé reporté dans la littérature, pour des nanoparticules d'Ag₂S, est de 11% [68]. Ce matériau performant a été obtenu grâce à un traitement laser femtoseconde (50 fs, 90 min, 9 W.cm⁻²) effectué après la synthèse des nanoparticules en voie organique.

D'après la littérature, la synthèse de sulfure d'argent avec un rendement quantique de l'ordre de 10% est possible (tableau I-5).

I.4.b. Sensibilité thermique supérieure à 1%.°C⁻¹ entre 35°C et 55°C

La première étude mettant en jeu les nanoparticules de sulfure d'argent pour la nanothermométrie est publiée en 2015. Elle reporte une extinction de photoluminescence (intensité totale) de 95% lorsque la température des nanoparticules de sulfure d'argent (enrobées de glutathion et synthétisées en voie aqueuse) augmente de 6°C à 50°C. Plus tard, entre 2018 et 2020, l'équipe de Daniel Jaque (Université Autonome de Madrid) publie plusieurs études sur ce sujet [43] [68] [37]. Des nanoparticules de sulfure d'argent obtenues en voie organique et post-fonctionnalisées avec du polyéthylène glycol ont une sensibilité relative supérieure à 1 %.°C⁻¹, entre 20°C et 60°C, lorsque que le paramètre de photoluminescence mesuré est l'intensité totale ou le rapport d'intensité [37]. Dans la même gamme de température, lorsque le paramètre d'intensité considéré est la position spectrale, la sensibilité relative de la sonde de température est inférieure à 1 %.°C⁻¹ [37]. Lorsque ces nanoparticules reçoivent, un traitement laser femtoseconde (50 fs, 90 min, 9 W.cm⁻²) post-synthèse, leur temps de vie passe de 400 ns à 2 μs. Dans la gamme de température 22 à 40 °C, la sensibilité relative de la nanosonde Ag₂S, en considérant le temps de vie comme paramètre de photoluminescence, est comprise entre 3 %.°C⁻¹ et 4 %.°C⁻¹ [68].

D'après la littérature (tableau I-6), la synthèse de sulfure d'argent avec une sensibilité thermique relative supérieure à 1%.°C⁻¹ entre 35 °C et 55 °C est possible. Il est important de préciser à ce stade que la sensibilité thermique du nanothermomètre dépend également du paramètre de photoluminescence choisi.

Tableau I-6 : Sensibilité thermique relative de nanoparticules de sulfure d'argent

Voie de synthèse	État de surface	Paramètre de photoluminescence	Gamme de température (°C)	Sensibilité relative (%.°C ⁻¹)	Référence
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	Intensité totale	26 - 42	3 - 4	[43]
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	Intensité totale	20 - 60	4 - 7	[37]
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	Rapport d'intensité I(1180nm)/I(1260nm)	20 - 60	1 - 2	[37]
Organique	Polyéthylène glycol (postfonctionnalisation)	Position spectrale	20 - 60	< 1	[37]
Organique	Coquille : AgCl Ligand : octadecylamine	Temps de vie	22 - 40	3 - 4	[68]

II. Les propriétés physicochimiques du nanocristal semi-conducteur de sulfure d'argent

II.1. Les phases cristallines du sulfure d'argent

En fonction de la température, la phase Ag_2S peut exister sous trois formes cristallines différentes. Le composé stœchiométrique Ag_2S existe sous la forme $\alpha\text{-Ag}_2\text{S}$ (acanthite) pour des températures inférieures à 448 K soit 177 °C (figure II-1). La maille élémentaire de cette phase est monoclinique, du groupe d'espace $P2_1/n$. Les paramètres de maille conventionnels sont²⁹ : $a = 4,229 \text{ \AA}$, $b = 6,931 \text{ \AA}$, $c = 7,862 \text{ \AA}$, $\beta = 99,61^\circ$. Lorsque que nous montons en température, entre 449 K et 453 K, la phase $\alpha\text{-Ag}_2\text{S}$ se transforme en $\beta\text{-Ag}_2\text{S}$ (argentite). La phase $\beta\text{-Ag}_2\text{S}$, stable jusqu'à 845 K, est cubique avec les atomes de soufre occupant une maille cubique centrée. Au-delà de 845 K, la phase $\beta\text{-Ag}_2\text{S}$ se transforme en $\gamma\text{-Ag}_2\text{S}$ cubique avec les atomes de soufre occupant une maille cubique à face centrée.

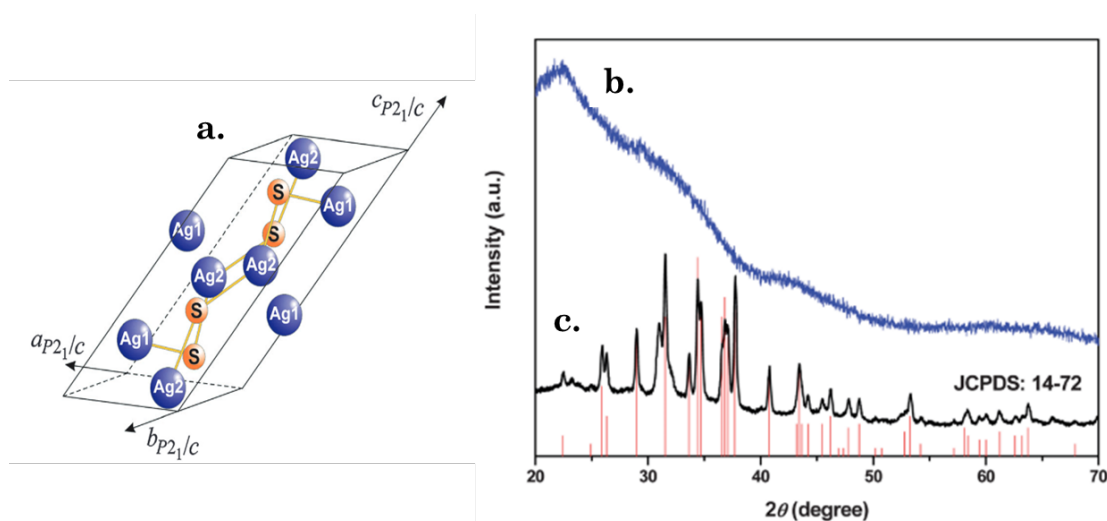


Figure II-1 : (a) La phase Ag_2S (acanthite) est stable pour des températures inférieures à 448 K (177°C). La distance interatomique Ag1-S est plus courte que la distance interatomique Ag2-S . Ag1 est en interaction avec deux atomes de soufre. Ag2 est en interaction avec trois atomes de soufre (Sadovnikov, Gusev, and Rempel 2015). (b) Diffractogrammes de Rayons X de nanoparticules de la phase $\alpha\text{-Ag}_2\text{S}$ à température ambiante et (c) après un traitement thermique à 180°C [59].

II.1.a. Compositions des nanoparticules de sulfure d'argent

Dans la littérature, plusieurs études reportent l'obtention de nanoparticules de sulfure d'argent non stœchiométrique ($\text{Ag}_{1.1}\text{S}$, $\text{Ag}_{1.7}\text{S}$, $\text{Ag}_{1.8}\text{S}$, $\text{Ag}_{1.93}\text{S}$, $\text{Ag}_{1.95}\text{S}$, $\text{Ag}_{1.98}\text{S}$) avec des rapports atomiques Ag:S inférieurs à 2 [50] [70] [71] [72].

Sadovnikov *et al.* montrent que les nanoparticules de sulfure d'argent ayant un diamètre supérieur à 50 nm sont stœchiométriques. En revanche, le rapport Ag:S mesuré pour des nanoparticules plus petites, de diamètre compris entre 50 nm et 20 nm, est de 1,93 [73]. La non-stœchiométrie des nanoparticules de sulfure d'argent de taille inférieure à 20 nm est confirmée par l'étude de Ortega-Rodríguez *et al.* Des nanoparticules de 9 nm, 13 nm et 18 nm de diamètre sont synthétisées avec un rapport Ag:S de 1,8 [50]. Dans une autre étude, des nanoparticules de sulfure d'argent de 5 nm de diamètre sont obtenues avec un rapport Ag:S de 1,1. La composition des nanoparticules de sulfure d'argent (rapport Ag:S) semble dépendre de leur taille. La taille des nanocristaux synthétisés est liée, entre autres, à la quantité et à la composition du ligand au sein du milieu réactionnel [50] [70].

²⁹ <http://www.handbookofmineralogy.org/pdfs/acanthite.pdf>

Certains auteurs interprètent cette non-stœchiométrie par un excès de soufre, provenant des ligands thiolés adsorbés en surface des nanoparticules [71] [72] [59]. D'autres, grâce à une étude par diffraction des rayons X des structures cristallines des nanoparticules de sulfure d'argent, ont démontré que des lacunes d'argent pouvaient exister au sein de la maille [50].

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons produire des nanoparticules de sulfure d'argent performantes pour la nanothermométrie. Un des critères de performance définis dans le chapitre 1 de ce manuscrit de thèse est le rendement quantique. L'étude de la non-stœchiométrie des nanoparticules d'Ag₂S est particulièrement pertinente, dans notre cas, puisqu'elle est liée aux performances optiques des nanoparticules. En faisant varier la composition en argent et en soufre (rapport Ag:S) du matériau, nous faisons varier le nombre de lacunes d'argent présentes au sein de la structure. Ces lacunes peuvent induire une extinction ou l'émission de photoluminescence [50].

II.1.b. Structure électronique des nanocristaux semi-conducteurs

Pour un nanocristal semiconducteur, les niveaux d'énergie de la bande de valence BV (ou Haute Occupée) et de la bande de conduction BC (ou Basse Vacante) sont discrets. Le nanocristal peut être considéré comme un puits de potentiel où les électrons sont confinés. Lorsque la taille du nanocristal diminue, le nombre d'atomes qui le compose diminue également. Il y a donc moins d'orbitales moléculaires formées par combinaison linéaire des orbitales atomiques. Les niveaux d'énergie tendent à s'écartier les uns des autres. Ainsi, plus la nanoparticule est petite, plus la largeur de gap (E_g), c'est-à-dire la différence d'énergie entre la BV et la BC, est grande. D'après les travaux de Brus *et al.*, la largeur de la bande interdite (E_g) peut être exprimée par l'équation ci-dessous [74] :

$$E_g = E_g^{solide} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8 e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{1}{r} \quad (1)$$

r	Rayon de la particule
E_g^{solide}	Largeur de la bande interdite du matériau massif vers lequel tend E_g lorsque r tend vers l'infini (matériau massif).
m_e^*	Masse effective de l'électron
m_h^*	Masse effective du trou
ϵ	Permittivité diélectrique du matériau relative au vide
ϵ_0	Permittivité du vide ($\epsilon_0=8,854 \times 10^{-12}$ F.m ⁻¹)
e	Charge de l'électron ($e=1,6022 \times 10^{-19}$ C)
\hbar	Constante de Planck réduite ($\hbar=1.0546 \times 10^{-34}$ J.s)

Le rayon de Bohr excitonique (r_B) est une grandeur caractéristique de l'exciton (défini dans le chapitre 1) pour un matériau donné. Il est défini comme étant la demie distance entre l'électron et le trou tel que :

$$r_B = \frac{4\pi\epsilon\epsilon_0\hbar^2}{e^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad (2)$$

En combinant les équations 1 et 2, nous pouvons exprimer la largeur de la bande interdite en fonction du rayon de Bohr excitonique (r_B) :

$$E_g = E_g^{solide} + \frac{1}{r} (2,74 \frac{r_B}{r} - 1) \quad (3)$$

Un nanocristal semiconducteur dont le rayon est inférieur à son rayon de Bohr excitonique (r_B) (confinement quantique) est appelé Quantum Dot (QD) (cas $r < r_B$ dans le tableau 13). Pour un QD, il est possible de moduler la largeur du gap et donc l'énergie du pic d'émission de photoluminescence (inversement proportionnel à la longueur d'onde d'émission λ) par un ajustement de la taille des nanoparticules. Plus les nanoparticules sont petites, plus l'énergie d'émission de photoluminescence est grande et donc plus la longueur d'onde du pic d'émission associé est faible (et réciproquement) (Figure II-2). Pour les nanosphères d'Ag₂S, le rayon de Bohr à température ambiante (300K) vaut 2,2 nm [75]. Ainsi, en théorie, pour des nanoparticules ayant un diamètre supérieur à 4,4 nm, la taille n'a pas d'effet sur la position spectrale. En revanche, pour des nanoparticules de diamètre inférieur à 4,4 nm, l'énergie du pic d'émission de photoluminescence augmente (déplacement vers les basses longueurs d'onde) lorsque la taille des nanoparticules diminue. Cet effet a déjà été illustré dans la littérature pour des nanoparticules d'Ag₂S enrobées de glutathion (synthétisées en voie aqueuse par chauffage conventionnel) ayant un diamètre compris entre 1,7 nm (émission à 622 nm) et 3,7 nm (émission à 724 nm). L'augmentation de la taille des nanoparticules engendre une diminution de l'énergie d'émission de photoluminescence de 0,28 eV [58].

Tableau II-1 : Interprétation de l'équation 3 en fonction du rayon d'un nanocristal semiconducteur par rapport à son rayon de Bohr

$r > r_B$	$\lim_{r \rightarrow +\infty} \frac{1}{r} = 0$	$E_g = E_g^{solide}$	La taille de la nanoparticule (r) <u>n'a pas d'influence</u> sur la largeur de la bande interdite (E_g)
$r \approx r_B$		$E_g = E_g^{solide} + \frac{1,74}{r}$ $E_g \approx E_g^{solide}$	La taille de la nanoparticule (r) a <u>peu d'influence</u> sur la largeur de la bande interdite (E_g)
$r < r_B$	$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{1}{r} = +\infty$	$E_g \gg E_g^{solide}$	La taille de la nanoparticule (r) a une <u>forte influence</u> sur la largeur de la bande interdite (E_g) → Cas du Quantum Dot

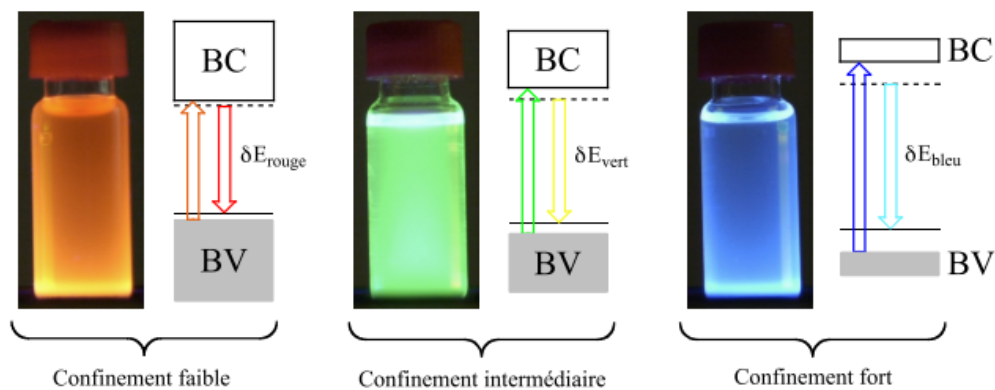


Figure II-2 : Influence de l'effet de confinement (cas $r < r_B$) sur les propriétés optiques de Quantum Dots [32]

II.2. Les propriétés de photoluminescence

II.2.a. Les défauts intrinsèques

Comme nous l'avons vu dans la section II.2., de nombreuses études reportent l'obtention de nanoparticules de sulfure d'argent non stœchiométrique. La non-stœchiométrie du sulfure d'argent donne lieu à des défauts intrinsèques dans la structure [72]. Selon la nature des défauts, il peut y avoir des niveaux intragaps de type accepteurs comme les lacunes d'argent ou donneurs comme les lacunes de soufre. Le spectre d'absorption des nanoparticules de sulfure d'argent ne présente pas de pic excitonique (figure II-3). Ceci est caractéristique de la recombinaison radiative résultant de la présence de défauts intrinsèques dans la structure du sulfure d'argent [72]. Par ailleurs, la bande d'émission est très large avec un décalage important (> 100 nm) par rapport à l'absorption en accord avec la présence de défauts intrinsèques.

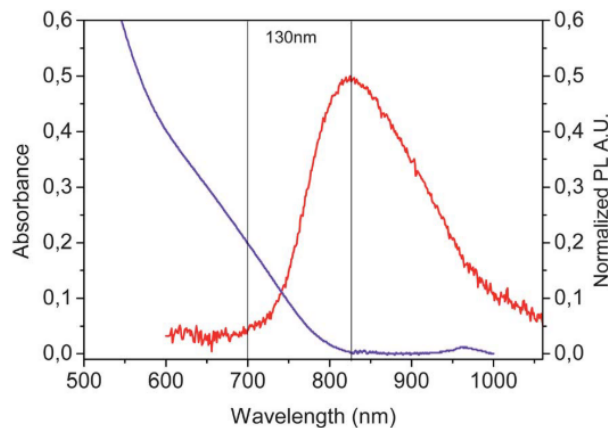


Figure II-3 : Spectres d'absorption et d'émission de photoluminescence de nanoparticules d'Ag₂S. Le spectre d'absorption ne présente pas de pic excitonique [59]

II.2.b. Les mécanismes de photoluminescence

Lorsqu'un électron est excité, il peut être piégé dans un niveau donneur proche de la BC (figure II-4 a). Le trou peut également être piégé dans un niveau accepteur proche de la bande de valance (BV). Une paire donneur-accepteur (DAP pour Donor-Acceptor Pair) est alors créée et se recombine en émettant un photon d'énergie inférieure à l'énergie du bangap (E_g). En l'absence de défauts donneurs, l'électron excité peut se délocaliser dans la BC (figure II-4 b). Il peut ensuite se recombiner de manière radiative avec un trou situé dans un niveau accepteur situé dans le gap avant de retourner dans la BV. Pour un échantillon excité à une irradiance donnée, la probabilité d'occupation des sites donneur-accepteur (DAP) de plus basse énergie augmente lorsque la température augmente. En effet à basse température, les forces de répulsions coulombiennes sont moins fortes, car il y a moins de phonons générés par les vibrations atomiques. Ainsi, lorsque la température augmente, les processus de désexcitation non radiatifs sont favorisés et l'intensité totale d'émission de photoluminescence décroît conformément à l'équation 4 ci-dessous. I est l'intensité de l'émission, E est l'énergie de la transition du DAP à la température T et k_B est la constante de Boltzmann.

$$I(T) = \frac{1}{1 - Ae^{\frac{-E}{k_B T}}} \quad (4)$$

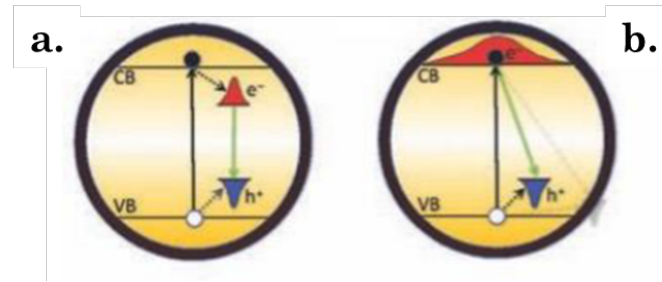
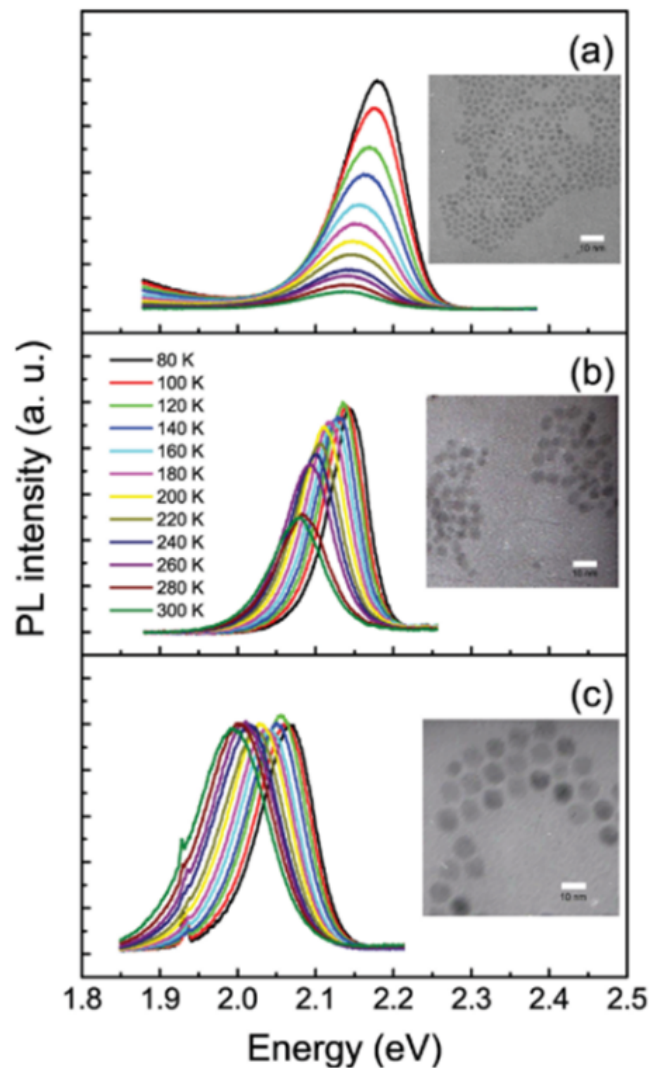


Figure II-4 : (a) Recombinaison d'un électron d'un niveau donneur avec un trou d'un niveau accepteur. (b) Recombinaison d'un électron excité délocalisé dans la BC avec un trou localisé dans un niveau accepteur [72].

Conformément à l'équation 4, l'intensité totale de photoluminescence du composé Ag_2S diminue avec l'augmentation de la température [76] [77]. En revanche, l'énergie du pic d'émission de photoluminescence des Ag_2S ne varie pas toujours avec la température. Entre 15°C et 50°C , pour des nanoparticules d' Ag_2S enrobées de dodecanthiol, l'énergie du pic d'émission de photoluminescence diminue de $5,4 \cdot 10^{-2}$ eV (décalage de la position spectrale de 70 nm) [77]. Dans le même intervalle de température, pour des Ag_2S décorées de glutathion l'énergie du pic d'émission de photoluminescence ne varie pas [76]. À ce stade, il est intéressant de comparer les propriétés de photoluminescence des nanoparticules d' Ag_2S à celles d'autres nanocristaux semiconducteurs. Pour les composés CdSe , CdSe@CdS et $\text{CdSe@CdS@CdZnS@ZnS}$, la dépendance de l'intensité totale de photoluminescence à la température dépend fortement du nombre de coquilles présentes autour du cœur CdSe (figure II-5). Les pièges responsables de l'extinction de photoluminescence sont donc préférentiellement présents en surface des nanoparticules. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une nanoparticule a un rapport surface/volume élevé avec une proportion importante d'atomes de surface porteurs de lacunes électroniques engendrant ainsi une densité importante de défauts [78]. Avec l'augmentation du nombre de coquilles autour du cœur CdSe , le nombre de défauts de surface diminue et la dépendance de l'intensité de photoluminescence à la température devient moins importante. [78].



è

Figure II-5 : Images TEM (la barre d'échelle représente 10 nm) et spectres de photoluminescence, enregistrés à différentes températures de 80 à 300 K sous excitation optique à 488 nm, pour les composés (a) CdSe, (b) CdSe@CdS et (c) CdSe@CdS@CdZnS@ZnS. [79]. Pour les trois composés, l'intensité totale de photoluminescence et la position spectrale varient différemment avec la température.

III. Synthétiser des nanoparticules de sulfure d'argent

III.1. Les stratégies de synthèses possibles

Les nanoparticules de sulfure d'argent peuvent être synthétisées en voie organique [49] [50] et en voie aqueuse [59] [2]. Chaque méthode conduit à la production de composés avec une morphologie, une composition et des propriétés optiques qui leur sont propres.

La voie de synthèse organique la plus utilisée dans la littérature est la décomposition thermique du précurseur moléculaire de diéthylthiocarbamate d'argent (Ag-DTDC) dans un solvant organique (servant également de surfactant) comme le dodécylthiol [49]. Cette synthèse a été testée au laboratoire. Un changement de couleur progressif (du blanc vers le noir, en passant par le jaune et le rouge) caractéristique de la décomposition d'Ag-DTDC et de la formation des nanoparticules de sulfure d'argent est observé autour de 120°C. Lorsqu'un palier de température à 200°C est imposé au milieu réactionnel pendant 30 min par chauffage conventionnel, les nanoparticules formées sont monodisperses, mesurent 5 nm et émettent autour de 1200 nm. Il est généralement admis que les nanoparticules obtenues en phase organique ont de meilleures propriétés optiques que celles produites en phase aqueuse. Néanmoins, l'étape de changement de ligand nécessaire pour obtenir des nanoparticules stables en milieu aqueux pour réaliser des expériences à l'interface avec le vivant peut sévèrement altérer les performances optiques des nanoparticules produites.

Les synthèses en voie aqueuse présentent des avantages majeurs. Elles ont un faible impact environnemental et permettent d'obtenir des particules « prêtes à l'emploi » pour des applications en milieu biologique. Pour ces raisons, nous avons fait le choix, dans le cadre de ce travail de thèse, d'axer nos travaux de recherche sur le développement d'une voie de synthèse de nanocristaux semi-conducteurs de sulfure d'argent en utilisant l'eau comme solvant de synthèse.

III.2. La synthèse aqueuse de nanocristaux semi-conducteurs d'Ag₂S

III.2.a. Mécanisme de formation

La synthèse de nanocristaux en voie aqueuse comprend généralement quatre grandes étapes, décrites par modèle de La Mer [80] (figure III-1). Dans le cas des synthèses de sulfure d'argent que nous avons développées, une étape préliminaire consiste à préparer une solution contenant un ligand amphiphile et un ion métallique, provenant d'un sel métallique soluble dans l'eau, le nitrate d'argent. Le ligand interagit avec les ions métalliques Ag⁺ pour former des complexes moléculaires Ag-Ligand. L'introduction de l'anion dans le milieu réactionnel, généralement S²⁻ (introduit sous la forme de sulfure de sodium), déclenche la formation de clusters moléculaires (**zone I**, figure III-1). De petites entités polynucléaires instables (les germes) se forment par condensation des clusters lorsque la concentration de ces derniers dépasse une valeur C_{min}, supérieure à la solubilité molaire du solide formé. C'est la nucléation (**zone II**, figure III-1). Plus les précurseurs sont réactifs, plus le nombre de clusters formés dans le milieu réactionnel est grand, et plus vite la nucléation sera déclenchée. La troisième étape du modèle proposé par La Mer est la croissance des germes (**zone III**, figure III-1). Elle entraîne la diminution rapide de la concentration en clusters au sein du milieu réactionnel. Si la concentration des clusters passe sous le seuil C_{min}, la formation de nouveaux germes est bloquée. Les germes formés pendant la nucléation capturent les clusters présents dans le milieu réactionnel formant ainsi des particules plus grosses. La quatrième étape (**zone IV**, figure III-1) décrite par La Mer est le vieillissement. Elle détermine les caractéristiques finales des particules. En effet, les particules formées dans les étapes précédentes sont dans un état métastable vis-à-vis de leur taille, de la structure cristalline ou de la morphologie. Des réorganisations à l'état solide et des équilibres de dissolution/cristallisation peuvent donc intervenir lors de l'étape de vieillissement.

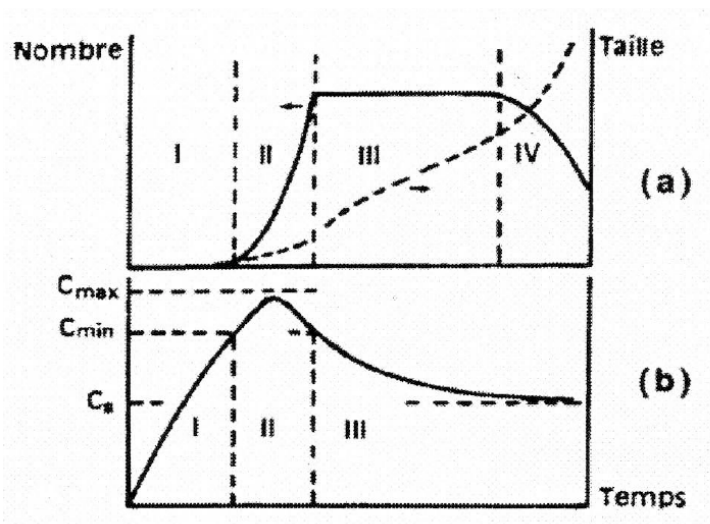


Figure III-1 : Profil décrivant l'évolution du nombre de particules et de leur taille (a) ainsi que la concentration en précurseurs de charge nulle en solution (b) en fonction du temps selon le modèle de La Mer [80]. C_s est la solubilité du composé formé ; C_{min} est concentration critique en cluster et C_{max} est la concentration maximale des germes dans le milieu réactionnel.

III.2.b. Contrôle de la morphologie et des propriétés optiques des nanocristaux d'Ag₂S grâce aux paramètres de synthèse

Les sels métalliques, généralement utilisés pour la synthèse de nanocristaux semi-conducteurs en voie aqueuse, réagissent instantanément dans l'eau contrairement aux précurseurs utilisés dans les synthèses en voie organiques. Dans ce cas, les phases de nucléation et de croissance des nanoparticules ne sont pas séparées temporellement et la cinétique de formation des nanoparticules n'est pas contrôlée. Cela peut être le cas lorsque le sulfure de sodium est utilisé comme précurseur de soufre et le nitrate d'argent comme précurseur d'argent. Ces espèces sont très réactives dans l'eau et conduisent à un relargage rapide du cation Ag^+ et de l'anion S^{2-} dans le milieu réactionnel [72]. Lorsque la cinétique de croissance des nanoparticules n'est pas contrôlée, les composés obtenus sont polydisperses et leur taille ne peut pas être modulée facilement grâce à l'ajustement des paramètres de synthèse. Néanmoins, des études montrent que la cinétique de formation des nanocristaux semi-conducteurs d'Ag₂S dans l'eau peut être contrôlée grâce à la composition du milieu réactionnel. Par exemple, la thiourée utilisée comme source de soufre permet un relargage lent de l'anion S^{2-} dans le milieu réactionnel. Dans ce cas, des nanoparticules monodisperses sont obtenues et la croissance des nanoparticules peut être modulée grâce au temps de réaction et au pH du milieu réactionnel [72]. Dans notre cas, nous avons choisi de complexer l'argent par le ligand de surface pour ralentir la précipitation d'Ag₂S et contrôler les étapes de nucléation et croissance.

Partie 2 : Synthèse et évaluation d'Ag₂S-11MUA pour la nanothermométrie

La deuxième partie du deuxième chapitre de ce manuscrit de thèse est organisé de la manière suivante. Nous commençons par présenter les résultats préliminaires ayant orienté nos choix expérimentaux pour la synthèse de sulfure d'argent développée dans ce travail de thèse (**section IV**). Ensuite, nous étudions l'influence des paramètres de synthèse **Surf:Ag** et **Ag:S** (tableau 8) sur la morphologie (MET), la composition (MEB-EDX) et les propriétés optiques (spectroscopie d'émission de photoluminescence) de 9 composés d'Ag₂S décorées de 11MUA (**section V**). Enfin, nous proposons une évaluation de ces 9 matériaux en vue de leur utilisation pour la nanothermométrie et en considérant la sensibilité thermique et le rendement quantique comme indicateurs de performance (**section VI**).

IV. Choix expérimentaux pour la synthèse de sulfure d'argent développée dans ce travail de thèse

IV.1. La stratégie de synthèse

Le protocole de synthèse de nanoparticules de sulfure d'argent que nous avons développé au Laboratoire de la Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP) est inspiré des travaux publiés par Hocaoglu *et al.* en 2012 [59] et Karimipour *et al.* en 2017 [67]. Pour développer notre synthèse, nous nous sommes fixé des contraintes reportées dans le cahier des charges (tableau IV-2). Le sulfure de sodium est utilisé comme précurseur de soufre, le nitrate d'argent comme précurseur d'argent et le 11MUA comme ligand. Cette synthèse en voie aqueuse, assistée par chauffage micro-ondes, fait intervenir les six paramètres de synthèse principaux rassemblés dans le **tableau IV-1**.

Tableau IV-1 : Principaux paramètres de synthèse pour les nanoparticules d'Ag₂S produites en voie aqueuse.

Notation	Signification
[Ag]	Concentration en argent dans le réacteur de synthèse (en mM)
Température de chauffage	Température du chauffage (en °C)
Temps de réaction	Temps du palier de température (en min)
Surf : Ag	Rapport molaire entre les molécules de surfactant et les atomes d'argent introduits dans le milieu réactionnel
Ag : S	Rapport molaire entre les atomes d'argent et de soufre introduits dans le milieu réactionnel
pH	pH du milieu réactionnel

Tableau IV-2 : Cahier des charges du procédé de synthèse

Contraintes	Mise en œuvre
Minimiser le coût énergétique	Le temps de chauffage est court grâce à l'emploi d'un four à micro-ondes
Produire des matériaux prêts à l'emploi en une seule étape	Les ligands utilisés comme agents de surface sont biocompatibles et permettent une stabilité colloïdale en phase aqueuse sans étape d'échange de ligand.
Faciliter la gestion des déchets	Le solvant de synthèse est H ₂ O
Proposer une synthèse compatible avec un développement industriel	Les réactifs sont accessibles facilement et sont peu onéreux. Le chauffage micro-ondes est compatible avec une production à grande échelle.

IV.2. La méthode de chauffage

IV.2.a. La synthèse assistée par chauffage micro-onde

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de développer une synthèse assistée par chauffage microonde. Deux mécanismes sont à l'origine de la chaleur générée par les micro-ondes : la polarisation dipolaire et la conduction ionique. Pour chauffer, un milieu réactionnel doit donc contenir des dipôles électriques³⁰ et des espèces chargées [81]. Dans le cas des synthèses micro-ondes, le champ électrique généré par le four est oscillant : les dipôles moléculaires se réalignent donc en permanence sur les lignes de champ (figure IV-1). Ce mouvement génère de la chaleur par friction entre les molécules présentes au sein du milieu réactionnel [82]. L'énergie thermique libérée par ce mécanisme dépend de la sensibilité des dipôles moléculaires à la fréquence du champ électrique. En effet, si les dipôles n'ont pas suffisamment de temps pour s'aligner aux lignes de champ électrique avant inversion de ce dernier (cas des rayonnements à haute fréquence) ou si les dipôles moléculaires s'orientent trop rapidement (cas des rayonnements à basse fréquence), l'énergie thermique libérée sera faible. En synthèse, une fréquence micro-onde couramment employée est 2,45 GHz. Elle permet l'oscillation des moments dipolaires des molécules d'eau, avec un temps d'alignement du dipôle moléculaire aux lignes de champ électrique optimum pour générer une quantité d'énergie thermique importante. De la même manière, les ions en solution oscillent sous l'effet du champ électrique du four à micro-ondes ce qui provoque des collisions entre espèces voisines. Ces collisions sont également à l'origine de libération d'énergie thermique.

³⁰ Comme par exemple, les molécules polaires du solvant ou des réactifs. Dans notre cas le solvant est H₂O. C'est est une molécule présentant un moment dipolaire non nul.

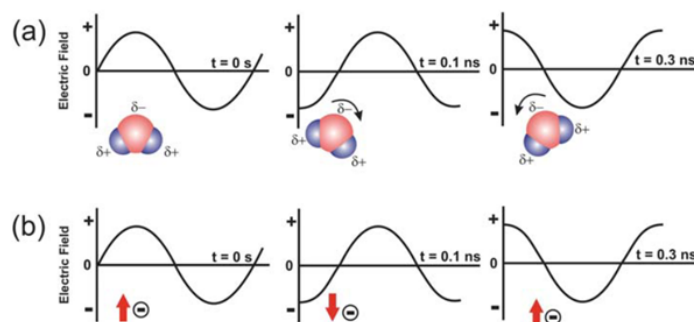


Figure IV-1 : Les deux mécanismes principaux de chauffage micro-onde : (a) polarisation dipolaire (b) conduction ionique [83]

IV.2.b. Avantages et inconvénients de la synthèse assistée par chauffage micro-onde

Les synthèses assistées par micro-ondes présentent des avantages comparés aux synthèses par chauffage conventionnel [82]. La synthèse micro-onde permet un bon contrôle des paramètres expérimentaux, et en particulier de la température. En effet, dans le cas des synthèses par chauffage micro-ondes, l'énergie des micro-ondes est directement transmise aux dipôles moléculaires et aux ions contenus dans le milieu réactionnel. Cette méthode permet donc une élévation de température du milieu réactionnel uniforme et directement « à cœur ». Dans le cas des méthodes de chauffage conventionnelles, l'apport d'énergie thermique est effectué par convection de chaleur à partir d'une source externe (bain d'huile ou chauffe-ballon). Les rampes de montées en températures sont lentes et mal contrôlées, car elles sont limitées par les transferts thermiques entre la source de chaleur et le réacteur, et entre le réacteur et le milieu réactionnel. Grâce au chauffage micro-onde, nous pouvons imposer au milieu réactionnel une température élevée pendant un temps très court [84] permettant ainsi une nucléation homogène dans l'ensemble du réacteur. Ce mode de chauffe est aussi une solution intéressante pour limiter l'exposition du ligand à des températures élevées et conserver son intégrité. Ceci est un enjeu crucial pour produire des nanoparticules stables avec des propriétés morphologiques et optiques reproductibles [59]. Néanmoins, la synthèse assistée par micro-ondes possède également des inconvénients. La taille des réacteurs micro-ondes est limitée par la longueur d'onde des micro-ondes³¹. Un champ homogène ne peut pas être appliqué sur une largeur de récipient supérieure à 1 cm. Cela constitue un frein pour le passage à grande échelle des synthèses assistées par micro-ondes.

IV.2.c. Les fours à micro-ondes monomode et multimode

Dans ce projet de thèse, des essais de synthèse ont été effectués grâce à un four à micro-ondes multimode (Synthos 3000, Anton Paar) et à un four à micro-ondes monomode (Monowave 300, Anton Paar)³². Le four multimode permet des synthèses à plus grande échelle que le monomode. Il possède huit réacteurs pouvant contenir 40 mL de milieu réactionnel. Le volume de production est 20 fois plus important avec le micro-ondes multimode (320 mL) qu'avec le micro-ondes monomode (16 mL). Néanmoins, contrairement aux nanoparticules produites avec le four à micro-ondes monomode (figure IV-2), les propriétés optiques des nanoparticules synthétisées à grande échelle, avec le four à micro-ondes multimode, ne sont pas reproductibles (figure IV-3). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le **four à micro-ondes monomode** permet de focaliser le rayonnement micro-onde au niveau de la cavité dans laquelle est inséré le réacteur³³. Toute l'énergie apportée par le rayonnement micro-onde, atteint de manière homogène l'échantillon. Cela n'est pas le cas pour le **four à micro-ondes multimode**. Dans ce travail de thèse, nous avons donc choisi de travailler avec le four à **micro-ondes monomode**

³¹ Une fréquence de 2,45 GHz correspond à une longueur d'onde de l'ordre de 10 cm.

³² Les instruments sont présentés dans l'annexe A, section A.I.1).

³³ Un schéma explicatif est proposé annexe A, section A.I.1.

(Monowave 300, Anton Paar) possédant une petite cavité, mais permettant d'obtenir des nanoparticules avec des propriétés optiques reproductibles (figure IV-2).

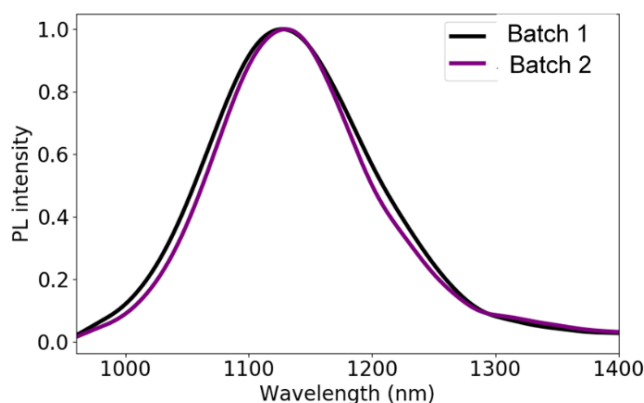


Figure IV-2 : Test de reproductibilité des propriétés optiques des nanoparticules d'Ag₂S (Ag:S = 2, Surf:Ag = 3, T = 100°C, [Ag] = 5 mM) synthétisées avec le four à micro-ondes monomode (Monowave 300, Anton Paar) pour un temps de palier en température de 5 min. Le volume des suspensions aqueuses ayant servi à effectuer la mesure est de 0,7 mL. La totalité du volume de la suspension étudiée est excitée par la LED-730 nm. La température lors de l'acquisition des spectres est de 25°C.

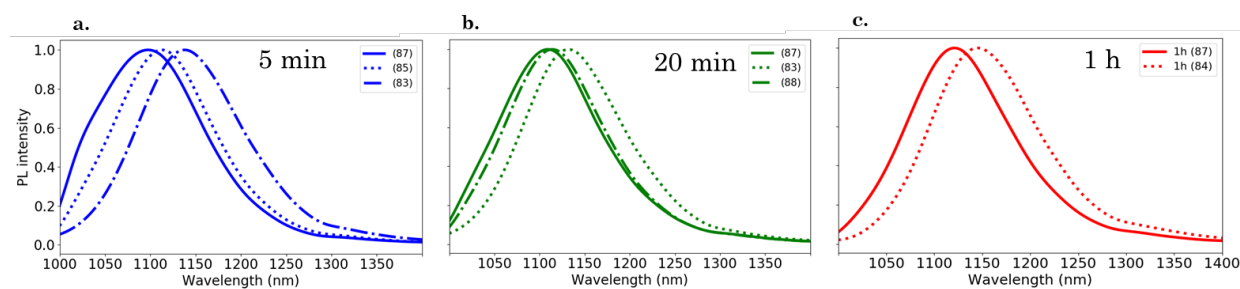


Figure IV-3 : Test de reproductibilité des propriétés optiques des nanoparticules d'Ag₂S (Ag:S=2, Surf:Ag=3, T=100°C, [Ag]=5 mM) synthétisées avec le four à micro-ondes multimode (Synthos 3000, Anton Paar) pour des temps de paliers en température de (a) 5 min, (b) 20 min et (c) 1 h. Le volume des suspensions aqueuses ayant servi à effectuer la mesure est de 0,7 mL. La totalité du volume de la suspension étudiée est excitée par la LED-730 nm. La température lors de l'acquisition des spectres est de 25°C

IV.2.d. Le chauffage micro-onde améliore les propriétés optiques des nanoparticules d'Ag₂S

Le produit de solubilité du sulfure d'argent à température ambiante (6.3×10^{-50}) rend la formation des nanoparticules d'Ag₂S thermodynamiquement favorable à basse température (<100°C) quand les précurseurs d'argent et de soufre sont disponibles et en quantité suffisante dans le milieu réactionnel. Nous avons étudié le signal de photoluminescence d'un composé obtenu à température ambiante (6 min à 20°C puis centrifugation et lavage à l'éthanol absolu) et d'un autre issu d'une synthèse assistée par micro-ondes (5 min à 100°C, 300 W, puis centrifugation et lavage à l'éthanol absolu). Tous les autres paramètres de synthèse étaient identiques pour les deux composés : [Ag]=5 mM, Ag:S=2, Surf:Ag=3, T=100°C, t=5 min. D'après la figure 10, l'intensité totale d'émission de l'échantillon obtenu à température ambiante (figure IV-4, spectre rouge) est plus intense que celui de l'échantillon issu de la synthèse assistée par chauffage micro-ondes (figure IV-4, spectre mauve). L'intensité totale de PL n'est pas une grandeur permettant de comparer les performances optiques de deux composés puisqu'elle dépend de la concentration des émetteurs en suspension et des réglages du montage

optique. Le rendement quantique de l'échantillon obtenu à température ambiante (spectre rouge) (0,024%) est en fait 3 fois moins important que l'échantillon obtenu après chauffage micro-ondes (figure IV-4, spectre mauve) (0,06%). Dans le cadre de notre étude, l'utilisation du chauffage micro-onde permet donc d'améliorer les propriétés optiques des nanoparticules d'Ag₂S.

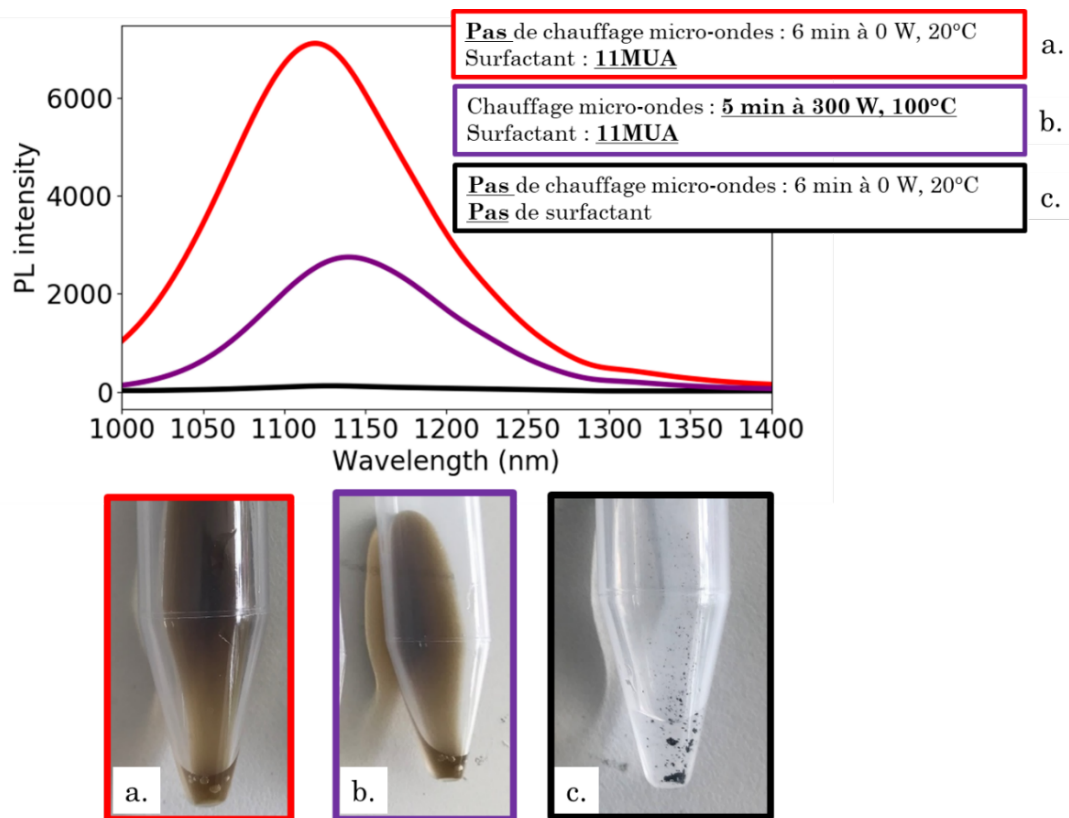


Figure IV-4 : Effet du surfactant et du chauffage microonde sur les propriétés des nanoparticules obtenues. Ces expériences ont été réalisées avec les paramètres de synthèse suivants : [Ag] = 5 mM, Ag:S = 2, Surf:Ag = 3, T = 100°C, t = 5 min.

IV.3. Le ligand de synthèse

IV.3.a. Rôle du ligand

À la surface des nanoparticules, de nombreux atomes peuvent présenter des lacunes électroniques constituant des états pièges pour les photons et pouvant faire diminuer le rendement quantique du composé [78]. Les liaisons formées entre les molécules de ligand et la surface des nanoparticules peuvent réduire le nombre de pièges de surface. En contrôlant l'état de surface des nanoparticules, le ligand a donc une influence sur le rendement quantique des nanoparticules synthétisées. En plus de contrôler l'état de surface, le ligand permet le contrôle de la croissance des nanoparticules et de leur stabilité colloïdale en suspension [78]. Dans le cas de la synthèse d'Ag₂S, l'ion Ag (I) est un acide mou qui se liera préférentiellement à une base molle comme les thiols. Dans leur étude, Castanon *et al.* [85] comparent l'efficacité d'un ligand possédant une fonction hydroxyle (Triton X-100) et d'un ligand possédant une fonction thiol pour contrôler la taille et l'état de surface de nanoparticules de sulfure d'argent obtenues via une synthèse en milieu aqueux et à température ambiante. L'utilisation du ligand avec une fonction hydroxyle (Triton X-100) conduit à la formation de nanoparticules agrégées de 74 nm. Dans les mêmes conditions de synthèse, des particules deux fois plus petites (30,1 nm) sont obtenues en utilisant le ligand thiolé (3-mercaptopropandiol). Ce résultat montre que le composé possédant une fonction hydroxyle (base dure) a une plus faible affinité avec l'ion Ag (I) (acide mou) que celui possédant une fonction thiol (base molle). L'affinité du ligand avec le cation Ag⁺, sa structure chimique et spatiale ainsi que la concentration du ligand au sein du milieu réactionnel sont des paramètres ayant une influence significative sur la cinétique de formation, la morphologie et les propriétés optiques des nanocristaux semi-conducteurs d'Ag₂S synthétisés en milieu aqueux [78].

IV.3.b. Choix du ligand

Dans ce travail de thèse, nous avons testé l'action du ligand 11MUA (acide 11-Mercaptodecanoïque) pour contrôler l'état de surface, la croissance et la stabilité colloïdale des nanoparticules synthétisées. Nous avons sélectionné l'acide 11-Mercaptodecanoïque, car il fait partie de la même famille de molécule que l'acide 2-mercaptopropionique utilisé dans la synthèse de Hocaoglu *et al.* [59] et que l'acide 2-mercптоacetique proposé dans l'étude de Karimipour *et al.* [67]. Ces molécules possèdent une fonction thiol et une fonction acide carboxylique. D'une part, la fonction thiol a une forte affinité avec le cation métallique Ag⁺ pour la formation de complexe moléculaire Ag-11MUA. D'autre part, le pKa du 11MUA par rapport à la fonction acide carboxylique est 4,75 [86]. Dans des conditions de pH > pKa, l'espèce prédominante est l'ion carboxylate. La charge négative en bout de chaîne de la molécule permet de stabiliser les particules en suspension aqueuse. Par ailleurs, le 11MUA possède une chaîne organique plus longue que celle des acides 2-mercaptopropionique et 2-mercптоacetique. L'encombrement stérique du ligand permettrait d'améliorer la monodispersité et les propriétés optiques des nanoparticules produites [78]. Dans le cadre de notre étude, le surfactant est nécessaire à la formation des nanoparticules d'Ag₂S. En l'absence de 11MUA dans le milieu réactionnel, un précipité noir se forme instantanément après la mise en contact entre le précurseur d'argent (AgNO₃) et celui de soufre (Na₂S), dans les proportions Ag:S = 2. De plus, aucun signal de photoluminescence n'est détecté dans la fenêtre [1000 nm – 1400 nm] (Figure IV-4, signal noir) puisque la suspension n'est pas stable. Dans les mêmes proportions Ag:S, la présence du 11MUA permet d'obtenir une suspension colloïdale brune à température ambiante (figure IV-4, spectre rouge) et après chauffage micro-ondes à 100°C pendant 5 min (figure IV-4, spectre mauve). Un signal de photoluminescence centré sur 1140 nm à 25°C, caractéristique de la présence des nanoparticules d'Ag₂S, est détecté pour ces deux échantillons.

IV.4. Le pH du milieu réactionnel

Le 11MUA possède une longue chaîne alkyle hydrophobe rendant difficile sa dissolution dans l'eau. Nous ajustons le pH du milieu réactionnel pour permettre, d'une part, la déprotonation de la fonction acide carboxylique du ligand ($pK_a = 4,5$) et favoriser sa dissolution en milieu aqueux grâce à la fonction acide carboxylate, et d'autre part pour favoriser la déprotonation de la fonction thiol afin de favoriser l'interaction Ag-Ligand. Plusieurs synthèses à différents pH de milieu réactionnel ont été testées dans les conditions Surf:Ag = 3 et Ag:S = 2 (tableau IV-3). Peu d'évolution en fonction du pH n'est observée vis-à-vis de la taille (tableau 16) et de la position spectrale de la bande d'émission (figure IV-5) des nanoparticules obtenues. Dans la suite des expériences, toutes les synthèses seront réalisées à pH = 8.

Tableau IV-3 : Effet du pH du milieu réactionnel sur la morphologie des nanoparticules obtenues

pH	échantillon	Axe long (nm)	Axe court (nm)
7,4	Ag2S 04 086 01	6,1	4,8
8	Ag2S 04 086 02	6,4	4,5
9	Ag2S 04 086 03	7,6	3,9
10	Ag2S 04 086 04	6,4	2,9
11	Ag2S 04 086 05	8,4	4,3

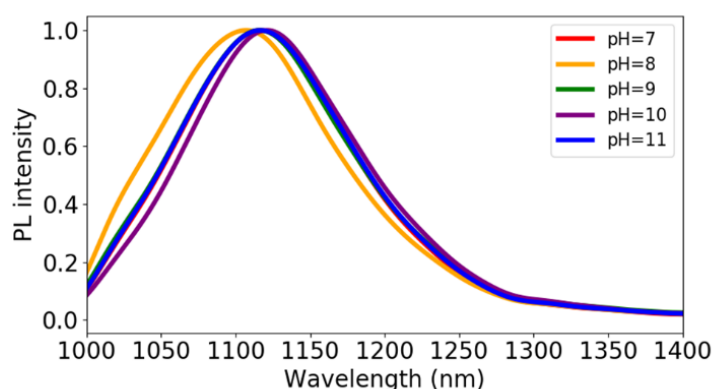


Figure IV-5 : Effet du pH du milieu réactionnel sur le spectre de photoluminescence des nanoparticules obtenues (les spectres ont été normalisés pour s'affranchir des différences de concentrations en nanoparticules).

IV.5. Description des expériences

IV.5.a. Protocole de synthèse

Les résultats préliminaires présentés ci-dessus nous ont permis de sélectionner le type de four à micro-ondes (**Monowave 300, Anton Paar**), le ligand (**11MUA**) et le pH (**pH = 8**) de synthèse.

Protocole de synthèse détaillé pour les paramètres de synthèse suivant : [Ag] = 5 mM, Ag:S = 2, Surf:Ag = 3, T = 100°C, t = 5 min

273 mg de 11MUA ont été dissous dans 38 mL d'eau, puis 42,5 mg d'AgNO₃ dissous dans 1 mL d'eau ont été ajoutés. Le pH est ajusté à 8 avec une solution aqueuse d'ammoniaque. L'étape de complexation Ag-Ligand dure 24 h. Tout au long de cette étape, le milieu réactionnel est placé sous agitation à 25°C et à l'abri de la lumière. Après 24 h, 24 mg de Na₂S.9H₂O dissous dans 11 mL d'eau ont été ajoutés à la solution. Immédiatement après, le milieu réactionnel est transféré dans une cavité micro-ondes (monomode) et chauffé à 100°C (300W) pendant 5 min, sous agitation magnétique. Le volume de production du réacteur pour le four micro-ondes monomode est de 16,7 mL. Nous réalisons trois programmes de chauffe pour traiter la totalité du volume (50 mL) du batch de synthèse. Après le chauffage micro-ondes, les nanoparticules d'Ag₂S décorées de 11MUA sont lavées à l'éthanol absolu et dispersées dans l'eau distillée.

IV.5.b. Composés étudiés

Dans ce travail, nous considérons trois valeurs du rapport **Ag:S** (1, 2 et 4). Nous nous plaçons dans les conditions stœchiométriques pour la phase Ag₂S lorsque Ag:S = 2. En ajustant la quantité de précurseur de soufre (sulfure de sodium Na₂S.9H₂O), nous introduisons soit un excès (Ag:S = 1), soit un déficit (Ag:S = 4) de soufre par rapport aux conditions stœchiométriques (tableau IV-4). La quantité de nitrate d'argent AgNO₃ reste la même pour toutes nos expériences (elle vaut 2,5.10⁻⁴ mol) et la quantité de Na₂S est ajustée pour fixer le ratio Ag:S (tableau IV-5). Pour chaque condition Ag:S, trois valeurs du paramètre **Surf:Ag** (1, 3 et 5) sont testées (tableau IV-4). La concentration en argent est fixée à 5 mM. Une concentration plus faible ne nous permettrait pas de produire une quantité de nanoparticules suffisante pour mener toutes les caractérisations. Une concentration plus élevée engendrerait une saturation du milieu réactionnel par les espèces chimiques servant de réactifs pour la synthèse. La température de chauffage micro-ondes est de 100°C³⁴ et la durée du palier est fixée à 5 min. Pour ne pas dénaturer la molécule de surfactant, nous souhaitons minimiser son exposition à la température, définie par le produit [température x temps de réaction]. Les échantillons sont référencés avec entre crochets les ratios Ag:S, Surf :Ag et temps de réaction.

³⁴ La puissance délivrée par le four à micro-ondes est de 300 W.

Tableau IV-4 : Paramètres de synthèse. Les paramètres de synthèse étudiés dans le document principal sont identifiés en jaune.

Échantillon	[Ag] (mM)	Ag:S	Surf:Ag	Température (°C)	Temps de réaction (min)
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 1 ; 5]	5	1	1	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 3 ; 5]	5	1	3	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 5 ; 5]	5	1	5	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 1 ; 5]	5	2	1	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]	5	2	3	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]	5	2	5	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]	5	4	1	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]	5	4	3	100	5
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]	5	4	5	100	5

Tableau IV-5 : Quantités molaires des réactifs mis en jeu. Le paramètre de synthèse Ag:S (molaire) est ajusté grâce à la quantité de sulfure de sodium (Na₂S) ajouté au milieu réactionnel. Le paramètre de synthèse Surf:Ag (molaire) vari grâce à la quantité de ligand acide 11-mercaptopentanoïque (11MUA) ajouté au milieu réactionnel.

Échantillon	[AgNO ₃] (mM)	[Na ₂ S] (mM)	[11MUA] (mM)	Volume total (mL)
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 1 ; 5]	5	5	5	50
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 3 ; 5]	5	5	15	50
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 5 ; 5]	5	5	25	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 1 ; 5]	5	2,5	5	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]	5	2,5	15	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]	5	2,5	25	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]	5	1,25	5	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]	5	1,25	15	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]	5	1,25	25	50

V. Caractérisations physicochimiques des matériaux

V.1. Morphologies des particules

V.1.a. Observations

Les 9 composés obtenus dans cette étude présentent des morphologies atypiques avec une certaine anisotropie de forme. Le rapport d'anisotropie augmente avec les rapports Ag:S et Surf:Ag (tableau V-1). Dans les conditions Ag:S = 4, l'axe court mesure respectivement 3,2 nm ; 3,7 nm et 3,4 nm pour les nanoparticules obtenues avec un rapport Surf:Ag de 1, 3 et 5. En considérant les mêmes valeurs du paramètre Surf:Ag, l'axe long mesure 3,4 nm ; 4,3 nm et 4,7 nm. Le rapport Surf:Ag a donc peu d'influence sur les dimensions des nanoparticules (figure V-2 et V-3). En revanche, la taille des nanoparticules peut être modulée par le rapport Ag:S introduit dans le milieu réactionnel (figures V-2 et V-3). En effet, dans les conditions Ag:S = 2, la longueur des axes courts et longs augmente. Pour les composés obtenus avec un rapport Surf:Ag de 1, 3 et 5, l'axe court mesure respectivement 4,7 nm ; 5,9 nm et 4,5 nm. L'axe long mesure respectivement 6,6 nm ; 7,5 nm et 7,4 nm. L'anisotropie moyenne est faible pour tous les échantillons.

Tableau V-1 : Résultats des caractérisations en taille (MET) pour 6 composés Ag₂S étudiés.

Échantillon Ag ₂ S-11MUA-	Ag:S	Surf:Ag	Axe long (nm)	Axe court (nm)	Facteur d'anisotropie
[2 ; 1 ; 5]	2	1	6,6	4,7	1,5
[4 ; 1 ; 5]	4	1	3,4	3,2	1,1
[2 ; 3 ; 5]	2	3	7,5	5,9	1,3
[4 ; 3 ; 5]	4	3	4,3	3,7	1,2
[2 ; 5 ; 5]	2	5	7,4	4,5	1,6
[4 ; 5 ; 5]	4	5	4,7	3,4	1,4

À partir de nos observations et de l'étude morphologique par Microscopie Electronique en Transmission (MET) (figures 12, 13 et 14) des 9 composés obtenus après synthèse assistée par micro-ondes et lavages de nanoparticules, des hypothèses sur leur mécanisme de formation peuvent être avancées. En effet, en fonction des paramètres de synthèse **Surf:Ag** et **Ag:S**, un changement de couleur du milieu réactionnel (du blanc opaque au noir) a lieu soit directement après ajout du précurseur de soufre avant chauffage, soit après chauffage du milieu réactionnel (tableau V-2). Le changement de couleur du milieu réactionnel est caractéristique de la formation des nanoparticules d'Ag₂S. En fonction des paramètres (nous étudions ici seulement l'effet de Surf:Ag et Ag:S), la nucléation des nanoparticules d'Ag₂S est donc initiée à des instants différents du processus de synthèse.

Tableau V-2 : Bilan des événements (ajout du précurseur de soufre Na₂S ou apport d'énergie par chauffage microonde, MW) déclenchant le changement de coloration du milieu réactionnel du blanc opaque vers le noir (caractéristique de la formation des nanoparticules d'Ag₂S).

	Ag:S = 1	Ag:S = 2	Ag:S = 4
Surf : Ag = 5	ajout de Na ₂ S	MW	MW
Surf : Ag = 3	ajout de Na ₂ S	MW	MW
Surf : Ag = 1	ajout de Na ₂ S	ajout de Na ₂ S	ajout de Na ₂ S

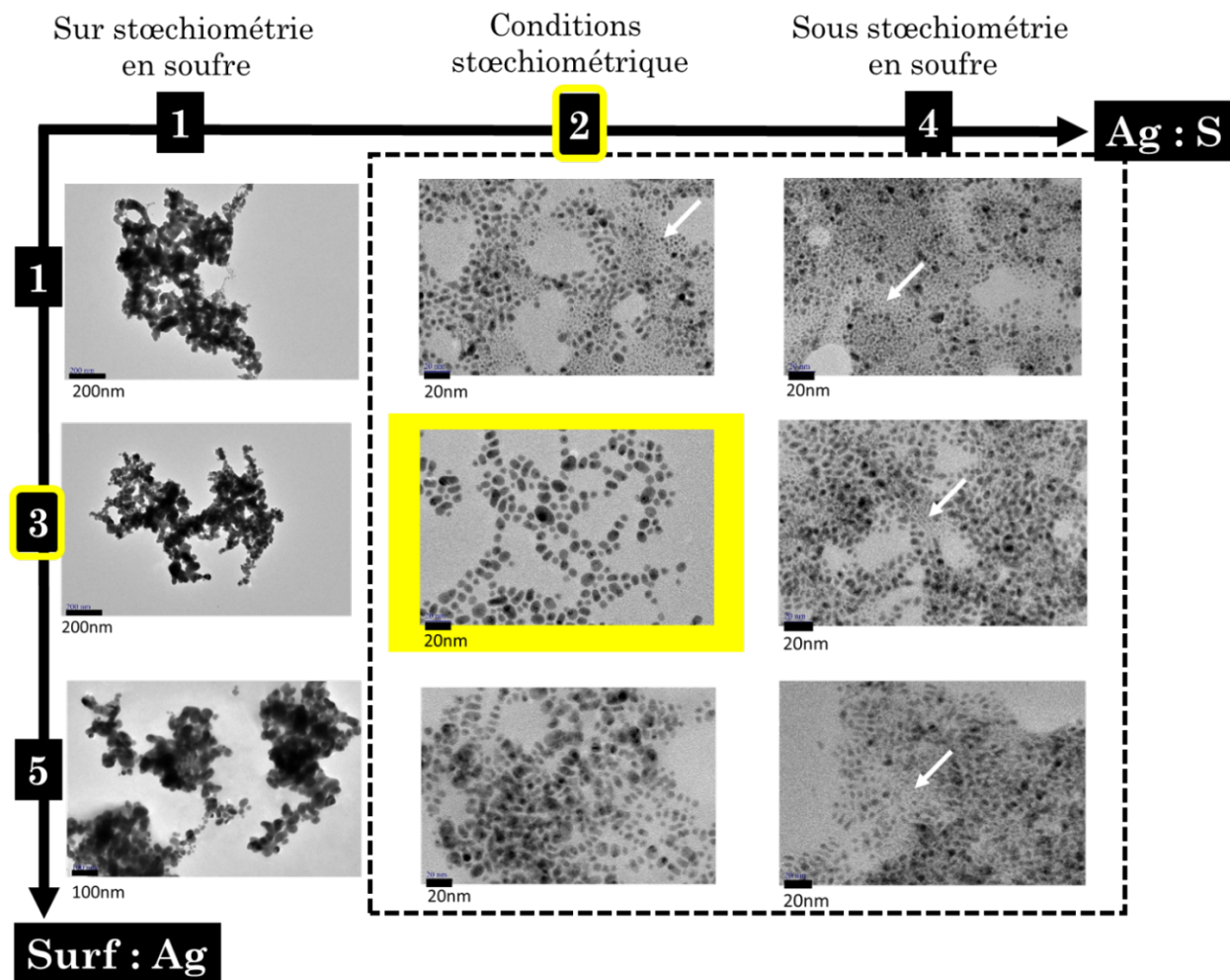


Figure V-1 : Clichés de Microscopie Electronique en Transmission des 9 composés obtenus dans cette étude. Ils présentent des morphologies atypiques avec une certaine anisotropie de forme. Des îlots de petites particules ($< 1 \text{ nm}$) sont indiqués par des flèches blanches. Ces populations n'apparaissent pas dans les distributions en taille présentée figures 12 et 13, car leur taille est plus petite que la précision de la méthode statistique utilisée pour établir les diagrammes.

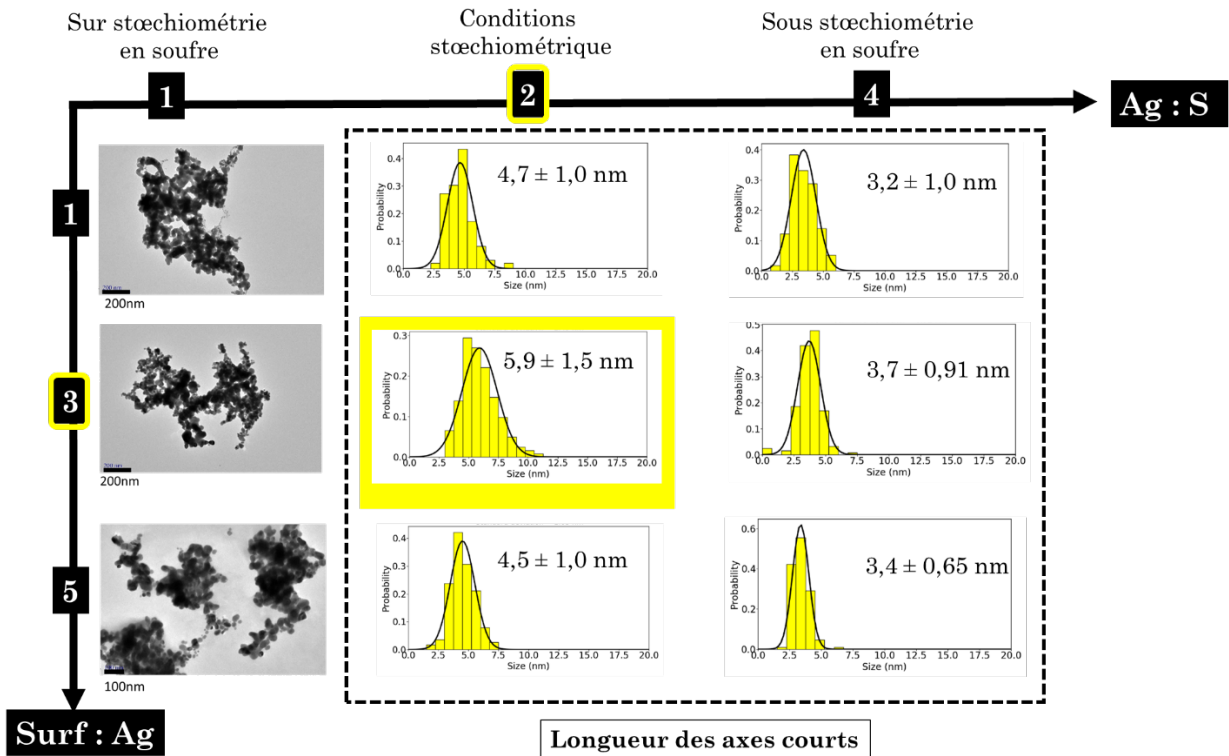


Figure V-2 : Distributions des longueurs des axes courts pour les composés synthétisés dans cette étude.

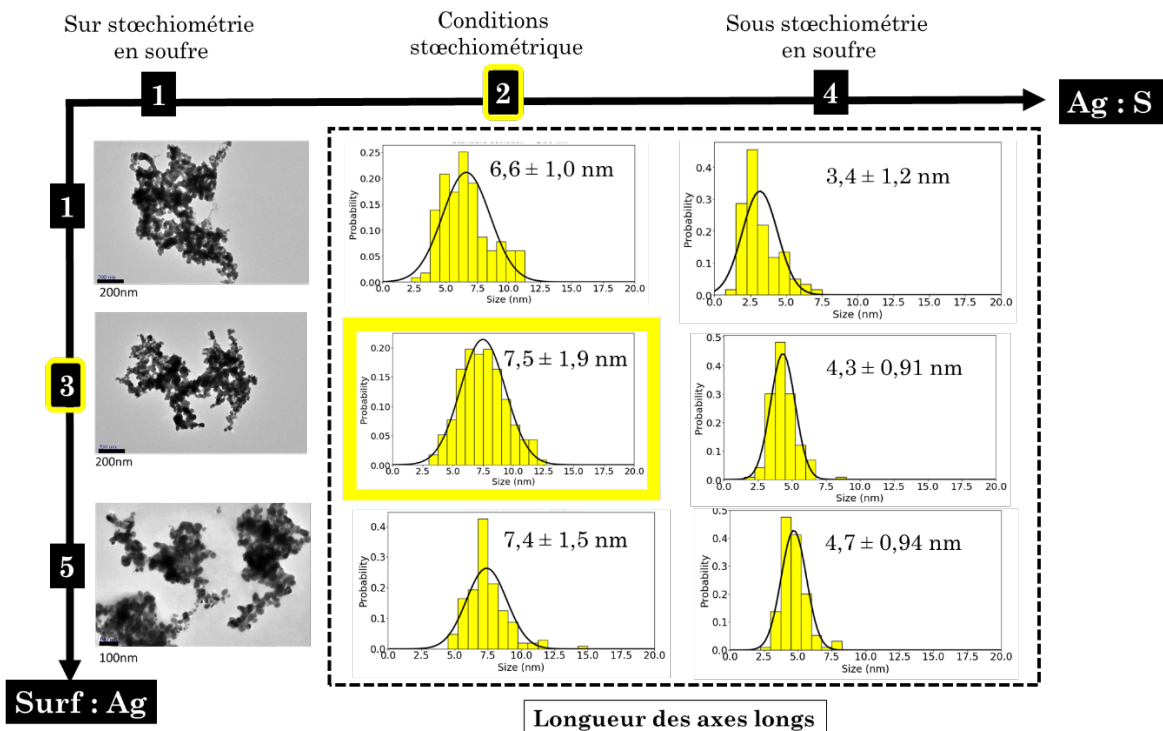


Figure V-3 : Distributions des longueurs des axes longs pour les composés synthétisés dans cette étude.

V.1.b. Cas du déclenchement de la nucléation des nanoparticules au moment de l'ajout du précurseur de soufre

Les composés Ag:S = 1

Les composés issus des synthèses réalisées avec un rapport **Ag:S = 1** (sur stœchiométrie en soufre) sont notés respectivement : Ag₂S-11MUA-[1 ; 1 ; 5], Ag₂S-11MUA-[1 ; 3 ; 5] et Ag₂S-11MUA-[1 ; 5 ; 5]. Ces trois composés présentent des caractéristiques particulières sur le plan morphologique (figure V-1). D'après les clichés de Microscopie Electronique en Transmission (MET), les trois synthèses conduisent à la formation de nanoparticules de tailles importantes et agrégées. Le ratio Ag:S est un paramètre contrôlé grâce à la quantité de Na₂S introduit dans le milieu réactionnel. Lorsque le rapport Ag:S est fixé à 1, la quantité de sulfure de sodium introduit dans le milieu réactionnel est plus élevée que pour les conditions Ag:S = 2 et Ag:S = 4. Par conséquent, pour la condition Ag:S = 1 ([Na⁺]=10mM), la quantité d'ions sodium dans le milieu réactionnel est supérieure à celle dans les conditions Ag:S = 2 ([Na⁺] = 5mM), et Ag:S = 4 ([Na⁺] = 2,5mM). Lorsque la force ionique devient trop importante (cas d'Ag:S=1), la précipitation des nanoparticules est très rapide, sans contrôle des étapes de nucléation et de croissance. Nous obtenons un solide sans morphologie particulière et peu structurée. Les charges de la fonction carboxylate du 11MUA, mises en jeu dans la stabilité colloïdale, sont écrantées par les cations Na⁺. Cela conduit à une agrégation des nanoparticules.

Les composés Surf:Ag = 1

La répartition en taille des composés **Ag:S = 1** rappelle celles des espèces formées dans les conditions **Surf:Ag = 1** (Ag₂S-11MUA-[2 ; 1 ; 5] et Ag₂S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]) (figures figure V-2 et V-3). Pour ces composés, grâce aux clichés MET, nous observons également la présence de deux populations en tailles. La première population correspond à des nanoparticules de taille inférieure à 1 nm et la seconde à des nanoparticules mesurant environ 4 nm de diamètre. Dans les conditions **Surf:Ag = 1** et **Ag:S > 1**, la diminution de la force ionique et de la quantité de soufre dans le milieu réactionnel conduit à ralentir la formation du solide, mais la quantité de surfactant présent au sein du milieu réactionnel n'est pas suffisante pour protéger l'argent sous forme complexe moléculaire Ag-Ligand lors de l'ajout du soufre dans le milieu réactionnel.

V.1.c. Cas du déclenchement de la nucléation des nanoparticules par irradiation micro-ondes

Les composés Ag:S = 4

En effet, la taille des composés formés dans les conditions **Ag:S = 4** (Ag₂S-11MUA-[4 ; 1 ; 5], Ag₂S-11MUA-[4 ; 3 ; 5] et Ag₂S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]) varie très peu avec l'augmentation de la quantité de ligands introduits dans le milieu réactionnel. De plus, nous observons que les nanoparticules obtenues avec Ag:S = 4 (sous stœchiométrie en soufre) sont plus petites que celles obtenues dans les conditions Ag:S = 2 (conditions stœchiométriques) (figures V-1, V-2 et V-3). Les trois composés Ag:S = 4 correspondent à des populations de nanoparticules polydisperses (figures V-1, V-2 et V-3). Pour chaque composé, nous observons deux populations de tailles différentes : (i) une population de très petite taille (< 1 nm) (ii) l'autre population de nanoparticules mesurant environ 3 nm de diamètre. Dans les conditions Ag:S = 4, la quantité de sulfure de sodium ajouté au milieu réactionnel est plus faible que pour les conditions Ag:S = 2. La polydispersité et la faible évolution en taille des nanoparticules Ag:S = 4 lorsqu'on augmente la quantité de ligands peut être expliquée par une diminution de la vitesse de formation des nanoparticules, liée à une force ionique faible dans le milieu de réaction.

Les composés Ag:S=2

Les composés formés dans les conditions **Ag:S = 2** et **Surf:Ag > 1** (Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5], Ag₂S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]) présentent des morphologies atypiques avec une certaine anisotropie de forme (figures V-1, V-2 et V-3). D'après les clichés de microscopie (MET), lors du passage d'Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] à Ag₂S-11MUA-[2 ; 5 ; 5], la longueur de l'axe court des nanoparticules diminue de 5,9 nm à 4,5 nm (figures V-2) alors que la longueur de l'axe long reste constante (figures V-3). Le facteur d'anisotropie est donc plus élevé avec **Surf:Ag = 5** (1,6) que avec **Surf:Ag = 3** (1,3) (tableau V-1). Dans les conditions **Ag:S = 2** et **Surf:Ag > 1**, l'augmentation de la quantité de surfactant dans le milieu réactionnel induit donc une contrainte plus importante selon un des axes de la nanoparticule pendant la phase de croissance.

Pour comprendre l'origine des morphologies atypiques des nanoparticules d'Ag₂S obtenues, nous nous sommes placés dans les conditions (Ag:S = 2 et Surf:Ag = 5) maximisant le facteur **d'anisotropie (1,6)** pour les nanoparticules obtenues à 100°C. Nous avons étudié l'effet de la température du palier de chauffage micro-ondes (pour un temps de palier de 5 min) sur l'anisotropie des nanoparticules synthétisées (figure V-4). Nous remarquons que le facteur d'anisotropie diminue avec l'élévation de la température de chauffe. Il vaut respectivement 2,1 ; 1,6 et 1,1 pour des températures de palier de 65°C, 100°C et 180°C. Une étude parue dans la littérature en 2012 s'est intéressée à la stabilité thermique de l'acide 2-mercaptopropionique dans le cadre de la synthèse d'Ag₂S [59]. Elle met en évidence le risque de décomposition du ligand à partir d'un certain degré d'exposition à la température. Les auteurs décrivent l'apparition d'une couleur jaune après 4h de chauffage conventionnel à 50°C d'une solution aqueuse d'acide 2-mercaptopropionique. La couleur jaune marquerait la décomposition de la molécule de surfactant et un relargage d'atome de soufre dans le milieu réactionnel. Dans le cadre de notre étude, chauffer le milieu réactionnel à 180°C, pendant 5 min par irradiations micro-ondes, pourrait être à l'origine d'une dénaturation du ligand de synthèse (11MUA), réduisant les interactions entre le ligand et la surface des nanoparticules, les rendant plus sphériques. Pour appuyer cette hypothèse, nous remarquons que la stabilité colloïdale des nanoparticules synthétisées à 180°C (24h après la synthèse, les nanoparticules ne sont plus stables) est moins satisfaisante que celle des nanoparticules obtenues à 100°C (les nanoparticules sont stables en suspension aqueuse même 2 ans après la synthèse).

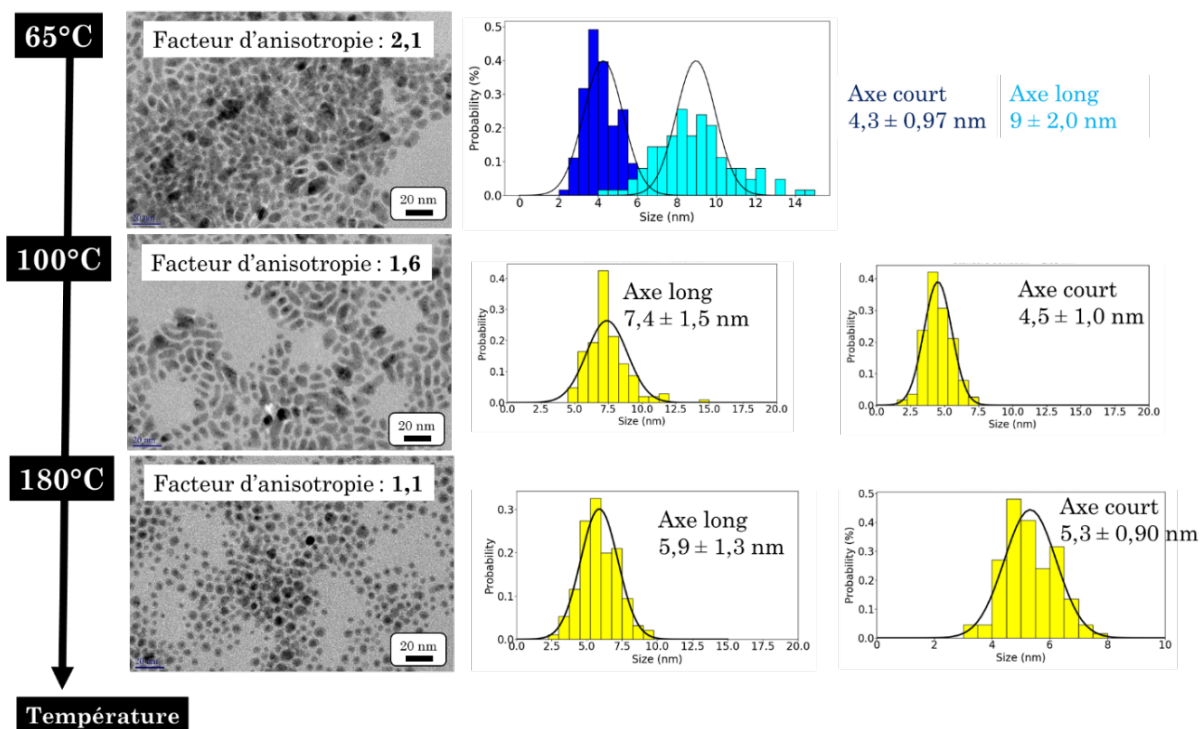


Figure V-4 : Cette étude est réalisée en considérant les paramètres de synthèse suivants : : [Ag] = 5 mM, Ag:S = 2, Surf:Ag = 5, t = 5 min. Nous étudions la morphologie des nanoparticules (par analyses MET) obtenues en fonction de la température de chauffage micro-ondes (65°C, 100°C, et 180°C). Le facteur d'anisotropie des nanoparticules diminue avec la température du palier de chauffage micro-ondes.

V.1.d. Pour conclure

La quantité d'éléments Ag^+ dans le milieu réactionnel est la même dans toutes les expériences. Le rapport Ag:S est contrôlé grâce à la quantité de Na_2S introduits dans le milieu réactionnel. Le rapport Ag:S diminue par augmentation de la quantité de Na_2S . Ainsi, la force ionique augmente par augmentation de la quantité de cations (Na^+) présents dans le milieu, mais n'intervient pas dans la réaction de formation des nanocristaux semi-conducteurs d' Ag_2S . Dans le cadre de notre étude, si la force ionique est élevée (Ag:S = 1) ou si l'argent est disponible, car relativement peu encombré par le surfactant (Surf:Ag = 1), la nucléation des nanoparticules d' Ag_2S est déclenchée par l'ajout du soufre dans le milieu réactionnel. En effet, nous observons une coloration noire du milieu réactionnel, caractéristique de la précipitation des nanoparticules d' Ag_2S , qui apparaît directement après l'ajout de Na_2S dans le milieu réactionnel (tableau V-3). Dans le cadre de la synthèse en voie aqueuse d'un autre nanocristal semi-conducteur, CdTe, l'augmentation de la force ionique (par ajout de NaCl) du système réactionnel engendre l'augmentation de la cinétique de croissance des nanoparticules [78]. D'après les auteurs, l'augmentation de la force ionique engendre la réduction des interactions électrostatiques entre les espèces présentes dans le milieu et facilite la diffusion des complexes Cd-Ligand [78].

Plus le rapport Surf:Ag est élevé, moins l'argent est disponible pour réagir avec le soufre ajouté lors de la deuxième étape de la synthèse. En effet, pour les conditions Surf:Ag > 1 et Ag:S > 1, le milieu réactionnel reste blanc opaque après ajout du précurseur de soufre au sein du milieu réactionnel (tableau V-3). Pour ces composés, la couleur noire caractéristique de la précipitation des sulfures d'argent est observée à la sortie du four à micro-ondes. Pour ces composés, la nucléation est donc déclenchée par l'irradiation micro-ondes. La montée rapide en température, possible grâce au four à micro-ondes monomode utilisé dans cette étude (Monowave 300, Anton Paar), génère, en un temps court, la nucléation d'un grand nombre de germes et donc l'obtention de petites nanoparticules (< 10 nm). Néanmoins, tous les composés formés, sauf ceux obtenus dans les conditions Ag:S = 2 et Surf:Ag > 1 (Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5], Ag_2S -11MUA-[2 ; 5 ; 5]), présentent deux populations en

taille. Des îlots de petites particules (< 1 nm) sont indiqués par des flèches blanches figure 12. Cela montre que nous ne sommes pas encore à l'équilibre thermodynamique. Il faudrait probablement chauffer plus longtemps pour aller vers un état plus stable avec une seule population de nanoparticules. Les composés formés dans les conditions **Ag:S = 2** et **Surf:Ag > 1** ($\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]}$, $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]}$) présentent une seule population en taille, mais des morphologies atypiques avec une certaine anisotropie de forme résultant des interactions entre le ligand 11MUA et la surface des nanoparticules (figures 13 et 14).

V.2. Composition chimique

Le rapport Ag:S mesuré par analyse MEB-EDX varie entre 1,1 pour le composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]}$ et 1,7 pour le composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]}$. Les composés Ag_2S obtenus dans notre étude ne sont donc pas stœchiométriques et le rapport atomique Ag:S des 9 composés synthétisés est donc inférieur à 2 (Figure V-5). Des rapports atomiques Ag:S inférieurs à 2 sont reportés dans plusieurs études [50] [70] [71] [72]. La non-stœchiométrie des nanoparticules obtenues peut s'expliquer par deux facteurs. Tout d'abord, la surface des nanoparticules présente une forte teneur en soufre en raison de la présence du ligand thiolé de synthèse. Une analyse FTIR menée sur le composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]}$ démontre bien la présence du 11MUA en surface des nanoparticules (figure V-6). Par ailleurs, il a été montré dans la littérature, que des lacunes d'argent peuvent exister au sein de la structure du sulfure d'argent [50].

Une tendance générale est observée pour les 9 composés étudiés dans cette étude : le rapport Ag:S mesuré augmente avec la taille des nanoparticules (figure V-5). Dans notre étude, le plus faible rapport Ag:S a été mesuré pour le composé le plus petit ($\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]}$). La longueur de son axe court vaut 3,2 nm et son axe long mesure 3,4 nm (tableau 15). Le rapport Ag:S maximum (1,7) a été mesuré pour le composé le plus grand ($\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]}$). Pour ce matériau, l'axe court mesure 5,9 nm et l'axe long 7,5 nm (tableau V-3). D'après la **figure V-5**, la quantité d'argent dosé par analyse MEB-EDX augmente avec la longueur de l'axe court des nanoparticules alors que la quantité de soufre reste constante. La quantité de soufre dosé provient du volume des nanoparticules (S de cœur) et de la surface (S provenant du surfactant thiolé 11MUA) alors que la quantité d'argent dosé provient, quant à elle, seulement du volume des nanoparticules (Ag de cœur). La quantité d'atomes d'argent et de soufre contenue dans le volume des nanoparticules augmente en r^3 . Alors que la quantité de soufre de surface augmente en r^2 . La quantité totale d'atomes de soufre contenue dans une nanoparticule d' Ag_2S dépend donc moins de la taille des nanoparticules que la quantité totale d'atomes d'argent.

Tableau V-3 : Résultats des caractérisations en taille (MET) et en composition (MEB-EDX) pour 6 composés Ag_2S . La colonne « Ag:S mesuré » correspond aux résultats obtenus avec l'analyse MEB-EDX.

Échantillon $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-}$	Surf:Ag	Ag:S	Axe long (nm)	Axe court (nm)	Ag:S mesuré par EDX
[2 ; 1 ; 5]	1	2	6,6	4,7	1,3
[4 ; 1 ; 5]	1	4	3,4	3,2	1,1
[2 ; 3 ; 5]	3	2	7,5	5,9	1,7
[4 ; 3 ; 5]	3	4	4,3	3,7	1,2
[2 ; 5 ; 5]	5	2	7,4	4,5	1,6
[4 ; 5 ; 5]	5	4	4,7	3,4	1,2

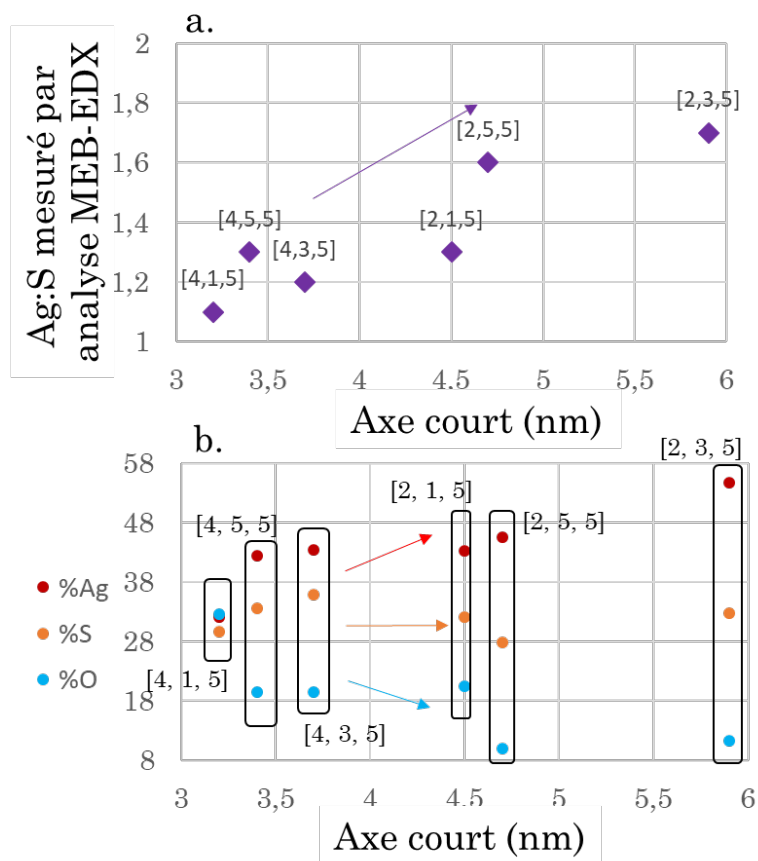


Figure V-5 : (a) Évolution du rapport Ag:S mesuré par analyse MEB-EDX (b) Dosage MEB-EDX des éléments argent, soufre et oxygène des composés Ag₂S-11MUA étudiés. La quantité d'argent dosé augmente avec la taille, la quantité de soufre reste constante et la quantité d'oxygène diminue.

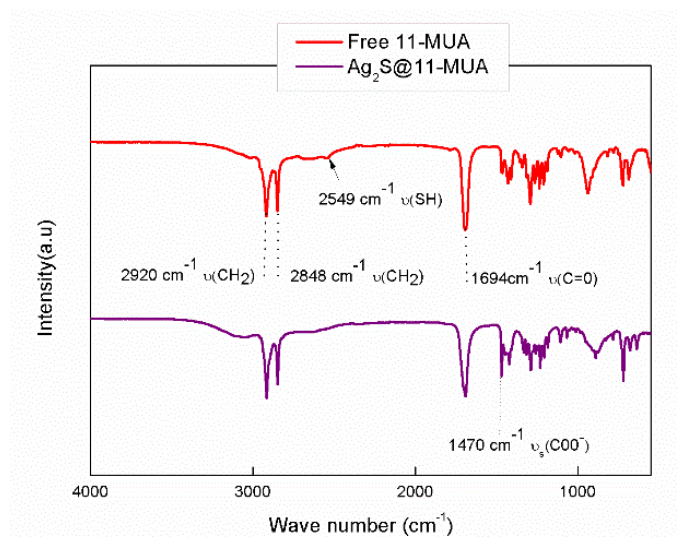


Figure V-6 : Spectre FTIR (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) du composé Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] (défini ci-dessous, section I.2.c) comparé à celui du ligand 11MUA.

V.3. Propriétés optiques

V.3.a. Observations

Ag :S=1

Parmi les 9 composés Ag_2S que nous étudions, trois n'émettent pas de photons dans la fenêtre de longueur d'onde que nous ciblons (1000nm-1400nm), lorsqu'ils sont excités avec une LED ($0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$) à 730 nm. Il s'agit des composés $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[1 ; 1 ; 5]}$, $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[1 ; 3 ; 5]}$ et $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[1 ; 5 ; 5]}$ (figure V-7 a). Ces trois composés correspondent à ceux obtenus dans les conditions $\text{Ag:S}=1$. D'après la **figure V-1**, les nanoparticules sont agrégées. Ces nanoparticules présentent donc un état de surface très mal contrôlé. La présence de nombreux défauts de surface pourrait expliquer l'absence d'émission de photoluminescence dans la fenêtre [1000 nm – 1400 nm]. Pour les 6 autres composés étudiés, la position spectrale du signal de photoluminescence émis par les nanoparticules (à 37°C) dépend de leur taille (figures V-7 et V-8).

Position spectrale et axe long

La **figure V-8.b** représentant la variation de la position spectrale en fonction de l'**axe long** met en évidence l'existence de groupe d'échantillons. Les particules obtenues dans les conditions $\text{Ag:S} = 4$ ont des dimensions (axes court et long) plus petites que celles synthétisées dans les conditions $\text{Ag:S} = 2$ (tableau 22). Par ailleurs, les particules obtenues dans les conditions $\text{Ag:S} = 4$ émettent à des longueurs d'onde plus basses (entre 1069 nm et 1108 nm à 37°C) (figure V-7 c, en vert) que celle obtenues dans les conditions $\text{Ag:S} = 2$ (entre 1120 nm et 1149 nm à 37°C) (figure V-7 b, en bleu).

Position spectrale et axe court

La **figure V-8.a** représente la variation de la position spectrale en fonction de l'**axe court**. Pour les échantillons $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]}$ (3,4 nm), $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]}$ (3,7 nm), $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 1 ; 5]}$ (4,7 nm) et $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]}$ (4,5 nm), cette figure illustre une nette augmentation de la position spectrale du signal de photoluminescence émis par les nanoparticules (à 37°C) avec la longueur de l'axe court. Cette évolution serait en faveur d'un comportement classique observé pour des Quantum Dots dans le domaine excitonique. Deux points s'écartent de cette tendance globale. Premièrement, la position spectrale du signal émis par le composé possédant le plus petit axe court ($\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]}$) n'émet pas aux plus faibles longueurs d'onde (figure V-7 a, en mauve). Une nouvelle synthèse dans les conditions $\text{Ag:S}=4$ et $\text{Surf:Ag}=1$ doit être effectuée pour confirmer ce résultat. Deuxièmement, la dépendance entre la position spectrale et la longueur de l'axe court semble être moins importante à partir de 4,8 nm (figure V-8 a). Une augmentation de 1,4 nm de la longueur de l'axe court du composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]}$ (5,9 nm) par rapport à celle du composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]}$ (4,5 nm) engendre un déplacement de 12 nm (vers les hautes longueurs d'onde) de la position spectrale. Un déplacement de la position spectrale du même ordre de grandeur (11 nm vers les hautes longueurs d'onde) est observé pour une augmentation cinq fois moins importante (0,3 nm) de la longueur de l'axe court du composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]}$ (3,4 nm) par rapport à celle du composé $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]}$ (3,7 nm). Ces observations mettent en évidence un effet de confinement quantique pour les composés présentant un axe court plus petit que 4,8 nm. Le rayon de Bohr excitonique pour les Ag_2S peut être calculé pour des sphères. À température ambiante (300 K), il vaut 2,2 nm [75]. Pour des nanosphères de sulfure d'argent, le confinement quantique est donc théoriquement observé pour des nanoparticules de diamètre inférieur à 4,4 nm. Dans notre étude, les composés obtenus ne sont pas des sphères. Ils sont anisotropes (figure 12). Les longueurs des axes courts et longs ne sont pas égales. Cette morphologie atypique pourrait expliquer que le seuil de dépendance entre la position spectrale et la taille de l'axe court mis en évidence expérimentalement

(4,8 nm) soit légèrement plus important que le double (4,4 nm) du rayon de Bohr théorique associé aux QDots d'Ag₂S (2,2 nm) [75].

Tableau V-4 : Dimensions et position spectrale du signal de photoluminescence émis à 37°C pour 6 composés Ag₂S. Le facteur d'anisotropie est défini par le rapport des longueurs des axes courts et longs.

Échantillon Ag ₂ S-11MUA-	Axe long (nm)	Axe court (nm)	Facteur d'anisotropie	Position spectrale à 37°C (nm)
[2 ; 1 ; 5]	6,6	4,7	1,5	1120
[4 ; 1 ; 5]	3,4	3,2	1,1	1108
[2 ; 3 ; 5]	7,5	5,9	1,3	1149
[4 ; 3 ; 5]	4,3	3,7	1,2	1080
[2 ; 5 ; 5]	7,4	4,5	1,6	1137
[4 ; 5 ; 5]	4,7	3,4	1,4	1069

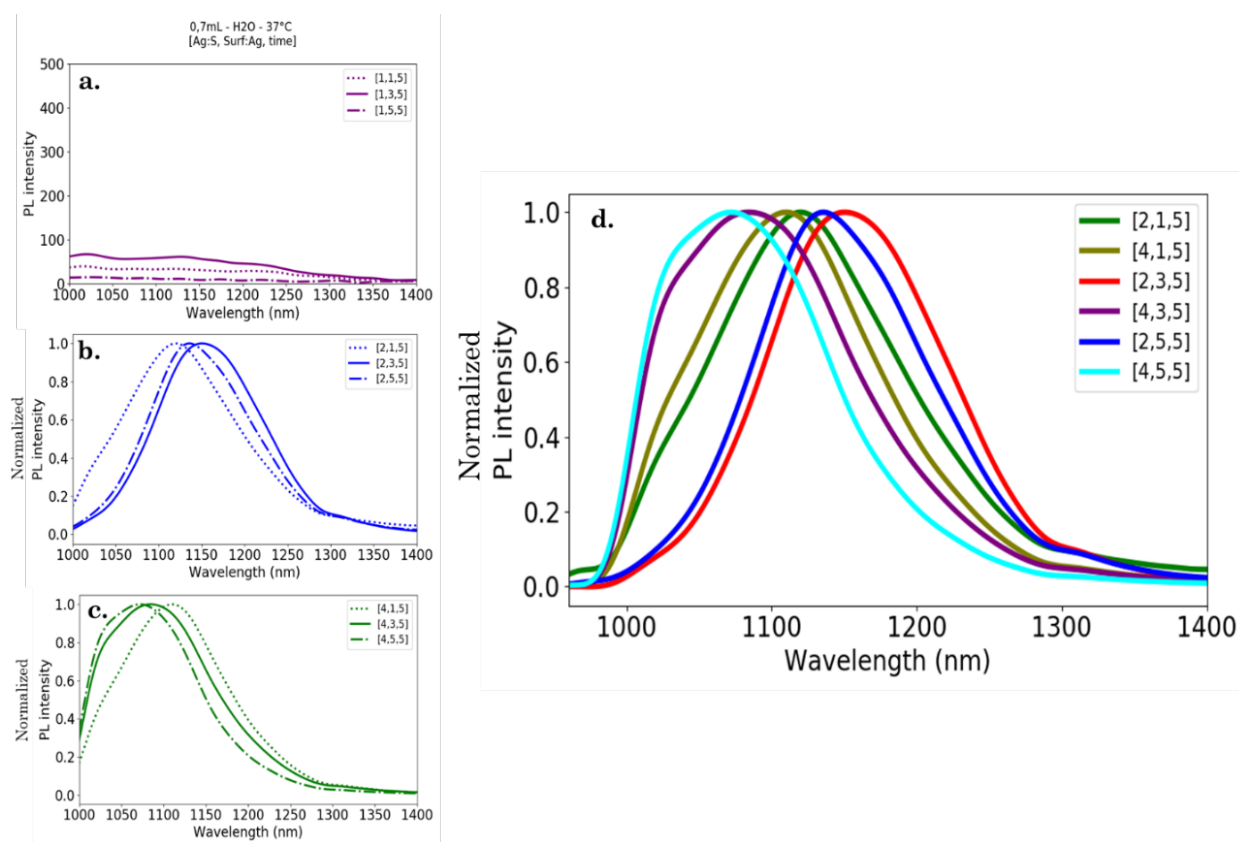


Figure V-7 : Spectres d'émission de photoluminescence normalisés des 9 composés étudiés. Émission dans la fenêtre [1000nm-1400nm] après excitation à 730nm de la série Ag:S = 1 (a), Ag:S = 2 (b), et Ag:S = 4 (c). Comparaison des séries Ag:S = 2 et 4 (d).

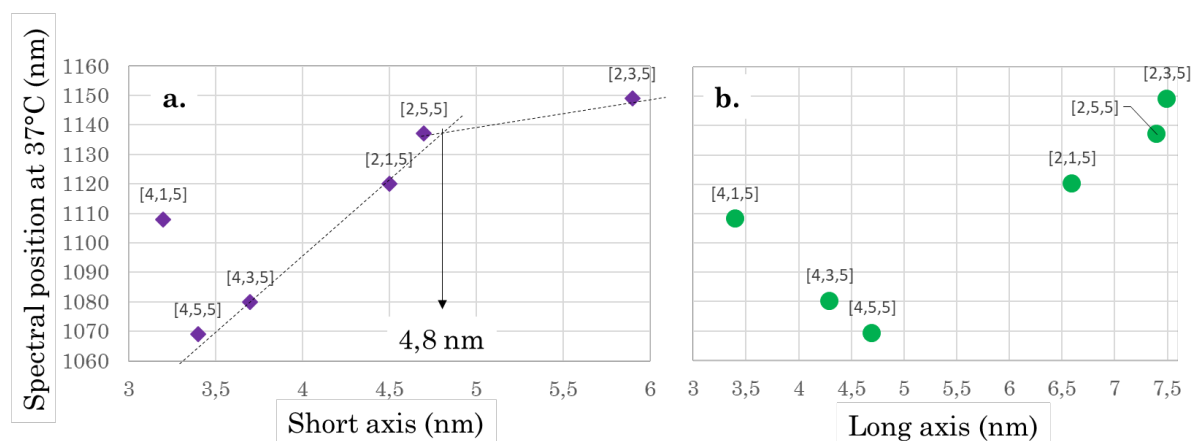


Figure V-8 : Évolution de la position spectrale des nanoparticules synthétisées en fonction de la longueur des axes courts (a) et longs (b).

V.3.b. Bilan des résultats

La modulation de la taille des nanocristaux d'Ag₂S synthétisés en milieu aqueux est difficile à réaliser lorsque le sulfure de sodium est utilisé comme précurseur de soufre et le nitrate d'argent comme précurseur d'argent [72]. En effet, ces espèces sont très réactives dans l'eau et conduisent à un relargage rapide du cation Ag⁺ et de l'anion S²⁻ dans le milieu réactionnel [72] [60]. Les phases de nucléation et de croissance des nanoparticules sont donc difficiles à contrôler. Dans notre étude nous avons choisi de travailler avec un ligand possédant une longue chaîne alkyle, le 11MUA, et de réaliser des synthèses assistées par irradiations micro-ondes en considérant différentes conditions Surf:Ag et Ag:S. Nous avons obtenu 9 composés Ag₂S de différentes tailles, présentant des morphologies atypiques avec un facteur d'anisotropie dépendant des paramètres de synthèses Surf:Ag et Ag:S.

Lorsque la quantité de ligands introduits dans le milieu réactionnel est suffisamment importante (Surf:Ag > 1) pour protéger le cation Ag⁺ par la formation de complexes moléculaires Ag-11MUA, la nucléation instantanée d'Ag₂S pouvant être déclenchée à température ambiante, au moment de l'ajout du précurseur de soufre dans le milieu réactionnel, est évitée. Elle intervient pendant l'étape de chauffage. Lorsque la nucléation est déclenchée par les irradiations micro-ondes, les germes sont formés sur une durée très courte. Les particules croissent en même temps ce qui réduit la polydispersité de la population de nanoparticules obtenues. Dans les conditions Ag:S = 4 (sous stoechiométrie en soufre), la réduction de la force ionique par rapport aux conditions Ag:S = 2 (conditions stoechiométriques), provoque une nucléation plus lente et en simultané par rapport à la phase de croissance. Ces conditions aboutissent à des nanoparticules plus petites et plus polydisperses que les échantillons obtenus avec le paramètre Ag:S=2.

La modulation des dimensions des nanoparticules (et notamment celle de l'axe court) nous a permis de mettre en évidence deux résultats. Tout d'abord, la composition des nanoparticules d'Ag₂S dépend de leur taille. Le rapport Ag:S mesuré par analyse MEB-EDX augmente avec la longueur de l'axe court. Ensuite, nous avons observé un effet de confinement quantique pour une longueur d'axe court inférieure à 4,8 nm.

VI. Évaluation de la performance des nanothermomètres candidats Ag₂S-11MUA

VI.1. Description de l'étude

Ce travail est le premier, à notre connaissance, où l'influence des paramètres de synthèse (**Ag:S** et **Surf:Ag**) sur les critères de performance de composés Ag₂S est étudiée de manière détaillée, en vue de leur utilisation pour la nanothermométrie. Les critères de performance que nous considérons sont le rendement quantique et la sensibilité relative (S_r en $\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$) à la température (ces grandeurs ont été définies dans le premier chapitre du manuscrit). Dans le premier chapitre de ce manuscrit de thèse, nous avons établi que nous souhaitions développer un nanothermomètre ayant un rendement quantique de l'ordre de **10 %**. Malheureusement, aucun des 9 nanothermomètres candidats ne valide ce critère du cahier des charges (tableau VI-I). Nous recentrons donc l'évaluation des 9 nanothermomètres candidats sur leur sensibilité à la température. Notre critère de sélection est $S_r > 1\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$. Dans notre étude, trois des composés n'émettent pas de photons dans la fenêtre de longueur d'onde que nous ciblons [1000 nm - 1400 nm] lorsqu'ils sont excités à 730 nm. Il s'agit des composé Ag₂S-11MUA-[1 ; 1 ; 5], Ag₂S-11MUA-[1 ; 3 ; 5] et Ag₂S-11MUA-[1 ; 5 ; 5] (figure V-7). Ils ne sont donc pas sélectionnés pour une application en nanothermométrie.

Tableau VI-1 : Résultats des caractérisations MET et le rendement quantique de 6 nanothermomètres candidats.

Échantillon Ag ₂ S-11MUA-	Axe long (nm)	Axe court (nm)	Facteur d'anisotropie	Rendement quantique (%)
[2 ; 1 ; 5]	6,6	4,7	1,5	0,03
[4 ; 1 ; 5]	3,4	3,2	1,1	0,01
[2 ; 3 ; 5]	7,5	5,9	1,3	0,07
[4 ; 3 ; 5]	4,3	3,7	1,2	0,04
[2 ; 5 ; 5]	7,4	4,5	1,6	0,06
[4 ; 5 ; 5]	4,7	3,4	1,4	0,03

VI.2. Choix du paramètre de photoluminescence pour la nanothermométrie avec Ag₂S-11MUA

VI.2.a. Les paramètres de photoluminescence des nanothermomètres candidats

Notre objectif est de sélectionner un **nanothermomètre candidat** et un **paramètre de photoluminescence (p)** de sorte à obtenir $S_r > 1\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ avec $S_r = \frac{1}{p} \left| \frac{\partial p}{\partial T} \right|$. Pour déterminer la sensibilité relative d'un composé photoluminescent à la température, nous devons sélectionner un paramètre de photoluminescence. Dans le cadre de notre étude, un paramètre de photoluminescence et une grandeur extraite du signal d'émission de photoluminescence des nanothermomètres candidats Ag₂S-11MUA. Lorsque la température de cœur des composés augmente en suivant le cycle décrit **figure VI-1.a**, nous observons une extinction de photoluminescence et un déplacement du spectre d'émission de photoluminescence vers les hautes longueurs d'onde (figure VI-1). La dépendance thermique des paramètres de photoluminescence permet d'établir un modèle d'étalonnage p(T) permettant de remonter à la température de cœur du nanothermomètre à partir de son spectre d'émission de PL. Le protocole d'étalonnage d'un nanothermomètre est donné **annexe A.III.3**.

L'intensité totale de photoluminescence (p_0 , figure VI-2.b), telle que $p_0(T) = \int_{1000\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda$, est un paramètre de photoluminescence dépendant de la quantité d'émetteurs présents dans l'échantillon et des réglages du montage optique donc peu fiable. La position spectrale est peu sensible à la température (figure 21.a). Pour le composé Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5], ce paramètre de photoluminescence ne permet pas de satisfaire notre critère sur la sensibilité thermique relative. Nous obtenons une valeur de $S_r < 1\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$. En effet, lorsque la température de cœur du composé Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] augmente de 22°C à 60°C, nous observons un décalage de 60 nm vers les hautes longueurs d'onde de la bande d'émission de photoluminescence (figure VI-2.a). Le déplacement de la position spectrale n'est pas simple à mesurer précisément à cause du bruit thermique (voir annexe B.I) et des interactions entre les photons émis par la sonde de photoluminescence et le milieu (chapitre 4).

Dans ce travail de thèse, le paramètre de photoluminescence avec lequel nous avons choisi de travailler est le rapport d'intensité. C'est un paramètre intéressant, car nous pouvons suivre l'évolution du signal de photoluminescence avec la température sans dépendre de la concentration de l'émetteur. De plus, pour la mesure d'un rapport d'intensité, le signal est intégré sur deux plages de longueurs d'onde. Nous perdons donc moins d'informations que lorsque nous mesurons la position spectrale, pour laquelle une seule valeur de longueur d'onde est extraite du signal de photoluminescence. Pour définir le rapport d'intensité, nous devons sélectionner les bornes en longueurs d'onde de deux intégrales. Pour faire ce choix, nous étudions ici la dépendance à la température de trois rapports d'intensité p_1 , p_2 et p_3 . Ils sont illustrés **figures VI-2 c, d et e**, respectivement, et définis dans le **tableau 24**.

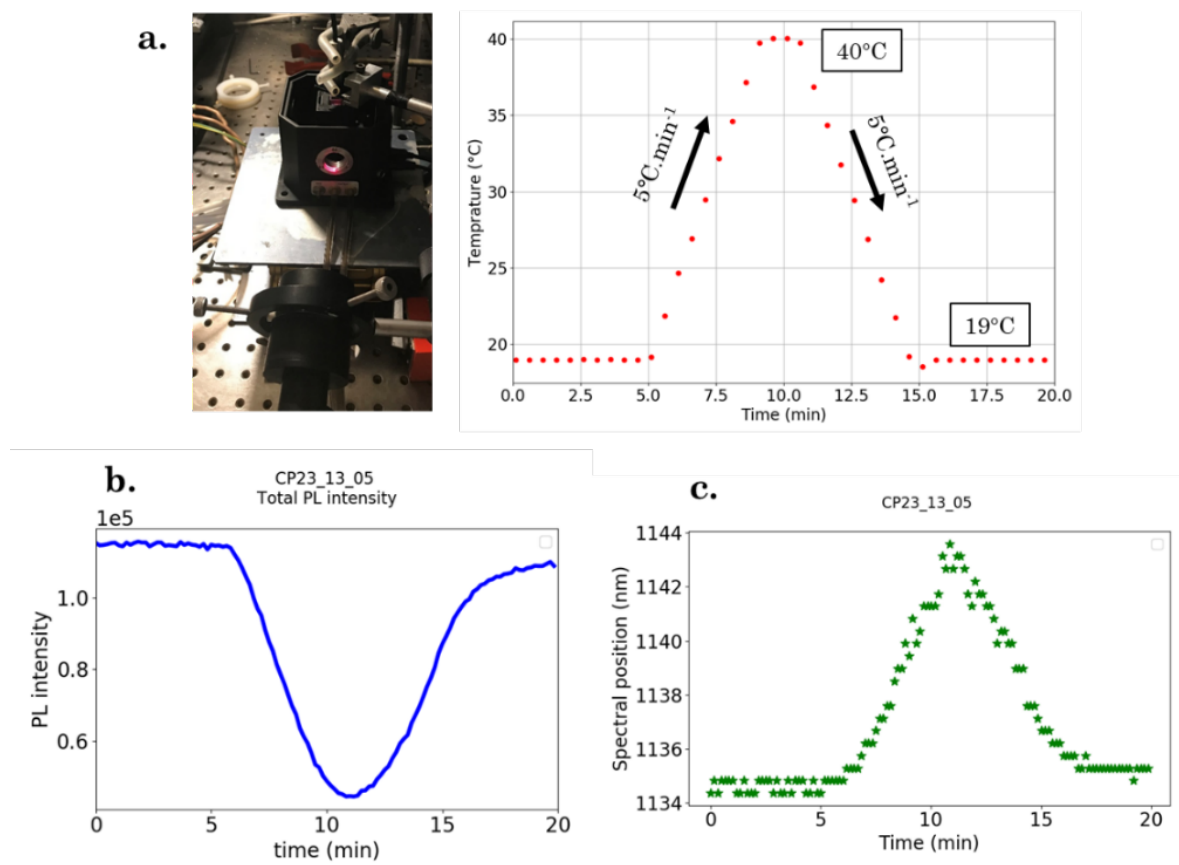


Figure VI-1 : Une suspension d'Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] (0,7 mL à 0,5 mg.mL⁻¹) est placée à l'intérieur du support de cuve chauffant (Quantum Northwest) et est illuminée avec la LED-730 nm à 1 mW.cm⁻¹ pendant 20 min. Les spectres d'émission de photoluminescence des nanoparticules d'Ag₂S sont enregistrés au cours du temps. Pendant les 6 premières minutes d'expérience, la température de la suspension est fixée à 19°C (a). L'intensité totale (b) et l'énergie du pic d'émission (c) de photoluminescence restent stables. À partir de t = 6 min, une rampe de montée en température de 5°C.min⁻¹ est imposée à l'échantillon (a). Une diminution de l'intensité totale (b) et de l'énergie du pic d'émission (déplacement vers les hautes longueurs d'onde) de photoluminescence (c) sont observées. À partir de t = 11 min, une rampe de descente en température de 5°C.min⁻¹ est imposée à l'échantillon (a). Une augmentation de l'intensité totale (b) et de l'énergie du pic d'émission (déplacement vers les basses longueurs d'onde) (c) de photoluminescence sont observées.

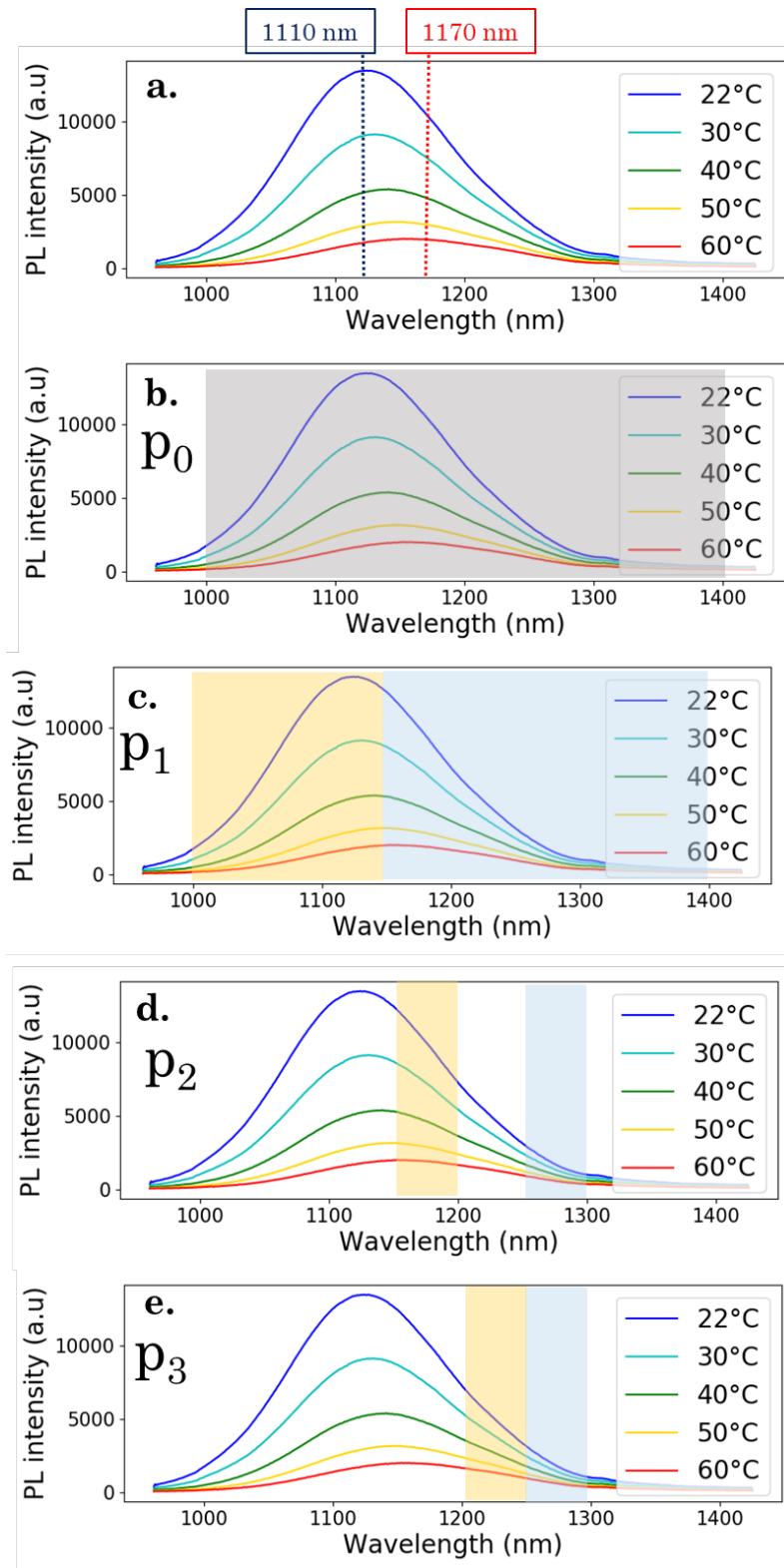
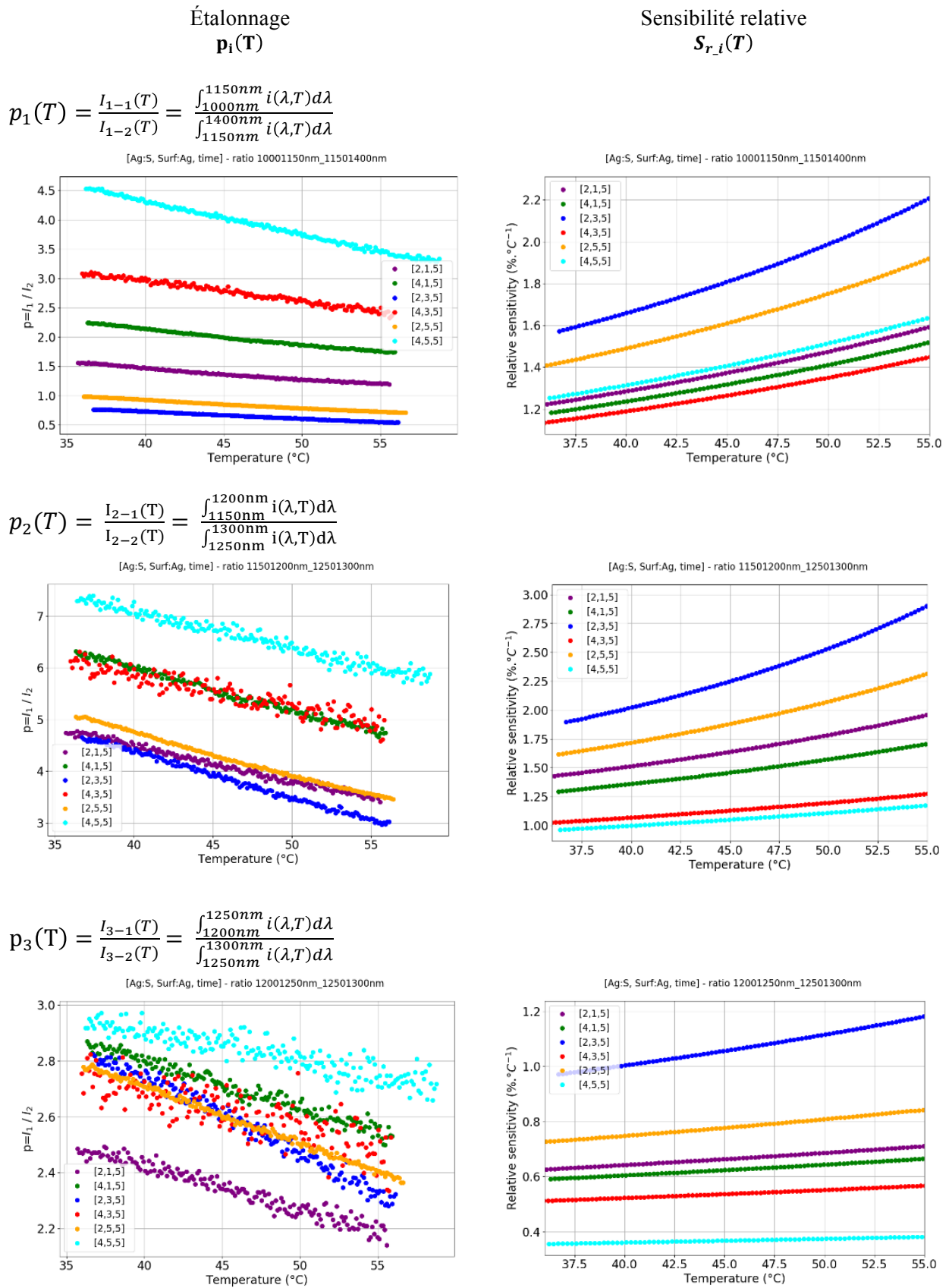


Figure VI-2 : (a) Évolution du spectre d'émission de photoluminescence du composé Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] en fonction de sa température de cœur. Lorsque la température augmente de 22°C à 60°C, nous observons une extinction de photoluminescence et une diminution de l'énergie du pic d'émission de $5,7 \cdot 10^{-2}$ eV (décalage de 60 nm vers les hautes longueurs d'onde). Illustration de l'intensité totale de photoluminescence p_0 (b) et des rapports d'intensité p_1 (c), p_2 (d) et p_3 (e).

Tableau VI-2 : Variation du paramètre de photoluminescence et de la sensibilité relative avec la température



VI.2.b. Les rapports d'intensité p_1 , p_2 et p_3

Dans la colonne de gauche du **tableau VI-2**, les évolutions des rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 sont données en fonction de la température de cœur des 6 composés Ag_2S émettant un signal de photoluminescence dans la fenêtre [1000 nm – 1400 nm]. Ces 6 composés sont de potentiels nanothermomètres que nous évaluons dans cette section de chapitre. Entre 35°C et 55°C, l'évolution des rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 peut être modélisée par une fonction affine.

Nous remarquons que la dispersion des valeurs autour de cette tendance linéaire dépend du rapport d'intensité considéré. Les valeurs sont plus dispersées pour le rapport d'intensité p_3 que pour p_2 et que pour p_1 . Parmi les signaux de photoluminescence des 6 nanothermomètres candidats, celui du composé émettant aux plus hautes longueurs d'onde (Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5]) est centré sur 1149 nm à 37°C (tableau VI-3). Pour le rapport d'intensité p_1 , l'intervalle d'intégration du numérateur a une largeur de 150 nm (de 1000 nm à 1150 nm) et celle du dénominateur de 350 nm (de 1150 nm à 1400 nm) (figure VI-2). La longueur d'onde de coupure du rapport d'intensité p_1 (1150 nm) correspond à la position spectrale du composé Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5] à 37°C (1149 nm). Cela signifie, d'une part, que le numérateur et le dénominateur de p_1 intègrent des proportions équivalentes du signal. D'autre part, tous les photons émis par les nanoparticules d' Ag_2S sont intégrés par le paramètre de photoluminescence p_1 . Cela n'est pas le cas pour les paramètres p_2 et p_3 . En effet, les intervalles d'intégration du numérateur et du dénominateur de p_2 et p_3 ont une largeur de 50 nm. Les rapports d'intensité p_2 et p_3 ont le même dénominateur (intégrale sur les longueurs allant de 1250 nm à 1300 nm) (figure VI-2). En revanche, le numérateur de p_3 (intégrale de 1200 nm à 1250 nm) intègre moins de photons que le numérateur de p_2 (intégrale de 1150 nm à 1200 nm) pour les 6 nanothermomètres candidats. Plus le nombre de photons intégrés est faible, plus le bruit (thermique lié au détecteur InGaAs de la caméra hyperspectrale, annexe A.I.2 et B.I) a une contribution importante dans la mesure du paramètre d'intensité.

Nous remarquons également que les valeurs des rapports d'intensité p_2 et p_3 obtenus avec les échantillons $\text{Ag:S} = 4$ sont plus dispersées autour de la tendance linéaire que celles obtenues avec le paramètre de synthèse $\text{Ag:S} = 2$. Cela s'explique par le fait qu'un nombre plus faible de photons est intégré dans les fenêtres de longueurs d'onde intervenant dans les rapports d'intensité p_2 et p_3 pour les échantillons $\text{Ag:S} = 4$ que pour les échantillons $\text{Ag:S} = 2$. En effet, nous l'avons déjà discuté précédemment, les composés obtenus dans les conditions de synthèse $\text{Ag:S} = 4$ émettent à des longueurs d'onde plus basses que ceux obtenus avec $\text{Ag:S} = 2$ (tableau VI-3).

Tableau VI-3 : Position spectrale du signal de photoluminescence émis à 37°C par les 9 composés Ag_2S étudiés.

Échantillon Ag_2S -11MUA-	Ag:S	Surf:Ag	Position spectrale à 37°C (nm)
[2 ; 1 ; 5]	2	1	1120
[4 ; 1 ; 5]	4	1	1108
[2 ; 3 ; 5]	2	3	1149
[4 ; 3 ; 5]	4	3	1080
[2 ; 5 ; 5]	2	5	1137
[4 ; 5 ; 5]	4	5	1069

VI.2.c. Sensibilité thermique relative associée aux rapports d'intensité p_1 , p_2 et p_3

Dans la colonne de droite du **tableau VI-2**, la sensibilité relative S_r est calculée en fonction de la température de cœur des 6 nanothermomètres candidats, pour les trois rapports d'intensité p_1 , p_2 et p_3 . Tout d'abord, les courbes de sensibilité relative ne sont pas bruitées puisqu'elles sont obtenues à partir des modèles de variation linéaire pour les trois rapports d'intensité (p_1 , p_2 et p_3) en fonction de la température. La méthode utilisée pour établir les courbes de sensibilité thermique relative est décrite **annexe B.II**.

Les 6 nanothermomètres candidats présentent des sensibilités thermiques relatives différentes par rapport à p_1 , p_2 et p_3 , dans la gamme de température [37°C – 55°C]. La dépendance du signal d'émission de photoluminescence à la température est donc différente pour chaque composé synthétisé. Cela signifie les paramètres de synthèse Surf:Ag et Ag:S sont corrélés aux mécanismes à l'origine de la photoluminescence des composés. Enfin, la sensibilité thermique relative (S_r), par rapport à p_1 et p_2 , est supérieure au seuil fixé par notre cahier des charges ($1\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$) pour les 6 nanothermomètres candidats. Néanmoins, le rapport d'intensité p_1 permet de limiter la dispersion de valeurs autour du modèle de régression linéaire $p_1(T)$ (tableau VI-2). Le bruit a un impact important sur la précision de la mesure du rapport d'intensité (tableau VI-2) et *in fine* sur celle de la température mesurée³⁵. La précision d'un nanothermomètre n'est donc pas déterminée seulement par la sensibilité thermique relative. Elle dépend également du signal de photoluminescence exploité et de la méthode de traitement de données. Nous sélectionnons le rapport d'intensité p_1 comme paramètre de photoluminescence pour la suite des études détaillées dans ce manuscrit de thèse. **Nous établissons l'étalonnage en température du nanothermomètre sélectionné (parmi les 6 candidats) par rapport d'intensité p_1**

³⁵ Le protocole expérimental pour l'étalonnage d'un nanothermomètre est détaillé en **annexe A.III.3** et la méthode de traitement de données est donnée en **annexe B.II**.

VI.3. Les mécanismes de photoluminescence des nanothermomètres candidats

VI.3.a. Description de l'étude

Les processus de photoluminescence peuvent être réversibles ou irréversibles au cours de cycles de montée-descente en température. L'extinction de photoluminescence irréversible est due à des changements permanents dans la structure du composé (figure VI-3.a). Les processus d'extinction de photoluminescence réversibles résultent de la présence de pièges thermiquement activés qui relaxent lors du refroidissement [87] (figure VI-3.b). La réversibilité des paramètres de photoluminescence du nanothermomètre est un critère important de son cahier des charges. Pour l'évaluer, nous imposons un cycle de montée et de descente en température de 37°C à 55°C aux neuf composés Ag₂S synthétisés. Le protocole expérimental est décrit **annexe A.III.4**. Nous étudions ici la réversibilité de l'intensité totale de photoluminescence $p_0(T) = \int_{1000nm}^{1400nm} i(\lambda, T) d\lambda$ et du rapport d'intensité $p_1(T) = \frac{\int_{1150nm}^{1400nm} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1000nm}^{1150nm} i(\lambda, T) d\lambda}$. Les résultats de cette étude sont donnés dans le **tableau VI-4**. Le rapport d'intensité p_0 permet d'étudier l'amplitude et la largeur du signal d'émission de photoluminescence au cours du cycle de montée-descente en température. En revanche, nous perdons l'information relative à l'énergie du pic d'émission de photoluminescence (ou position spectrale). Le rapport d'intensité p_1 est le paramètre de photoluminescence sélectionné comme paramètre de photoluminescence pour ce travail de thèse. Il prend en compte la position spectrale et la largeur du signal d'émission de photoluminescence, mais ne dépend pas de l'intensité totale d'émission de photoluminescence.

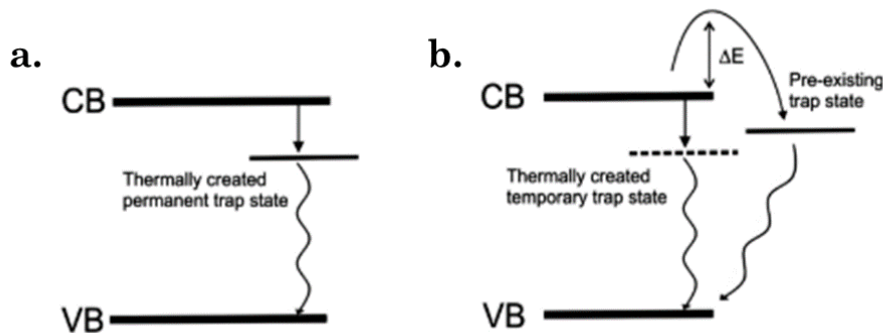


Figure VI-3 : (a) Extinction de photoluminescence irréversible liée aux pièges formés de manière permanente suite à une augmentation de la température. (b) Extinction de photoluminescence réversible liée aux pièges formés de manière temporaire suite à une augmentation de la température [87].

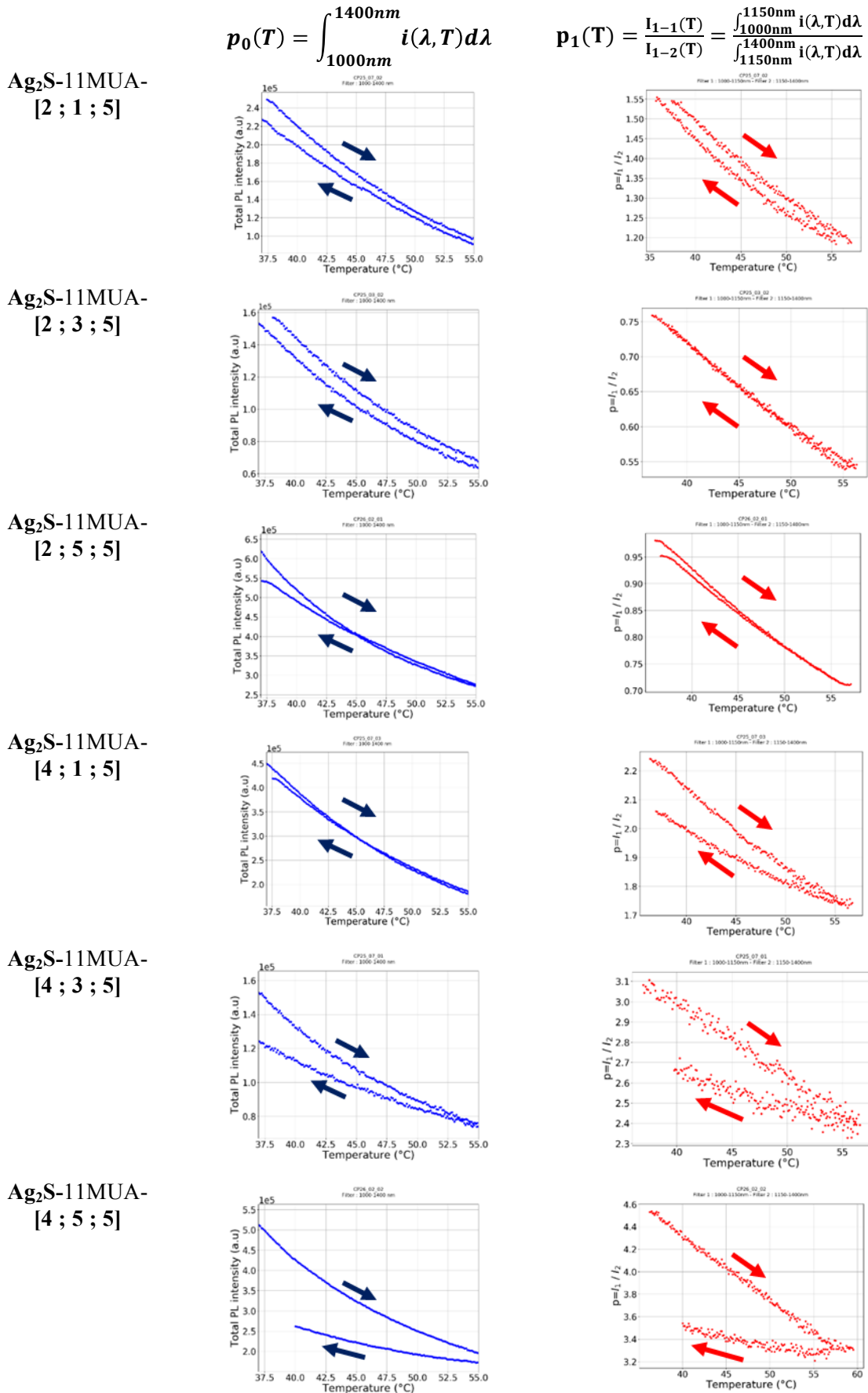
VI.3.b. La réversibilité des paramètres de photoluminescence

Observations

Au cours du cycle de montée-descente en température, plus les valeurs du paramètre de photoluminescence sont proches plus le caractère réversible du nanothermomètre est satisfaisant. Dans la **colonne de gauche du tableau VI-4**, nous étudions la réversibilité de l'intensité totale d'émission de photoluminescence pour les 6 nanothermomètres candidats. L'intensité totale de photoluminescence p_0 est réversible pour $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]}$, mais est irréversible pour tous les autres composés. Les valeurs de p_0 mesurées lors de la montée en température ne sont pas superposées aux valeurs p_0 mesurées dans la phase de descente en température. Nous remarquons que l'écart entre les valeurs p_0 mesurées lors des phases de montée et de descente en température est plus élevé à basse température. De plus, pour la série de composés $\text{Ag:S} = 2$, l'augmentation de la quantité de surfactant introduit dans le milieu réactionnel améliore la réversibilité de l'intensité totale de photoluminescence p_0 des échantillons correspondants. Néanmoins, la tendance inverse est observée pour les échantillons $\text{Ag:S} = 4$.

Dans la **colonne de droite du tableau IV-4**, nous étudions la réversibilité du rapport d'intensité p_1 pour les 6 nanothermomètres candidats. Le rapport d'intensités p_1 est réversible pour les composés $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]}$ et $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]}$ dans l'intervalle de température $[37^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}]$. Pour les composés $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]}$, $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]}$ et $\text{Ag}_2\text{S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]}$, le rapport d'intensité p_1 est irréversible. Les valeurs de p_1 mesurées lors de la montée en température ne sont pas superposées aux valeurs p_1 mesurées dans la phase de descente en température. Grâce aux analyses MEB-EDX, nous avons mis en évidence que les composés synthétisés en considérant le paramètre de synthèse $\text{Ag:S} = 4$ étaient non stœchiométriques et présentaient un défaut d'atomes d'argent plus important que les nanoparticules obtenues avec le paramètre de synthèse $\text{Ag:S} = 2$. Cela pourrait signifier que les lacunes d'argent sont plus nombreuses pour les composés $\text{Ag:S} = 4$ que pour ceux obtenus avec $\text{Ag:S} = 2$. Les lacunes d'argent sont des sites accepteurs : ils peuvent piéger des trous. La recombinaison d'un électron excité délocalisé dans la bande de conduction est donc possible avec un trou situé dans un niveau accepteur localisé au niveau des lacunes d'argent [72].

Tableau VI-4 : Étude de la réversibilité et reproductibilité des nanothermomètres candidats



Interprétation

Les lacunes d'argent pourraient être à l'origine du mécanisme de photoluminescence des sulfures d'argent synthétisés dans cette étude. Cette proposition est en accord avec l'absence de bande excitonique sur le spectre d'absorption (annexe C.I.3). Dans ces conditions, l'émission résulte de recombinaison des électrons excités et délocalisés dans la BC sur des niveaux pièges dans le gap à proximité de la BV. Ces niveaux accepteurs sont classiquement associés à des lacunes d'argent. Plus la température augmente, plus les paires accepteurs-donneurs de basse énergie sont favorisés pour les recombinaisons. Ceci est cohérent avec la diminution de l'énergie du pic d'émission de photoluminescence des Ag_2S ($5,7 \cdot 10^{-2}$ eV pour Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5]) lorsque la température augmente. Plus l'énergie de la transition est basse, plus les transitions non radiatives ont une probabilité élevée d'événement. Ceci est cohérent avec l'extinction de photoluminescence observée pour les Ag_2S lorsque la température augmente. Lorsque les lacunes d'argents deviennent trop nombreuses (cas d'Ag:S = 4), l'augmentation de la densité de phonons avec l'augmentation de la température pourrait induire de légers déplacements des atomes au sein de la maille cristalline. Cette mobilité atomique conduirait à la formation pièges permanent dans la structure expliquant la non-réversibilité de l'intensité de totale de photoluminescence et du rapport d'intensité p_1 au cours du cycle montée-descente en température.

Le caractère réversible de l'intensité totale d'émission de photoluminescence p_0 pourrait être corrélé à l'état de surface des nanoparticules. Des pièges permanents peuvent donc se former au niveau de la surface des nanoparticules. Leur densité pourrait diminuer avec la quantité de surfactant greffé à la surface des nanoparticules. Le caractère réversible du rapport d'intensité p_1 pourrait être corrélé à la composition des nanoparticules et à la quantité de lacunes d'argent présentes au sein de la structure. Nous rappelons que le rapport d'intensité p_1 donne une information sur la position spectrale et donc l'énergie de la transition radiative mise en jeu.

VII. Sélection du nanothermomètre de référence

Parmi les neuf nanothermomètres candidats Ag_2S -11MUA, Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5] a le meilleur rendement quantique (0,07 %) et la meilleure sensibilité relative à la température ($1,9 \text{ \%} \cdot \text{°C}^{-1}$ à 37°C en considérant le rapport d'intensité p_1). La réversibilité et répétabilité (figure VII-1) du nanothermomètre est démontrée pour le rapport d'intensité p_1 . Le nanothermomètre de référence émet un signal de photoluminescence centré sur 1149 nm à 37°C . Dans la suite de ce travail, nous utiliserons toujours le nanothermomètre de référence pour mener nos expériences. Néanmoins, une nouvelle calibration est réalisée avant chaque session expérimentale de nanothermométrie pour garantir la fiabilité de la mesure de température (Annexe A.I.2).

Parmi les neuf nanothermomètres candidats Ag_2S -11MUA, nous sélectionnons le composé **Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5]** pour la suite de l'étude. Nous désignerons désormais ce composé comme le **nanothermomètre de référence**.

Les paramètres de synthèse optimisés pour la suite de l'étude sont les suivants :
 $T = 100\text{°C}$; $t = 5\text{min}$; $[\text{Ag}] = 5\text{mM}$; Surf : Ag = 3 ; Ag : S = 2

Les neuf nanothermomètres candidats Ag_2S enrobés de 11MUA que nous venons d'étudier ont des rendements quantiques faibles ($< 1\%$). Dans la troisième partie de ce chapitre de thèse, nous avons souhaité étudier l'effet du ligand enrobant les Ag_2S sur la performance des matériaux obtenus en vue de leur utilisation en nanothermométrie.

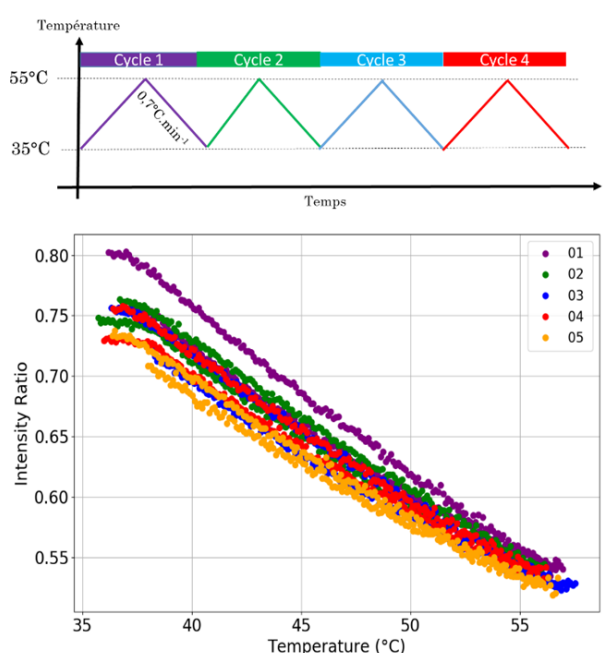


Figure VII-1 : Cyclage en température de l'échantillon Ag_2S -11MUA-[2 ; 3 ; 5] , 0,7 mL à 0,5 mg/mL. Paramètres d'excitation : LED 730 nm 1A, 100%. Rampe de montée en température : $85\text{°C} - 58\text{°C}$ à $0,7 \text{°C/min}$ soit 57 min d'expérience. Rampe de descente en température : $58\text{°C} - 38\text{°C}$ à $0,7 \text{°C/min}$ soit 57 min d'expérience. Acquisition du signal : Un spectre de PL est enregistré toutes les 10 secondes soit 360 spectres enregistrés par rampe de température.

Partie 3 : Effets de la nature du ligand sur la performance des nanothermomètres candidats

Dans la troisième partie du deuxième chapitre de ce manuscrit de thèse, nous testons notre synthèse en voie aqueuse avec deux nouveaux ligands thiol :

- Une molécule commerciale : le polyéthylène glycol méthyl éther thiol (6 kDa) (**section VIII**)
- Une molécule fournie par l'équipe de **Stéphane Roux** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté) : le DTDTPA (dithiolated diethylenetriamine pentaacetic acid) (**section IX**).

VIII. Synthèse de nanoparticules d'Ag₂S-PEG

VIII.1. Stratégie expérimentale

Nous avons synthétisé des nanoparticules de sulfure d'argent décorées de polyéthylène glycol méthyl éther thiol (6 kDa) suivant un procédé de synthèse en voie aqueuse, en une seule étape et par chauffage avec le four à micro-ondes monomode (Monowave 300, Anton Paar). Nous avons testé trois conditions de synthèse résumées dans le **tableau VIII-1**. Les paramètres étudiés sont la concentration du précurseur d'argent ([Ag]) et le temps de réaction (t). Les paramètres constants sont la température de réaction (T = 100°C), les rapports Ag:S (Ag:S = 2) et Surf:Ag (Surf:Ag = 2). Pour chaque échantillon synthétisé, la morphologie, la composition et les propriétés optiques sont caractérisées.

Tableau VIII-1 : de synthèses pour la famille de composés Ag₂S-PEG

Échantillon	[Ag] (mM)	Ag:S	Surf:Ag	T (°)	t (min)
Ag ₂ S-PEG-[2.5 ; 5]	2.5	2	2	100	5
Ag ₂ S-PEG-[5 ; 5]	5	2	2	100	5
Ag ₂ S-PEG-[5 ; 15]	5	2	2	100	15

Protocole de synthèse pour les paramètres [Ag] = 5 mM, Ag:S = 2, Surf:Ag = 3, T = 100°C, t = 15 min

666 mg de polyéthylène glycol méthyl éther thiol (6 kDa) ont été dissous dans 9,5 ml d'eau, puis 9,3 mg d'AgNO₃ dissous dans 0,5 ml d'eau ont été ajoutés. Le pH est ajusté à 8 avec une solution aqueuse d'ammoniaque. La solution est agitée pendant 24 h, à l'abri de la lumière. Après 24 h, 6,7 mg de Na₂S.9H₂O dissous dans 4 mL d'eau sont ajoutés à la solution. Immédiatement après, le milieu réactionnel est transféré dans une cavité micro-ondes monomodale et chauffé à 100°C (300W) pendant 15 min, sous agitation magnétique. Après ce court programme de chauffage par micro-ondes, les sulfures d'argent PEGylés sont dialysés, à l'aide d'une cassette de dialyse ayant un seuil de poids moléculaire de 10 kDa, plongée dans de l'eau désionisée pendant 24 h pour éliminer les molécules et les ions n'ayant pas réagi.

VIII.2. Caractérisation physicochimique des matériaux

La microscopie électronique en transmission haute résolution (HR-TEM) a été réalisée pour mesurer la distance interfrange des structures obtenues et identifier leur phase cristalline. Néanmoins, il n'a pas été possible d'obtenir ces images à cause de la diffusion du revêtement PEG à la surface des nanoparticules.

Pour un temps de réaction de 5 min, la taille des particules augmente avec la concentration du précurseur d'argent dans le milieu réactionnel (VIII-2). Pour une concentration en argent de 2,5 mM, les nanoparticules obtenues sont des sphères monodisperses de 3,7 nm de diamètre. Pour une concentration d'argent de 5 mM, les nanoparticules mesurent 7,8 nm de diamètre. Dans ces conditions, elles sont plus polydisperses et présentent une structure cœur/coquille (figure VIII-2). Pour une concentration en argent de 5 mM, la taille des particules diminue avec le temps de réaction du chauffage microondes passant de 7,8 nm pour 5 min à 100 °C à 5,3 nm pour 15 min à la même température (VIII-2). L'énergie de l'émission de photoluminescence diminue (déplacement vers les hautes longueurs d'onde) lorsque la taille des particules augmente (VIII-1). Le rayon de Bohr du sulfure d'argent est de 2,2 nm. Ainsi, pour les nanoparticules d'Ag₂S ayant un diamètre supérieur à 4,4 nm, il n'y a pas de confinement quantique et la position spectrale n'est pas impactée par la taille des particules. Néanmoins, dans notre étude, une différence entre la position spectrale d'Ag₂S-PEG-[5 ; 5] (7,8 nm) et Ag₂S-PEG-[5 ; 15] (5,3 nm) est observée (figure 24). Nous remarquons que le spectre de photoluminescence d'Ag₂S-PEG-[5 ; 15] est très large, ce qui pourrait résulter de l'émission de deux populations de nanoparticules de taille différente et dont une aurait un diamètre inférieur à 4,4 nm. Le décalage de position spectrale observé entre Ag₂S-PEG-[5 ; 5] et Ag₂S-PEG-[5 ; 15] peut également être lié à une non-stœchiométrie des matériaux en argent et en soufre (rapport Ag:S différent de 2).

L'argent et le soufre atomiques mesurés par analyses TEM-EDX montrent que nous avons obtenu des particules de sulfure d'argent non stœchiométrique (tableau VIII-2). Pour Ag₂S-PEG-[2,5 ; 5], le rapport Ag:S mesuré est de 0,95:1. Ce rapport inférieur à 2:1 peut s'expliquer par deux facteurs. Tout d'abord, la surface des nanoparticules présente une forte teneur en soufre en raison du revêtement de polyéthylène glycol thiol. Ensuite, il a été montré dans la littérature, que des lacunes d'argent peuvent exister au sein de la structure du sulfure d'argent [50]. Pour Ag₂S-PEG-[5 ; 5], le rapport mesuré Ag:S est de 2,5:1 (tableau 28). La bande de photoluminescence à 1240 nm indique la présence de la phase sulfure d'argent (figure 24). En effet, les nanoparticules d'argent n'émettent pas dans la fenêtre de longueur d'onde que nous détectons avec la caméra hyperspectrale que nous avons utilisée dans cette étude [88]. Les images TEM montrent que les nanoparticules ont une structure cœur/coquille (figure VIII-2). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que la structure Ag₂S-PEG-[5 ; 5] est hétérogène et composée de deux phases : celle du sulfure d'argent et de l'argent métallique. Un rapport Ag:S supérieur à 2:1 a déjà été rapporté dans la littérature dans le cas d'une structure cœur/coquille Ag/Ag₂S [50]. En augmentant le temps de réaction de 5 min (Ag₂S-PEG-[5 ; 5], 7.8 nm) à 15 min (Ag₂S-PEG-[5 ; 15], 5.3 nm), tout en gardant les autres paramètres de synthèse constants, des nanoparticules plus petites sont obtenues. De plus, dans le cas d'un temps de réaction de 15 min, la structure cœur/coquille est perdue (figure VIII-2). Pour une concentration d'argent de 5 mM, l'augmentation du temps de réaction pourrait donc favoriser la participation la reconstruction des particules et l'incorporation des atomes d'argent dans le réseau cristallin de la phase de sulfure d'argent.

Tableau VIII-2 : Synthèse des résultats de caractérisations des matériaux pour la famille Ag₂S-PEG

Échantillon	[Ag] (mM)	Temps de réaction (min)	Taille (nm)	Rendement quantique	Position spectrale (nm)	Ag:S MET-EDX
Ag ₂ S-PEG-[2,5 ; 5]	2.5	5	3,7	< 0,001%	1100	0.95
Ag ₂ S-PEG-[5 ; 5]	5	5	7,8	< 0,001%	1240	2.5
Ag ₂ S-PEG-[5 ; 15]	5	15	5,3	< 0,001%	1160	NA

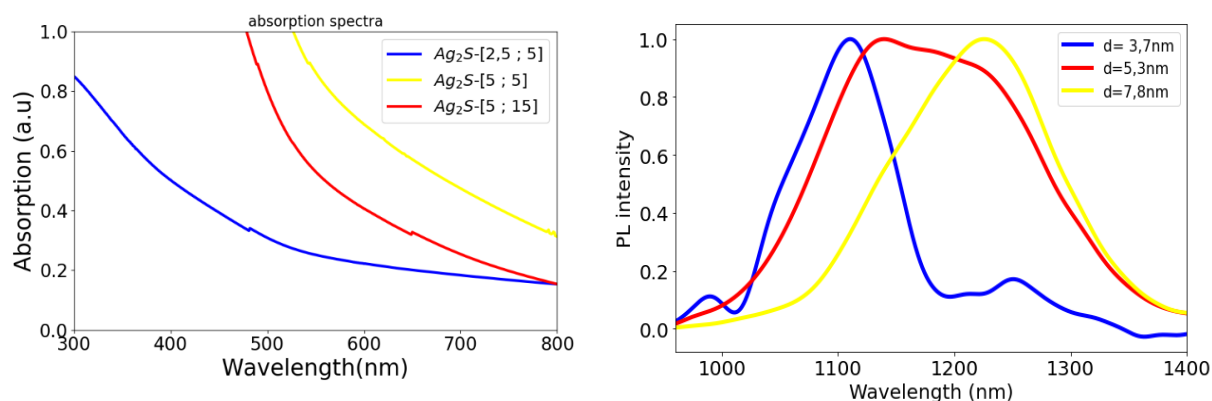


Figure VIII-1 : Spectres d'absorption et d'émission de photoluminescence. Spectre bleu $\text{Ag}_2\text{S-PEG-[2,5 ; 5]}$; Spectre jaune $\text{Ag}_2\text{S-PEG-[5 ; 5]}$; Spectre rouge $\text{Ag}_2\text{S-PEG-[5 ; 15]}$

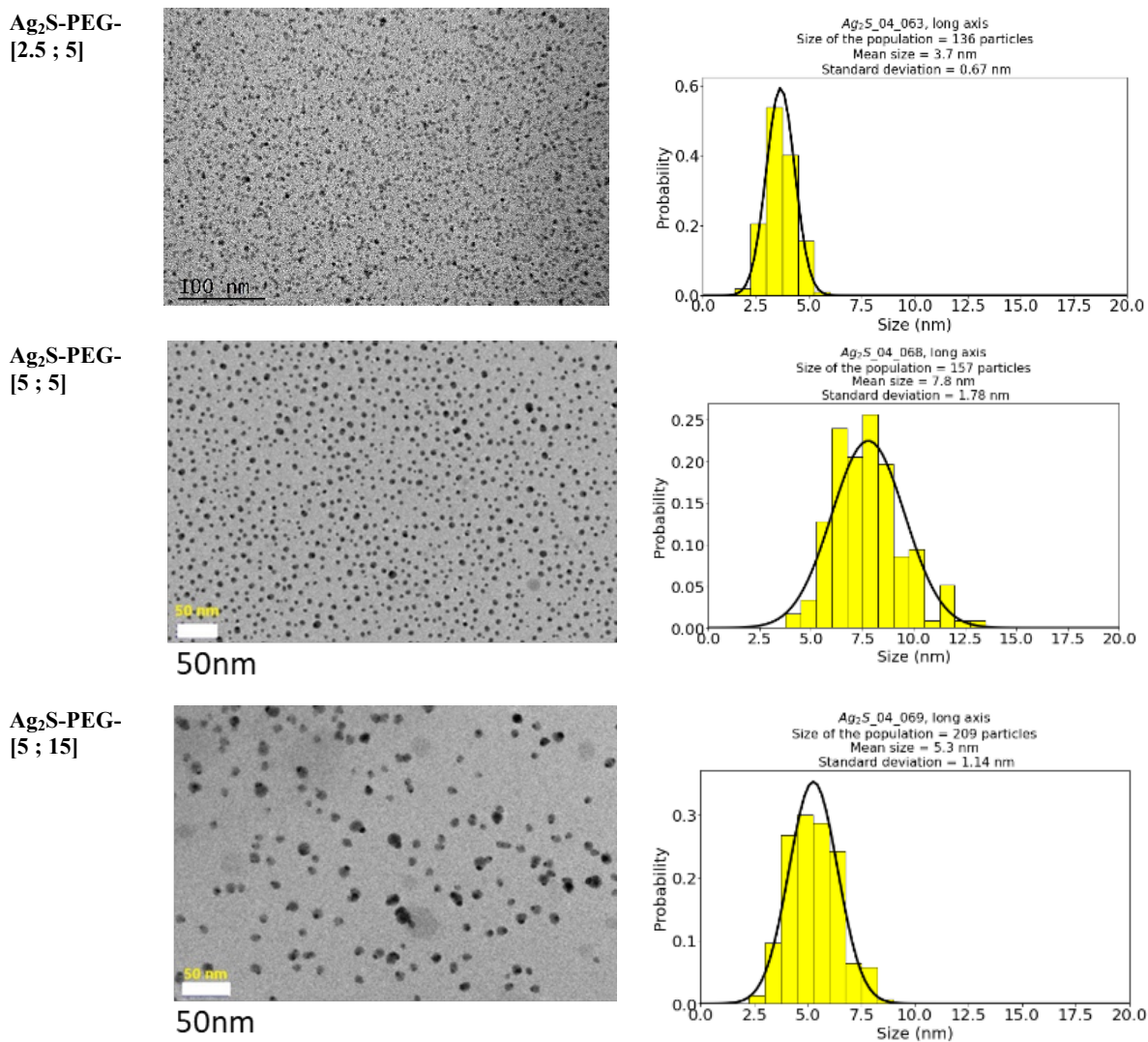


Figure VIII-2 : Clichés de Microscopie électronique en transmission et distribution de taille pour la série de nanoparticules $\text{Ag}_2\text{S-PEG}$

VIII.3. Évaluation d'Ag₂S-PEG-[5 ; 15] pour la nanothermométrie

Un seul des trois composés de la famille Ag₂S-PEG présentée ci-dessus est évalué pour la nanothermométrie : il s'agit d'Ag₂S-PEG-[5 ; 15]. Ce composé absorbe dans la première fenêtre des tissus biologiques et émet dans la seconde fenêtre des tissus biologiques (figure VIII-1). À 25°C, le spectre de photoluminescence du composé Ag₂S-PEG-[5 ; 15] est centré sur 1160 nm. D'après le test de photostabilité optique, les 10 premières minutes (de t = 10min à t = 20min) d'exposition de l'échantillon à la source d'excitation provoquent une extinction de photoluminescence de l'ordre de 30%. L'intensité de photoluminescence reste ensuite stable de la 10^{ème} à la 50^{ème} minute (de t = 20 min à t = 60 min) de photoexcitation (figure IX-6 c). Nous avons choisi d'effectuer un test de répétabilité et de réversibilité pour Ag₂S-PEG-[5 ; 15] en suivant le paramètre p₁ au cours de deux cycles de montée-descente en température entre 37°C et 55°C. Nous constatons une faible sensibilité du paramètre de photoluminescence p₁ à la température (figure VIII-3).

$$p_1(T) = \frac{I_{1-1}(T)}{I_{1-2}(T)} = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

La mesure de p₁ dans la gamme de température étudiée est réversible, mais non répétable (figure VIII-3). Pour une température donnée, nous observons un écart de l'ordre de 25% entre les valeurs de p₁ mesurées au cours du cycle 1 de montée-descente en température (figure VIII-3, en mauve) et celles mesurées au cours du cycle 2 (figure VIII-3, en vert). Le rendement quantique d'Ag₂S-PEG-[5 ; 15] est inférieur à 0,001%³⁶ (tableau VIII-2). Le rapport signal/bruit pour les spectres acquis lors du test de reproductibilité-répétabilité est donc faible. De plus, plus la température de cœur du nanothermomètre augmente, plus l'intensité du signal diminue. Cela engendre une augmentation de l'erreur effectuée sur la mesure du rapport d'intensité p₁ à température élevée et donc, *in fine*, sur la mesure de température elle-même. **Le rendement quantique et la sensibilité relative à la température d'Ag₂S-PEG-[5 ; 15] sont inférieurs aux seuils fixés par notre cahier des charges. Le nanothermomètre candidat Ag₂S-PEG-[5 ; 15] n'est donc pas sélectionné pour réaliser les expériences de nanothermométrie reportées dans la suite de ce travail de thèse.**

³⁶ C'est également le cas pour les deux autres composés Ag₂S@PEG obtenus (Ag₂S-PEG-[5 ; 5] et Ag₂S-PEG-[2,5 ; 5]) (tableau E.I-2)

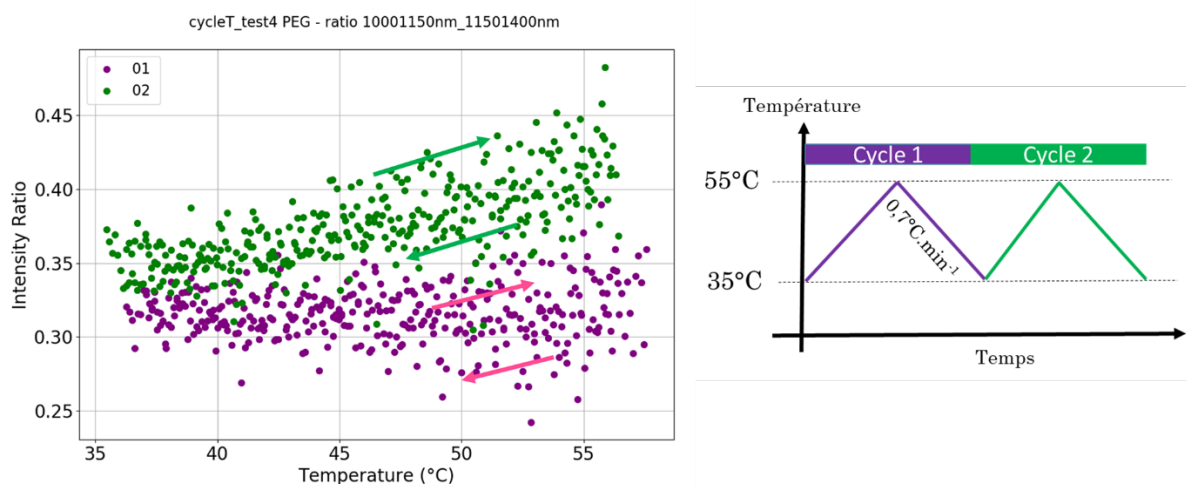


Figure VIII-3 : Test de répétabilité-réversibilité effectué sur $\text{Ag}_2\text{S-PEG-[5 ; 15]}$ avec un suivi du rapport d'intensité p_1 . Deux cycles de montée-descente en température ont été effectués avec une rampe de $0,7\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

IX. Synthèse de nanoparticules $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}$

IX.1. Stratégie expérimentale

Nous avons synthétisé des nanoparticules de sulfure d'argent décorées de DTDTPA (dithiolated diethylenetriamine pentaacetic acid) (figure IX-1). Le ligand DTDTPA est un ligand chélateur des métaux utilisé dans la formulation de nanoparticules d'or, par exemple, pour des applications en théranostic. Le DTDTPA nous a été fourni par **Stéphane ROUX** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté).

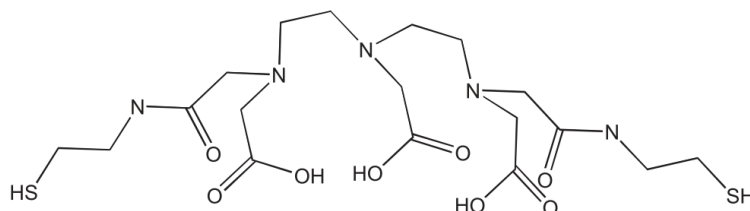


Figure IX-1 : Structure chimique du DTDTPA [89]

Dans le cadre de ce projet, nous n'avons pas accès au microonde monomode (en panne) utilisé pour la synthèse des nanoparticules $\text{Ag}_2\text{S-11MUA}$ (section V) et $\text{Ag}_2\text{S-PEG}$ (section VIII). Nous comparons, dans cette section de chapitre, les nanoparticules de sulfure d'argent décorées de 11MUA et de DTDTPA, obtenues dans les mêmes conditions de synthèse, en utilisant une autre référence de four à micro-ondes (Synthos 3000, Anton Paar) disponible au laboratoire (annexe A.I.1). La morphologie, la composition et les propriétés optiques des deux échantillons sont caractérisées. Les paramètres de synthèse sont les suivants : température de réaction $T=100^\circ\text{C}$, temps de réaction $t=20\text{ min}$, $\text{Ag:S}=2$ et $[\text{Ag}]=5\text{ mM}$. La molécule de DTDTPA possède deux fonctions thiols, alors que la molécule de 11MUA n'en possède qu'une seule. Dans le cadre de cette étude, nous avons souhaité travailler avec un rapport molaire des fonctions thiols provenant du surfactant par rapport à l'élément argent de 3. Pour la synthèse mettant en jeu le DTDTPA, le rapport Surf:Ag vaut donc 1,5 et pour celle avec le 11MUA, le rapport Surf:Ag vaut 3.

Tableau IX-1 : Conditions de synthèses

Échantillon	[Ag] (mM)	Ag:S	Surf :Ag	T (°)	t (min)
Ag ₂ S-DTDTPA	5	2	1,5	100	20
Ag ₂ S-11MUA	5	2	3	100	20

Protocole de synthèse pour les paramètres [Ag] = 5mM, Ag:S = 2, Surf:Ag = 1.5, T = 100°C, t = 20min

153 mg de DTDTPA sont dissous dans 29.6 mL d'eau, puis 34 mg d'AgNO₃ dissous dans 0.8mL d'eau sont ajoutés. La solution est agitée pendant 24 h, à l'abri de la lumière. Après 24 h, 24 mg de Na₂S.9H₂O dissous dans 9,6 mL d'eau sont ajoutés à la solution. Immédiatement après, le milieu réactionnel est transféré dans un réacteur du four à micro-ondes multimode et chauffé à 100°C pendant 20 min. Après ce programme de chauffage par micro-ondes, les nanoparticules d'Ag₂S décorées de DTDTPA ont été concentrées avec un tube d'ultrafiltration (30 K) et lavées à l'eau distillée.

IX.2. Caractérisations physicochimiques des matériaux

Les nanoparticules décorées avec le DTDTPA sont sphériques et monodisperses. Deux populations en tailles sont obtenues. Les nanoparticules de la première population ont un diamètre de 3,3 nm et celles de la deuxième, de 6,8 nm (figure IX-3). Les nanoparticules obtenues avec le 11MUA ont une forme ovoïdale et sont polydisperses. L'axe long mesure 6,1 nm et l'axe court 4,6 nm (figure IX-4). À 25°C, la position spectrale des nanoparticules Ag₂S-DTDTPA est 1050 nm. Puisque nous utilisons un filtre passe-haut 1000 nm, une partie du spectre de photoluminescence de ce composé n'est donc pas accessible (figure IX-2). À la même température, le spectre de photoluminescence d'Ag₂S-11MUA est centré sur 1140 nm (figure IX-2). Pour Ag₂S-DTDTPA, le rapport Ag:S mesuré par analyse MET-EDX est de 1,3. Le rapport Ag:S mesuré par analyse MEB-EDX vaut 1,6 pour le composé Ag₂S-11MUA (tableau IX-2).

Tableau IX-2 : Synthèse des résultats de caractérisations des matériaux pour Ag₂S-DTDTPA et Ag₂S-11MUA

Échantillon	[Ag] (mM)	Temps de réaction (min)	Forme	Rendement quantique	Position spectrale (nm)	Ag : S EDX
Ag ₂ S-DTDTPA	5	20	Sphère	0,66%	1050	1,3 *
Ag ₂ S-11MUA	5	20	Ovoïde	NA	1140	1,6 **

***dosage MET-EDX - **dosage MEB-EDX**

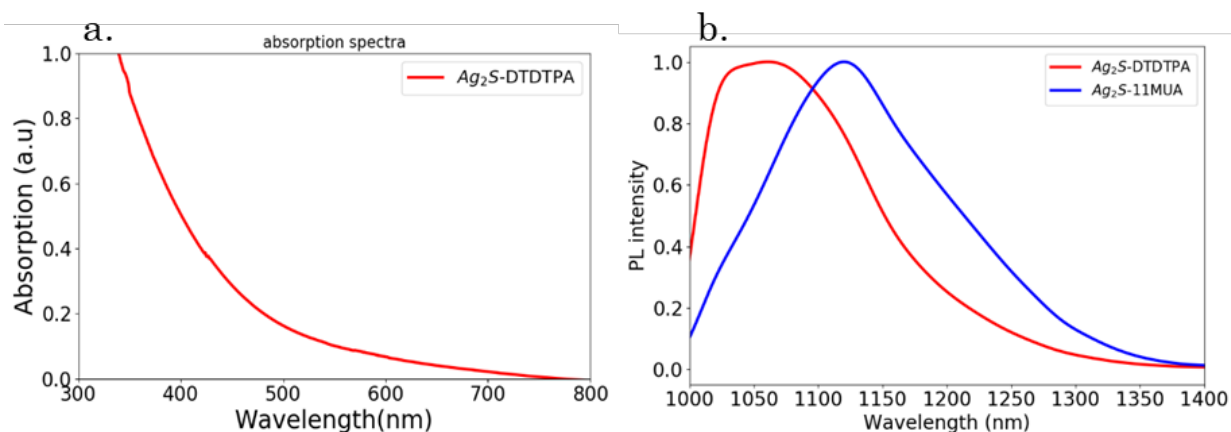


Figure IX-2: (a.) Spectre d'absorption d'Ag₂S-DTDTPA (b.) Comparaison des spectres de photoluminescence des composés Ag₂S-DTDTPA et Ag₂S-11MUA

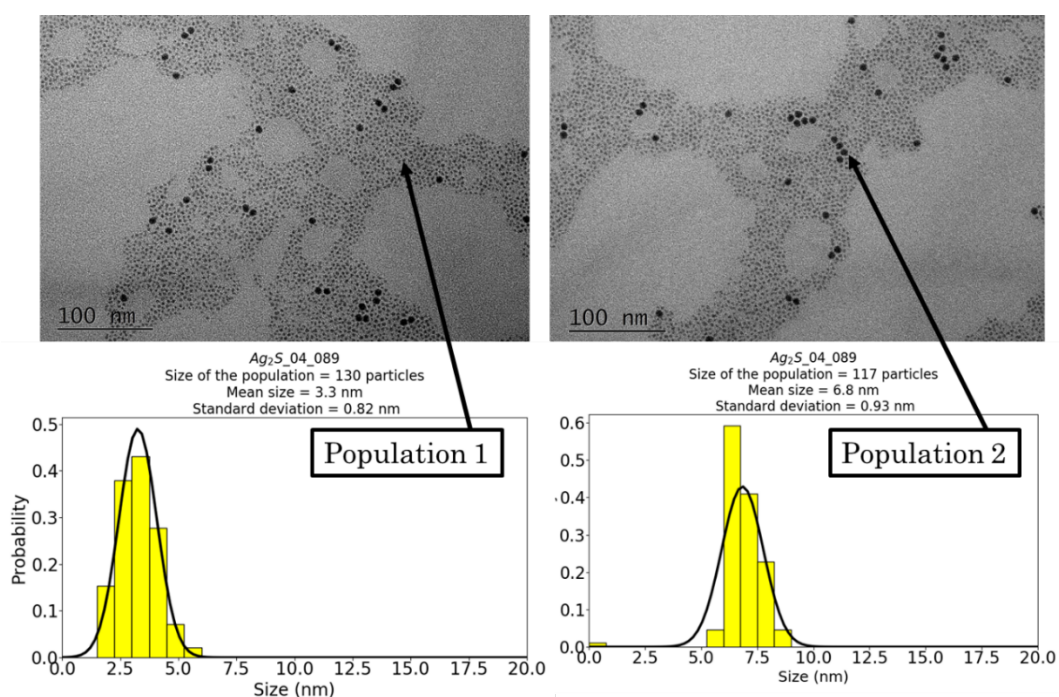


Figure IX-3 : Clichés de Microscopie électronique en Transmission et distribution de taille des échantillons Ag₂S-DTDTPA. Les nanoparticules sont sphériques et deux populations en tailles sont observées : une de dimension caractéristique 3,3 nm, l'autre de 6,8 nm.

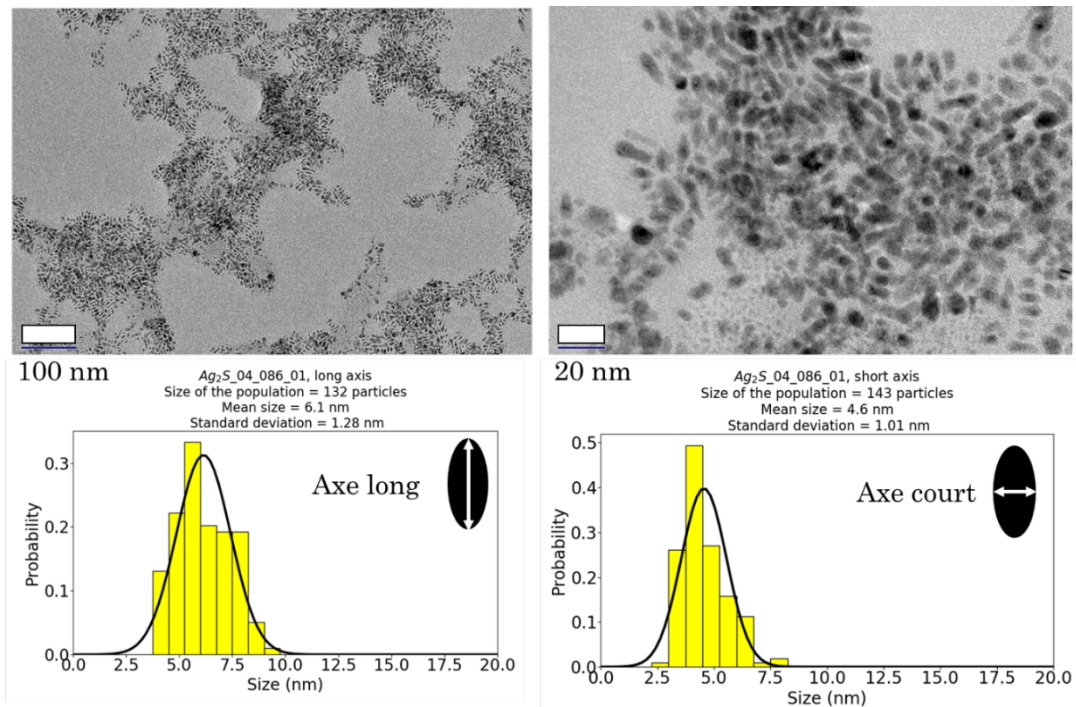


Figure IX-4 : Clichés de Microscopie électronique en Transmission et distribution de taille des échantillons Ag₂S-11MUA (microonde multimodes). Les nanoparticules ont une forme ovoïdale. L'axe long mesure 6,1 nm et l'axe court 4,6 nm.

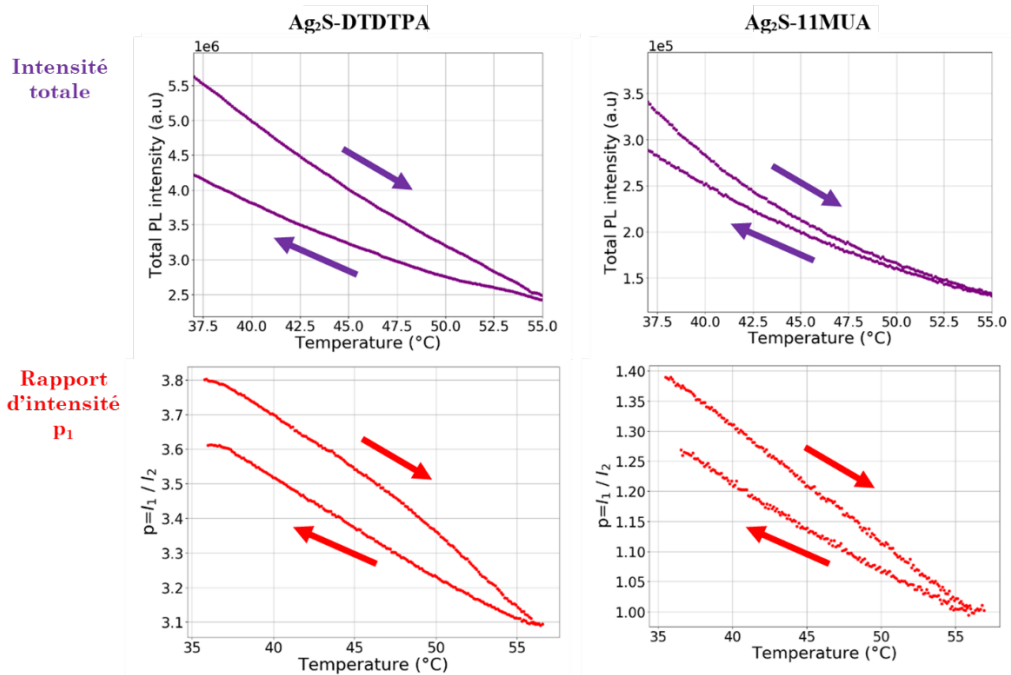


Figure IX-5 : Test de réversibilité effectué sur Ag_2S -DTDTPA et Ag_2S -11MUA avec un suivi de l'intensité totale et du rapport d'intensité p_1 . Un cycle de montée-descente ($35^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$) en température a été effectué avec une rampe de $0,7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

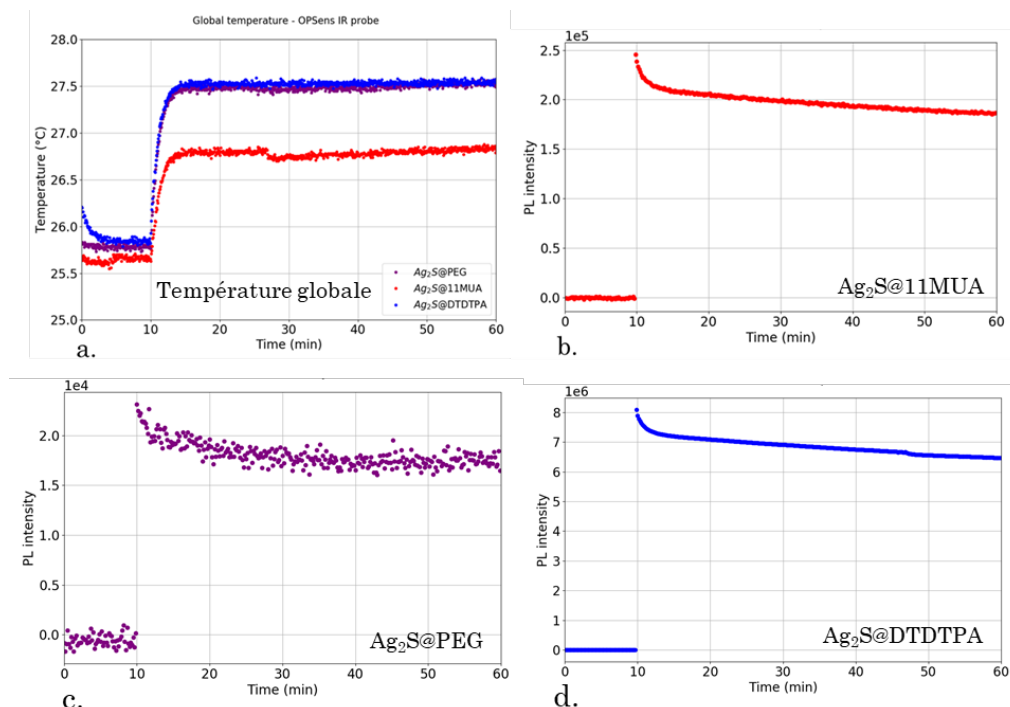


Figure IX-6 : Test de photostabilité réalisée pour les échantillons (b) $\text{Ag}_2\text{S}@11\text{MUA}$ (c) $\text{Ag}_2\text{S}@PEG$ et (d) $\text{Ag}_2\text{S}@DTDTPA$. Les échantillons (0,7 mL) sont thermalisés à 25°C grâce au support de cuve chauffant. Les dix premières minutes de l'expérience, la source d'excitation est éteinte. De $t = 10$ min à $t = 1$ h, chaque échantillon est excité avec une LED 730 nm à $1\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Pour chaque échantillon (b, c et d), un spectre d'émission de photoluminescence des Ag_2S est enregistré toutes les 10 secondes et intégré entre 1000 nm et 1400 nm pour suivre l'intensité totale de PL au cours du temps. (a) La température globale est mesurée grâce à une sonde à fibre optique plongeant dans l'échantillon (Opsens Solution).

IX.3. Évaluation d'Ag₂S-DTDTPA pour la nanothermométrie

Le composé Ag₂S-DTDTPA et Ag₂S-11MUA émettent dans la seconde fenêtre des tissus biologiques, respectivement autour de 1050 nm et 1140 nm (figure IX-2 b).

La **figure IX-6** reporte les résultats du test de photostabilité optique. Les 5 premières minutes (de t = 10 min à t = 15 min) d'exposition de l'échantillon Ag₂S-DTDTPA à la source d'excitation provoquent une extinction de photoluminescence de l'ordre de 12% et les 45 minutes suivantes (de t = 15 min à t = 60 min) provoquent une extinction de photoluminescence de 7% (figure IX-6 d). Pour l'échantillon Ag₂S-11MUA, les 5 premières minutes (de t = 10 min à t = 15 min) d'exposition à la source d'excitation provoquent une extinction de photoluminescence de l'ordre de 12% et les 45 minutes suivantes (de t = 15 min à t = 60 min) provoquent une extinction de photoluminescence de 14% (figure IX-6 b). Pendant toute la durée du test de photostabilité, effectué pour les deux composés, les suspensions étaient thermalisées à 25°C grâce au support de cuve chauffant (Quantum Northwest). Une élévation de température globale dans le milieu (mesurée avec la sonde à fibre optique) de 1°C pour Ag₂S-11MUA et de 1,7°C pour Ag₂S-DTDTPA est observée au cours des deux premières minutes de photoexcitation (de t = 10 min à t = 12 min). La température globale des suspensions se stabilise à la deuxième minute d'excitation et reste constante jusqu'à la fin du test (t = 60 min) alors que l'intensité totale de photoluminescence diminue légèrement (figure IX-6 a). L'extinction de photoluminescence observée pourrait donc être liée à une élévation de la température de cœur des nanoparticules excitées optiquement avec la LED.

Pour les deux composés obtenus avec le microonde multimode (Ag₂S-11MUA et Ag₂S-DTDTPA) l'intensité totale et le rapport d'intensité p_1 sont non-réversibles (figure IX-5). Ces composés, obtenus avec le four à micro-ondes multimode, ne sont donc pas de bons nanothermomètres. Néanmoins, nous avons montré dans que le nanothermomètre de référence, décoré de 11MUA, obtenu après chauffage avec le four à micro-ondes monomode le rapport d'intensité p_1 était réversible. Il serait donc intéressant de tester la synthèse d'Ag₂S-DTDTPA avec le four à micro-ondes monomode. En effet, Ag₂S-DTDTPA est un composé à fort potentiel pour la nanothermométrie : il possède **un rendement quantique 10 fois supérieur (0,7%) au nanothermomètre de référence (0,07%)**.

Chapitre 3

Nanothermométrie et hyperthermie magnétoinduite in vitro

Dans ce chapitre, nous commençons par présenter les principes fondamentaux de l'hyperthermie magnétoinduite ainsi que quelques exemples de système nanothermomètre - source de chaleur étudiés dans la littérature (**section I**). Le nanothermomètre optimisé dans le chapitre 2 est ensuite utilisé pour mesurer, en temps réel, la température locale au voisinage de nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en milieux aqueux (**section III**) et cellulaire (**section IV**), au cours d'un programme d'excitation optique et magnétique. Cette étude a été rendue possible grâce à un investissement conséquent, en termes de temps et d'énergie, dans la conception instrumentale d'un dispositif permettant de réaliser simultanément l'excitation magnétoinduite des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et la détection du signal de photoluminescence des Ag_2S pour la nanothermométrie (**section II**).

I. État de l'art

I.1. Les principes fondamentaux de l'hyperthermie magnétoinduite

I.1.a. Le superparamagnétisme

Les dipôles magnétiques, comme les nanoparticules d'oxydes de fer (maghémite et magnétite), ont un moment magnétique non nul. L'origine du moment magnétique est le moment cinétique orbital et de spin des électrons. Sous l'effet d'un champ magnétique, afin de minimiser l'énergie du dipôle magnétique, les moments magnétiques des nanoparticules superparamagnétiques s'alignent selon la direction du champ appliqué. Lorsqu'elles sont excitées avec un champ magnétique alternatif, les moments magnétiques suivent les oscillations du champ et s'orientent successivement selon la direction du champ. Ces changements d'orientation successifs induisent une élévation de température résultant de deux contributions : celle de Néel et celle de Brown (figure I-1). Le mouvement de Néel correspond à un mouvement interne des moments magnétiques au sein des nanoparticules (figure I-1.a). Le mouvement Brownien correspond à un mouvement physique de la nanoparticule sur elle-même engendrant des frottements avec son environnement (figure I-1 b).

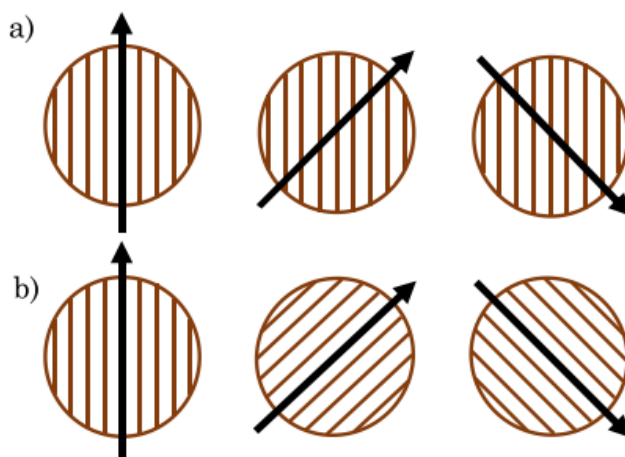


Figure I-1 : Représentation schématique de la rotation du moment magnétique d'une nanoparticule d'oxyde fer selon le type de relaxation de (a) Néel et de (b) Brown

I.1.b. Le pouvoir de chauffe des nanoparticules superparamagnétiques

Le SLP (*Specific Loss Power*) est une grandeur intensive, indépendante du nombre de nanoparticules, qui est utilisée dans la communauté de l'hyperthermie magnétoinduite pour évaluer la performance des sources de chaleur. Le SLP est une grandeur correspondant à l'énergie dissipée par unité de masse de matériel magnétique. Cette grandeur s'exprime en $W.g^{-1}$.

$$SLP = \frac{CV_{éch}}{m_{NP}} \frac{dT(t=0)}{dt}$$

	Grandeurs	Unités	Dimensions
SLP	Pouvoir de chauffe (<i>Specific Loss Power</i>)	$W.g^{-1}$	$L^2.T^{-3}$
C	Capacité calorifique volumique	$J.m^{-3}.K^{-1}$	$M.L^{-1}.T^{-2}.\Theta^{-1}$
$V_{éch}$	Volume	m^3	L^3
m_{NP}	Masse de matériel magnétique	g	M
$\frac{dT(t=0)}{dt}$	Pente initiale de la courbe représentative de la température en fonction du temps	$K.s^{-1}$	$\Theta.T^{-1}$

Nous pouvons supposer qu'aux premiers instants suivant le moment où le champ magnétique est allumé, l'échantillon est encore isolé thermiquement. Par conséquent, l'échauffement à l'origine est exclusivement lié aux mécanismes d'hyperthermie. Ainsi, la pente initiale $dT(t=0)/dt$ de la courbe représentant la température en fonction du temps correspond à l'élévation de la température de l'échantillon résultant de l'excitation magnétoinduite. Si nous la multiplions par la capacité calorifique volumique C de l'échantillon (capacité à emmagasiner la chaleur rapportée à son volume), nous obtenons la puissance à fournir pour obtenir une telle élévation de température pour un échantillon de volume unitaire. Nous revenons à la puissance nécessaire, dans le cas de notre échantillon, en multipliant par son volume $V_{\text{éch}}$. En divisant par la masse m_{NP} de matériau magnétique, présent dans l'échantillon, nous obtenons la puissance effective dissipée par gramme de matériau.

I.1.c. Effet de l'environnement des nanoparticules paramagnétiques sur le pouvoir de chauffe

Lorsque les nanoparticules sont internalisées par les cellules, elles sont en général confinées dans les lysosomes. Le confinement lysosomal des nanoparticules peut être un avantage. C'est le cas pour les nanoparticules d'oxyde de fer lorsqu'elles sont utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie IRM. L'agrégation des nanoparticules au sein des compartiments cellulaires améliore le contraste et facilite la détection de cellules marquées. En revanche, le pouvoir de chauffe de ces nanoparticules est très affecté par leur état d'agrégation au sein des cellules. Ceci constitue un frein à leur utilisation pour l'hyperthermie magnétoinduite au sein du vivant et à visée thérapeutique. L'augmentation de température induite par une source de chaleur superparamagnétique dépend de plusieurs paramètres comme la fréquence et l'amplitude de champ magnétique, mais également de la taille, de la forme ainsi que de la concentration en nanoparticules [90], [91]. Ces paramètres déterminent les contributions relatives de la relaxation de Brown et de Néel vis-à-vis de la dissipation de l'énergie magnétique sous forme de chaleur dans le milieu [92] [91]. Le pouvoir de chauffe des nanoparticules excitées grâce à un champ magnétique alternatif haute fréquence est en général plus faible en milieu cellulaire qu'en suspension aqueuse. En effet l'augmentation de la viscosité du milieu inhibe le mouvement brownien des nanoparticules [91].

I.2. Le couplage Nanothermomètre - source de chaleur dans la littérature

Une étude se basant sur un modèle de transfert de chaleur au voisinage de nanobâtonnets d'or excités optiquement montre que la température à la surface des nanoparticules est beaucoup plus élevée que globalement dans le milieu et qu'elle décroît très rapidement lorsqu'on s'éloigne de la surface des nanoparticules [93]. Lorsque les composés sont excités avec un laser pulsé (200 ps à 4.70 J.m^{-2}), la température à la surface des nanoparticules est de 650 K (377°C). À 10 nm de la surface, la température calculée grâce au modèle chute à 330 K (57°C). En contrôlant la distance entre la source de chaleur et un nanothermomètre, il devient possible de mesurer expérimentalement des gradients de température générés localement par l'excitation d'une nanosource de chaleur au sein d'un milieu.

Par exemple, dans ses travaux de thèse, Estelle Glais, a développé un nanothermomètre de composition $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}\text{Bi}^{3+}$ basé sur l'émission du centre coloré Cr (III) dans une matrice d'oxyde de zinc. Le paramètre de photoluminescence choisi pour cette étude est le temps de vie de photoluminescence : il décroît lorsque la température augmente. Les nanothermomètres de 10 nm de diamètre sont enrobés d'une couche de silice d'épaisseur variable (0, 3, 5 et 10 nm) et sont couplés à des nanobâtonnets d'or (nanoparticules plasmoniques). L'élévation de température mesurée par les nanothermomètres, lors de l'excitation optique des sources de chaleur (laser continu 976 nm), est d'autant plus importante que l'épaisseur de la couche de silice est faible. Pour les échantillons sous forme de poudre, l'élévation de température mesurée par les $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}\text{Bi}^{3+}$ sans couche de silice est de 160°C. Lorsqu'une couche de silice de 10 nm d'épaisseur enrobe les sondes de température, la température mesurée optiquement est de 100°C. Cette expérience met en évidence un gradient de température de 6°C.nm^{-1} au voisinage de la surface des nanobâtonnets d'or. Dans cette étude, lorsque les échantillons sont sous forme de poudre, les nanoparticules sont en contact les unes avec les autres. On ne mesure pas de régime stationnaire, le régime permanent est directement atteint [94]. En revanche, en suspension aqueuse, les particules ne sont pas toutes en contact. Dans ces conditions, et pour les mêmes échantillons, le régime permanent en température est atteint 10 min après la mise en marche de la source d'excitation des nanobâtonnets d'or [94]. Cette observation est cohérente avec le fait que la chaleur dissipée par les nanobâtonnets d'or diffuse dans l'eau avant d'être « ressentie » par les nanothermomètres.

La mesure d'une augmentation de température à l'échelle nanométrique induite par l'excitation magnétoinduite de nanoparticules d'oxydes de fer est également possible [95] [96] avec une haute résolution temporelle qui permet de mesurer les régimes transitoires locaux dans les premiers instants suivant la mise en route et l'arrêt du champ magnétique alternatif [96] [95]. Par exemple, dans l'étude réalisée par Dong *et al.*, les mêmes conditions d'excitation optique et magnétique sont imposées à (i) un système couplé nanothermomètre-nanosource de chaleur $[\text{NaYF}_4:\text{Yb}^3, \text{Er}^{3+} + \text{Fe}_3\text{O}_4]@\text{SiO}_2$ et (ii) un système libre de nanothermomètres $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ en présence de nanoparticules d'oxyde de fer $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Les deux systèmes sont dispersés dans l'eau et la température au voisinage des sources de chaleur est suivie au cours du temps grâce au signal de PL des nanothermomètres. Au sein du système libre (ii), les nanosources de chaleur et les nanothermomètres ne sont pas contraints à rester spatialement proches. Les nanothermomètres mesurent donc une température à une distance plus grande des sources de chaleur que dans le cas du système couplé (i). La température mesurée par les nanothermomètres du système couplé (i) (42 °C) est deux fois plus élevée que celle du système libre (ii) (20°C) au bout de 5 min d'excitation magnétique [95]. Lorsque le champ magnétique est coupé, la température mesurée par les nanothermomètres diminue instantanément dans le cas des deux systèmes, couplé (i) et libre (ii) [95]. Dans une autre étude mettant en jeu une nanoplateforme nanothermomètre-nanosource composée d'un noyau de maghémite, une élévation de température de 2°C au cours des 10 premières secondes après la mise en fonctionnement du champ magnétique alternatif est mesurée grâce au rapport d'émission des éléments Eu^{3+} et Tb^{3+} greffés à la surface des sources de chaleur (figure I-2).

Cette élévation de température n'est pas mesurée globalement dans le milieu en utilisant une sonde de température plongeant dans la solution [96].

Ces études mettent en évidence que des fluctuations en température très rapides ont lieu au voisinage des sources de chaleur. De plus, elles valident les résultats théoriques issus de modèles de transfert de chaleur à l'échelle nanométrique démontrant que la température au voisinage des nanosources de chaleur est bien plus élevée que dans le milieu environnant [96] [95] [94].

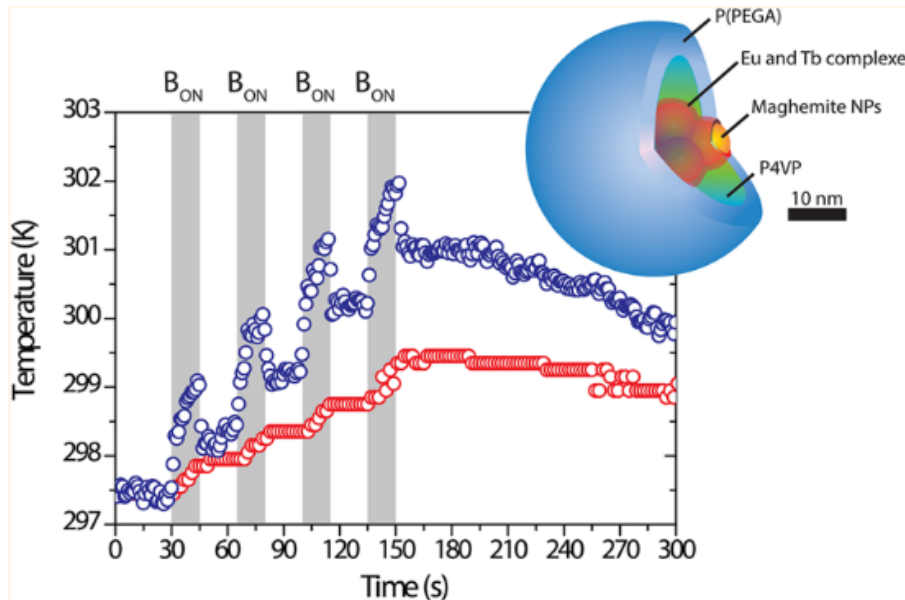


Figure I-2 : 4 cycles ON-OFF (en gris) du champ magnétique sont appliqués à la structure couplée nanothermomètre-nanosource de chaleur. La température mesurée grâce au rapport d'intensité des émissions Eu^{3+} et Tb^{3+} est représentée en bleu. La température mesurée par une sonde à fibre optique immergée dans la suspension est représentée en rouge. Les sources de chaleur sont les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Elles sont localisées au cœur de la structure.

II. Présentation de l'étude

II.1. Objectifs

L'objectif de la partie expérimentale de ce chapitre est d'établir une preuve de concept de l'utilisation du **nanothermomètre Ag₂S**, optimisé dans le chapitre 2, pour mesurer des variations de température locale au voisinage d'une source de chaleur. Pour satisfaire cet objectif, nous devons développer les dispositifs expérimentaux permettant de faire des mesures de nanothermométrie en temps réel pendant l'excitation optique et magnétique des sources de chaleur. Ces dispositifs expérimentaux sont les suivants : (i) le système couplé de particules nanothermomètre - nanosource de chaleur ; (ii) le système instrumental couplant un détecteur de photoluminescence aux sources d'excitation optique et magnétique.

II.2. Dispositifs expérimentaux

II.2.a. Le système nanothermomètre - nanosource de chaleur

Le nanothermomètre utilisé pour ce travail est le composé Ag₂S optimisé dans le chapitre 2. Les nanosources de chaleur sélectionnées pour ce travail sont les **nanosphères de maghémite**³⁷. Au laboratoire, trois tailles (diamètre) de nanoparticules, issues de synthèses par coprécipitation, sont disponibles en grande quantité : 7 nm, 12 nm et 30 nm [51]. Nous avons sélectionné les nanosphères de 12 nm de diamètre (figure II-1). Nous étudions le système de nanoparticules Ag₂S et γ -Fe₂O₃ en suspension aqueuse (section III) et en milieu cellulaire (section IV).

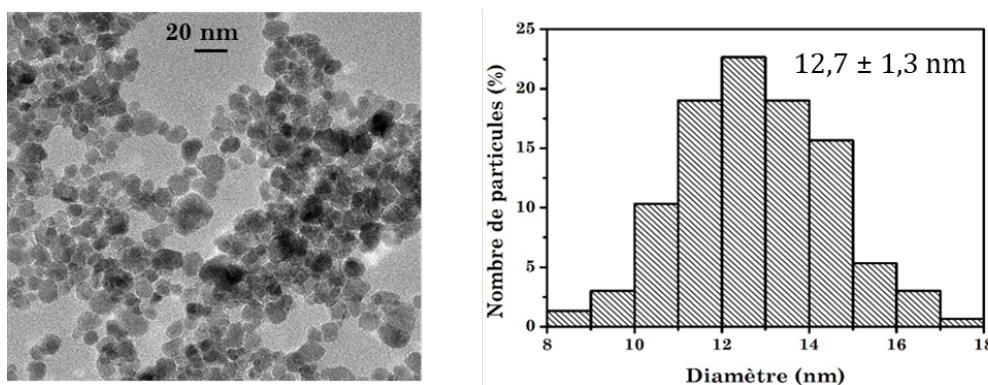


Figure II-1 : Cliché de Microscopie électronique en transmission et diagramme de distribution en tailles des γ -Fe₂O₃ sélectionnés pour notre étude.

³⁷ Nous ne cherchons pas à atteindre des températures élevées grâce à l'excitation des sources de chaleur.

II.2.b. Le dispositif instrumental couplant un détecteur de photoluminescence et les sources d'excitation optique et magnétique

Les expériences d'hyperthermie magnétoinduites ont été réalisées grâce à un dispositif expérimental (figure II-2) installé dans une salle optique mise à disposition par **Bruno VIANA** à Chimie Paris. Ce dispositif a été développé durant mes trois années de thèse par **Corinne CHANEAC** (LCMCP), **Florence GAZEAU** (MSC Med), **Bruno VIANA** (Chimie Paris) et moi-même. Il est constitué d'un appareil (magneTherm) commercialisé par la société nanoTherics pour les essais précliniques d'hyperthermie magnétique (annexe A.I.3). C'est un circuit RLC dont la bobine génère un champ magnétique alternatif. Nous avons travaillé avec deux champs magnétiques de fréquence et d'amplitude différentes en changeant la capacité et la bobine sur le circuit RLC. Les paramètres de champ magnétique mis en jeu dans notre étude sont renseignés dans le **tableau II-1**.

Tableau II-1 : Paramètres de champ magnétique mis en jeu dans notre étude

Amplitude du champ magnétique	Fréquence du champ magnétique
9,5 kA.m ⁻¹ 120 Gauss 12 mT	925 kHz
15,9 kA.m ⁻¹ 200 Gauss 20 mT	487 kHz

Au laboratoire, avec l'aide de **Jean-François ENGRAND** (Chimie Paris), nous avons adapté le magneTherm pour pouvoir réaliser les expériences de nanothermométrie en temps réel pendant l'excitation magnétique. Initialement, l'ergonomie du magneTherm ne permettait pas un couplage facile avec notre détecteur opérant dans le proche infrarouge (caméra hyperspectrale PyLoN-IR, Princeton) et la source d'excitation des nanothermomètres (LED-730 nm). Nous avons besoin de plus de degrés de liberté dans l'espace pour réaliser l'alignement du montage optique et optimiser le rapport signal/bruit pour la photoluminescence des Ag₂S. Nous avons donc fait le choix de rallonger les fils du circuit électrique pour sortir la bobine et la capacité de l'enceinte du magneTherm et opérer à l'extérieur de l'instrument.

De l'eau circule à l'intérieur de la bobine pour la refroidir, car elle est alimentée par un courant élevé (entre 3,4 A et 7,3 A) et à haute fréquence. Un chiller nous a été gracieusement prêté par **Anikitos GAROFALAKIS** de la société BiospaceLab pour contrôler la température de l'eau circulant (en système fermé pour éviter le gaspillage) à l'intérieur de la bobine. Ce système de refroidissement pourrait également servir de thermostat pour contrôler la température initiale des échantillons. Néanmoins, dans nos expériences, le diamètre de la bobine est grand devant celui du contenant (cuvette optique, eppendorf) des échantillons (figure II-2 c) et nous ne sommes pas parvenus à contrôler parfaitement la température initiale de nos échantillons. Ce sera à optimiser dans le futur. Plusieurs porte-échantillons (pour cuvette optique et eppendorfs) en plexiglas ont été conçus sur mesure par **Jacques ABIVEN** (merci Papa !) pour les besoins de nos expériences (figure II-2). Le volume des échantillons introduits à l'intérieur de la bobine (100 µL) a été choisi de manière à minimiser les effets dus aux inhomogénéités du champ. C'est également un volume de travail adapté pour les culots cellulaires avec lesquels nous allons travailler dans la **section IV** de cette partie de chapitre.

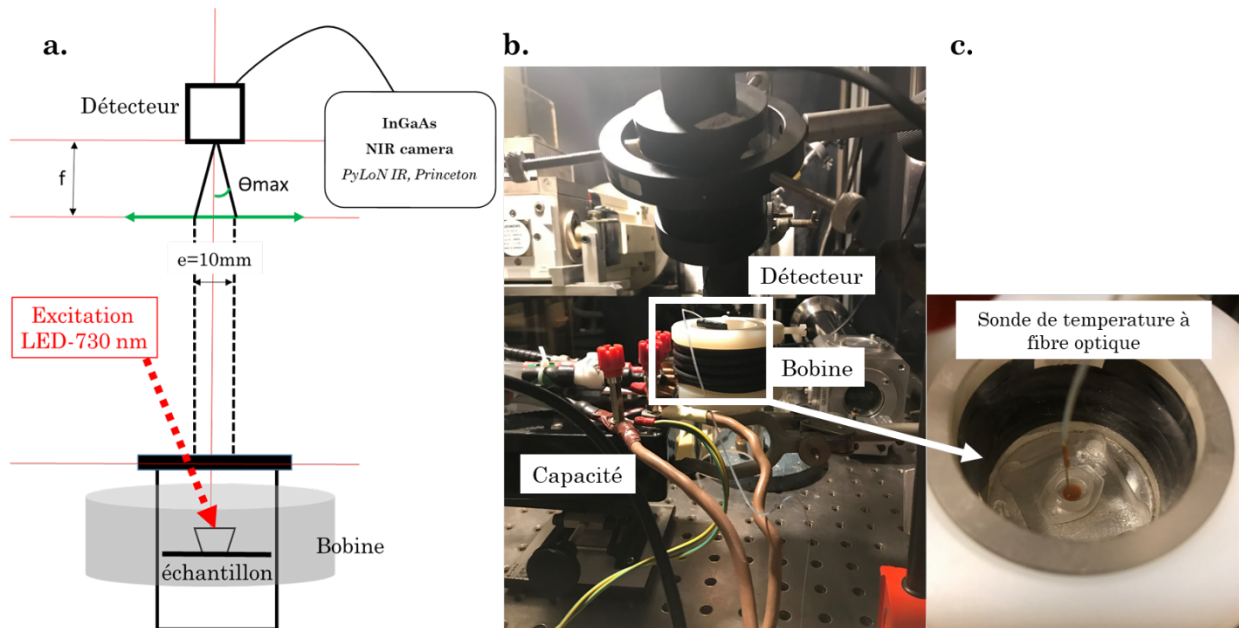


Figure II-2 : Dispositif d'hyperthermie magnétoinduite (magneTherm, nanoTherics) couplé à la caméra hyperspectrale (PyLoN-IR, Princeton) conçu pour nos expériences.

II.3. Étalonnage du nanothermomètre

II.3.a. Démarche expérimentale

Le montage expérimental utilisé pour l'étalonnage du nanothermomètre (figure II-3) est différent que celui utilisé pour les expériences d'hyperthermie (figure II-2). Nous réalisons la calibration du nanothermomètre, à partir d'une suspension aqueuse³⁸ de 0,7 mL à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹. Elle est contenue dans une cuvette optique placée à l'intérieur d'un support de cuve chauffant (Quantum Northwest). L'échantillon est illuminé grâce à une LED-730 nm. La détection du signal de photoluminescence se fait grâce à une fibre optique placée avec un angle de 90° par rapport à la direction d'illumination de l'échantillon. Un filtre passe-haut 1000 nm est utilisé à l'entrée de la fibre optique pour s'affranchir de la détection de signaux parasites. La température initiale (contrôlée grâce au support de cuve chauffant) de la suspension est de 25°C. À partir de cet état initial, une rampe de montée température de 0,7°C.min⁻¹ est imposée à l'échantillon grâce au support de cuve chauffant (Quantum Northwest). Une mesure de température globale est réalisée, grâce à une sonde de température à fibre optique (OTG-MPK5 d'Opsens Solutions) à intervalle de temps régulier. Pour chaque spectre de photoluminescence enregistré, le rapport d'intensité p_1 est mesuré. Nous avons sélectionné ce paramètre de photoluminescence grâce à une étude présentée dans le chapitre 1. Nous rappelons que p_1 est tel que :

$$p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

Le paramètre de photoluminescence p_1 est ensuite tracé en fonction de la température globale mesurée par la sonde de température à fibre optique. La correspondance entre la température globale et le paramètre de photoluminescence est calculé à partir du temps de mesure. La procédure de calibration est donnée **figure II-4**. La méthode de traitement des données est donnée en **annexe B.II.2**.

³⁸ Nous nous plaçons dans les conditions expérimentales correspondant à une profondeur de signal nulle. Cette notion sera détaillée dans le chapitre 4.

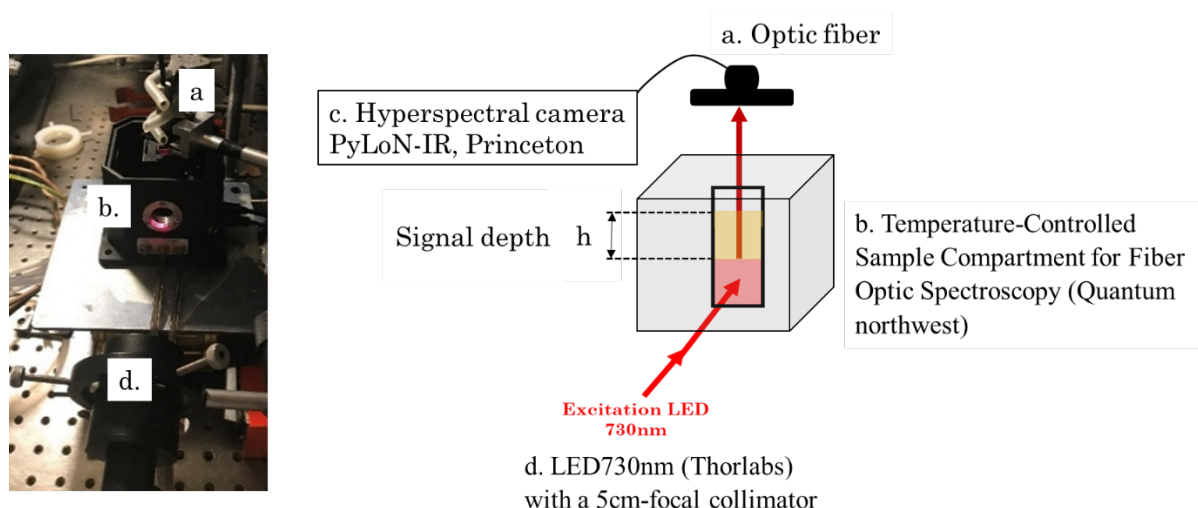


Figure II-3 : Montage optique utilisé pour la calibration du nanothermomètre

La dépendance du rapport d'intensité p_1 à la température est modélisée par une fonction affine. Ce modèle d'étalonnage nous permet, dans la phase d'utilisation du nanothermomètre, de remonter à la température de cœur des nanothermomètres à partir du rapport d'intensité p_1 extrait du spectre d'émission de photoluminescence. Le spectre de photoluminescence des nanocristaux semi-conducteurs d'Ag₂S est caractéristique de leur température du cœur. Dans cette étude, nous faisons l'hypothèse que la température de la suspension est égale à la température de cœur des nanoparticules de sulfure d'argent. Cette hypothèse peut être discutée, mais en première approximation elle nous paraît acceptable. En effet, la source d'excitation illumine la suspension d'Ag₂S avec une densité de puissance de $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-1}$ et nous nous plaçons en régime dilué avec $[\text{Ag}_2\text{S}] = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Nous réalisons l'étalonnage de la sonde Ag₂S par rapport au paramètre de photoluminescence p_1 à chaque session expérimentale pour nous affranchir des effets d'alignements entre la caméra et le monochromateur ayant une influence sur la forme du spectre d'émission des Ag₂S (annexe A.I.2). Les expériences présentées dans les sections III.2 et IV ont été réalisées au cours de la même session expérimentale (même alignement entre la caméra et le monochromateur). Le même modèle d'étalonnage est donc utilisé. En revanche, pour l'expérience de la section III.3, le modèle d'étalonnage est ajusté puisqu'il s'agit d'une session expérimentale ultérieure.

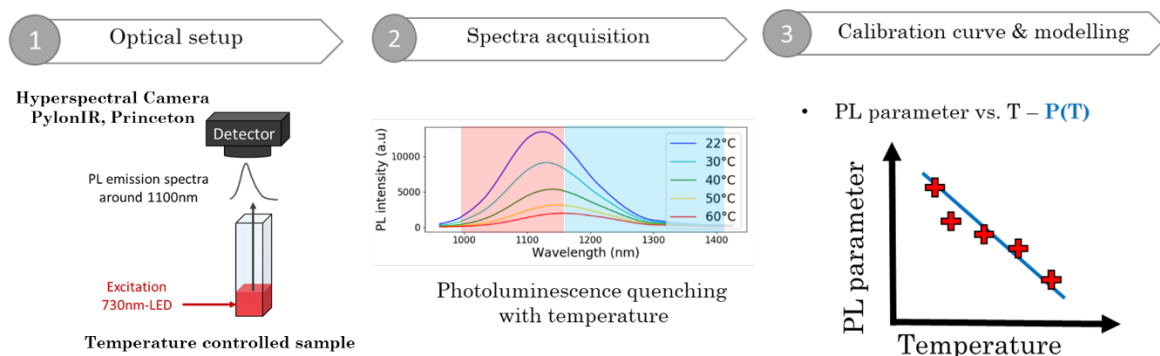


Figure II-4 : Procédure de calibration d'un nanothermomètre.

II.3.b. Remarques

Pour les expériences d'hyperthermie, nous souhaitons connaître à la température interne des Ag_2S , évoluant spontanément au voisinage des nanosources de chaleur ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) soumis à une excitation optique et magnétique. Pour cela, nous utilisons l'étalonnage du nanothermomètre établi sur p_1 à partir d'une suspension d'étalonnage contenant seulement les nanoparticules d' Ag_2S à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (sans $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). En effet, pour la calibration du nanothermomètre, nous devons contrôler sa température de cœur. Nous le faisons de manière indirecte en contrôlant la température de la suspension grâce à un support de cuve chauffant (Quantum Northwest) et en illuminant l'échantillon avec une faible densité de puissance (1 mW.cm^{-1}). Dans ces conditions, nous faisons l'hypothèse de travail que la température globale de la suspension de calibration (mesurée grâce à une sonde infrarouge plongeant dans la suspension) est égale à la température de cœur des nanothermomètres. En présence des sources de chaleur $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, nous ne pourrions pas contrôler la température de cœur des Ag_2S , les nanoparticules de maghémite, excitées optiquement, induisent des variations spontanées de la température des nanothermomètres comme nous le verrons par la suite.

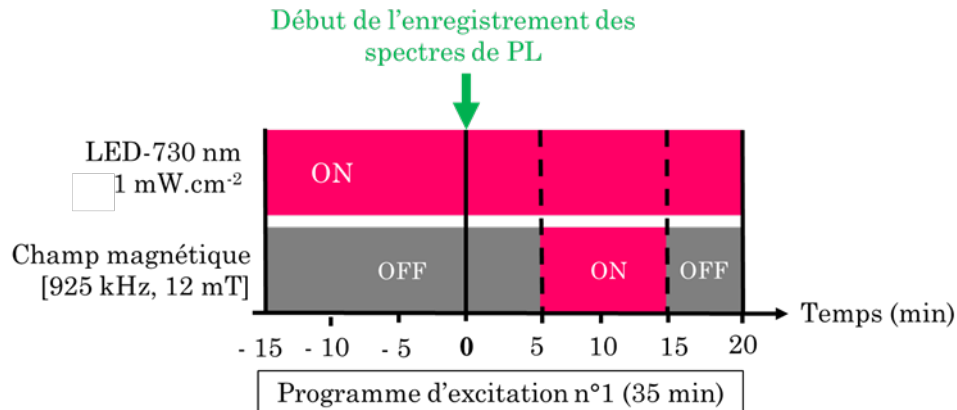
II.4. Programmes d'excitation

Dans nos expériences d'hyperthermie, la température des échantillons est mesurée d'une part grâce à une fine sonde infrarouge plongeant dans l'échantillon (figure II-2 c). Cette température est appelée **température globale** dans la suite de ce manuscrit. D'autre part, nous exploitons le signal de photoluminescence émis par le nanothermomètre de référence (optimisé dans le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse) grâce à un modèle d'étalonnage établi sur le paramètre de photoluminescence p_1 . Cette mesure de température est appelée **température locale** dans la suite de ce travail. La température globale et la température locale ont été mesurées en différé en réalisant deux expériences dans les mêmes conditions (composition de l'échantillon, programme d'excitation).

Pendant toute la durée de nos expériences d'hyperthermie magnétoinduite, les échantillons sont soumis à une excitation optique (LED-730 nm à 1 mW.cm^{-2}). L'excitation optique est nécessaire pour obtenir l'information sur la température locale résultant du traitement des spectres de PL des Ag_2S . Dans cette étude, deux programmes d'excitation des échantillons sont établis. Le **programme d'excitation n°1** est utilisé dans les sections III.2 et IV. Le **programme d'excitation n°2** est appliqué dans la section III.3.

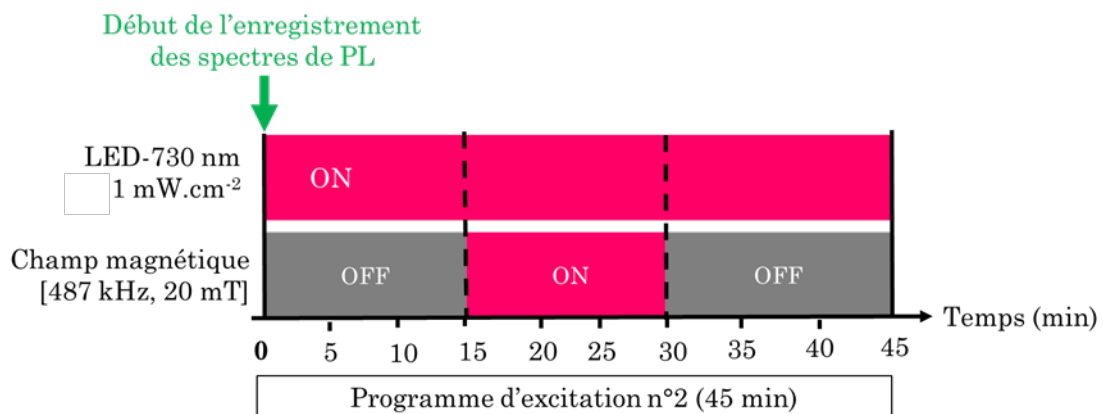
Programme d'excitation n°1 (35 min)

Pendant les 35 min d'expérience, les échantillons sont excités optiquement avec une LED-730 nm à une densité de puissance de 1 mW.cm^{-2} . 15 min après le début de l'excitation optique, nous lançons l'enregistrement du signal de photoluminescence des Ag_2S (Annexe A.III.2). Un spectre est acquis toutes les 10 secondes pendant 20 min. 5 min après le début de l'enregistrement des spectres de photoluminescence des Ag_2S , un champ magnétique haute fréquence [925 kHz, 12 mT] est mis en marche pendant 10 min.



Programme n°2 (45 min)

Pendant les 45 min d'expérience, les échantillons sont excités avec une LED-730 nm à une densité de puissance de 1 mW.cm^{-2} . À l'instant initial, $t = 0$, nous allumons la source d'excitation optique et nous démarrons simultanément l'enregistrement des spectres de PL des Ag_2S . À $t = 15$ min, un champ magnétique haute fréquence [487 kHz, 20 mT] est mis en marche pendant 15 min.




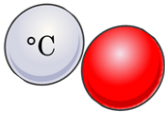
III. Mesures de températures locales en suspension aqueuse

III.1. Description du système nanothermomètre-nanosource de chaleur

III.1.a. Démarche expérimentale

Il nous a semblé important d'établir une première preuve de concept de mesure de température, grâce aux nanoparticules d'Ag₂S, au voisinage de nanoparticules de γ -Fe₂O₃ en milieu aqueux. En effet, les études en milieu cellulaire nécessitent un investissement important en ressources (temps, matériels) logistiques et expérimentales. Tout d'abord, les expériences en milieu aqueux nous ont permis d'optimiser le dispositif expérimental et de valider la performance des Ag₂S dans la mesure de température au voisinage des sources de chaleur. Enfin, nous avons pu tester le pouvoir de chauffe des γ -Fe₂O₃ pour plusieurs paramètres de champ magnétique. Les échantillons mis en jeu dans cette étude en milieu aqueux sont référencés dans le **tableau III-1**.

Tableau III-1 : Référencement des échantillons. L'échantillon Ag₂S contient 20 μ g d'Ag₂S et 0 μ g de Fe. L'échantillon Ag₂S- γ -Fe₂O₃ contient 20 μ g d'Ag₂S et 420 μ g de Fe, soit un rapport massique Fe/Ag₂S de 21.

Échantillon	H ₂ O	Ag ₂ S	Ag ₂ S- γ -Fe ₂ O ₃
Symbole	∅		
Volume (μ L)	100	100	100
[Ag ₂ S] (mg.mL ⁻¹)	0	0,2	0,2
m(Ag ₂ S) (μ g)	0	20	20
[Fe] (mg.mL ⁻¹)	0	0	4,2
m(Fe) (μ g)	0	0	420
Fe/Ag ₂ S (%w)	-	-	21

III.1.b. Proportion de nanoparticules Ag₂S et γ -Fe₂O₃ dans le mélange aqueux

Le nanothermomètre Ag₂S possède une surface chargée négativement. En effet, la fonction acide carboxylique de l'acide 11-mercaptopdecanoïque (11MUA) est déprotonée à pH > 4,5 pour donner la fonction carboxylate. Les nanoparticules sont donc stables en suspension aqueuse lorsque le pH est supérieur à 4,5. Par ailleurs, les nanoparticules de γ -Fe₂O₃ « nues » (sans ligand de surface) sont stables en milieu acide (le pH de la suspension mère à 42 g.L⁻¹ vaut 2,4). Des forces de répulsions électrostatiques s'exercent entre les nanoparticules de même charge (dont la charge globale de surface est positive à pH = 2,4) en équilibre avec les forces attractives de Van der Waals (modèle DLVO). Lors du mélange des deux suspensions de particules, le pH augmente, la charge de surface des particules de maghémite diminue et les nanoparticules précipitent. Or, nous avons une contrainte importante sur les proportions du mélange de nanoparticules Ag₂S et γ -Fe₂O₃. Le mélange final doit être stable, car les expériences de nanothermométrie durent entre 45 min et 1 h. Une évolution de la stabilité colloïdale du mélange au cours du temps engendrerait un biais important pour nos expériences. La précipitation des Ag₂S conduirait à une extinction de l'intensité de PL détectée sans lien avec la température. La précipitation des γ -Fe₂O₃ engendrerait une évolution de leur pouvoir de chauffe (SLP) et une modification importante de la distribution spatiale des points chauds dans le milieu. Nous avons testé trois rapports massiques Fe/Ag₂S (21, 15 et 5). Seul le mélange Fe/Ag₂S=21

(pH=5) reste stable pour une durée supérieure à 1h (figure III-1). Nous avons sélectionné ce mélange pour notre étude.

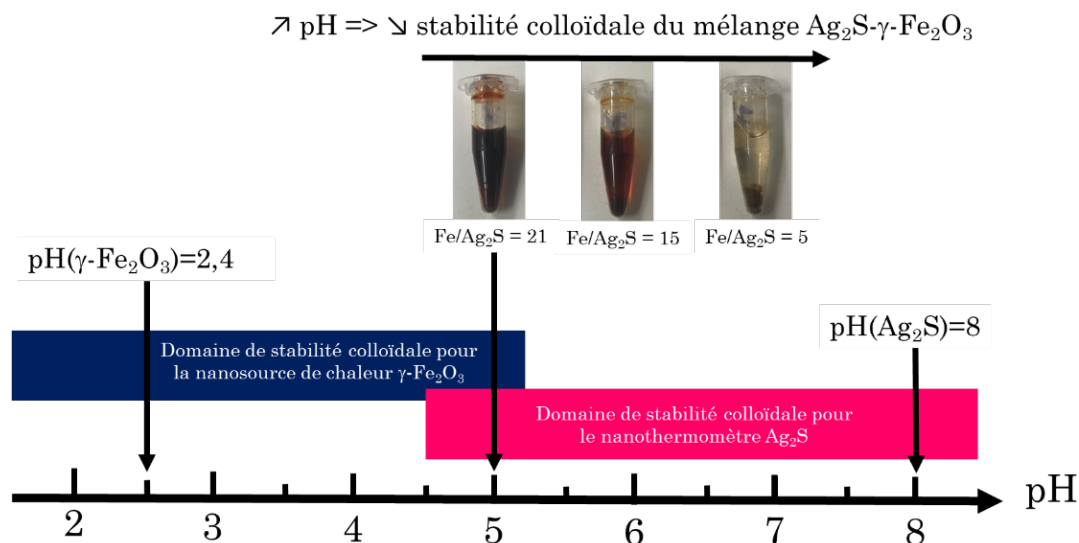


Figure III-1 : Trois rapports massiques Fe/Ag₂S ont été testés (5, 15 et 21). Pour obtenir les trois mélanges, 60 μL d'Ag₂S à 6,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ont respectivement été mélangés à 50 μL (pour Fe/Ag₂S=5) ; 150 μL (pour Fe/Ag₂S=15) et 200 μL (pour Fe/Ag₂S = 21) de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ([Fe]=42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et 1,89 mL ; 1,79 mL et 1,74 mL d'eau distillée, respectivement. Le mélange Fe/Ag₂S = 21 dont le pH vaut 5 présente une bonne stabilité colloïdale. Il est sélectionné pour notre étude.

III.1.c. Localisation des nanothermomètres par rapport aux sources de chaleur

Pour interpréter les résultats de nos expériences de nanothermométrie et les mesures de température locale, il est important de localiser les Ag₂S par rapport aux $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En suspension aqueuse, les nanothermomètres (Ag₂S) et les sources de chaleur ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont couplés grâce aux interactions électrostatiques dues aux charges de surface. Les Ag₂S (enrobée de 11MUA) possèdent une surface chargée négativement. Le potentiel zéta de ces nanoparticules vaut -36 mV. Les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (sans ligand de surface) possèdent une surface chargée positivement. Leur potentiel zéta vaut 40 mV. Lorsque les Ag₂S et les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont mélangés en suspension aqueuse (Ag₂S $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans les proportions massiques Fe/Ag₂S=21, tableau 2), nous vérifions leur colocalisation de la manière suivante :

Trois échantillons sont étudiés grâce à la caméra d'imagerie proche infrarouge (Princeton) disponible à la faculté de Pharmacie de Paris Descartes (équipe UCTBS). Le premier échantillon est une suspension aqueuse d'Ag₂S (nanothermomètre de référence) (figure III-2 a). Lorsque cet échantillon est excité avec un laser 808 nm, un signal de PL est détecté. Aucune évolution spatiale du signal de PL des Ag₂S n'est observée 30 min après avoir placé un aimant à côté de l'éppendorf. Le second échantillon est une suspension aqueuse de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (figure III-2 b). Lorsque cet échantillon est excité avec un laser 808 nm, aucun signal de PL n'est détecté. En revanche, contrairement au premier échantillon, nous observons visuellement que les nanoparticules sont attirées par l'aimant déposé à côté de l'éppendorf. Le troisième échantillon est une suspension aqueuse de Ag₂S- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ([Ag₂S]=0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et [Fe]= 4,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).(figure III-2 c). Sous excitation laser 808 nm, nous détectons un signal de PL, caractéristique de la présence des Ag₂S. De plus, le signal de PL évolue spatialement en direction de l'aimant placé à côté de l'éppendorf.

L'expérience décrite ci-dessus montre que pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, les Ag_2S sont contraints spatialement au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Néanmoins, pour cet échantillon, nous ne parvenons pas à localiser les nanoparticules de Ag_2S parmi les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ par microscopie électronique en transmission (figure III-2 c) du fait de leur faible différence de taille et des morphologies similaires. L'analyse EDS nous a permis de démontrer la présence des éléments fer et argent, caractéristique de la présence des nanoparticules Ag_2S et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sein de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($[\text{Ag}_2\text{S}]=0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $[\text{Fe}]=4,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), (figure III-3).

Pour l'échantillon d'étude $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (dans les proportions massiques $\text{Fe}/\text{Ag}_2\text{S}=21$), les nanoparticules de Ag_2S sont contraintes au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Nous appellerons « température à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ » une mesure de température obtenue en exploitant le signal de PL des Ag_2S . En première approximation, nous pouvons considérer que la distance nanothermomètre-nanosource de chaleur correspond à la longueur de la molécule de ligand (11MUA) enrobant les Ag_2S et assurant leur couplage électrostatique avec les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La longueur du 11MUA est de 1,71 nm [97].

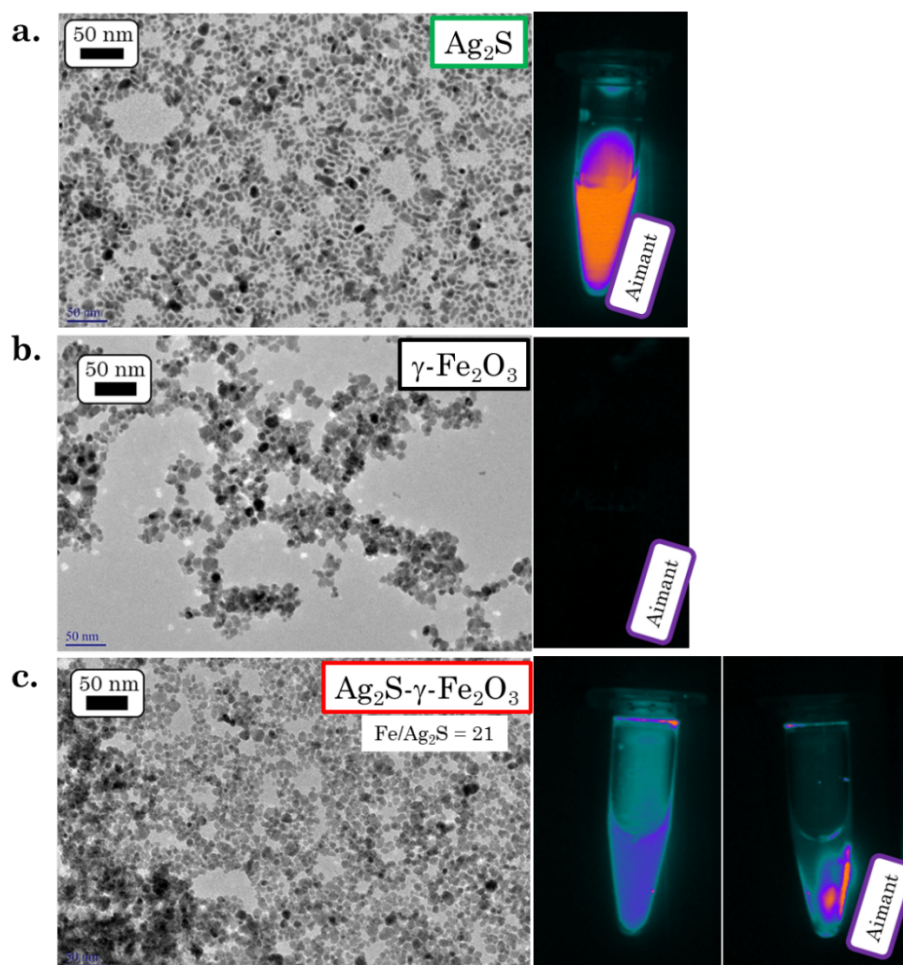


Figure III-2 : Démonstration de la contrainte spatiale des Ag_2S vis-à-vis des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Les clichés de Microscopie électronique en transmission et le suivi spatial du signal de PL lorsqu'un aimant est placé à côté des eppendorfs pendant 30 min sont présentés pour (a) le nanothermomètre Ag_2S , (b) la source de chaleur $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et (c) le mélange $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

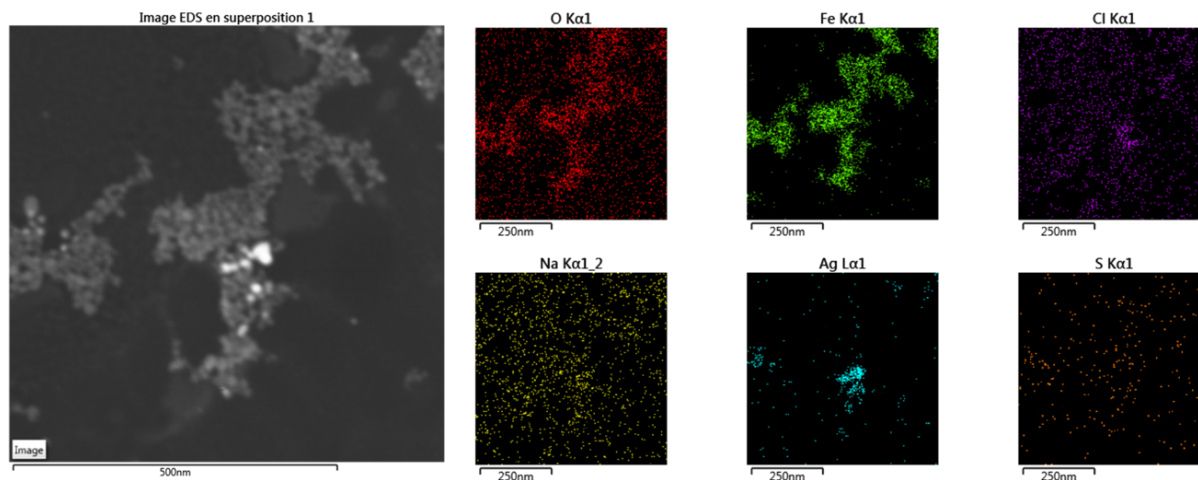


Figure III-3 : Cartographie EDS (spectroscopie à dispersion d'énergie) de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en suspension aqueuse. Analyse réalisée par Sandra CASALE du Laboratoire de Réactivité des Surfaces (LRS) à Sorbonne Université. Nous observons la présence des éléments fer et argent caractéristiques de la présence des nanoparticules Ag_2S et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sein de l'échantillon. Néanmoins, l'organisation des deux types de nanoparticules n'est pas contrôlée.

III.1.d. Propriétés optiques des échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Prérequis pour la mesure de température à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ grâce au signal de photoluminescence des Ag_2S

Pour pouvoir utiliser la courbe de calibration du nanothermomètre Ag_2S , la présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ne doit pas engendrer de déformation spectrale du signal de photoluminescence émis par l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Ce critère est validé dans nos conditions expérimentales (figure III-4). En effet, les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ n'absorbent pas dans la fenêtre d'émission des nanothermomètres (1000 nm – 1200 nm) (figure III-4).

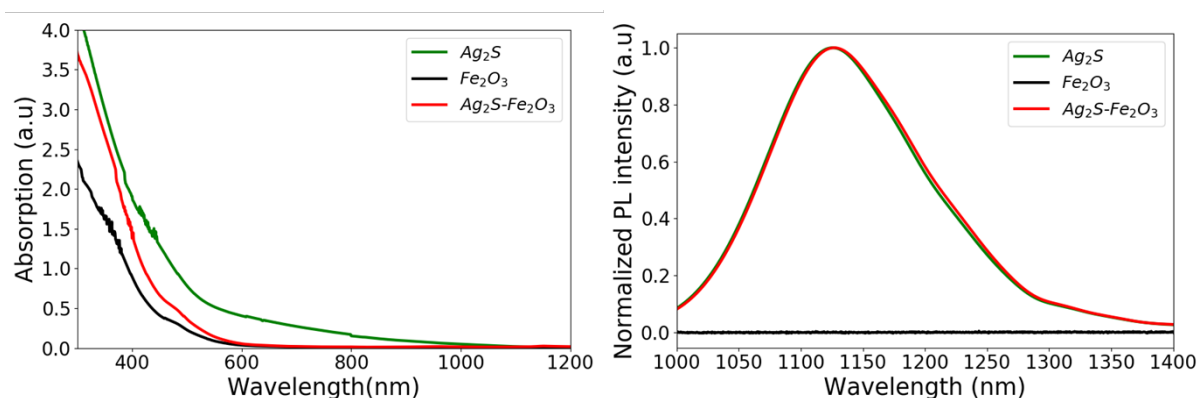


Figure III-4 : Spectres d'absorption et d'émission de photoluminescence des trois échantillons mis en jeu dans cette étude : Ag_2S ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($[\text{Fe}] = 4,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($[\text{Ag}_2\text{S}] = 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $[\text{Fe}] = 4,2 \text{ mg.mL}^{-1}$). Une absence d'émission de PL est constatée pour les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Les spectres de PL (normalisés par rapport à leur maximum d'intensité respectif) de Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont superposés à 25°C . La courbe d'étalonnage de Ag_2S peut être utilisée pour mesurer la température à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Évolution de la température globale des échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sous excitation optique

• Description de l'expérience

Dans cette expérience préliminaire, nous étudions la réponse à l'excitation optique des échantillons H_2O , Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (présentés dans le tableau III-1). Nous mesurons la température **globale** des suspensions grâce à une sonde à fibre optique (figure II-2 c) au cours d'un cycle ON-OFF d'excitation optique (LED-730 nm à $1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) (figure III-5).

• Observations

Après 10 min d'excitation optique ($t = 15 \text{ min}$) nous mesurons une élévation de $0,5^\circ\text{C}$ de la température globale de l'échantillon H_2O (en noir, figure III-5). L'eau, le milieu de dispersion des nanoparticules, est donc peu sensible à nos conditions d'excitation optique. Entre $t=5 \text{ min}$ et $t=15 \text{ min}$ (correspondant à 10 min d'excitation optique), l'élévation de la température globale mesurée pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($[\text{Ag}_2\text{S}]=0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $[\text{Fe}]=4,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) est de 4°C (en rouge, figure III-5). Cette augmentation de température, résultant de l'excitation optique des Ag_2S et des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, est 50% plus importante que celle (2°C) résultant de l'excitation optique des Ag_2S ($[\text{Ag}_2\text{S}]=0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) seules dans les mêmes conditions d'excitation (en vert, figure III-5). **Les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($[\text{Fe}]=4,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et les Ag_2S ($[\text{Ag}_2\text{S}]=0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) participent donc à l'élévation de température globale de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.**

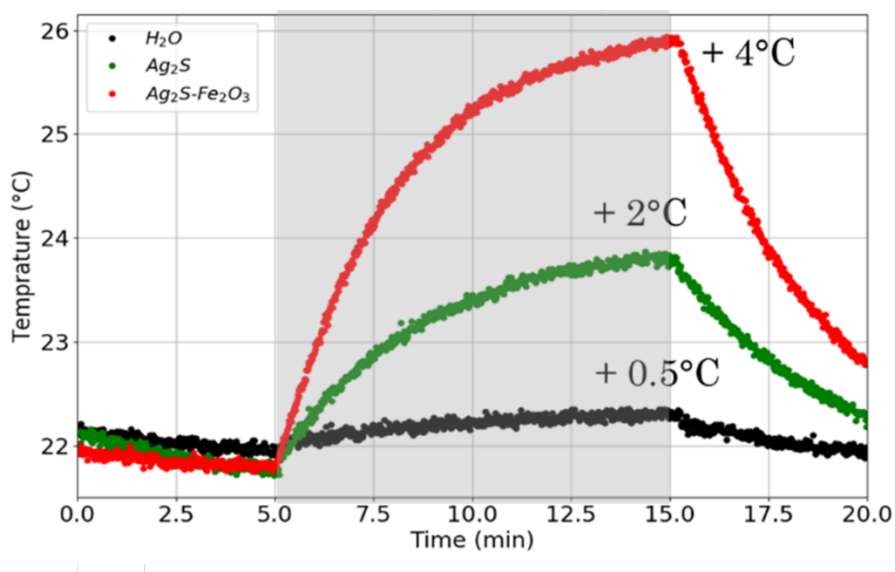


Figure III-5 : Dans cette expérience, nous étudions la réponse à l'excitation optique des échantillons présentés dans le tableau 2. Nous mesurons la température **globale** de la suspension grâce à une fine sonde à fibre optique (figure 7 c) au cours d'un cycle ON-OFF d'excitation optique (LED-730 nm à $1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Entre $t = 5 \text{ min}$ et $t = 15 \text{ min}$, en gris, la LED est allumée.

III.2. Programme d'excitation n°1

III.2.a. Description de l'expérience

Nous appliquons le programme d'excitation n°1 décrit dans la **section II.4.** aux échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (présentés dans le tableau III-1). Dans cette expérience la température globale est celle mesurée par la sonde de température plongeante alors que la température locale correspond à celle déduite de la photoluminescence des nanoparticules d' Ag_2S . L'enregistrement des spectres de photoluminescence des Ag_2S (à $t = 0$) commence 15 min après le début de l'excitation optique. À $t = 5$ min, un champ magnétique haute fréquence [925kHz, 12mT] est mis en marche pendant 15 min. Pour les échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, une acquisition des spectres de PL est effectuée toutes les 10 secondes pendant 20 min. Pour chaque spectre enregistré, le rapport d'intensité p_1 est calculé. Les températures internes des Ag_2S associées aux valeurs de p_1 sont obtenues grâce au modèle d'étalonnage suivant :

$$T(p_1) = -73,7 p_1 + 98,7 \text{ avec } p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda} \quad (\text{i})$$

La procédure d'étalonnage du nanothermomètre a été décrite dans la **section II.3** de ce chapitre³⁹.

III.2.b. Résultats

Mesures de température globales

Les températures initiales ($t = 0$) des échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ valent respectivement 24°C et 26°C (figure III-6). Ces valeurs sont stables pendant les 5 premières minutes de l'expérience (excitation optique seule) pour les deux échantillons (figure III-6). À $t=5$ min, au moment où le champ magnétique est mis en fonctionnement, les deux suspensions sont donc à l'équilibre thermique (régime permanent). Dans cette expérience, le découplage des contributions des excitations optique et magnétique dans l'évolution de la température globale est possible. L'excitation magnétique [925kHz, 12mT] de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, pendant 10 min, engendre une élévation de la température globale de 1°C ($T(t = 15 \text{ min}) = 27^\circ\text{C}$). Dans les conditions d'excitation du programme n°1, la présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ engendre une élévation totale (à $t = 15$ min) de la température **globale** de 3°C par rapport à l'expérience réalisée avec les Ag_2S seules. L'excitation optique a une contribution de 67% (2°C) et l'excitation magnétique de 33% (1°C) dans l'élévation de température **globale** mesurée.

³⁹ Une suspension aqueuse de Ag_2S (0,7 mL à 0,5 mg.mL⁻¹) est excitée avec une LED-730 nm à 0,1 mW.cm⁻². La température de la suspension d'étalonnage est contrôlée grâce à un support chauffant.

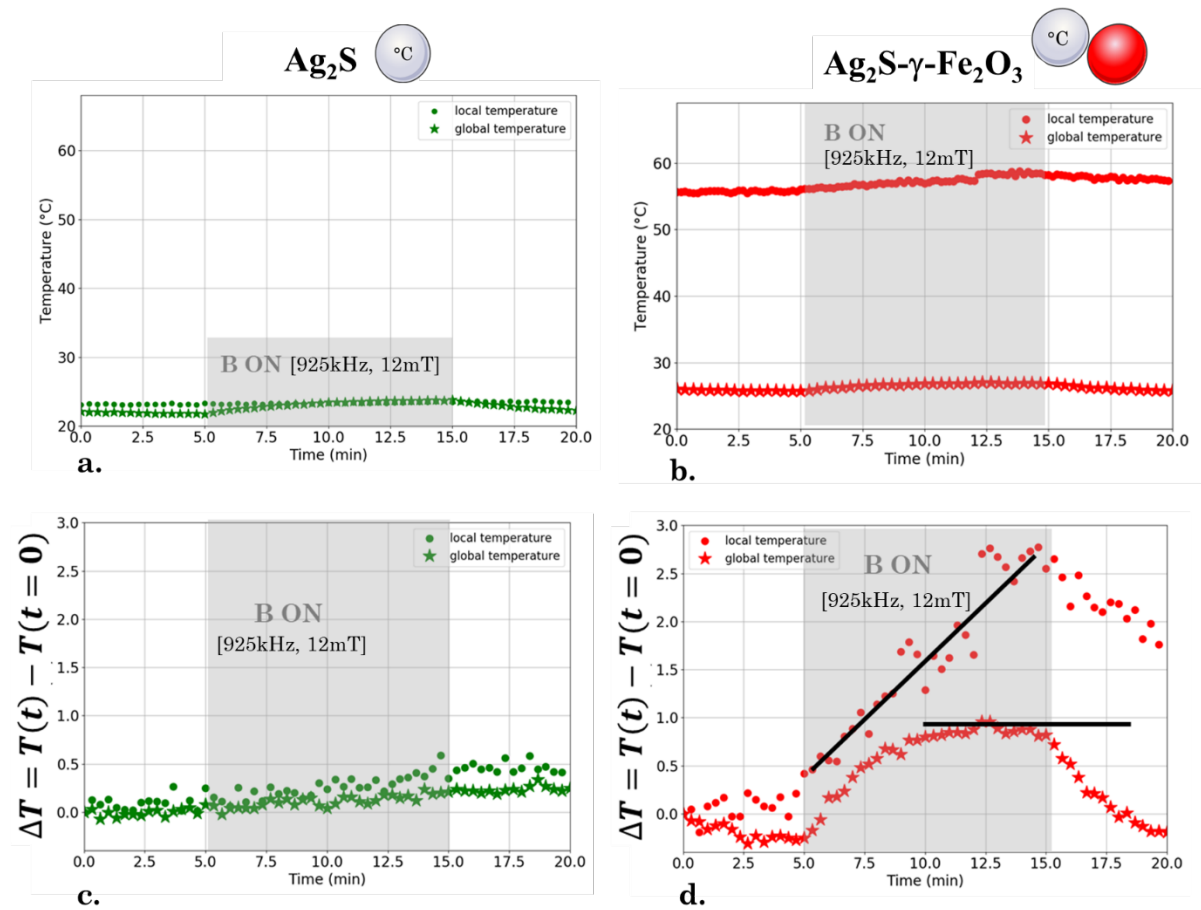


Figure III-6 : Les nanoparticules contenues dans les échantillons (a, c) Ag₂S et (b, d) Ag₂S- γ -Fe₂O₃ sont excitées optiquement (LED-730 nm à 1 mW.cm⁻²) de t = 0 à t = 20 min. L'excitation optique est allumée 15 min avant l'enregistrement du premier spectre de PL des Ag₂S. Nous n'avons donc pas accès au régime transitoire vis-à-vis de l'excitation optique. Entre t=5 min et t=15 min les échantillons sont excités avec un champ magnétique [925 kHz, 12 mT] (en plus de l'excitation optique). Les mesures de températures absolues (a, b) et relatives (c, d) effectuées grâce au spectre de PL des Ag₂S sont représentées.

Mesures des températures locales

Pour les échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, dans les conditions du programme d'excitation n°1, les températures mesurées correspondent à l'équilibre thermique après excitation optique.

Pour l'échantillon Ag_2S , les mesures de températures locales (entre $23,3^\circ\text{C}$ et $23,4^\circ\text{C}$) et globales (24°C) sont proches et constantes pendant toute la durée de l'expérience (figures III-6 a et c). Pour cet échantillon, les spectres de photoluminescence enregistrés lorsque le champ magnétique est mis en fonctionnement (à $t = 5$ min, spectre bleu) et lorsqu'il est éteint ($t = 15$ min spectre rouge) se superposent (figure III-8). La température de cœur des Ag_2S varie donc peu au cours de l'excitation magnétique lorsque ces nanoparticules sont seules en suspension aqueuse. En effet, le paramètre de photoluminescence p_1 reste globalement constant entre le début ($t = 5$ min) et la fin ($t = 15$ min) de la période d'excitation magnétoinduite (figure III-6 c). Les valeurs de p_1 mesurées correspondent (en appliquant le modèle d'étalonnage i) à une température locale de $23,3^\circ\text{C}$ au moment de la mise en marche du champ magnétique ($t=5$ min) et $23,4^\circ\text{C}$ au moment où il est éteint ($t=15$ min) (figure III-6 a).

En revanche, pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, lorsque les Ag_2S sont en présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, nous observons une diminution de photoluminescence caractéristique de l'augmentation de la température de cœur du sulfure d'argent (figure III-8). Les mesures du rapport d'intensité p_1 montrent une sensibilité de l'échantillon au champ magnétique. Entre $t = 5$ min et $t = 15$ min, p_1 diminue de 6% (figure III-7 b) correspondant à une augmentation de température locale de $2,7^\circ\text{C}$ (passant de $55,7^\circ\text{C}$ à $58,4^\circ\text{C}$) (figure III-6 d). Il est intéressant de noter que, pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, au moment où le champ magnétique est mis en fonctionnement, les vitesses de montée en température ($0,28^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) sont proches aux deux échelles (locale et globale) (figure III-6 d). En revanche, la température globale se stabilise 5 min après le début de l'excitation magnétique alors que la température mesurée grâce à la photoluminescence du sulfure d'argent reste en régime transitoire durant les 10 min d'excitation magnétique. Par ailleurs, au moment où le champ magnétique est éteint, la température décroît plus vite globalement dans le milieu ($0,35^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) que localement, au voisinage des nanosphères de maghémite ($0,2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure III-6 d). Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, les températures mesurées grâce au signal de PL émis par les Ag_2S (entre $55,7^\circ\text{C}$ et $58,4^\circ\text{C}$) sont environ deux fois plus élevées que les mesures de températures globales ($26^\circ\text{C} - 27^\circ\text{C}$) (figure III-6 b).

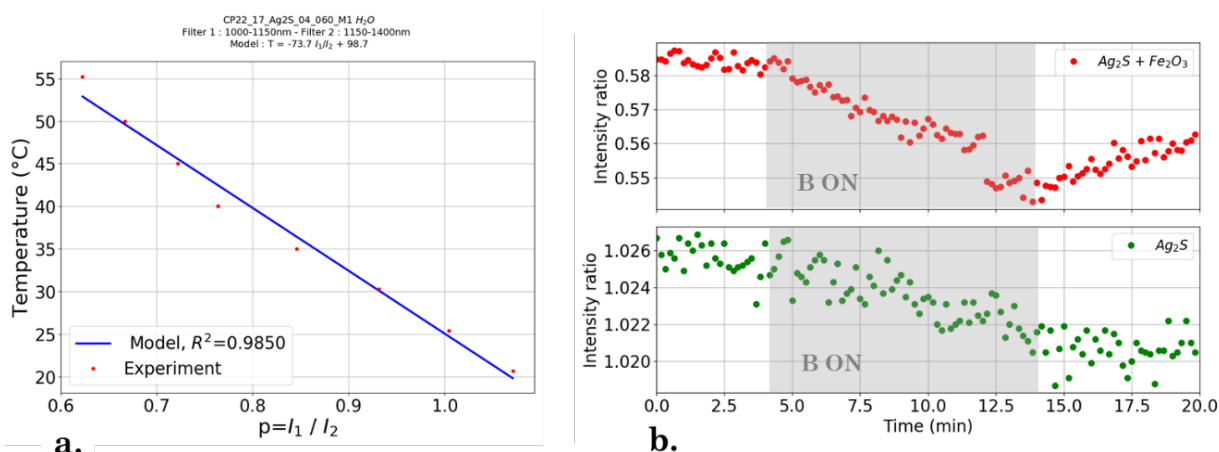


Figure III-7 : (a) Modèle d'étalonnage du nanothermomètre de référence pour le rapport d'intensité p_1 . (b) Variation du paramètre p_1 en fonction du temps pour les particules d' Ag_2S (en vert) et pour le mélange de particules $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (en rouge). L'instant initial $t = 0$ correspond au début de l'enregistrement des spectres de photoluminescence des Ag_2S . L'excitation optique est mise en fonctionnement 15 min avant l'instant $t=0$.

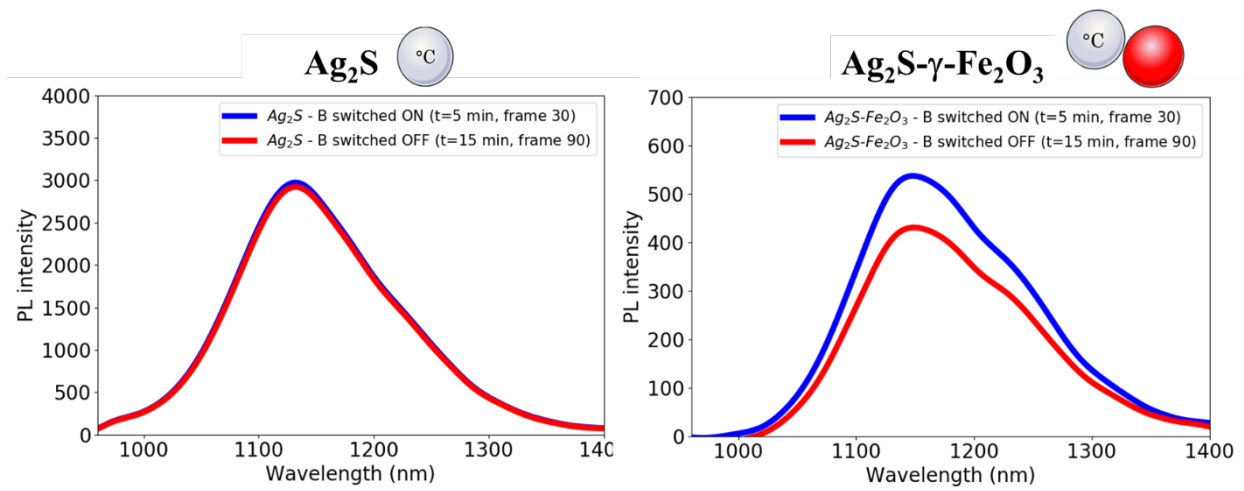


Figure III-8 : Les spectres de photoluminescence des sulfures d'argent sont représentés lorsque le champ magnétique est mis en fonctionnement (à $t=5$ min en bleu) et lorsqu'il est éteint ($t=15$ min en rouge). Nous considérons ici le programme d'excitation n°1. À gauche : les Ag_2S sont seules en suspension. À droite, les Ag_2S sont couplées électrostatiquement aux $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

III.2.c. Conclusion

Les températures locales (obtenues grâce au modèle d'étalonnage **i**) restent stables pendant les 5 premières minutes de l'expérience (excitation optique seule) pour les échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. À $t = 5$ min, au moment où le champ magnétique est mis en fonctionnement, les deux suspensions sont donc à l'équilibre thermique (régime permanent). Dans cette expérience, le découplage des contributions des excitations optique et magnétique dans l'évolution de la température locale est possible. Dans les conditions d'excitation du programme n°1, la présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ engendre une élévation totale (à $t = 15$ min) de la température **de cœur des Ag_2S de 35°C** par rapport à l'expérience réalisée avec les nanothermomètres seuls en suspension aqueuse. Pour cet échantillon, l'excitation optique a une contribution de 92% (32°C) et l'excitation magnétique de 8% (3°C) dans l'élévation de température mesurée grâce au signal de photoluminescence des nanothermomètres.

III.3. Programme d'excitation n°2

III.3.a. Description de l'expérience

Dans les conditions du programme d'excitation n°2 (décrit dans la section II.4), les échantillons sont excités optiquement pendant les 45 min d'expérience. La température globale des échantillons est suivie grâce à une sonde à fibre optique. À $t = 15$ min, un champ magnétique haute fréquence [487 kHz, 20 mT] est mis en marche jusqu'à $t = 30$ min. Dans cette expérience, nous allumons la source d'excitation optique et nous démarrons l'enregistrement des spectres de PL des Ag_2S simultanément, à l'instant initial ($t = 0$). Un spectre de photoluminescence est acquis toutes les 10 secondes et le paramètre p_1 est calculé pour chaque spectre. Les températures internes des Ag_2S associées aux valeurs de p_1 sont obtenues grâce au modèle d'étalonnage (figure III-9) suivant :

$$T(p_1) = -52.6 p_1 + 109 \text{ avec } p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda} \quad (\text{ii})$$

La procédure d'étalonnage du nanothermomètre a été décrite dans la **section II.3** de ce chapitre⁴⁰.

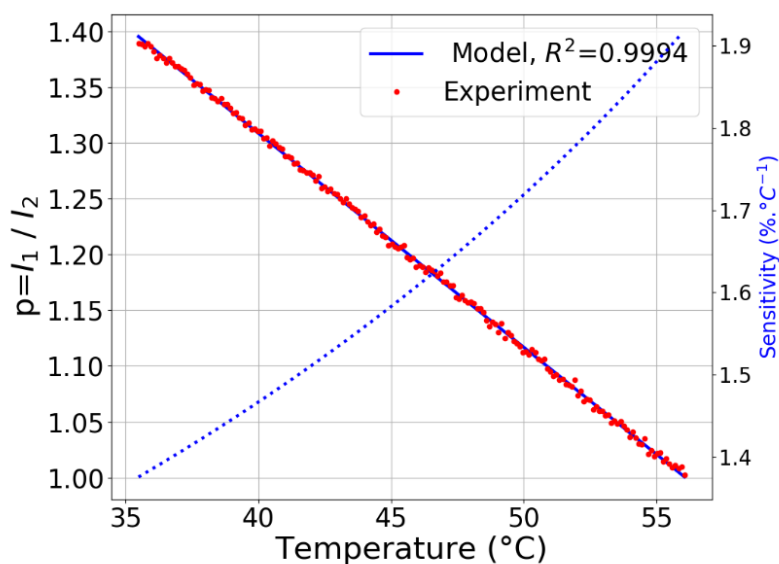


Figure III-9 : Modèle d'étalonnage $p_1(T)$ correspondant aux expériences du programme d'excitation n°2.

⁴⁰ Une suspension aqueuse d' Ag_2S ($0,7$ mL à $0,5$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) est excitée avec une LED-730 nm à $0,1$ $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. La température de la suspension d'étalonnage est contrôlée grâce à un support chauffant.

III.3.b. Résultats

Mesures de température globales

Les températures initiales ($t=0$) des échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ valent respectivement 23°C et 20°C (figure III-10). Ces valeurs augmentent pendant les 15 premières minutes de l'expérience (excitation optique seule) pour les deux échantillons (figure III-10). À $t = 15$ min, au moment où le champ magnétique est mis en fonctionnement, les deux suspensions ne sont pas à l'équilibre thermique (régime permanent) à l'échelle globale. Dans cette expérience, le découplage des contributions des excitations optique et magnétique dans l'évolution de la température globale n'est pas possible. Pour l'échantillon Ag_2S , à $t = 15$ min (juste avant l'instant où le champ magnétique est mis en fonctionnement), la température globale mesurée grâce à la sonde à fibre optique est de 24°C (figure III-10, en vert). La période d'excitation optique engendre donc une augmentation de 1°C de la température globale de la suspension contenant les Ag_2S seules. Nous observons par ailleurs que la période d'excitation magnétique engendre une augmentation de presque 2°C ($T(t=30\text{min}) = 26^\circ\text{C}$) de la température globale de cet échantillon alors que les Ag_2S ne sont pas sensibles au champ magnétique (figure III-10, en vert). Pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la période d'excitation optique engendre une augmentation de 2°C ($T(t = 15 \text{ min}) = 22^\circ\text{C}$) de la température globale (figure III-10, en mauve). L'excitation magnétique [487 kHz, 20 mT] de cet échantillon, pendant 15 min, engendre une élévation de 4°C de la température globale ($T(t=30 \text{ min}) = 26^\circ\text{C}$) (figure III-10, en mauve)).

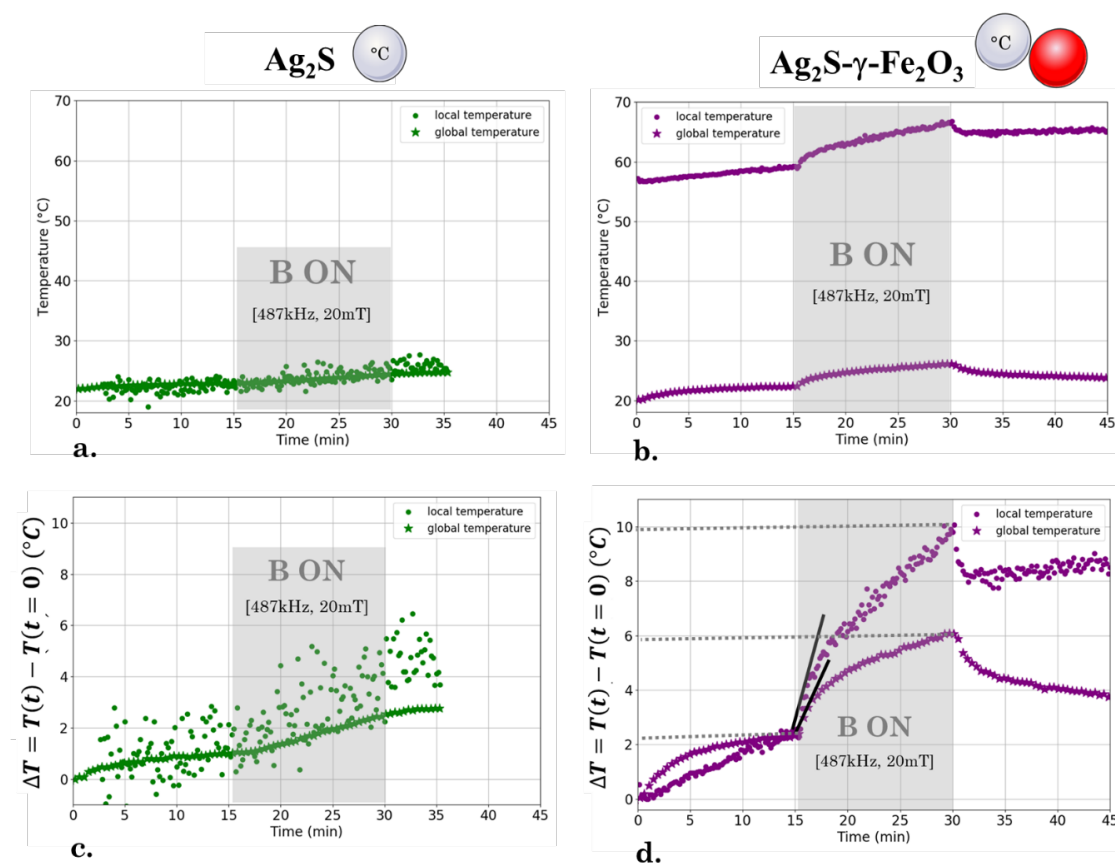


Figure III-10 : Les nanoparticules contenues dans les échantillons (a, c) Ag_2S et (b, d) $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont excitées optiquement (LED-730 nm à $1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) de $t = 0$ min à $t = 20$ min. L'excitation optique est allumée simultanément à l'enregistrement du premier spectre de PL des Ag_2S . Nous observons donc un régime transitoire vis-à-vis de l'excitation optique. Entre $t = 15$ min et $t = 30$ min les échantillons sont excités avec un champ magnétique [487 kHz, 20 mT] (en plus de l'excitation optique). Les mesures de

températures absolues (a, b) et relatives (c, d) effectuées grâce au spectre de PL des Ag_2S sont représentées.

Mesures de températures locales

Échantillon Ag_2S

Le spectre de photoluminescence enregistré lorsque le champ magnétique [487 kHz, 20 mT], est appliqué (à $t = 15$ min, spectre bleu) est légèrement plus intense que lorsque le champ est éteint ($t = 30$ min spectre rouge) (figure III-11, gauche). La température de cœur des Ag_2S varie donc peu au cours de l'excitation magnétique lorsque ces nanoparticules sont seules en suspension aqueuse. Néanmoins, la **figure III-10** (en vert) illustre une dispersion très importante des valeurs de température mesurée grâce au modèle d'étalonnage (équation ii) sur p_1 . Cela s'explique par le faible rapport signal/bruit des données de photoluminescence traitées pour cette expérience. En effet, l'intensité du signal détecté est 7,5 fois plus faible ($I_{\text{max}}=400$) (figure III-11, gauche) que celle mesurée dans le cadre de l'expérience avec le programme d'excitation n°1 ($I_{\text{max}}=3000$) (figure III-8, gauche). Pour ces deux expériences, la concentration et le volume des échantillons Ag_2S étaient pourtant identiques ($100 \mu\text{L}$ à $[\text{Ag}_2\text{S}] = 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$). Ici, nous attribuons la faible intensité (ainsi que la modification de la forme) du signal détecté pour l'échantillon Ag_2S , aux réglages optiques. Cet essai illustre une difficulté expérimentale majeure que nous avons rencontrée lors des expériences de nanothermométrie. Les réglages optiques et le bruit contenu dans le signal ont un impact très important sur la précision des mesures de température effectuées grâce au modèle d'étalonnage établi à partir du rapport d'intensité p_1 . Des propositions de solutions, visant rendre les mesures de températures plus robustes, sont présentées dans le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse.

Échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de $t = 0$ à $t = 15$ min

Dans cette expérience, nous avons accès à des informations sur l'évolution de la température interne des Ag_2S , au moment où la source d'excitation optique est mise en marche. Pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la première mesure de température effectuée grâce au signal de PL émis par les Ag_2S , au moment où la source d'excitation optique est mise en marche est de 57°C ($t = 0$). Au même instant, la température globale mesurée dans le milieu grâce à la sonde à fibre optique est de 23°C . Ensuite, la température mesurée dans le milieu avec la sonde à fibre optique augmente plus rapidement ($0,34^\circ\text{C.min}^{-1}$) que celle sondée par les Ag_2S la surface des nanoparticules de maghémite ($0,19^\circ\text{C.min}^{-1}$). À partir de $t = 10$ min, le régime stationnaire est atteint globalement dans le milieu alors que localement la température continue d'augmenter à vitesse constante ($0,13^\circ\text{C.min}^{-1}$) (figure III-10 d). La température sondée par les Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) après 15 min d'excitation optique est de 59°C (figures III-10 b et d). Dans les mêmes conditions d'excitation optique et avec la même composition d'échantillon (tableau III-1), cette température est très proche de celle (56°C) mesurée à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans le cadre du programme d'excitation n°1. Ce résultat confirme que la température de cœur des Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ augmente instantanément au moment de la mise en fonctionnement de l'excitation optique de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de $t = 15$ min à $t = 30$ min

Lorsque les Ag_2S sont en présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, nous observons, pendant la période d'excitation magnétique [487 kHz, 20 mT] (entre $t = 15$ min et $t = 30$ min), une diminution de l'intensité de photoluminescence caractéristique de l'augmentation de la température de cœur des particules de sulfure d'argent (figure III-11, droite). L'augmentation de la température sondée par les Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ atteint 8°C au bout de 15 min d'excitation magnétique (par comparaison, 4°C globalement dans le milieu) (figure III-10 d).

Au moment de la mise en fonctionnement de l'excitation magnétique [487 kHz, 20 mT], la température sondée par les Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ augmente plus rapidement ($1,7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) que celle mesurée globalement dans le milieu⁴¹. ($0,47^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure 16.d). De même, entre $t = 30$ min et $t = 35$ min, l'arrêt du champ magnétique [487 kHz, 20 mT] engendre une décroissance deux fois plus rapide de la température locale ($1,4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) par rapport à la température mesurée globalement dans le milieu⁴² ($0,71^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure 16.d). Cela met en évidence des dynamiques d'échanges thermiques différentes à l'échelle globale dans le milieu et locale à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La puissance dissipée par les sources de chaleur superparamagnétiques évolue instantanément lorsque le champ magnétique alternatif [487 kHz, 20 mT] est allumé (à $t = 15$ min) et éteint (à $t = 30$ min). Comme les particules de sulfure d'argent sont à une distance très faible (de l'ordre de la longueur de la chaîne du 11MUA, soit 1,71 nm [97]) de la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, elles ont la capacité de sonder, la variation de température résultant de la variation de la puissance dissipée par les sources de chaleur. L'énergie thermique nécessaire pour que la température globale augmente dans le volume total de l'échantillon est plus grande que pour celle nécessaire à l'augmentation de température d'un volume infinitésimal de suspension à la surface des sources de chaleur. Il faut donc un temps plus long pour mesurer une élévation de température à l'échelle locale avec les Ag_2S , qu'à l'échelle globale avec la sonde à fibre optique. De plus, le milieu (eau) a la capacité d'emmagasiner la chaleur diffusée par les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ lors de leur excitation magnétique (capacité calorifique). Cette chaleur est ensuite dissipée via des échanges thermiques macroscopiques entre la suspension de nanoparticules et l'air. La vitesse de diffusion de la chaleur dans le milieu est gouvernée par sa viscosité et sa conductivité thermique [94]. Les échanges thermiques macroscopiques sont plus lents que ceux s'effectuant à l'échelle nanométrique au voisinage des sources de chaleur. Ce résultat serait à prendre en compte lors de l'évaluation du pouvoir de chauffe des nanosources de chaleur magnétique. En effet le SLP est un indicateur macroscopique qui ne caractérise pas directement le pouvoir de chauffe des nanoparticules à l'échelle nanométrique. À l'échelle nanométrique, la pente initiale dT/dt (au moment où le champ magnétique est allumé) de la courbe représentant la température en fonction du temps, peut être différente que celle mesurée à l'échelle globale.

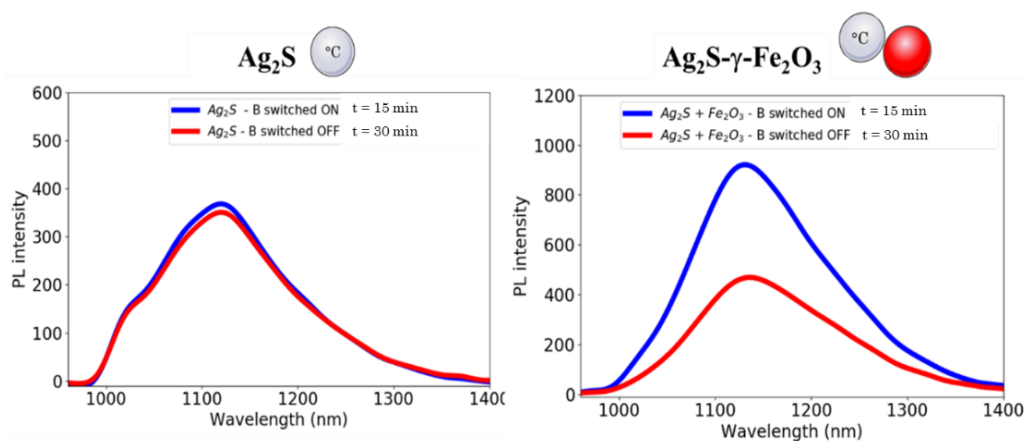


Figure III-11 : Les spectres de photoluminescence des sulfures d'argent sont représentés lorsque le champ magnétique est mis en fonctionnement (à $t = 15$ min en bleu) et lorsqu'il est éteint ($t = 30$ min en rouge). Nous considérons ici le programme d'excitation n°2. À gauche : les Ag_2S sont seules en suspension. À droite, les Ag_2S sont couplées électrostatiquement aux $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

⁴¹ Dans le cadre du programme d'excitation n°1, pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}\text{-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, au moment où le champ magnétique est mis en fonctionnement, les vitesses de montée en température ($0,28^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) sont proches aux deux échelles (locale et globale) (figure 12.d).

⁴² Dans le cadre du programme d'excitation n°1, pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}\text{-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, au moment où le champ magnétique est éteint, la température décroît plus vite globalement dans le milieu ($0,35^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) que localement, au voisinage de nanosphères de maghémite ($0,2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure 12.d).

Échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de $t = 35$ min à $t = 45$ min

Au moment de la mise en fonctionnement de l'excitation magnétique [487 kHz, 20 mT] ($t = 15$ min), la température sondée par les Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) n'a pas atteint de palier (figure III-10 d). L'excitation optique conserve donc une contribution dans l'élévation de température locale à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pendant les 45 min du programme d'excitation n°2. Cette contribution est illustrée **figure III-10 d**, entre les instants $t = 35$ min et $t = 45$ min. Le champ magnétique est coupé, mais nous observons une légère élévation de température locale ($0,05^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) résultant de l'excitation optique de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (figure III-10 d). Entre les mêmes instants ($t = 35$ min et $t = 45$ min), la température globale diminue dans le milieu ($0,08^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure III-10 d).

III.4. Synthèse des résultats

III.4.a. Effet de l'excitation optique

Dans le cadre des expériences menées avec les programmes d'excitation n°1 et n°2, la température mesurée grâce au nanothermomètre Ag_2S lorsque qu'il est seul en suspension aqueuse est très proche de la température globale mesurée par la sonde à fibre optique. En revanche, la température sondée par les Ag_2S , lorsqu'ils sont localisés au voisinage des nanosphères de maghémite est environ 30°C supérieure à la température globale mesurée dans le milieu (cas de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Nous avons mis en évidence que la contribution de l'excitation optique est prépondérante devant la contribution de l'excitation magnétique dans l'élévation de température sondée par les Ag_2S au voisinage des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La mesure de température effectuée grâce au spectre d'émission des Ag_2S correspond à la température de l'environnement des sources de chaleur, à une distance donnée de ces dernières. Nous avons montré que les particules de sulfure d'argent sont contraintes à la surface des nanoparticules de maghémite grâce aux interactions électrostatiques dues à leur charge de surface de signe opposé. En première approximation, nous pouvons considérer que la distance nanothermomètre-nanosource de chaleur correspond à la longueur de la molécule de ligand (11MUA) enrobant les Ag_2S . La longueur du 11MUA est de 1,71 nm [97]. La source de chaleur est donc très proche du nanothermomètre. Cela peut expliquer le fait que les températures sondées par les Ag_2S à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ soient bien plus élevées que globalement dans le milieu, et ce dès le moment où l'excitation optique est mise en marche.

III.4.b. Effet de l'excitation magnétique

Après 10 min d'excitation magnétique, l'élévation de la température sondée par les Ag_2S à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ est de 6°C avec les paramètres [487 kHz, 20 mT] et de 3°C avec les paramètres [925 kHz, 12 mT]. Dans les mêmes conditions, la température globale des échantillons $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($100 \mu\text{L}$, $[\text{Fe}] = 4,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $[\text{Ag}_2\text{S}] = 0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; tableau III-1) augmente respectivement de 4°C et de 1°C (figures III-6 en rouge et III-10 en mauve). D'après nos résultats, les $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont donc plus sensibles aux paramètres de champ magnétique [487 kHz, 20 mT] qu'aux paramètres [925 kHz, 12 mT]. Les résultats sont résumés dans le **tableau III-2**.

Tableau III-2 : Synthèse des résultats obtenus pour les deux couples de paramètres de champ magnétique utilisés dans cette étude.

			[925 kHz, 12 mT]	[487 kHz, 20 mT]
Ag₂S Volume : 100 µL [Ag ₂ S] = 0,2 mg.mL ⁻¹	Températures à l'instant où le champ est allumé	Sondée par Ag ₂ S Globale	23°C 24°C	24°C 23°C
	Températures après 10 min d'excitation magnétique	Sondée par Ag ₂ S Globale	23°C 24°C	27°C 26°C
Ag₂S-γ-Fe₂O₃ Volume : 100 µL [Fe] = 4,2 mg.mL ⁻¹ [Ag ₂ S] = 0,2 mg.mL ⁻¹	Températures à l'instant où le champ est allumé	Sondée par Ag ₂ S Globale	56°C 26°C	59°C 22°C
	Températures après 10 min d'excitation magnétique	Sondée par Ag ₂ S Globale	58°C 27°C	65°C 26°C

Dans le cas de l'expérience réalisée avec le programme d'excitation n°1, le régime permanent en excitation optique est atteint au moment où le champ magnétique [925 kHz, 12 mT] est allumé. Ainsi, pour les deux échelles (locale et globale), les vitesses de montée en température au moment où le champ magnétique est allumé sont caractéristiques de l'énergie dissipée par les nanoparticules de maghémite sous excitation magnétoinduite. Dans ces conditions, nous pouvons donc calculer le SLP (Specific Loss Power) : il vaut environ 5 W.g⁻¹ (tableau III-3). Cette valeur est moins élevée que celles reportées dans certaines études de la littérature pour les γ-Fe₂O₃ [91] en considérant d'autres paramètres de champ magnétique que ceux utilisés dans notre étude. Or le SLP dépend de l'amplitude et de la fréquence du champ magnétique.

Tableau III-3 : SLP pour γ-Fe₂O₃ : comparaison entre les valeurs calculées dans notre étude et des valeurs de la littérature pour plusieurs paramètres de champ magnétique (amplitude et fréquence).

Amplitude	Fréquence (kHz)	SLP (W.g ⁻¹)	Référence
24,8 kA.m ⁻¹ 312 Gauss 31,2 mT	700	4 - 1650	[91]
18,3 kA.m ⁻¹ 230 Gauss 23 mT	98	33 - 50	[96]
9,5 kA.m⁻¹ 120 Gauss 12 mT	925	4,7	Notre étude
15,9 kA.m⁻¹ 200 Gauss 20 mT	487	7,8	Notre étude ⁴³

⁴³ Cette valeur est donnée à titre indicatif, car l'échantillon n'est donc pas à l'équilibre thermique au moment où le champ magnétique [487 kHz, 20 mT] est allumé (figure 12.b et d). Le SLP est calculé à partir de la valeur de la pente en température **globale** au moment où le champ magnétique est allumé.

IV. Mesures de températures locales en milieu cellulaire

IV.1. Description de l'expérience

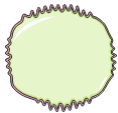

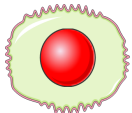
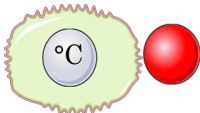
IV.1.a. Les échantillons de l'étude

Dans ce travail, nous souhaitons étudier l'effet de l'environnement des nanoparticules et de la distance entre Ag_2S et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sur la température mesurée grâce au signal de photoluminescence des Ag_2S en milieu cellulaire. Le contrôle de la distance entre le nanothermomètre et la source de chaleur est effectué *in situ* grâce aux compartiments cellulaires (tableau IV-1). Le protocole de culture cellulaire est donné en **annexe A.IV**. Le marquage des cellules a été réalisé en collaboration par **Sonia Becharef** (MSC Med).

Pour les échantillons Ag_2S IN et Ag_2S IN + $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ OUT, nous faisons l'hypothèse de travail que toutes les nanoparticules de Ag_2S introduites dans le milieu de culture ($35 \mu\text{L}$ à $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) sont internalisées par les cellules après incubation pendant 24 h. Cette hypothèse peut être tout à fait discutée, mais elle nous permet d'estimer un ordre de grandeur de la quantité de nanothermomètres présent dans l'échantillon.

Pour l'échantillon $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IN, nous ne pouvons pas estimer la masse de nanoparticules de maghémite internalisées par les cellules. En effet, lors de l'ajout des nanoparticules de maghémite ($250 \mu\text{L}$ à $42 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dans le milieu de culture cellulaire, nous avons observé leur précipitation.

Tableau IV-1 : Référencement des échantillons cellulaires de l'étude.

Échantillons	Contrôle	Ag_2S IN	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IN	Ag_2S IN + $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ OUT
Symbole				
Nombre de cellules	$2,65 \cdot 10^6$	$2,89 \cdot 10^6$	$2,62 \cdot 10^6$	$2,39 \cdot 10^6$
Volume (μL)	100	100	100	100
m(Ag_2S) (μg)	0	175	0	175
m(Fe) (μg)	0	0	?	80

IV.1.b. Étalonnage du nanothermomètre de référence

Démarche expérimentale

Dans cette partie de chapitre, les expériences sont réalisées en milieu cellulaire, mais l'étalonnage du nanothermomètre est effectué en suspension aqueuse. Nous utilisons le nanothermomètre de référence sélectionné dans le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse. La procédure de calibration du nanothermomètre a été décrite dans la **section II.3**. La méthode de traitement des données figure en **annexe B.II.2**. Avec le matériel disponible au laboratoire, il n'est pas possible d'effectuer l'étalonnage en température directement avec les échantillons cellulaires. En effet, un volume minimum de $0,7 \text{ mL}$ est nécessaire pour que l'échantillon, placé à l'intérieur du support de cuve chauffant du montage optique de calibration (figure 5), puisse être excité par la source lumineuse (LED-730 nm). Or dans cette section de chapitre, nous travaillons sur des culots cellulaires. Le volume maximum disponible par échantillon est de l'ordre de $100 \mu\text{L}$. Nous montrons **figure IV-1** que la présence des cellules ne modifie pas la forme du spectre d'émission des Ag_2S . Nous considérons donc, ici, que le modèle

d'étalonnage obtenu avec la suspension aqueuse de nanothermomètre de référence peut être utilisé pour remonter à la température de cœur de ces mêmes matériaux internalisés au sein de cellules.

Dans le futur, cette hypothèse de travail devra néanmoins faire l'objet d'une étude approfondie. En effet, à la fin du chapitre 2, nous avons montré que l'environnement biologique pouvait avoir un effet sur la dépendance du spectre d'émission de photoluminescence du nanothermomètre de référence à la température. Lorsque les Ag₂S sont contenues au sein de poumons de souris, dont la température passe de 15°C à 22°C en 30 min, nous observons une extinction de photoluminescence caractéristique de l'augmentation de la température de cœur des Ag₂S. En revanche, nous n'observons pas d'évolution de l'énergie de pic d'émission de photoluminescence des Ag₂S, ce qui est le cas lorsque les Ag₂S sont dispersés en suspension aqueuse (annexe D.II).

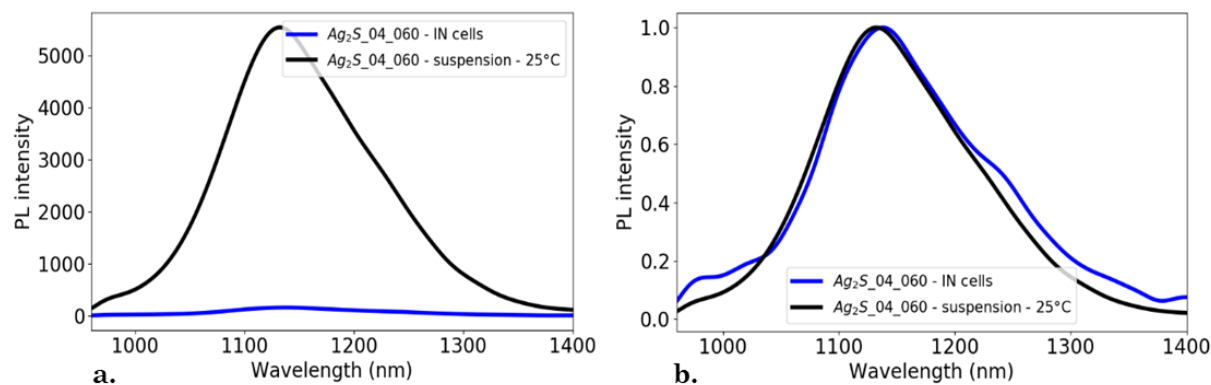


Figure IV-1 : (a) Spectres de photoluminescence à 25°C des Ag₂S internalisées au sein de cellules et en suspension aqueuse. (b) Pour comparer leur forme spectrale, nous les avons normalisés par rapport à leur maximum d'intensité respectif.

Modèle d'étalonnage utilisé

Aucun signal de photoluminescence n'est détecté pour les échantillons contrôle : cellules seules (spectre noir) et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanosphères}}$ IN (spectre mauve) (figure IV-2). Les signaux détectés pour les autres échantillons sont donc émis par les nanoparticules de sulfures d'argent. Grâce au signal de photoluminescence émis par les Ag₂S contenues dans les échantillons Ag₂S IN (figure IV-2, spectre bleu) et Ag₂S IN + $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ OUT (figure IV-2, spectre rouge), nous allons pouvoir remonter à leur température de cœur grâce à un modèle d'étalonnage en température à partir de p_1 . Pour cette expérience, le modèle d'étalonnage (iii) du nanothermomètre par rapport à p_1 a été établi avec une suspension aqueuse de Ag₂S à 0,5 mg.mL⁻¹. Plus le rapport d'intensité p_1 mesuré à partir du spectre de photoluminescence de Ag₂S est faible, plus la température de cœur du nanothermomètre est élevée. Ce modèle a été établi entre 25°C et 60°C.

$$T(p_1) = -73.7 p_1 + 98,7 \text{ avec } p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda} \quad \text{(iii)}$$

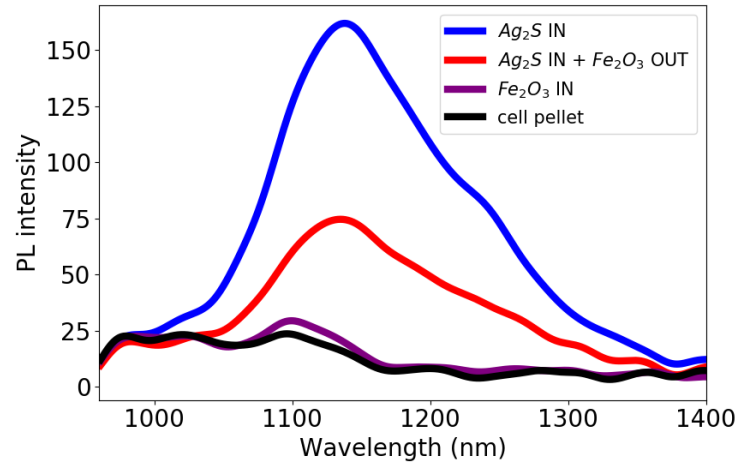


Figure IV-2 : Spectres de photoluminescence des échantillons cellulaires

IV.2. Résultats

IV.2.a. Mesure de températures globales

D'après les mesures de température globale, aucun des quatre échantillons n'est sensible au champ magnétique [925kHz, 12mT] appliqué entre $t = 5$ min et $t = 15$ min (figure IV-3).

La température globale de l'échantillon contrôle (cellules seules, points noirs) est 1°C plus faible (22°C) que celle des autres échantillons Ag₂S IN (points bleus), γ -Fe₂O₃ IN (points mauves) et Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT (points rouges) (environ 23°C) (figure IV-3). Cet écart en température pourrait résulter de l'excitation optique des nanoparticules Ag₂S et γ -Fe₂O₃ par la LED-730 nm contenus dans les échantillons. La température globale mesurée grâce à la sonde à fibre optique est légèrement plus importante (l'ordre du dixième de degrés Celsius) pour l'échantillon Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT (points rouges) que pour les échantillons Ag₂S IN (points bleus) et γ -Fe₂O₃ IN (points mauves) (figure IV-3). Cela pourrait s'expliquer par la quantité plus importante de fer contenu dans l'échantillon Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT (m(Fe)=80 μ g) que dans les deux autres échantillons. Pour l'échantillon, Ag₂S IN la quantité de fer est nulle. Pour l'échantillon γ -Fe₂O₃ IN, 10 mg de fer ont été mis en présence de 2,6 millions de cellules. Néanmoins, lors de l'ajout des nanoparticules de maghémite dans le milieu de culture cellulaire, nous avons observé leur précipitation. Nous ne pouvons pas estimer la masse de nanoparticules de maghémite internalisées par les cellules dans cet échantillon.

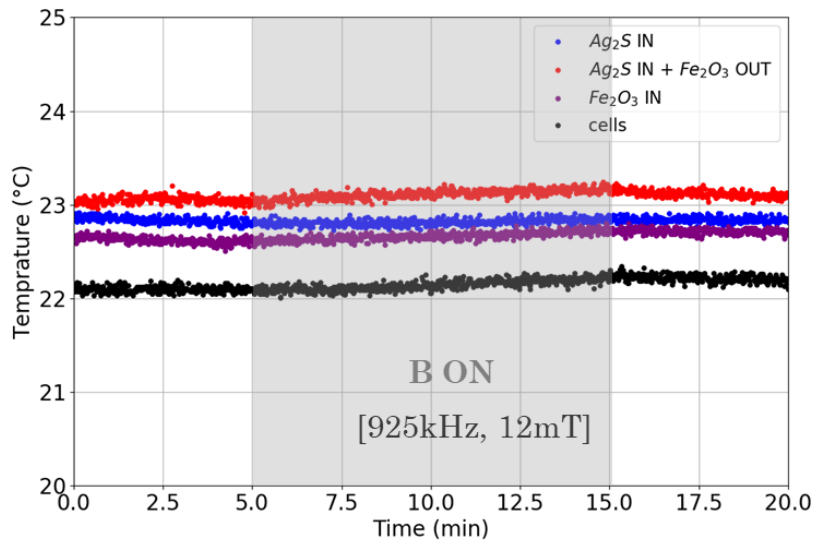


Figure IV-3 : Évolution de la température globale mesurée avec la sonde à fibre optique pour les échantillons cellulaires dans le cadre du programme d'excitation n°1.

IV.2.b. Mesures de température locales

Étude de l'échantillon contenant le nanothermomètre seul

Tout d'abord, nous remarquons que lorsque les Ag₂S sont internalisés dans les cellules (échantillon Ag₂S IN), la différence entre les températures locales et globales (5°C) (figure IV-5 a) est plus importante que lorsque les nanoparticules sont en milieu aqueux (1°C) (figure III-6 a). Cette observation peut être liée à une différence de concentration locale en Ag₂S au sein des échantillons. Dans le cas des échantillons cellulaires, les nanoparticules sont concentrées dans de petits compartiments cellulaires : les lysosomes. Dans le cas de la suspension aqueuse de Ag₂S, les nanoparticules sont dispersées de manière homogène dans l'échantillon. De plus, en milieu aqueux, nous nous plaçons en régime dilué avec une concentration massique Ag₂S valant entre 0,2 mg.mL⁻¹. L'échantillon Ag₂S IN, n'est sensible au champ magnétique [925kHz, 12mT] appliqué entre t = 5 min et t = 15 min. En effet, le spectre de photoluminescence des Ag₂S évolue très peu entre ces deux instants (figure IV-4, gauche). Cela signifie que la température de cœur des nanothermomètres, obtenue grâce au modèle d'étalonnage (iii) (28°C), reste constante au cours de l'excitation magnétique. Ceci est cohérent avec les résultats observés **figure IV-5 a**.

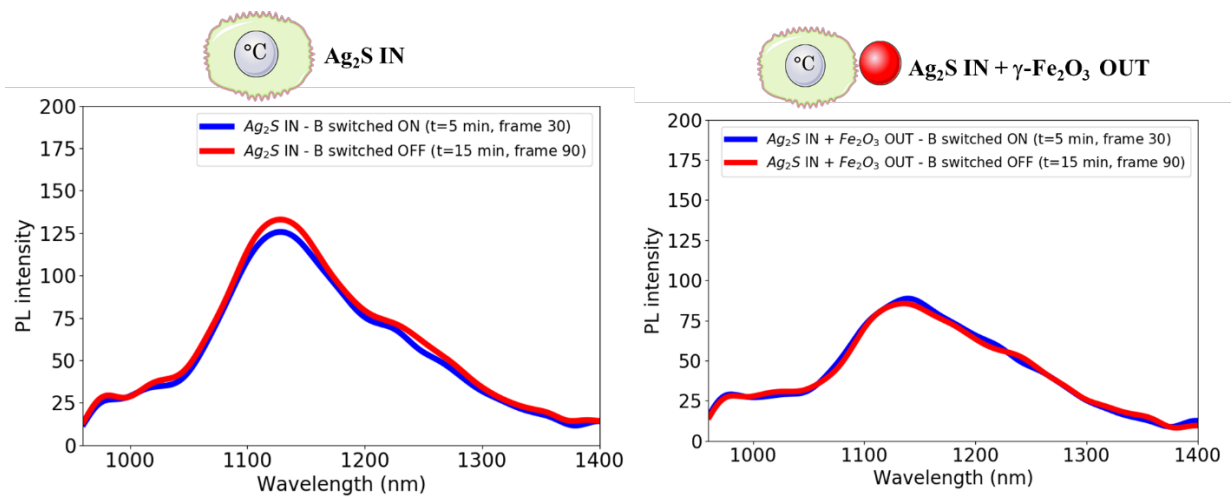


Figure IV-4 : Visualisation des spectres d'émission de photoluminescence des échantillons Ag₂S IN (a) et Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT (b) au moment où le champ magnétique est allumé (t=5 min) et au moment où il est éteint (t = 15 min). Le spectre de photoluminescence des deux échantillons évolue très peu entre ces deux instants. La température de cœur des nanothermomètres reste donc constante au cours de l'excitation magnétique. Les échantillons ne sont pas sensibles au champ magnétique.

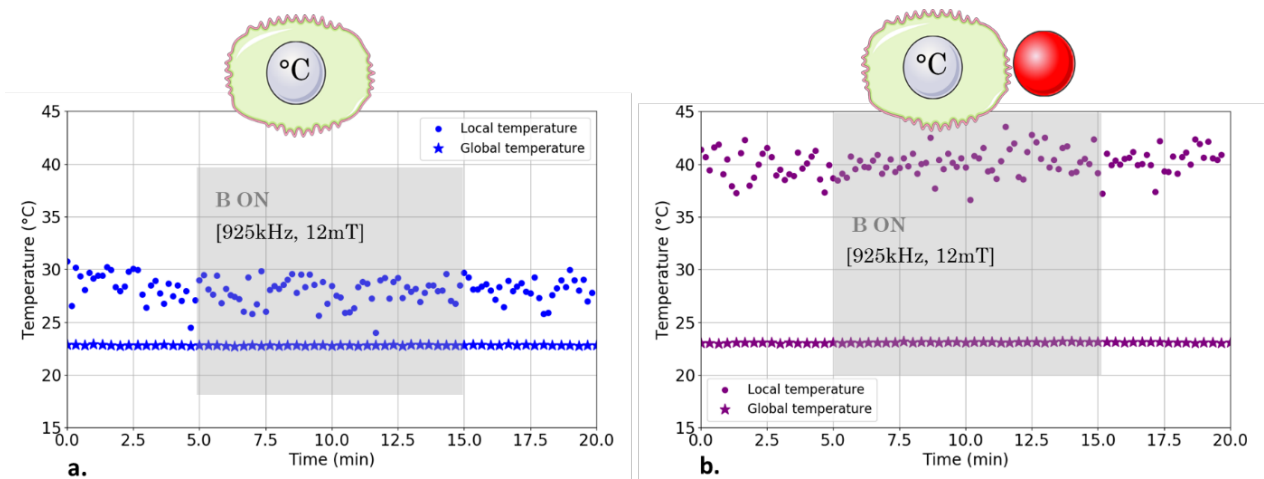


Figure IV-5 : Les nanoparticules contenues dans les échantillons (a) Ag₂S IN et (b) Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT sont excitées optiquement (LED-730 nm à 1 mW.cm⁻²) de t = 0 min à t = 20 min. L'excitation optique est allumée 15 min avant l'enregistrement du premier spectre de PL des Ag₂S. Nous n'avons donc pas accès au régime transitoire vis-à-vis de l'excitation optique. Entre t = 5 min et t = 15 min les échantillons sont excités avec un champ magnétique [925 kHz, 12 mT] (en plus de l'excitation optique). L'échantillon Ag₂S IN + γ -Fe₂O₃ OUT contient 80 μ g de Fer.

Effet de la présence des sources de chaleur

Pour l'échantillon cellulaire $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$, un écart de 17°C est mesuré entre la température globale et la température locale, réalisées grâce au signal de PL des Ag_2S (40°C) (figure IV-5 b). Entre $t = 5 \text{ min}$ et $t = 15 \text{ min}$, le spectre de photoluminescence des Ag_2S évolue très peu (figure IV-4, droite). La température locale mesurée reste constante et égale à 40°C (figure IV-5 b). L'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ n'est donc pas sensible au champ magnétique [925kHz , 12mT]. En revanche, la présence des nanosphères de maghémite excitées optiquement, dans le milieu extracellulaire, semble induire une élévation de la température de cœur des Ag_2S . En effet, la **figure IV-4** montre que les spectres d'émission de photoluminescence émis par les nanothermomètres au sein de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ (figure IV-4, droite) ont une intensité plus faible que ceux contenus au sein de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN}$ (figure IV-4, gauche). Ceci est cohérent avec le fait que la température mesurée (à partir du modèle d'étalonnage sur p_1 (iii)) pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ (40°C) est 1,5 fois plus élevée que pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN}$ (28°C) (figure IV-5) dans les mêmes conditions d'excitation optique.

Comparaison des expériences en milieu aqueux et cellulaire

Dans le cas de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, étudié en milieu aqueux, les températures locales mesurées au cours de l'expérience varient entre $55,7^\circ\text{C}$ et $58,4^\circ\text{C}$ (figures III-6 b) alors que dans le cas de l'échantillon cellulaire $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$, les températures locales restent fixes et égales à 40°C (figure IV-5 b). Selon nous, l'absence de sensibilité de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ au champ magnétique [925 kHz , 12 mT] peut être lié à trois facteurs. Tout d'abord, la quantité de fer contenu dans les deux échantillons n'est pas la même. L'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ contient $80 \mu\text{g}$ de fer alors que pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en contient 5 fois plus ($420 \mu\text{g}$). Ensuite, des expériences antérieures ont montré que le SLP des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ diminuait fortement après l'internalisation cellulaire [98]. Ici même si les nanoparticules d'oxyde de fer sont hors des cellules, elles sont probablement agrégées dans milieu extracellulaire. De plus, l'augmentation de la viscosité du milieu cellulaire par rapport à l'eau également pourrait participer à l'inhibition des contributions de Brown et de Néel dans la libération d'énergie thermique par les nanoparticules de maghémites excitées avec un champ magnétique alternatif [91]. Enfin, la distance entre le nanothermomètre et la source de chaleur est plus élevée pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ que pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En effet, pour $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$, le nanothermomètre et la source de chaleur sont séparés par le milieu intracellulaire et l'ordre de grandeur de la taille d'une cellule est $10 \mu\text{m}$. En revanche dans le cas de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la distance entre les deux types de nanoparticules peut être assimilée à la longueur de la molécule 11MUA, soit $1,71 \text{ nm}$ [97].

IV.2.c. L'effet du bruit dans la précision des mesures de température locales

Observations

Le bruit a une contribution plus importante dans la valeur du rapport d'intensité de photoluminescence mesuré lorsque le nanothermomètre Ag_2S se trouve en milieu cellulaire qu'en milieu aqueux. Ceci est lié à deux contributions principales : l'autofluorescence des cellules et la faible intensité du signal de photoluminescence détecté pour les échantillons cellulaires.

L'autofluorescence des cellules

L'autofluorescence des tissus est une émission de photoluminescence provenant des tissus biologiques soumis à une source d'excitation optique. Elle est liée à la présence de protéines endogènes fluorescentes. L'équipe de José Lifante enregistre un signal d'autofluorescence entre 1000 nm (limite du détecteur) et 1200 nm pour le cerveau, le cœur et les reins excités à 808 nm [99]. C'est également ce que nous observons lorsque ces mêmes organes, prélevés chez une souris, sont soumis à une source d'excitation LED-626 nm (figure IV-6 a). Les signaux enregistrés **figure IV-6 a** sont les signaux d'autofluorescence des organes. Il n'y a pas de nanoparticules en présence des échantillons.

Les spectres bleus, cyans, verts et rouges présentés **figures IV-6 b et c** correspondent aux spectres d'émission de photoluminescence de culots cellulaires excités avec une LED émettant à 625 nm (figure 27 b) et 730 nm (figure IV-6 c). Les culots ont été préparés après des durées différentes d'incubation des cellules à 37°C (1, 4, 7, et 10 jours). L'échantillon contrôle est le PBS (spectre noir). Aucun signal n'est détecté lorsque le PBS est excité optiquement dans les mêmes conditions que les culots cellulaires. Dans les deux conditions d'excitation optique (figure IV-6 b et c), nous détectons (caméra hyperspectrale PylonIR, Princeton) un signal centré sur les mêmes longueurs d'onde que le signal d'autofluorescence des organes (figure IV-6 a). L'intensité du signal d'autofluorescence des culots cellulaires est plus faible lorsqu'ils sont excités avec la LED-730 nm (figure IV-6 c) qu'avec la LED-625 nm (figure IV-6 b).

Lorsque nous travaillons avec les Ag_2S en milieu cellulaire, le signal de photoluminescence transmis au détecteur correspond donc à la somme du signal d'autofluorescence des cellules et de celui des Ag_2S . Dans ce travail, nous travaillons avec la LED émettant à 730 nm, nous minimisons donc l'intensité du signal d'autofluorescence des cellules.

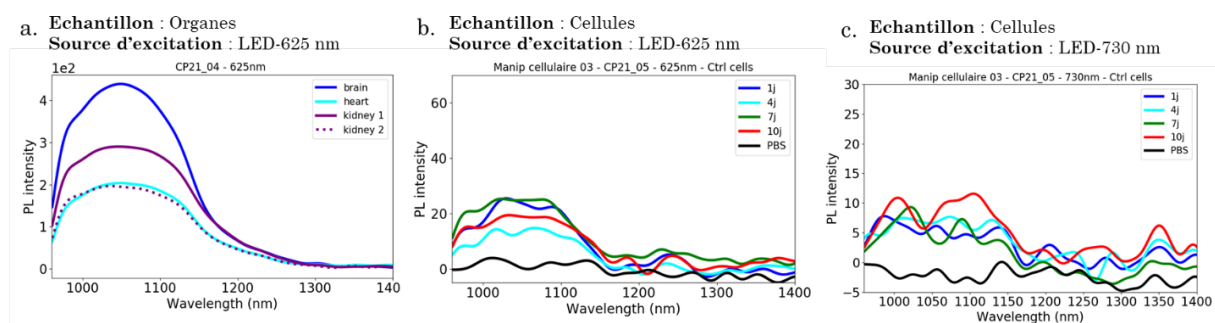


Figure IV-6 : (a) Signal d'autofluorescence d'organes de souris enregistrés selon la procédure décrite en annexe D.II à température ambiante. Les organes sont excités avec une LED émettant à 625 nm. Nous retrouvons ce signal d'autofluorescence pour un culot de cellule excité à 625 nm (b) et 730 nm (c). Nous remarquons que le signal d'autofluorescence des cellules est moins intense à 730 nm (c) qu'à 625 nm (b). Il est important de préciser ici que les signaux ne sont pas les données brutes, pour plus de lisibilité, nous avons utilisé un filtre passe-bas (annexe B.I).

Le rapport signal/bruit

Nous considérons ici deux échantillons aqueux : Ag_2S (points verts) et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (points rouges) ; ainsi que deux échantillons cellulaires : $\text{Ag}_2\text{S IN}$ (étoiles bleues) et $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ IN}$ (étoiles orange). Les quatre échantillons sont soumis à une source d'excitation LED-730 nm pendant 5 min. Une acquisition du spectre de photoluminescence des nanoparticules d' Ag_2S contenues dans les échantillons est réalisée toutes les 10 secondes. Nous mesurons l'écart type des températures obtenues avec le modèle d'étalonnage (iii) sur p_1 . Les échantillons sont à l'équilibre thermique localement (température de cœur des Ag_2S constante) et globalement (palier en température mesuré avec la sonde à fibre optique plongeant dans l'échantillon). Nous remarquons, **figure IV-7 a**, que la dispersion des valeurs de rapports d'intensité p_1 est plus importante pour les échantillons cellulaires $\text{Ag}_2\text{S IN}$ (étoiles bleues) et $\text{Ag}_2\text{S IN} + \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ OUT}$ (étoiles orange) que pour les échantillons aqueux Ag_2S (points verts) et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (points rouges). Ceci est, *a fortiori*, le cas pour les températures calculées grâce au modèle d'étalonnage (iii) établi à partir des rapports d'intensité p_1 (figure IV-7 b).

Pour chaque échantillon, nous mesurons l'écart type sur les températures obtenues à partir du modèle d'étalonnage (iii) sur p_1 . Nous mesurons également le rapport $\frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}}$, avec :

$$\frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}} = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1400\text{nm}} i^{\text{signal}}(\lambda)d\lambda}{\int_{1000\text{nm}}^{1400\text{nm}} i^{\text{bruit}}(\lambda)d\lambda}.$$

La **figure IV-7 b** montre que lorsque le rapport $\frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}}$ diminue, l'écart type sur les mesures de température augmente. Cela engendre une diminution de la précision de la mesure de température locale.

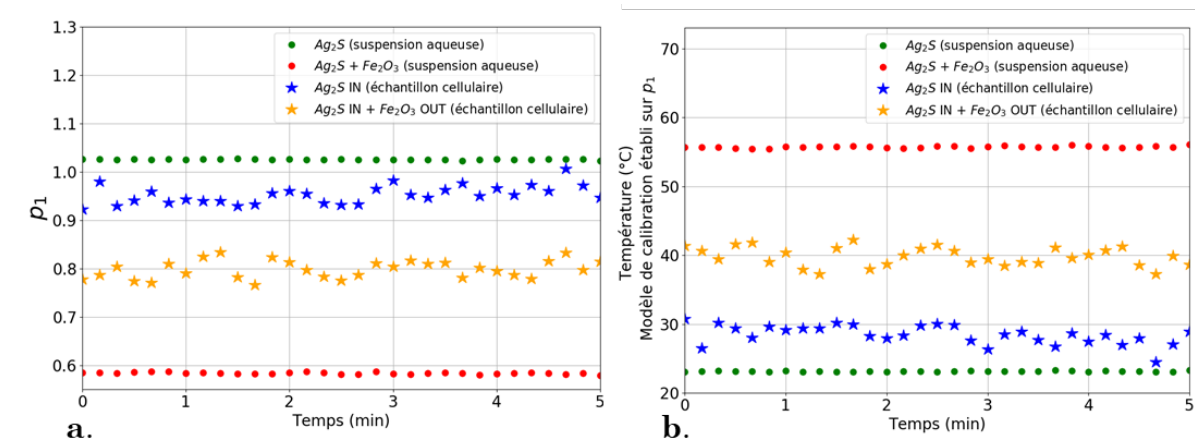


Figure IV-7 : Nous considérons ici deux échantillons cellulaires : Ag_2S IN (étoiles bleues) et Ag_2S IN + γ - Fe_2O_3 IN (étoiles orange) et les deux échantillons aqueux : Ag_2S (points verts) et Ag_2S - γ - Fe_2O_3 (points rouges). Pendant les 5 min d'expérience, les quatre échantillons sont soumis à une source d'excitation LED-730 nm (1 mW.cm^{-2}). Les échantillons sont à l'équilibre thermique. Les températures globales (mesurées avec la sonde à fibre optique) des échantillons sont constantes : Ag_2S IN (28°C) ; Ag_2S IN + γ - Fe_2O_3 IN (40°C) ; Ag_2S (24°C) ; Ag_2S - γ - Fe_2O_3 (26°C). (a) Pour chaque échantillon, nous illustrons l'évolution du rapport d'intensité p_1 (mesuré grâce au spectre de photoluminescence des Ag_2S) au cours du temps. (b) Les températures de cœur des Ag_2S obtenues avec le modèle d'étalonnage (iii) (établi sur p_1) sont plus élevées que les températures globales pendant les 5 min d'expérience. Les valeurs présentées sont plus dispersées pour les échantillons cellulaires que pour les échantillons aqueux.

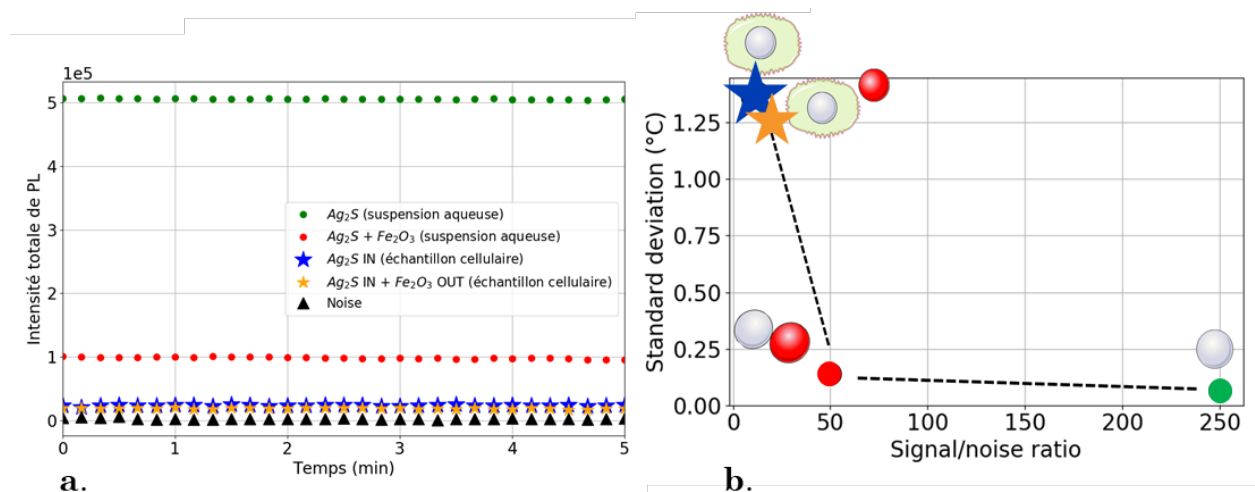


Figure IV-8 : 4 échantillons sont excités optiquement (LED-730 nm ; $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$) pendant 5 min. (a) A gauche, nous représentons les intensités totales (unité arbitraire) au cours du temps du bruit (noise, triangle noir) : 2.10^3 ; de l'échantillon Ag_2S (points verts) : 5.10^5 ; de l'échantillon Ag_2S - γ - Fe_2O_3 (points rouges) : 1.10^5 ; de l'échantillon Ag_2S IN (étoiles bleues) : $2,5.10^4$; de l'échantillon Ag_2S IN + γ - Fe_2O_3 IN (étoiles orange) : 2.10^4 . (b) A droite, pour les quatre échantillons étudiés, nous représentons l'influence du rapport signal/bruit sur l'écart type des températures mesurées grâce au signal de PL des Ag_2S .

IV.3. Pour conclure

Le contrôle de la distance nanothermomètre – source de chaleur grâce aux compartiments cellulaires présente un réel intérêt. Les expériences décrites dans ce chapitre démontrent qu'il est **possible de mesurer la température intracellulaire grâce au signal de PL des Ag₂S** et au système expérimental développé dans le cadre de ce travail de thèse. Les températures mesurées grâce au signal de PL des Ag₂S sont plus élevées pour les échantillons cellulaires en présence des γ -Fe₂O₃ que pour les échantillons cellulaires contenant les Ag₂S seules. Néanmoins, de nouvelles expériences doivent être réalisées pour aboutir à des conclusions plus précises quant à l'influence des sources de chaleur sur l'élévation de la température intracellulaire. Les expériences suivantes sont proposées :

Un culot cellulaire de 160 μ L contenant environ 2 millions de cellules est obtenu après centrifugation et 24 h d'incubation avec 175 μ g de Ag₂S. L'expérience décrite dans la section 3. est réalisée avec les paramètres de champ [487 kHz, 20 mT] pour les 4 échantillons cellulaires suivant :

- 40 μ L de γ -Fe₂O₃ à 2 mg.mL⁻¹ (80 μ g) sont ajoutés à 40 μ L du culot cellulaire
- 40 μ L de γ -Fe₂O₃ à 4 mg.mL⁻¹ (160 μ g) sont ajoutés à 40 μ L du culot cellulaire
- 40 μ L de γ -Fe₂O₃ à 8 mg.mL⁻¹ (320 μ g) sont ajoutés à 40 μ L du culot cellulaire
- 40 μ L de PBS sont ajoutés à 40 μ L du culot cellulaire

Nous recommandons de démarrer l'enregistrement des spectres de PL des Ag₂S au moment où l'excitation optique est enclenchée. En effet, les vitesses d'évolution en température lors des régimes transitoires vis-à-vis de l'excitation optique apportent des informations intéressantes sur les variations de température locales résultant de l'excitation optique.

Au-delà de la composition des échantillons et du programme d'excitation, d'autres aspects du protocole expérimental nécessitent d'être amélioré pour aboutir à des résultats quantitatifs. D'une part, les quantités de nanoparticules présentes dans les échantillons doivent être dosées par ICP. D'autre part une observation des échantillons cellulaires aux microscopes optique et électronique doit être réalisée pour vérifier la localisation des sources de chaleur par rapport aux nanothermomètres.

V. Analyse critique des résultats présentés dans ce chapitre

V.1. Les résultats de l'étude

Les températures très élevées (jusqu'à 67°C avec le champ [487 kHz, 20 mT], tableau III-3) sondées par les Ag₂S à la surface des nanosphères de maghémite posent question. En effet, les nanosphères γ -Fe₂O₃ ne sont pas connues pour être des sources de chaleur performantes. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle certaines équipes de recherche ont mené des travaux visant à optimiser les performances des nanoparticules de maghémite en modifiant leur morphologie. C'est le cas de l'équipe de **Stéphane Roux** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté), ayant mis au point une synthèse de nanofleurs de maghémite. Néanmoins, dans le **chapitre 4**, une autre méthode de traitement des spectres de photoluminescence, prenant en compte une quantité d'informations plus importantes que le rapport d'intensité p_1 va confirmer l'ordre de grandeur de températures sondées par les Ag₂S à la surface des γ -Fe₂O₃ dans ce chapitre.

V.2. Les limites de l'étude

V.2.a. Le nanothermomètre

- Le constructeur du support de cuve chauffant (Quantum Northwest) recommande de ne pas utiliser l'appareil au-delà de 55°C. Les modèles d'étalonnage que nous utilisons pour déterminer la température de cœur des Ag₂S à partir du rapport d'intensité p_1 sont donc, en théorie, définis jusqu'à 55°C. Dans ce travail nous avons fait l'hypothèse que les modèles d'étalonnage sont toujours vrais pour des températures supérieures à 55°C. Dans ce travail, les températures sondées au voisinage des γ -Fe₂O₃ par les Ag₂S sont supérieures à 55°C.
- Le rendement quantique des nanoparticules d'Ag₂S développées dans ce travail de thèse est faible. Il vaut 0,07%. Cela signifie que seulement 0,07% de l'énergie absorbée est dissipée via des transferts radiatifs (photoluminescence). 99,3% de l'énergie absorbée par Ag₂S est donc convertie via des transferts non radiatifs, pouvant s'effectuer par libération de chaleur et engendrer une augmentation de la température interne des Ag₂S. L'hypothèse de travail considérant que la température de la suspension Ag₂S ($[Ag_2S] = 0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) est égale à la température de cœur du nanothermomètre est-elle acceptable ?

V.2.b. Dispositif expérimental

Description de l'expérience

Pour illustrer les limites du dispositif expérimental que nous avons utilisé, trois échantillons Ag₂S- γ -Fe₂O₃ (vert, rouge et bleu) de même composition (100 μ L, $[Fe] = 4,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $[Ag_2S] = 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) sont soumis à trois programmes d'excitation. Entre $t=0$ et $t=5$ min, les échantillons ne sont soumis à aucune source d'excitation. À $t=5$ min à $t=50$ min, les échantillons sont excités optiquement avec une LED émettant à 730 nm (1 mW.cm^{-2}). De $t=20$ min à $t=35$ min, les échantillons sont excités optiquement et magnétiquement. L'effet de trois paramètres de champ magnétique est étudié sur l'évolution de la température globale des échantillons.

Résultats

Les résultats sont présentés **figure V-I**. La température initiale (à $t = 0$) des trois échantillons (de même composition) est différente. De plus, au cours des 5 premières minutes d'expérience, les sources d'excitation optique et magnétique sont éteintes, pourtant la température de l'échantillon bleu augmente. La température des échantillons rouge et vert reste stable. Actuellement, nous nous servons du système de refroidissement de la bobine pour contrôler la température initiale des échantillons. Néanmoins, dans nos expériences, le diamètre de la bobine est grand devant celui des échantillons. Dans le futur il est donc important de trouver **une solution efficace pour contrôler la température (globale) initiale des échantillons**.

Par ailleurs, entre $t = 5$ min et $t = 20$ min, les échantillons (de composition identique) sont soumis aux mêmes paramètres d'excitation optique (LED-730 nm à 1 mW.cm^{-2}), mais différents profils de variation de température sont mesurés. J'attribue ce résultat réglages du montage optique. L'échantillon est théoriquement soumis à une irradiance de l'ordre de 1 mW.cm^{-2} . Il est probable que l'angle avec lequel la source d'excitation irradie l'échantillon est un impact important sur la densité de puissance vu par l'échantillon. Dans le cadre de notre dispositif expérimental, l'angle d'excitation peut varier d'un échantillon à l'autre. Dans le futur il est donc important d'**améliorer le contrôle de la densité de puissance avec laquelle sont excités les échantillons**.

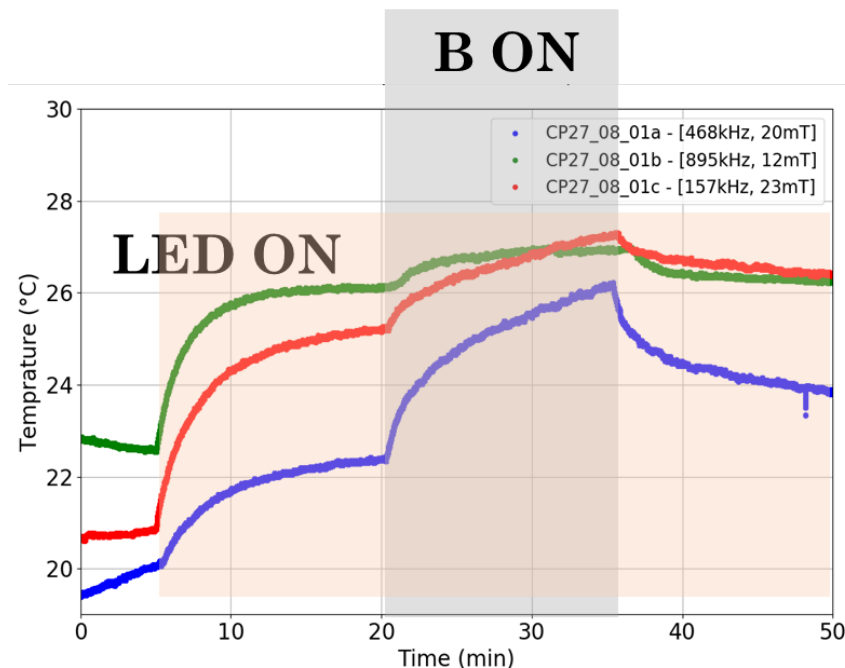


Figure V-1 : Trois échantillons $\text{Ag}_2\text{S-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de même composition (volume : $100 \mu\text{L}$, $[\text{Fe}] = 4,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $[\text{Ag}_2\text{S}] = 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) sont soumis à trois programmes d'excitation. Entre $t=0$ et $t=5$ min, l'échantillon n'est soumis à aucune source d'excitation. À $t=5$ min, la source d'excitation optique est mise en marche (LED-730 nm à 1 mW.cm^{-2}) (en rouge). À $t=20$ min, l'excitation magnétoinduite des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ est initiée pour 3 paramètres de champ magnétique (en gris). Elle est arrêtée à $t=35$ min. Les températures globales sont mesurées grâce à la sonde à fibre optique.

Chapitre 4

Nanothermométrie et interaction lumière-matière

L'interaction lumière-matière est-elle un frein au déploiement de la nanothermométrie de photoluminescence ? Voici la question que nous nous posons dans la **première partie (sections I à IV)** de ce chapitre. Pour y répondre, nous modélisons, tout d'abord, l'interaction entre les photons émis par les sulfures d'argent et l'eau grâce à la loi de Beer-Lambert. Nous réalisons, ensuite, une étude métrologique poussée vis-à-vis de la mesure de température effectuée grâce aux sulfures d'argent. Enfin, nous proposons un changement de paradigme concernant le traitement du signal de photoluminescence pour la nanothermométrie.

Dans la **seconde partie (sections V et VI)** de ce chapitre, nous portons un nouveau regard sur le potentiel applicatif de la nanosonde photoluminescente Ag_2S . Nous utilisons l'émission de photoluminescence des Ag_2S pour discriminer deux types de tissus biologiques (cerveau et foie) par transillumination. Les interactions lumière-matière représentent une opportunité pour accéder à un grand nombre d'informations sur les tissus biologiques et ce travail pourrait initier le développement d'une nouvelle méthode de diagnostic de pathologies.

Partie 1 : L'interaction lumière-matière : un frein au déploiement de la Nanothermométrie de photoluminescence ?

I. Nanothermométrie et interactions lumière-matière

I.1. Contexte

Les membres de la communauté de la nanothermométrie souhaitent utiliser les nanothermomètres qu'ils ont mis au point au sein de milieux complexes tels que les tissus biologiques. Pour effectuer des mesures de températures robustes et reproductibles au sein de milieux complexes, il est nécessaire de se pencher sur les questions de métrologies [35] [33] [100]. Dans ce chapitre de thèse, nous montrons que l'étalonnage de la sonde de température est une étape cruciale pour la fiabilité des mesures de températures effectuées grâce à la photoluminescence de nanomatériaux. Pourtant le protocole expérimental de cette étape est rarement détaillé dans les études publiées dans la littérature. De plus, nous démontrons que l'exploitation du signal de photoluminescence de nanothermomètres n'a pas de sens si les propriétés optiques de l'environnement dans lequel il est utilisé ne sont pas précisément connues.

I.2. L'interaction entre la lumière et la matière

I.2.a. L'extinction optique

La lumière peut être vue à la fois comme une particule (le photon) et une onde électromagnétique. C'est la dualité onde-particule. Une onde électromagnétique, de longueur d'onde λ , peut être décrite comme un champ électrique oscillant couplé à un champ magnétique oscillant à la même fréquence. Si l'on place, sur le chemin de propagation d'une onde électromagnétique, une particule électriquement chargée, cette dernière peut absorber une partie de l'énergie de l'onde incidente et la dissiper via des processus de relaxation non radiatifs (chaleur) ou radiatifs (photoluminescence). Le champ électrique de l'onde électromagnétique peut aussi déformer le nuage électronique de la particule chargée, formant un dipôle électrostatique. Ce dipôle émet alors un rayonnement secondaire à la même fréquence que l'onde incidente et dans toutes les directions de l'espace. C'est le principe de diffusion élastique [101] [39]. L'absorption et la diffusion sont deux phénomènes physiques donnant lieu à une dissipation énergétique pour une onde électromagnétique incidente se propageant dans un milieu donné. La diffusion et l'absorption contribuent le processus d'extinction de l'énergie électromagnétique incidente.

$$\text{Extinction} = \text{Absorption} + \text{Diffusion}$$

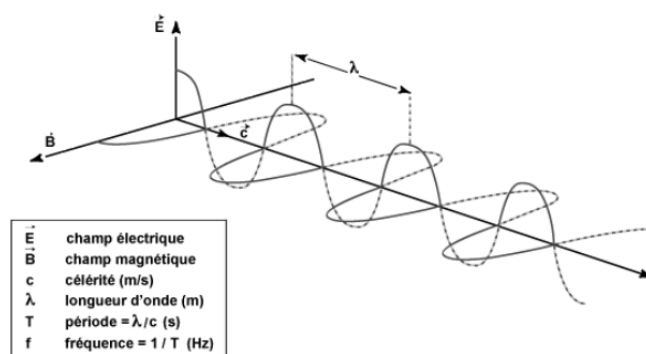


Figure I-1 : Représentation d'une onde électromagnétique plane progressive et homogène (OPPH) dans le vide

Les propriétés optiques d'un milieu sont définies par le coefficient d'absorption μ_{abs} , le coefficient de diffusion μ_{sca} et le facteur d'anisotropie g . Le libre parcours moyen d'extinction est la distance moyenne parcourue par un photon entre deux impacts successifs avec un composant absorbant ou diffusant, modifiant respectivement son énergie et sa direction. Le libre parcours moyen est défini par :

$$l_{ext} = \frac{1}{\mu_{ext}} = \frac{1}{\mu_{abs} + \mu_{sca}}$$

I.2.b. La couleur du ciel

La couleur n'est pas une propriété intrinsèque de la matière, mais une résultante de son interaction avec le rayonnement électromagnétique de la partie visible du spectre. Pour illustrer ce propos, prenons le ciel comme cas d'étude. Avant d'arriver à nos yeux (détecteur), les photons émis par le soleil (source d'émission) traversent l'atmosphère. L'ionosphère est une des couches de l'atmosphère située à 60 km d'altitude. C'est un plasma. Dans ce milieu, les particules diffusantes sont des atomes et des molécules ionisées. Leur taille est très petite devant les longueurs d'onde du visible (400 nm – 800 nm). Dans ces conditions, d'après la loi de Rayleigh, le libre parcours moyen d'un photon varie en λ^4 . Plus la longueur d'onde est grande, plus le libre parcours moyen du photon est important et moins il sera diffusé. Ainsi, la composante bleue du spectre visible émis par le soleil est beaucoup plus diffusée par l'ionosphère que la composante rouge. Pendant la journée, le ciel est bleu, car les diffuseurs de l'ionosphère se comportent comme une infinité de sources secondaires émettant dans le bleu dans toutes les directions de l'espace. À l'aube et au crépuscule, la longueur du chemin optique augmente entre la source (soleil) et le détecteur (nos yeux). La composante bleue du spectre visible émis par le soleil est entièrement diffusée avant d'arriver à nos yeux. Cela explique que, lorsqu'il est dégagé, la couleur du ciel soit rouge au coucher et au lever du soleil. Par ailleurs, par beau temps, la couleur du ciel est homogène, car, dans les conditions de Rayleigh, la diffusion se fait de manière isotrope. C'est-à-dire de manière homogène dans toutes les directions de l'espace. Lorsque le ciel est nuageux, la loi de Rayleigh ne s'applique plus. En effet, les nuages sont chargés de gouttes d'eau dont la taille est du même ordre de grandeur que les longueurs d'ondes du visible (de 400 nm à 800 nm). Dans ces conditions (régime de Mie), le libre parcours moyen d'un photon dépend faiblement de la longueur d'onde. Les nuages apparaissent blancs avec des zones plus ou moins sombres. La couleur des nuages est inhomogène, car la diffusion est anisotrope. Elle se fait préférentiellement dans une direction de l'espace.

La couleur du ciel perçue par l'œil humain dépend donc de sa position par rapport au soleil (longueur du chemin optique) et de la composition du milieu traversé par les photons entre l'émission par le soleil et la détection par nos yeux. Cet exemple est intéressant pour introduire le principal frein au déploiement de la nanothermométrie basé sur le spectre de photoluminescence pour des applications biomédicales. **Comme dans l'exemple expliquant les changements de couleur du ciel, que nous détectons grâce à nos yeux, le nombre et l'énergie des photons émis au sein de tissus biologiques par les nanothermomètres et transmis au détecteur vont dépendre de la distance parcourue par les photons dans les tissus biologiques et de la composition de ces derniers.**

I.3. L'interaction entre la lumière et les tissus biologiques

I.3.a. Les fenêtres de transparence des tissus biologiques

Un tissu est un milieu complexe formé d'un ensemble de cellules. Les tissus biologiques sont constitués, entre autres, d'eau, de graisse et de sang. Chaque constituant des tissus a des coefficients d'absorption et de diffusion qui lui sont propres. Il existe trois fenêtres de transparence biologiques. Ces fenêtres correspondent à des intervalles de longueurs d'onde pour lesquels les coefficients d'absorption et de diffusion des constituants des tissus biologiques sont minimisés. La première se situe entre 650 nm et 950 nm (First Optical Window, Ist OW), la deuxième entre 1000 nm et 1350 nm (IInd OW), et la troisième entre 1500 nm et 1800 nm (IIIrd OW) (figure I-2).

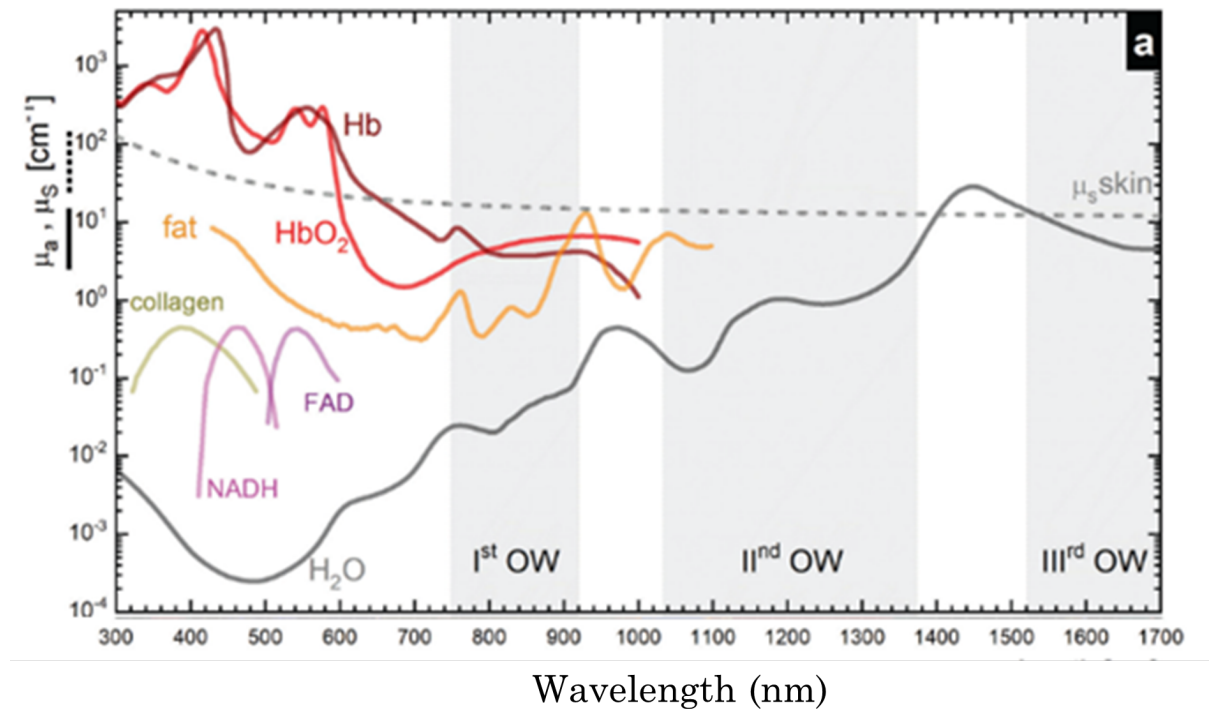


Figure I-2 : Coefficient d'absorption de différents constituants des tissus biologiques et coefficients de diffusion de la peau en fonction de la longueur d'onde. Les trois fenêtres de transparence des tissus biologiques (OW pour Optical Window) sont représentées en gris [39].

Le sang

Le sang est l'un des principaux constituants absorbants contenus dans les tissus biologiques. Il est donc intéressant de constater que sang est plus transparent pour les longueurs d'onde du proche infrarouge que pour les longueurs d'onde du visible. Par exemple, l'absorbance du sang oxygéné (HbO₂) et désoxygéné (Hb) est 6 fois moins importante à 1100 nm, dans le proche infrarouge, qu'à 600 nm, dans le visible [39]. Par ailleurs, le coefficient de diffusion du sang diminue lorsque la longueur d'onde augmente. Le libre parcours moyen des photons se propageant dans le sang est donc plus grand dans le proche infrarouge que dans le visible [39].

La peau

Le principal chromophore contenu dans la peau est la mélanine. La mélanine protège l'organisme contre les rayons ultraviolets en les absorbant et en convertissant l'énergie absorbée par relaxation non radiative, sous forme de chaleur. Les valeurs absolues des coefficients d'absorption de la peau dépendent, entre autres, de la densité de mélanine. En revanche qualitativement, leur évolution en fonction de la longueur d'onde suit la même tendance. Ils sont maximums entre 300 et 400 nm, diminuent à partir de 400 nm et atteignent un minimum dans la région du proche infrarouge.

L'eau

L'eau représente en moyenne 60 % du poids du corps humain. L'eau est transparente dans les longueurs d'onde visibles, mais ses coefficients d'absorption augmentent de manière importante dans l'infrarouge. L'eau possède d'ailleurs deux pics d'absorption à 980 nm et 1200 nm, dans la fenêtre d'émission des nanothermomètres d'Ag₂S. L'eau possède un troisième pic d'absorption beaucoup plus intense à 1400 nm qui réduit fortement le libre parcours moyen des photons émis autour de cette longueur d'onde.

I.3.b. L'absorption et l'autofluorescence des tissus biologiques

L'autofluorescence des tissus biologiques est liée à la présence de protéines endogènes fluorescentes. Après leur excitation optique, ces protéines se désexcitent par relaxation radiative, c'est-à-dire par émission de photons autour de 1000 nm. L'autofluorescence des tissus diminue lorsque la longueur d'onde la source d'excitation augmente. Le signal d'autofluorescence des tissus dépend de leur composition (figure I-3). L'équipe de José Lifante propose d'utiliser le signal d'autofluorescence du cerveau pour détecter de manière précoce et à faible coût des troubles du système nerveux [99]. Les chercheurs souhaitent utiliser le signal d'autofluorescence du cerveau pour diagnostiquer le vieillissement neuronal et le développement de certains troubles neurodégénératifs [99]. Pour des expériences de nanothermométrie ou d'imagerie, l'autofluorescence des tissus constitue un signal parasite s'ajoutant au signal d'intérêt de la sonde photoluminescente. En réduisant l'autofluorescence des tissus, nous augmentons donc le rapport signal/bruit. La maximisation du rapport signal : bruit est cruciale pour la précision de la mesure de température dans le cadre de la nanothermométrie.

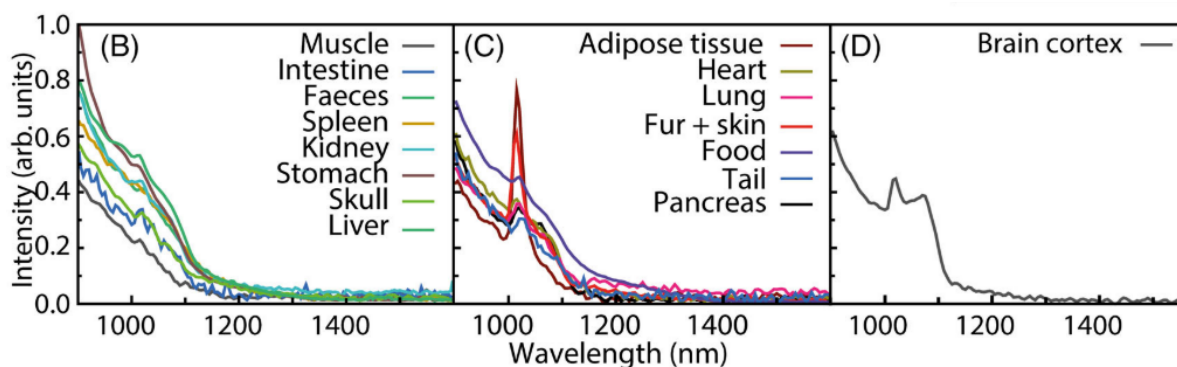


Figure I-3 : Spectres d'autofluorescence d'organes de souris obtenus sous excitation laser à 808 nm.

I.3.c. La diffusion et la résolution spatiale en imagerie optique

Lorsque nous mettons notre main devant une lampe émettant de la lumière blanche, elle apparaît rouge (figure I-4 a). Les longueurs d'ondes les plus élevées du spectre du visible sont transmises jusqu'à nos yeux, au travers de notre main, alors que les basses longueurs d'onde sont absorbées et diffusées. Dans le proche infrarouge, les photons peuvent donc parcourir une distance de l'ordre du centimètre au sein de tissus biologiques (figure I-4). Cette distance est 10^2 à 10^3 fois plus élevée que la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion. Dans les tissus biologiques, le libre parcours moyen de diffusion vaut entre 10 et 100 μm [101]. Chaque photon sera donc diffusé plusieurs fois au sein des tissus. À chaque impact avec un composant diffusant, la direction du photon est modifiée. La diffusion de la lumière réduit donc la quantité d'informations transportées par le signal optique. La conséquence directe de cette perte d'informations est une diminution de la résolution spatiale pour l'imagerie optique. La résolution spatiale détermine la dimension du plus petit détail observable sur le cliché d'imagerie et peut être définie comme la capacité à séparer les images de deux points objets voisins [39]. Plus l'épaisseur de tissu traversée par la lumière est importante, plus la résolution spatiale est affectée par la diffusion des photons au sein des tissus (figure I-5 a). Cet impact peut être modulé en jouant sur la longueur d'onde de la sonde photoluminescente. Les coefficients de diffusions des tissus biologiques diminuent avec la longueur d'onde [39]. Ainsi, dans le proche infrarouge, le libre parcours moyen des photons augmente, diminuant l'impact de la profondeur du signal sur la résolution spatiale. La résolution spatiale est un paramètre clé dans l'évaluation des performances de tout système d'imagerie (figure I-5 b). Pour la nanothermométrie par imagerie optique, la performance de l'instrument est donc dépendante du détecteur, mais également de la sonde photoluminescente utilisée (figure I-5 b). Pour la nanothermométrie par spectroscopie d'émission de photoluminescence, la résolution spatiale est nulle. La conséquence directe de la diffusion est la diminution du rapport signal/bruit impactant la précision de la mesure de température.

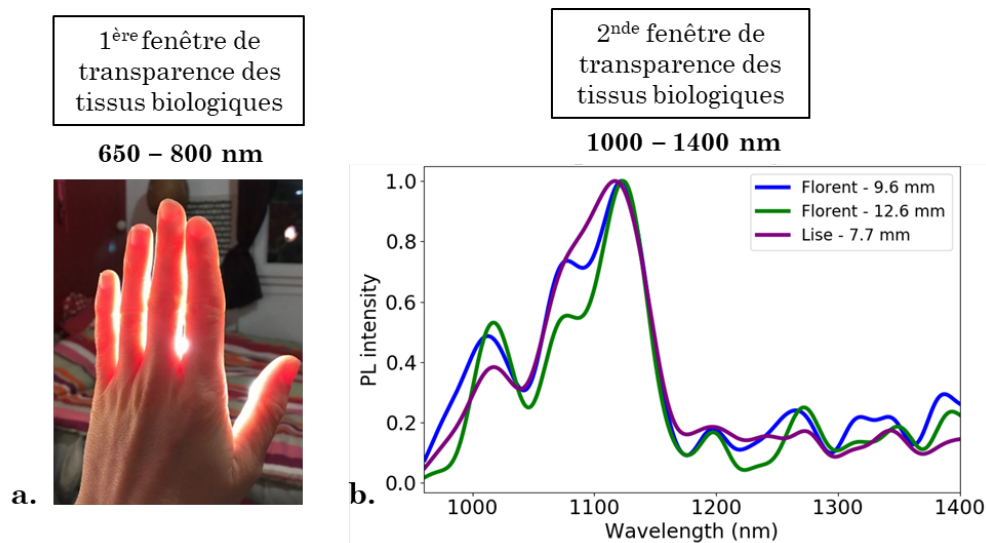


Figure I-4 : (a) lorsque nous plaçons notre main devant une source de lumière blanche, la composante bleue du spectre du visible est diffusée et absorbée par les tissus alors que la composante rouge est transmise. (b) Lorsque nous plaçons notre doigt au-dessus d'une cuvette optique contenant des nanoparticules d'Ag₂S dispersées dans le D₂O, les photons émis par les nanoparticules sont transmis au détecteur. Deux expérimentateurs ont participé à cette expérience : Florent Moreau (épaisseurs de doigts : 9,6 mm et 12,6 mm) et moi-même (Lise Abiven) (épaisseur de doigt : 7,7 mm). Les spectres d'émission transmis sont normalisés par rapport au maximum d'intensité pour comparer leur forme spectrale. Le rapport signal/bruit diminue lorsque l'épaisseur de tissus traversée par les photons augmente.

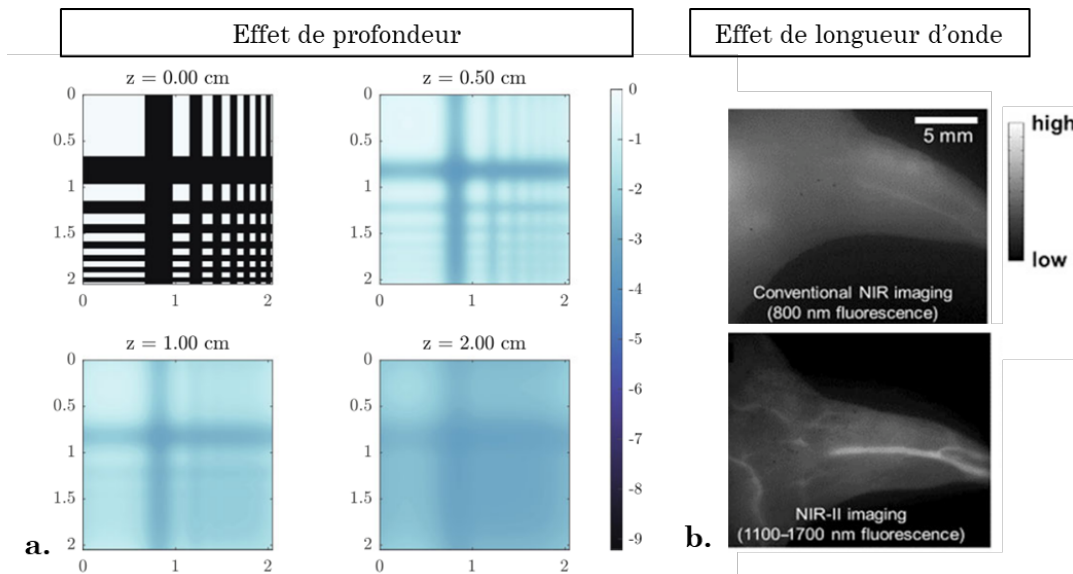


Figure I-5 : (a) Simulation de la propagation de la lumière à travers un milieu diffusant ($\mu_{\text{abs}}=0,025 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_{\text{sca}}=10 \text{ cm}^{-1}$). Lorsque la profondeur de l'épaisseur de milieu diffusant augmente, nous parvenons de moins en moins à distinguer les détails contrastés de l'image initiale ($z=0 \text{ mm}$). Les informations contenues dans l'image à $z = 0 \text{ mm}$ sont perdues à $z = 2 \text{ mm}$ [39]. (b) Illustration expérimentale de l'augmentation de la résolution spatiale de l'image avec la longueur d'onde d'émission de la sonde photoluminescente [39].

I.3.d. Retour sur le cahier des charges du nanothermomètre

Les nanoparticules d'Ag₂S émettent dans la seconde fenêtre de transparence des tissus biologiques entre 1000 nm et 1350 nm. Cette propriété optique a été un critère important dans la sélection des nanoparticules d'Ag₂S pour mener ce travail de thèse. Les instruments de détection (caméra d'imagerie et caméra hyperspectrale) permettent aujourd'hui la détection de signaux émis dans la seconde fenêtre des tissus biologiques. En utilisant des sondes photoluminescentes émettant entre 1000 nm et 1350 nm, plutôt que dans le visible, il est possible de détecter les signaux de photoluminescence émis plus profondément dans les tissus (minimisation des coefficients d'extinction) avec une meilleure résolution spatiale (minimisation des coefficients de diffusion) pour l'imagerie optique et un meilleur rapport signal/bruit (minimisation de l'autofluorescence des tissus) améliorant la précision de la mesure de température pour la nanothermométrie.

I.4. Un nanothermomètre est-il toujours fiable ?

I.4.a. Contexte

Dans ce projet de thèse, nous exploitons la dépendance du spectre de photoluminescence des sulfures d'argent vis-à-vis de leur température de cœur. Cependant, les photons émis spontanément par les nanoparticules d'Ag₂S après excitation optique se propagent dans un milieu (eau, cellules, tissus biologiques) avant d'être transmis au détecteur. Le spectre de photoluminescence acquis par le détecteur est donc caractéristique de la température, mais aussi des propriétés optiques du milieu (coefficients d'absorption et de diffusion) traversé par les photons.

I.4.b. Positionnement du problème

En 2018, la première étude portant sur l'influence de l'environnement des nanothermomètres sur leur spectre de photoluminescence est parue dans la littérature [35]. Dans cette étude, des nanothermomètres luminescents dopés aux terres rares (SrF₂:0.5Nd), émettant entre 1250 nm et 1400 nm, sont dispersés dans l'eau. Or ce solvant possède une bande d'absorption centrée sur 1400 nm et les coefficients d'absorption augmentent à partir de 1300 nm. L'absorption de l'eau dans la fenêtre d'émission du nanothermomètre engendre une déformation du spectre de photoluminescence (figure I-6).

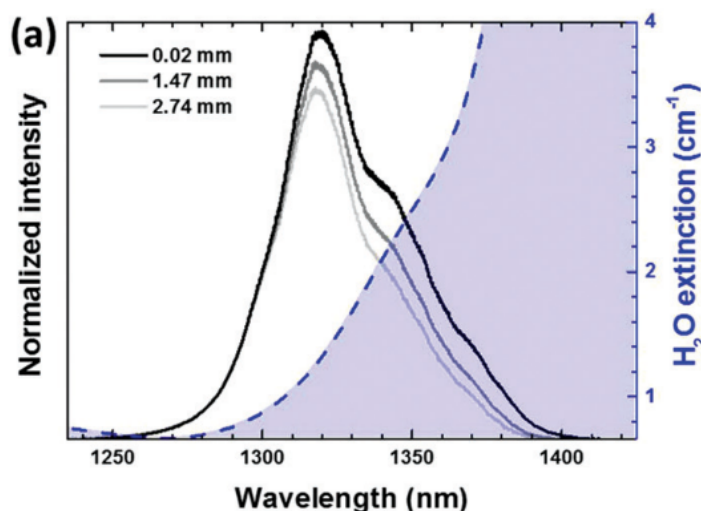


Figure I-6 : Le spectre d'extinction de l'eau (pointillés bleus) et trois spectres d'émission du nanothermomètre SrF₂:0.5Nd (lignes pleines) sont représentés. L'eau absorbe dans la fenêtre d'émission du nanothermomètre. Cela engendre la déformation du spectre de photoluminescence (SrF₂:0.5Nd) lorsque la hauteur de focalisation de la source d'excitation (laser 808 nm) par rapport à la cuvette optique contenant une suspension aqueuse de nanothermomètre varie [35].

Les nanoparticules de sulfure d'argent ont déjà été utilisées pour mesurer, sans contact, la température intracérébrale d'une souris [43]. Dans ce cas d'étude, le milieu de travail et le milieu d'étalonnage de la sonde température, H₂O, n'ont donc pas les mêmes coefficients d'extinction. En effet, les photons émis par les Ag₂S *in vivo* vont traverser plusieurs milieux biologiques avec des propriétés optiques différentes (coefficient d'absorption et de diffusion) avant d'être transmis au détecteur (caméra d'imagerie infrarouge). Ils vont traverser le cerveau, la boîte crânienne (os) et la peau. Or l'eau et les tissus cérébraux n'ont pas les mêmes coefficients d'absorption. Les tissus cérébraux contiennent de l'eau, mais d'autres constituants biologiques interviennent dans leur composition. En effet, le cerveau est composé à 60% de graisse et est irrigué par des vaisseaux sanguins [102]. De plus, la structure tissulaire diffuse la lumière alors que pour une suspension aqueuse de sulfure d'argent dilué, la diffusion de la lumière peut être négligée [101]. Ainsi, pour une température donnée, la forme du spectre de photoluminescence transmis au détecteur, lorsque la nanosonde Ag₂S se situe dans l'eau

(milieu de calibration) ou dans le cerveau (milieu de travail), n'est probablement pas la même. Pour illustrer ce propos, la **figure I-7** montre une déformation importante du spectre de photoluminescence transmis au détecteur lorsque les Ag_2S sont *in vivo* dans le foie (figure I-7 b et e) [37]. Cette déformation spectrale est moins importante lorsque les Ag_2S sont localisés sous la peau d'une souris (figure I-7 a et b) [37]. Néanmoins, en utilisant une caméra d'imagerie⁴⁴, nous n'avons pas de résolution en longueur d'onde. Ainsi, il n'est pas possible d'observer directement les effets de l'interaction lumière-matière, car nous n'avons pas accès au spectre d'émission de photoluminescence transmis au détecteur infrarouge. Sans tenir compte de la déformation spectrale liée aux interactions lumière-matière, une mesure de température fiable à partir du signal optique émis par les sulfures d'argent n'est pas garantie.

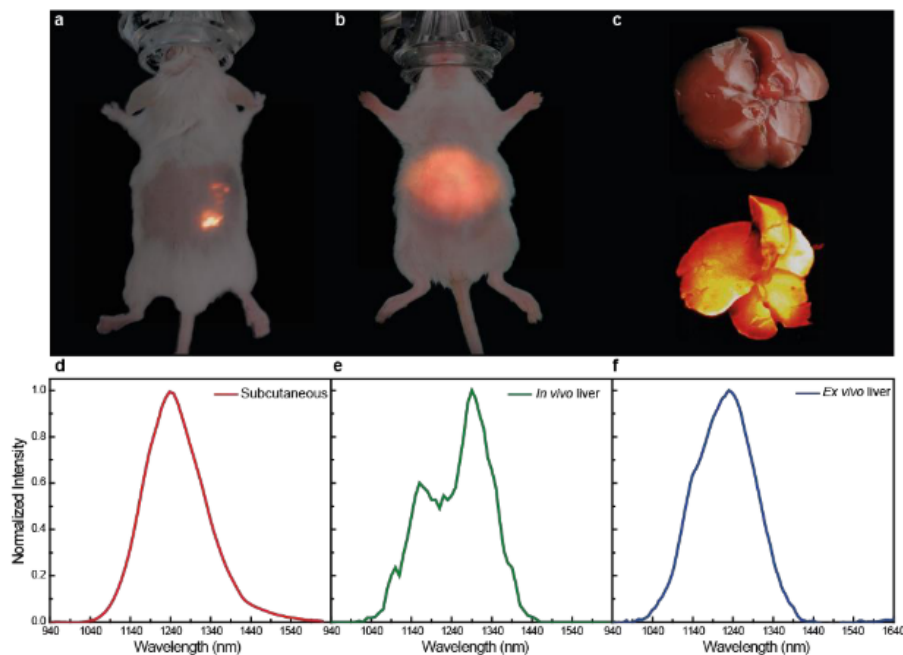


Figure I-7 : Évolution du spectre d'émission de photoluminescence de nanoparticules de Ag_2S transmis au détecteur infrarouge en fonction du milieu traversé par les photons. [37]

I.4.c. Solution

Pour effectuer des mesures de température fiables grâce à la photoluminescence de nanomatériaux, il est primordial de prendre en compte l'interaction entre les photons émis par les nanothermomètres et le milieu dans lequel se propagent ces photons avant d'être transmis au détecteur. Des précautions doivent être prises vis-à-vis des conditions expérimentales pour effectuer des mesures de températures robustes grâce à la photoluminescence des nanothermomètres. En effet si la déformation spectrale liée à l'environnement de la sonde de température est différente pendant les phases d'étalonnage et de mesures, l'information en température obtenue ne peut pas être fiable. Jusqu'à présent, dans la littérature, les effets de l'interaction lumière-matière ont été décrits qualitativement, mais aucune étude quantitative n'a encore été réalisée. **Ici, nous avons souhaité modéliser l'interaction entre les photons émis par les sulfures d'argent et l'eau grâce à la loi de Beer-Lambert.**

⁴⁴ La société BioSpace Lab (membre du consortium NanoTBTEch) a développé une caméra d'imagerie pour la nanothermométrie. Le dispositif est équipé d'un système de roue à filtres permettant de mesurer le paramètre p_1 et de remonter à une mesure de la température de cœur des nanoparticules. Cette caméra a été livrée en mai 2021 à l'Université Autonome de Madrid, au sein de l'équipe de Daniel Jaque. Elle est aujourd'hui opérationnelle.

II. Modélisation de l'absorption de l'eau

II.1. Description de l'expérience

Les coefficients d'absorption de l'eau dépendent de la température (figure II-1). Dans cette étude, nous allons calculer les coefficients d'absorption de l'eau à 25°C grâce à la loi de Beer-Lambert et en utilisant les spectres de photoluminescence des sulfures d'argent enregistrés dans H₂O et dans D₂O pour plusieurs profondeurs de signal, h , connues.

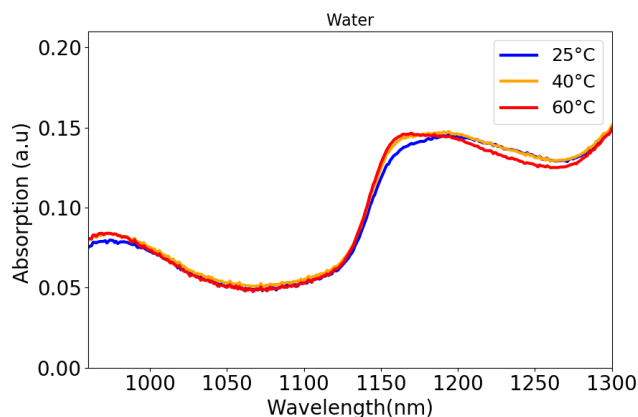


Figure II-1 : Spectres d'absorption de l'eau enregistrés pour des échantillons thermalisés à 25°C, 40°C et 60°C.

Deux séries d'expériences sont réalisées pour les nanoparticules de Ag₂S dispersées dans l'eau (H₂O) et dans l'oxyde de deutérium (D₂O). Chaque suspension est contenue dans une cuvette optique et sa température est fixée à 25°C à l'aide d'un compartiment à température contrôlée (Quantum northwest). L'échantillon est excité avec une LED émettant à 730 nm (Thorlabs). Le faisceau d'excitation est focalisé avec un collimateur de focal 5 cm de manière à exciter 0,7 mL du volume de la suspension. Le volume de la suspension augmente progressivement de 0,7 mL à 2,6 mL par ajouts progressifs de 100 µL de suspension. Après chaque ajout de 100 µL, les spectres de photoluminescence des nanoparticules de Ag₂S sont enregistrés à l'aide d'une fibre optique connectée à une caméra hyperspectrale infrarouge (PyLoN-IR, Princeton). Pour éviter la détection des photons parasites provenant de la LED-730 nm et maximiser le rapport signal/bruit, la direction d'excitation du signal de photoluminescence est orthogonale à la direction de détection des photons émis par les nanoparticules de sulfures d'argent. De plus, un filtre passe-haut avec une longueur d'onde de coupure de 1000 nm est utilisé à l'entrée de la fibre optique (figure II-2).

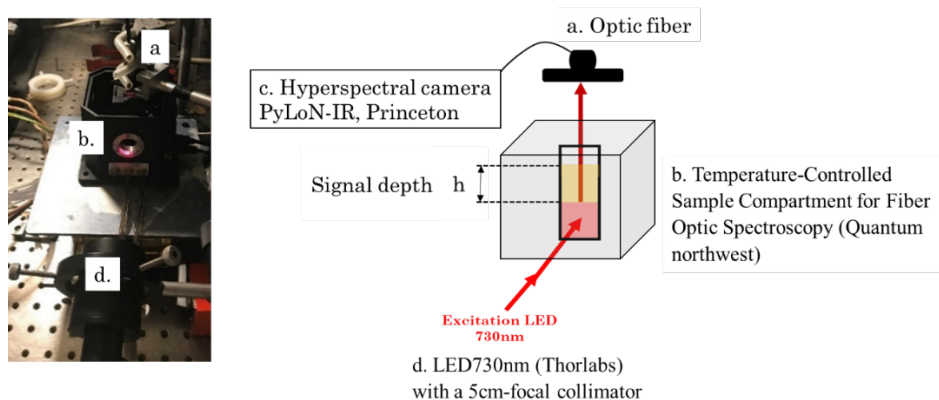


Figure II-2 : Montage expérimental

II.2. Résultats et discussions

Pour les suspensions de 0,7 mL, tout le volume de l'échantillon est situé dans le champ d'excitation de la LED-730 nm. Toutes les nanoparticules de Ag_2S contenues dans le volume de l'échantillon sont excitées par la source d'excitation. Chaque nanoparticule de sulfure d'argent située dans le champ d'excitation se comporte comme une nouvelle source incidente, émettant autour de 1100 nm à 25°C.

Pour les suspensions de volume supérieur à 0,7 mL, une partie de l'échantillon est située en dehors du champ d'excitation de la LED. Nous appellerons désormais « volume excédentaire », le volume situé en dehors du champ de photoexcitation. Les nanoparticules de Ag_2S contenues dans le volume excédentaire ne sont pas excitées : elles n'émettent donc aucun photon. Ainsi, le volume excédentaire se comporte comme un filtre placé entre les sources incidentes de Ag_2S émettant à 1100 nm et le détecteur. En effet, avant d'atteindre le détecteur, l'émission incidente provenant des sources Ag_2S ($i_0(\lambda, T)$) traverse le milieu filtrant, où les photons peuvent être absorbés ou diffusés (figure II-3). Plus le volume de l'échantillon est élevé, plus le volume excédentaire est important et donc plus la profondeur du signal de Ag_2S incident ($i_0(\lambda, T)$) dans le milieu est élevée.

Dans le cas présent, l'effet de la diffusion peut être négligé. Les seuls diffuseurs présents dans les deux milieux d'études sont les particules d' Ag_2S et nous travaillons en régime dilué pour minimiser le nombre de diffuseurs. La concentration de Ag_2S dans l'eau et l'oxyde de deutérium est de 0,2 mg/mL. Par ailleurs, la taille des diffuseurs (4,5 nm) est bien inférieure à la longueur d'onde correspondant aux photons détectés (1100 nm). Nous sommes donc dans le régime de diffusion de Rayleigh. Plus la longueur d'onde est élevée, plus la diffusion de la lumière est faible. Ici, la diffusion des photons dans le milieu peut être négligée. D'après la loi de Beer-Lambert, l'intensité de photoluminescence transmise ($i(\lambda, T, h)$) dépend de la profondeur de la source dans le milieu (h) et des coefficients d'absorption du milieu traversé par le photon de la source au détecteur.

$$i(\lambda, T, h) = i_0(\lambda, T)e^{-h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T)}$$

Le spectre d'absorption de H_2O présente trois bandes d'absorption à 960 nm, 1200 nm et 1400 nm. Selon la loi de Beer-Lambert, l'émission de photoluminescence provenant des nanoparticules de Ag_2S , transmise au détecteur dépend de la profondeur des nanoparticules de Ag_2S dans le milieu (h). La théorie est confirmée expérimentalement (Figure II-3 a). Dans H_2O , plus le volume excédentaire est élevé, plus la déformation du spectre de photoluminescence détecté est importante. Dans nos expériences, la surface de la base de la cuvette optique contenant la suspension de Ag_2S vaut 1 cm². **L'ajout d'un volume de 100 μL correspondant donc théoriquement à une augmentation de la profondeur de signal de 1 mm.** Lorsque le solvant utilisé est le D_2O , aucune déformation spectrale n'est observée lorsque la profondeur du signal augmente (figure II-3 b). En effet, les coefficients d'absorption du D_2O sont constants et proches de zéro entre 960 nm et 1400 nm. Ainsi, lorsque le milieu considéré est l'oxyde de deutérium, la loi de Beer-Lambert peut être simplifiée de la manière suivante :

$$i^{\text{D}_2\text{O}}(\lambda, T, d) = i_0(\lambda, T)$$

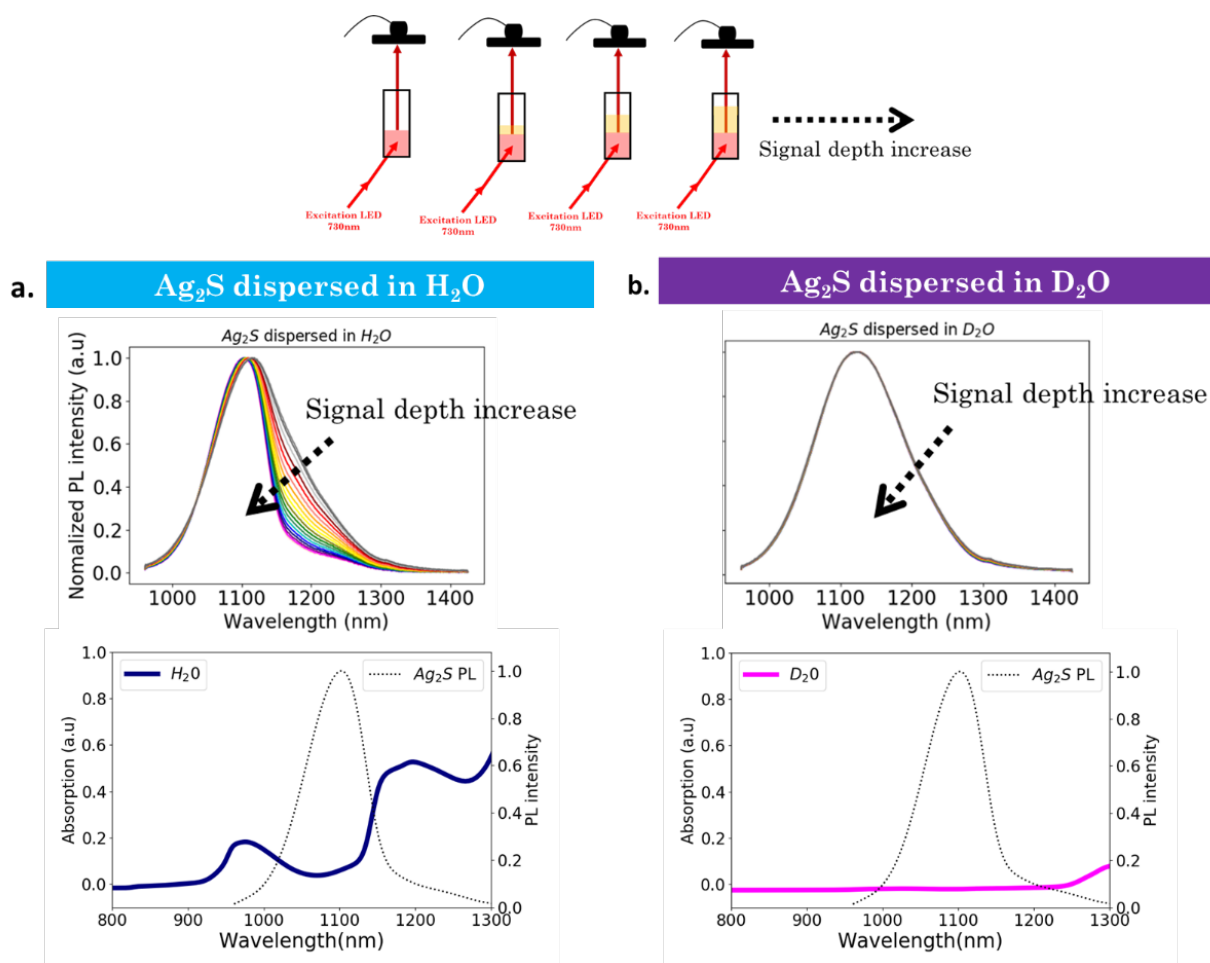


Figure II-3 : Illustration de l'influence des coefficients d'absorption et de la profondeur du signal sur le signal transmis au détecteur. Les milieux considérés sont H₂O (a) et D₂O (b).

II.3. Calcul des coefficients d'absorption de l'eau

Nous avons démontré dans la section précédente :

$$i^{D2O}(\lambda, T, h) = i_0(\lambda, T) \quad \text{(i)}$$

Dans D₂O, l'intensité transmise $i^{D2O}(\lambda, T, h)$ ne dépend donc pas la profondeur du signal. Nous pouvons donc écrire :

$$i^{D2O}(\lambda, T, h) = i^{D2O}(\lambda, T) \quad \text{(ii)}$$

Par ailleurs, dans H₂O, l'intensité transmise $i^{H2O}(\lambda, T, h)$ s'écrit :

$$i^{H2O}(\lambda, T, h) = i_0'(\lambda, T) \cdot e^{-h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T)} \quad \text{(iii)}$$

À ce stade, introduisons le coefficient adimensionnel A. Ce coefficient permet de corriger la différence de concentration de la suspension Ag₂S dans H₂O par rapport à la suspension Ag₂S dans D₂O. Nous posons donc :

$$i_0'(\lambda, T) = A \cdot i_0(\lambda, T) \quad \text{(iv)}$$

Ainsi,

$$i^{H2O}(\lambda, T, h) = A \cdot i^{D2O}(\lambda, T) \cdot e^{-h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T)} \quad \text{(v)}$$

En divisant l'équation (v) par $A \cdot i^{D2O}(\lambda, T, d)$ et en prenant le logarithme népérien des termes, nous obtenons :

$$\ln\left(\frac{i^{H2O}(\lambda, T, h)}{A \cdot i^{D2O}(\lambda, T)}\right) = -h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T) \quad \text{(vi)}$$

Enfin, en ajoutant $\ln(A)$, nous arrivons à la relation suivante :

$$\ln\left(\frac{i^{H2O}(\lambda, T, h)}{i^{D2O}(\lambda, T)}\right) = -h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T) + \ln(A) \quad \text{(vii)}$$

Les sulfures d'argent émettent dans l'intervalle de longueur d'onde $L = [960-1300]$ (nm). À 25°C, pour une gamme de profondeurs de signal, h, allant de 0 mm à 1,6 mm, et pour toute longueur d'onde, λ , comprise dans l'intervalle L, nous avons mesuré $i^{H2O}(\lambda, 25^\circ C, h)$ et $i^{D2O}(\lambda, 25^\circ C)$.

L'équation (vii) contient donc seulement deux inconnues $\mu_{abs}(\lambda, T)$ et $\ln(A)$. Pour toute longueur d'onde λ , nous pouvons déterminer ces inconnues en effectuant une régression linéaire à partir du tracé de $\ln\left(\frac{i^{H2O}(\lambda, T, h)}{i^{D2O}(\lambda, T)}\right)$ en fonction de la profondeur du signal h. Les coefficients directeurs des droites sont les opposés des coefficients d'absorption de l'eau à 25°C, $\mu_{abs}(\lambda, 25^\circ C)$. Les ordonnées à l'origine des droites correspondent à la valeur $\ln(A)$, qui ne dépend pas de la longueur d'onde (annexe B.III.1).

Grâce au monochromateur de notre dispositif optique, nous mesurons les intensités pour 1024 valeurs de longueurs d'onde. Nous avons donc effectué 1024 régressions linéaires et obtenu 1024 coefficients directeurs correspondant aux coefficients d'absorption de l'eau $\mu_{abs}(\lambda, 25^\circ C)$ dans l'intervalle en longueur d'onde L (figure II-5).

Nous observons une bonne correspondance entre les coefficients d'absorption calculés grâce aux données expérimentales (grâce à la méthode décrite ci-dessus) (figure II-4) et les coefficients d'absorption dont les valeurs sont extraites de la littérature⁴⁵ (voir figure I-2) [39]. Le programme utilisé, écrit en langage Python, est disponible en **annexe B.III**. Les valeurs extraites de la littérature sont obtenues par lecture graphique. Elles sont donc peu précises. De plus, la température de l'échantillon n'est pas précisée. Or, nous l'avons vu précédemment, les coefficients d'absorption de l'eau dépendent de la température.

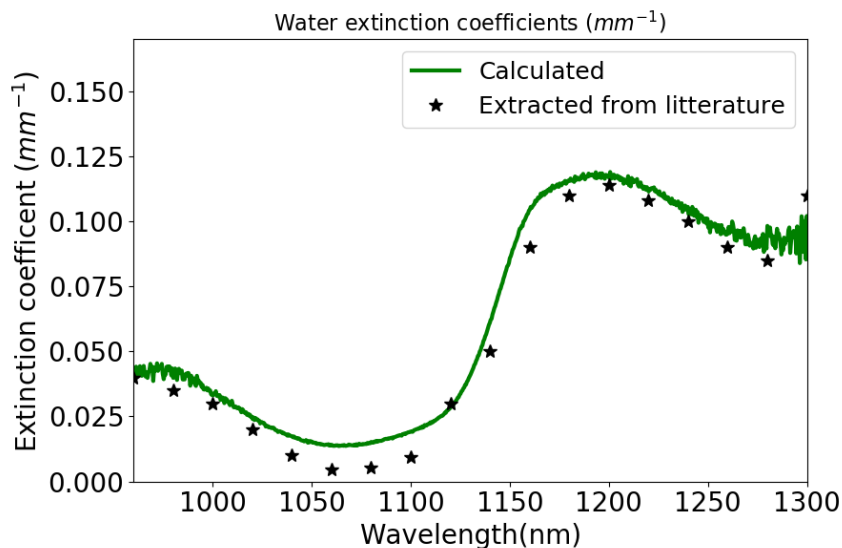


Figure II-4 : Les coefficients d'absorption de l'eau à 25°C pour toutes les valeurs d'ondes comprises dans l'intervalle L.

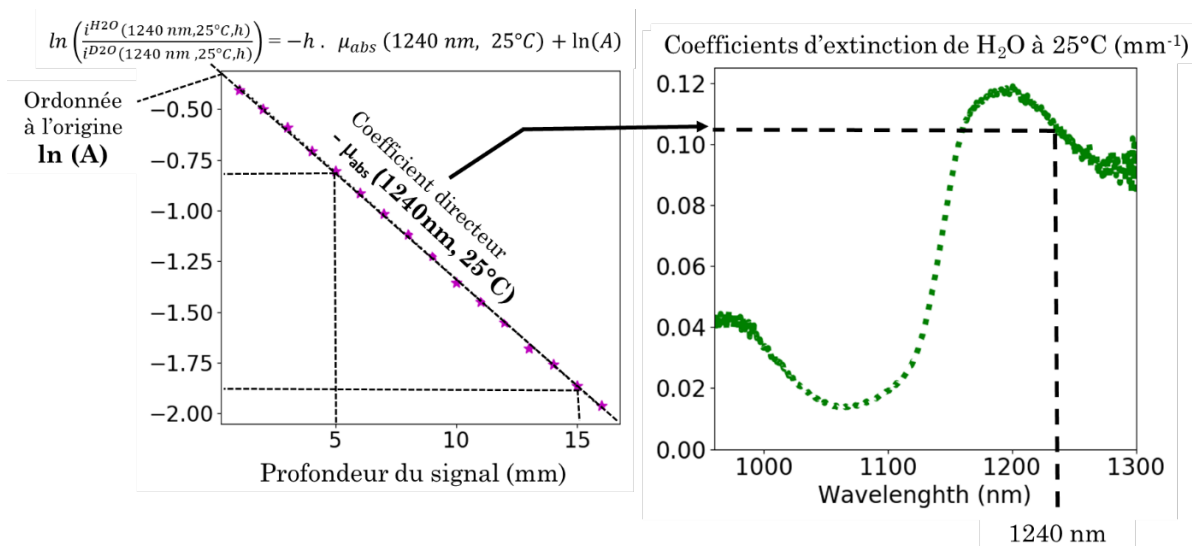


Figure II-5 : Méthode utilisée pour calculer les coefficients d'absorption de l'eau à 25°C pour toutes les valeurs d'ondes comprises dans l'intervalle L.

⁴⁵ Les résultats extraits de la littérature sont disponibles **figure I-2**. Attention les coefficients d'absorption de l'eau y sont donnés en cm^{-1} . Les coefficients d'absorption calculés grâce à la méthode décrite dans ce développement sont en mm^{-1} (figure II-4)

III. Interactions lumière matière et robustesse de la mesure de température

III.1. Démarche expérimentale

III.1.a. Contexte

Afin d'évaluer la fiabilité de la mesure de la température, obtenue à partir d'un modèle d'étalonnage par rapport à un paramètre de photoluminescence, il est primordial de prendre en compte l'interaction entre la lumière et la matière dans les travaux de recherche mettant en jeu la nanothermométrie de photoluminescence. En effet, l'interaction lumière-matière a un impact direct sur la forme du spectre et donc sur la mesure du paramètre de photoluminescence effectuée pour une température donnée.

III.1.b. Illustration du problème

Description de l'expérience

Une suspension aqueuse de Ag_2S à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (matériau optimisé dans le chapitre 2) est placée dans le support de cuve chauffant (Quantum Northwest). Elle est thermalisée à 25°C (figure 9). La température globale de la suspension est contrôlée grâce à la sonde à fibre optique. Nous enregistrons un spectre d'émission de photoluminescence (caméra hyperspectrale, PyLoN-IR, Princeton) pour plusieurs volumes de cette suspension compris entre 0,7 mL et 3,4 mL. Pour chaque spectre de photoluminescence acquis, nous utilisons le modèle d'étalonnage établi sur p_1 pour remonter à la température sondée par les Ag_2S . La suspension d'étalonnage est suspension aqueuse de Ag_2S à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, de volume 0,7 mL (profondeur de signal nulle). Nous rappelons que p_1 est tel que :

$$p_1(T) = \frac{I_1}{I_2} = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

La même expérience est réalisée avec une suspension de nanoparticules de Ag_2S dispersés dans l'oxyde de deutérium, thermalisée à 20°C , pour plusieurs volumes compris entre 0,7 mL et 2,1 mL. Un modèle d'étalonnage établi sur p_1 est utilisé pour remonter à la température sondée par les Ag_2S . Dans cette expérience, la suspension d'étalonnage est une suspension de Ag_2S dispersées dans le D_2O , de volume 0,7 mL (profondeur de signal nulle).

Rappel du protocole d'étalonnage

Un programme de montée en température (de 23°C à 45°C) avec une rampe de $0,7^\circ\text{C min}^{-1}$ est imposée à une suspension de Ag_2S à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (matériau optimisé dans le chapitre 2) placée dans un support de cuve chauffant (Quantum Northwest) (figure 9). Un spectre de photoluminescence détecté grâce à une caméra hyperspectrale (PyLoN-IR, Princeton) est enregistré toutes les 10 secondes. Pour chaque spectre de photoluminescence enregistré, nous calculons le rapport d'intensité grâce à la méthode de traitement des données est **décrite en annexe B.II**. La correspondance entre les valeurs des rapports d'intensité et la température se fait grâce au temps d'acquisition des spectres de photoluminescence.

Résultats

La **figure III-1** illustre que la différence entre la température mesurée par la sonde à fibre optique (25°C, triangles noirs) et la température obtenue grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 à partir des spectres de photoluminescence des nanoparticules de **Ag₂S dispersées dans H₂O** (étoiles cyan) augmente drastiquement lorsque la profondeur du signal augmente. La **figure III-2** montre que cela n'est pas le cas lorsque les nanoparticules de **Ag₂S** sont **dispersées dans D₂O**. Pour tous essais effectués avec des volumes de suspension compris entre 0,7 mL et 2,1 mL, la température obtenue grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 est très proche de la température globale mesurée par la sonde à fibre optique (20°C, triangles noirs).

L'eau présente une bande d'absorption centrée sur 1200 nm, dans la fenêtre d'émission des sulfures d'argent (figure II-3). Ainsi, la contribution de I_2 est d'autant plus faible que la profondeur du signal des sulfures d'argent est grande. Autrement dit, pour une température donnée, le rapport $p_1 = \frac{I_1}{I_2}$ diminue avec la profondeur du signal dans le milieu. Comme D₂O ne possède pas de bande d'absorption dans la fenêtre d'émission des Ag₂S [1000 nm -1300 nm] (figure II-3), le rapport p_1 est indépendant de la profondeur du signal.

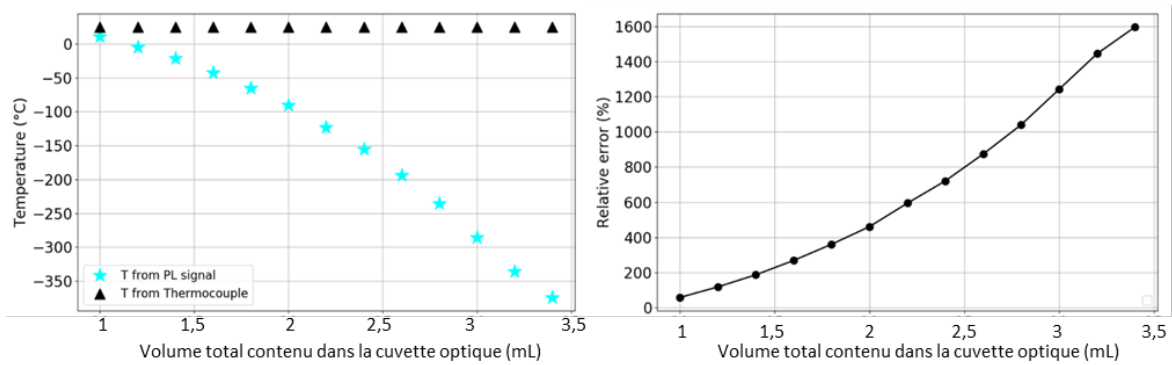


Figure III-1 : La figure de gauche illustre la différence entre la température mesurée par la sonde à fibre optique (triangles noirs) et la température obtenue grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 à partir des spectres de photoluminescence des nanoparticules de **Ag₂S dispersées dans H₂O** pour des profondeurs de signal comprises entre 0,7 mL et 3,4 mL (étoiles cyan). La figure de droite montre que l'erreur effectuée sur la mesure de température sondée par les Ag₂S est d'autant plus grande que la profondeur de signal est grande.

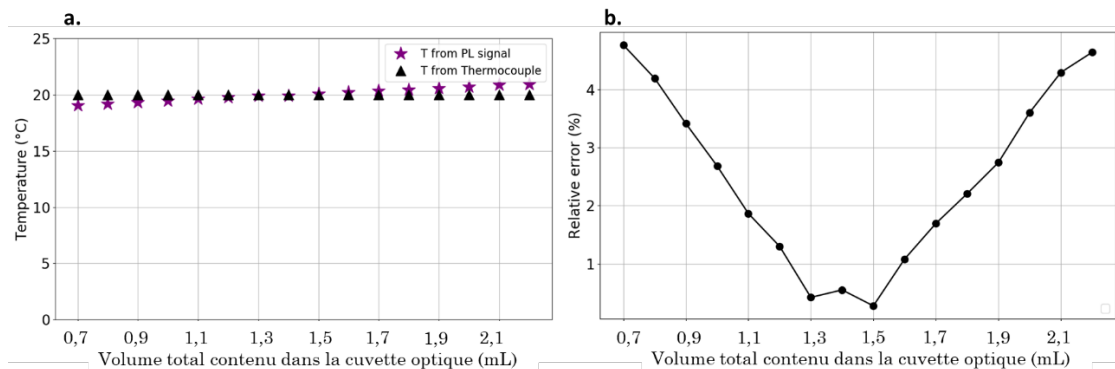


Figure III-2 : La figure de gauche illustre la différence entre la température mesurée par la sonde à fibre optique (triangles noirs) et la température obtenue grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 à partir des spectres de photoluminescence des nanoparticules de **Ag₂S dispersées dans D₂O** pour des profondeurs de signal comprises entre 0,7 mL et 2,1 mL (étoiles cyan). La figure de droite illustre l'erreur effectuée sur la mesure de température sondée par les Ag₂S en fonction de la profondeur de signal. L'erreur est beaucoup

moins importante dans l'expérience réalisée avec le D₂O qu'avec H₂O comme milieu de dispersion des nanoparticules.

III.1.c. Études de cas

Pour étudier de manière approfondie l'effet du milieu sur la robustesse de mesures de températures, obtenue à partir d'un modèle d'étalonnage établi sur un paramètre de photoluminescence, considérons les deux études de cas suivantes :

- **Première étude de cas** : nous évaluons l'erreur effectuée sur la mesure de température lorsque les milieux d'étalonnage et d'utilisation de la sonde de température ont des coefficients d'extinction optique différents. Nous travaillerons à une profondeur de signal de 8 mm (soit avec des suspensions de 1,5 mL) dans H₂O et dans D₂O.
- **Seconde étude de cas** : nous évaluerons, l'erreur effectuée sur la mesure de température lorsque la profondeur des signaux enregistrés dans les conditions d'étalonnage et d'utilisation du nanothermomètre sont différentes. Nous travaillerons dans l'eau à des profondeurs de 0 mm (0,7 mL), 6 mm (1,3 mL) et 8 mm (1,5 mL).

Dans les conditions expérimentales des deux études de cas décrits ci-dessus, nous étudions l'évolution de rapports d'intensité en fonction de la température.

III.2. Étude de cas 1

Pour une profondeur de signal donnée (8 mm), évaluation de l'erreur effectuée sur la mesure de température lorsque les milieux d'étalonnage et de travail ont des coefficients d'extinction optique différents.

Dans le cadre de cette première étude de cas, les nanoparticules de Ag₂S sont dispersées dans deux milieux différents : H₂O et D₂O. Les deux suspensions ont un volume de 1,5 mL.

	Échantillon 1	Échantillon 2
Volume	1,5 mL	1,5 mL
Profondeur de signal	8 mm	8 mm
Milieu de dispersion	H ₂ O	D ₂ O

Entre 22°C et 45°C, les rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 varient linéairement avec la température lorsque les nanoparticules sont dispersées dans H₂O et dans D₂O (tableau III-3). Néanmoins, le milieu a une influence sur le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine des modèles d'étalonnage. Lorsque deux milieux ont des coefficients d'extinction différents, c'est le cas pour H₂O et D₂O, pour une température donnée, une valeur différente de paramètre de photoluminescence sera mesurée. Ainsi, si le milieu de travail est différent du milieu de calibration, une erreur sur la mesure de températures absolue doit être considérée.

Si deux modèles ont le même coefficient directeur et des ordonnées à l'origine différentes, il est possible d'effectuer une mesure fiable de variation de température locale en mesurant une variation de rapport d'intensité. Dans ce travail, trois rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 sont testés. Le rapport d'intensité a une influence sur l'écart entre les coefficients directeurs des modèles d'étalonnage obtenus dans H₂O (a_{H2O}) et dans D₂O (a_{D2O}). Cet écart est de 39% si on considère le rapport d'intensité p_1 alors qu'il n'est plus que de 3% en considérant le rapport d'intensité p_2 (tableau III-1). Autrement dit, en utilisant p_2 comme paramètre de photoluminescence, l'effet du milieu engendre une erreur de 3% sur la mesure de température relative alors qu'une erreur de 39% est engendrée par l'utilisation du rapport p_1 (tableau III-1). Il serait intéressant de tester automatiquement, grâce à un algorithme, toutes les combinaisons possibles de rapports d'intensité, en jouant sur la position et la

largeur des bornes d'intégration, jusqu'à obtenir le rapport d'intensité minimisant l'écart entre les coefficients directeurs du modèle d'étalonnage obtenu dans H₂O et dans D₂O.

Tableau III-1 : Variation de l'écart entre les coefficients directeurs des modèles d'étalonnages obtenus dans H₂O (a_{H20}) et dans D₂O (a_{D20})

	p₁	p₂	p₃
$\left \frac{a_{D20} - a_{H20}}{a_{D20}} \right $	39%	3%	15%

Admettons qu'une différence de rapport d'intensité p₁ et p₂ de 0,2 soit mesurée. Grâce au modèle d'étalonnage, nous pouvons écrire :

$$\Delta T = T_2 - T_1 = a (p_1(T_2) - p_1(T_1)) - b + b$$

Soit,

$$\Delta T = T_2 - T_1 = a (p_1(T_2) - p_1(T_1))$$

Tableau III-2 : Écart sur les variations de température correspondant à une augmentation de 0,2 du rapport d'intensité p₁ et p₂. Les calculs sont effectués en considérant les modèles d'étalonnage obtenus dans H₂O et dans D₂O.

	p₁(T₂) - p₁(T₁) = 0,2	p₂(T₂) - p₂(T₁) = 0,2
ΔT_{H20} (°C)	0,2 × 25,9 = 5,2	0,2 × 14,4 = 2,9
ΔT_{D20} (°C)	0,2 × 42,8 = 8,6	0,2 × 15,0 = 3
$\left \frac{\Delta T_{D20} - \Delta T_{H20}}{\Delta T_{D20}} \right $	39%	3%

Tableau III-3 : Droites d'étalonnage obtenues dans H₂O et dans D₂O à partir des rapports d'intensité p₁, p₂ et p₃.

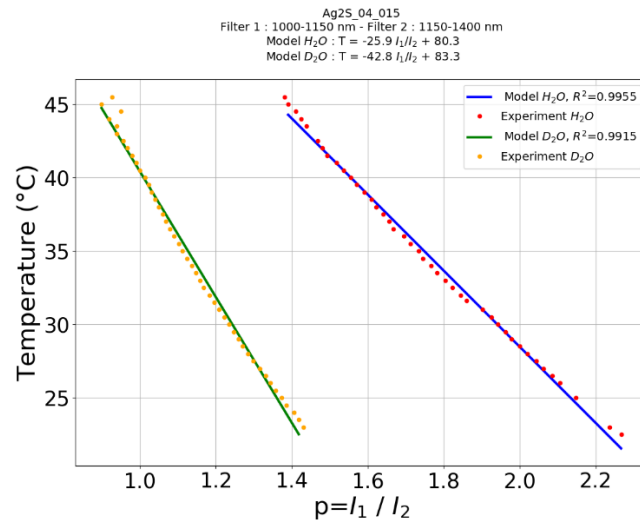
Rapports d'intensités

p₁(T)

$$= \frac{I_{1-1}(T)}{I_{1-2}(T)}$$

$$= \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

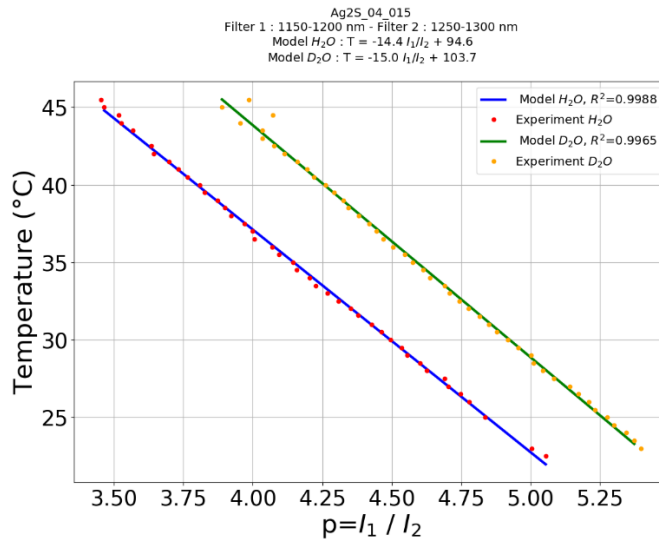
Droites d'étalonnage



p₂(T)

$$= \frac{I_{2-1}(T)}{I_{2-2}(T)}$$

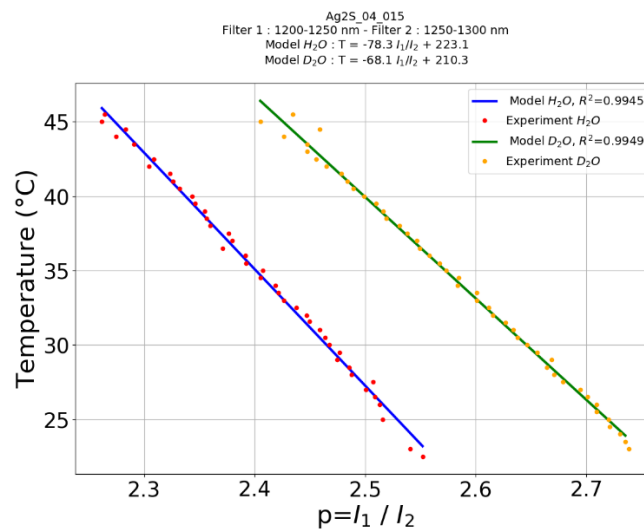
$$= \frac{\int_{1150\text{nm}}^{1200\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1250\text{nm}}^{1300\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$



p₃(T)

$$= \frac{I_{3-1}(T)}{I_{3-2}(T)}$$

$$= \frac{\int_{1200\text{nm}}^{1250\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1250\text{nm}}^{1300\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$



III.3. Étude de cas 2

Pour un milieu donné, évaluation de l'erreur effectuée sur la mesure de température lorsque la profondeur des signaux enregistrés dans les conditions d'étalonnage et de travail est différente.

Considérons désormais trois suspensions aqueuses de nanoparticules de Ag_2S de volume différents.

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Volume	0,7 mL	1,3 mL	1,5 mL
Profondeur de signal	0 mm	6 mm	8 mm
Milieu de dispersion	H_2O	H_2O	H_2O

Nous avons tracé les droites d'étalonnages à partir du rapport d'intensité p_1 pour les trois volumes de suspensions (tableau III-5). À une température donnée, le volume de l'échantillon (autrement dit la profondeur du signal dans H_2O) a un impact sur le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage (tableaux III-4 et III-5). Le coefficient directeur (a) de la droite d'étalonnage augmente de 10 % lorsque le volume de l'échantillon passe de 0,7 mL à 1,3 mL. Et de 21 % lorsque le volume de l'échantillon passe de 0,7 mL et 1,5 mL. La dépendance du rapport d'intensité à la température dépend donc du volume de l'échantillon (tableaux III-4 et III-5). Ainsi, lorsque la profondeur de la sonde de température dans le milieu de travail est différente de celle dans le milieu d'étalonnage, une erreur sur les mesures de température relatives doit être considérée, de la même manière que pour les mesures de température absolue. Pour le rapport d'intensité p_1 , la sensibilité relative à la température de la sonde Ag_2S dépend faiblement du volume de l'échantillon. Elle reste supérieure à 1,6 %. $^{\circ}\text{C}^{-1}$ pour les trois volumes considérés. Cette étude a été réalisée pour les trois rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 (annexe C.III.1).

Tableau III-4 : Modèle d'étalonnages $p_1(T)$ établi par rapport au rapport d'intensité p_1 pour trois volumes (0,7 mL, 1,3 mL et 1,5 mL) de suspension aqueuse de Ag_2S à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les données sont répertoriées dans le tableau 5.

Volume mL	Coefficient directeur (a)	Ordonnées à l'origine (b)
0,7	-0,019	1,50
1,3	-0,021	1,68
1,5	-0,023	1,87

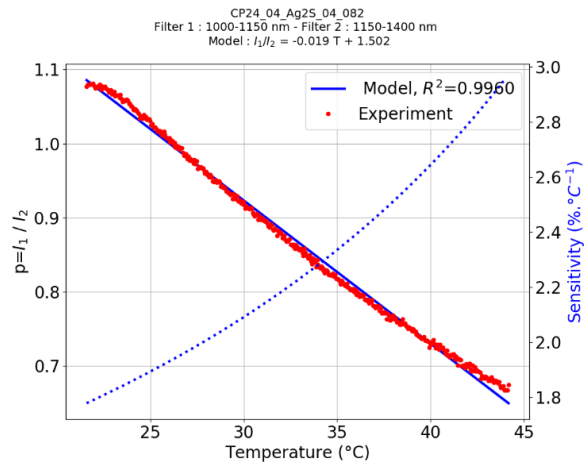
Tableau III-5 : Les droites d'étalonnages obtenues à partir du rapport d'intensité p_1 pour les trois échantillons contenant les nanoparticules d'Ag₂S dispersées dans H₂O, de volumes différents.

Échantillon **Volume**

Droites d'étalonnage

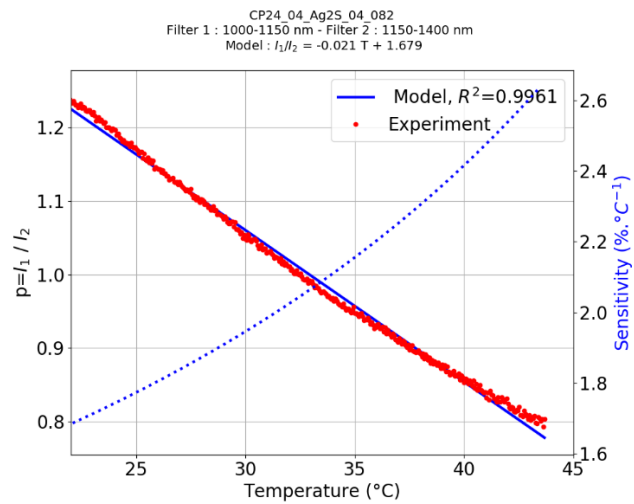
1

0,7 mL



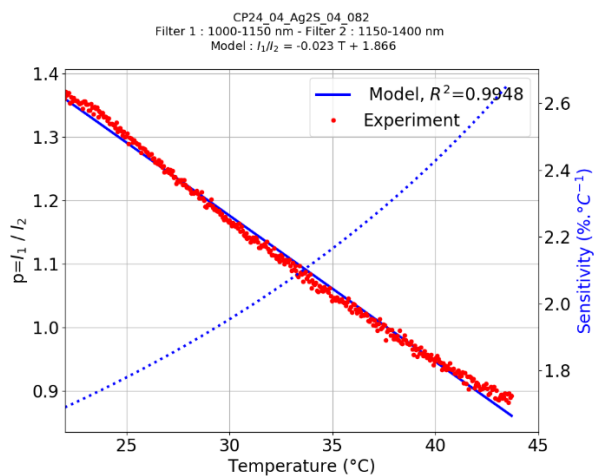
2

1,3 mL



3

1,5 mL



III.4. Pour conclure

Lorsqu'une mesure de rapport d'intensité est réalisée, la nature du milieu et la profondeur du signal dans le milieu doivent être connues pour réaliser une mesure fiable de température locale. L'étalonnage de la nanosonde de température et son utilisation doivent être réalisés dans le même milieu et à la même profondeur de signal. De plus, nous recommandons d'effectuer un étalonnage de la sonde avant chaque utilisation pour prendre en compte la contribution de l'alignement entre le monochromateur et la caméra dans le signal de photoluminescence détecté (annexe A.I.2). Ces recommandations expérimentales sont nécessaires pour effectuer une mesure de température fiable. Néanmoins, elles ne sont pas compatibles avec une utilisation de la nanothermométrie pour des applications au sein du vivant. Nous proposons donc un changement de paradigme concernant le traitement de signal de photoluminescence détecté dans un milieu donné afin de remonter à une mesure de température fiable au sein de milieux complexes absorbant et diffusant la lumière, tel que les tissus biologiques.

IV. Propositions de changement de paradigme pour la mesure de température par photoluminescence des sulfures d'argent

IV.1. Exploitation de la loi de Beer-Lambert

IV.1.a. Calcul de la profondeur du signal des sulfures d'argent dans l'eau

Nous avons précédemment calculé les coefficients d'absorption de l'eau, à 25°C et pour toutes les longueurs d'onde comprises dans l'intervalle $L = [960-1300]$ (nm). Dans cette section, notre objectif est de remonter à une valeur inconnue de profondeur de signal h , dans l'eau, grâce à la loi de Beer-Lambert. Pour cela, nous mesurons, $i^{H_2O}(\lambda, 25^\circ C, h)$ et $i^{D_2O}(\lambda, 25^\circ C)$, pour toutes longueurs d'onde λ appartenant à L et pour une série de profondeurs de signal h inconnues.

Méthode 1

- **Description de l'expérience**

La première méthode à laquelle nous pouvons penser pour calculer h grâce à $i^{H_2O}(\lambda, 25^\circ C, h)$, $i^{D_2O}(\lambda, 25^\circ C)$ et $\mu_{abs}(\lambda, 25^\circ C)$ consiste à utiliser l'expression de h directement adaptée de la loi de Beer-Lambert.

$$h = \ln\left(\frac{i^{H_2O}(\lambda, T, h)}{i^{D_2O}(\lambda, T)}\right) \frac{1}{\mu_{abs}(\lambda, T)} - \ln(A)$$

Avec $h \gg \ln(A) \approx 0,25 \text{ mm}$ (annexe B.III.1)

$$h \approx \ln\left(\frac{i^{H_2O}(\lambda, T, h)}{i^{D_2O}(\lambda, T)}\right) \frac{1}{\mu_{abs}(\lambda, T)}$$

Appliquons cette méthode à un spectre de photoluminescence enregistré à 25°C à partir d'un volume de suspension de nanoparticules de Ag_2S de 1,5 mL. Nous associons une profondeur de signal nulle (pas de déformation du signal liée à l'absorption de l'eau) à un volume de 0,7 mL. L'ajout d'un volume de 100 μL (dans notre cuvette optique dont la surface de base vaut 1 cm^2) correspondant à une augmentation de la profondeur de signal de 1 mm. La profondeur théorique du signal est donc ici de 8 mm.

- **Résultats**

Lorsque nous utilisons l'expression de h pour toutes les longueurs d'ondes appartenant à L , les valeurs de h calculées présentent une forte dépendance à la longueur d'onde (figure IV-1). Cela s'explique par le fait que pour chaque longueur d'onde, l'intensité de photoluminescence des sulfures d'argent varie de 0 à i_{\max} . Or, lorsque $i^{H_2O}(\lambda, T, h)$ tend vers 0, $\ln\left(\frac{i^{H_2O}(\lambda, T, h)}{i^{D_2O}(\lambda, T)}\right)$ tend vers $-\infty$.

Nous ne validons pas cette méthode pour mesurer la profondeur du signal des sulfures d'argent dans l'eau, car la dépendance de la profondeur du signal à la longueur d'onde n'a pas de sens physique.

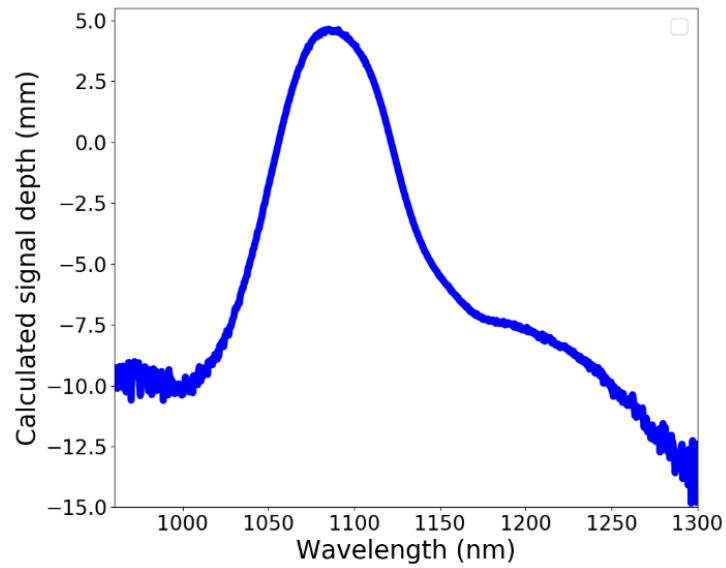


Figure IV-1 : Profondeur du signal de photoluminescence dans l'eau calculée pour chaque longueur d'onde de l'intervalle L.). La méthode consiste à utiliser l'expression de h directement adaptée de la loi de Beer-Lambert. Nous remarquons ici que le calcul de h dépend fortement de la longueur d'onde. De plus nous obtenons des valeurs de h négatives. Cela n'a pas de sens physique. Nous ne validons pas cette méthode.

Méthode 2

- **Démarche expérimentale**

La deuxième méthode employée pour calculer h à partir de $i^{H_2O}(\lambda, 25^\circ C, h)$, $i^{D_2O}(\lambda, 25^\circ C)$ et $\mu_{abs}(\lambda, 25^\circ C)$ repose sur un algorithme testant plusieurs valeurs de h pour calculer, grâce à la loi de Beer-Lambert, les intensités incidentes $i_0'(\lambda, T)$ à partir des intensités transmises dans l'eau pour la profondeur de signal h inconnue. Le programme python utilisé pour ce travail est fourni est **annexe B.III.2**. La relation utilisée est la suivante :

$$i_0'(\lambda, T) = i^{H_2O}(\lambda, T, h) \cdot e^{h \cdot \mu_{abs}(\lambda, T)}$$

Nous cherchons la profondeur de signal maximisant le coefficient de corrélation R^2 entre le signal de photoluminescence incident calculé et le signal de photoluminescence acquis dans D_2O . Pour nous affranchir des effets de concentration et de réglages du montage optique, nous travaillons avec les spectres de photoluminescence normalisés par rapport au maximum d'intensité.

Nous utilisons cette méthode pour calculer **13 valeurs théoriques** de profondeurs de signal dans l'intervalle [0 mm - 2,7 mm] correspondant à des volumes de suspension compris entre [0,7 mL et 3,4 mL]. Des ajouts successifs de 200 μ L de suspension ont été effectués. Dans nos expériences, la surface de la base de la cuvette optique contenant la suspension de Ag_2S vaut 1 cm^2 . L'ajout d'un volume de 200 μ L correspond donc théoriquement à une augmentation de la profondeur de signal de 2 mm. Nous considérons qu'une profondeur de signal nulle correspond à un volume de 0,7 mL. Pour chaque volume de travail, un spectre d'émission de photoluminescence transmis au détecteur (caméra hyperspectrale, PyLoN-IR, Princeton) est acquis à 20°C. Nous comparons les valeurs de profondeur de signal calculées grâce à l'algorithme avec les valeurs théoriques.

- **Résultats**

La **figure IV-2** montre que le coefficient de corrélation (en rouge) entre la profondeur de signal calculée grâce à l'algorithme (en vert) et la profondeur théoriques (en noir) est supérieur à 0,955 pour tous les essais de notre expérience. Le coefficient de corrélation est supérieur à 0,99 pour une profondeur de signal inférieur à 12 mm. La **figure IV-3** illustre deux signaux de photoluminescence calculés (en noir) à partir du signal de photoluminescence transmis dans H_2O (en bleu) et des valeurs de profondeurs de signal calculées grâce à l'algorithme. Le signal calculé est comparé au signal de photoluminescence acquis dans D_2O (en orange). La profondeur théorique du signal de gauche vaut 3 mm. La profondeur calculée par l'algorithme est légèrement supérieure et vaut 3,3 mm. Pour le signal de droit, la profondeur théorique est de 9 mm et la profondeur calculée de 9,5 mm. Nous observons une bonne correspondance entre les profondeurs de signal théoriques et calculées.

Nous validons cette méthode pour calculer des valeurs de profondeur de signal dans H_2O .

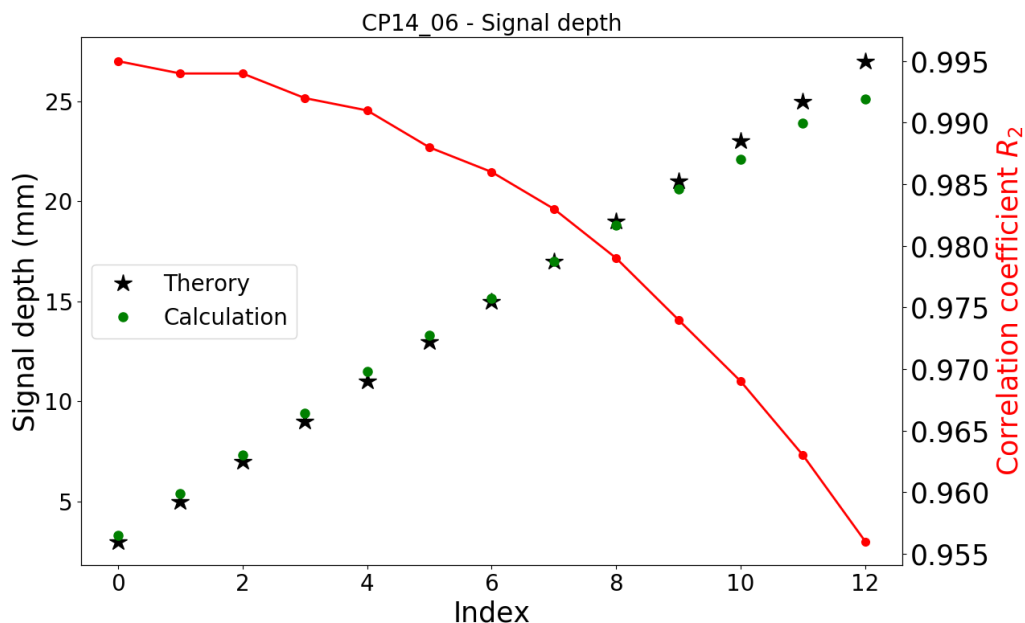


Figure IV-2 : Comparaison entre les profondeurs calculées grâce à l’algorithme (points verts) et les profondeurs de signal théoriques (étoiles noires). La comparaison est quantifiée grâce au coefficient de corrélation (en rouge).

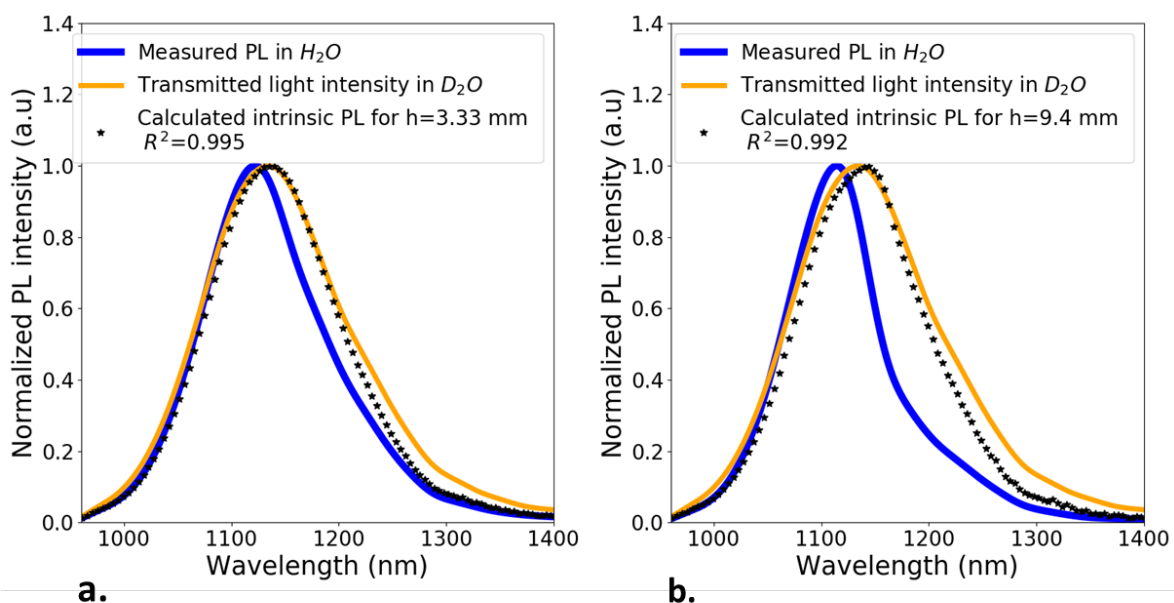


Figure IV-3 : Deux signaux de photoluminescence calculés (étoiles noires) à partir du signal de photoluminescence transmis dans H_2O (en bleu) et des valeurs de profondeurs de signal calculées grâce à l’algorithme. Le signal calculé est comparé au signal de photoluminescence acquis dans D_2O (en orange). Pour nous affranchir des effets de concentration, nous travaillons avec les spectres de photoluminescence normalisés par rapport au maximum d’intensité. (a) Profondeur théorique 3 mm ; profondeur calculée : 3,3 mm (b) Profondeur théorique : 9 mm ; profondeur calculée : 9,5 mm.

IV.1.b. Correction de l'influence du milieu vis-à-vis de la robustesse de la mesure de température

Nous avons développé un algorithme permettant de calculer la profondeur du signal émis par les sulfures d'argent dans l'eau, à 25°C, pour 13 valeurs théoriques de profondeurs de signal dans l'intervalle [0 mm - 2,7 mm] correspondant à des volumes de suspension compris entre 0,7 mL et 3,4 mL. La **figure IV-4** montre que lorsqu'un modèle d'étalonnage sur p_1 , réalisé à une profondeur de signal nulle, est utilisé pour traiter des spectres de photoluminescence, acquis avec un volume de 1,5 mL de suspension aqueuse de Ag_2S , l'erreur effectuée sur la mesure de température est supérieure à 200%. En revanche, si les spectres de photoluminescence sont corrigés avec l'algorithme dans la **méthode 2**, l'erreur devient inférieure à 5% pour des volumes de suspension compris entre 0,7 mL et 1,5 mL, soit des profondeurs de signal comprises entre 0 mm et 8 mm.

Cet algorithme est intéressant, mais il présente des limites majeures sur le plan applicatif. Il nécessite de connaître les coefficients d'extinction du milieu cible pour toutes les températures de travail. Dans ce travail, les coefficients d'absorption de l'eau sont connus à 25°C. Cet algorithme peut donc seulement être utilisé des suspensions aqueuses thermalisées à 25°C. Avec les données dont nous disposons, l'algorithme ne peut pas être exploité à une autre température de travail et dans un autre milieu que l'eau.

Afin de répondre aux besoins de la communauté de la nanothermométrie, nous souhaitons développer une solution capable d'extraire deux informations à partir du spectre de photoluminescence des Ag_2S transmis au détecteur : la température et la profondeur du signal.

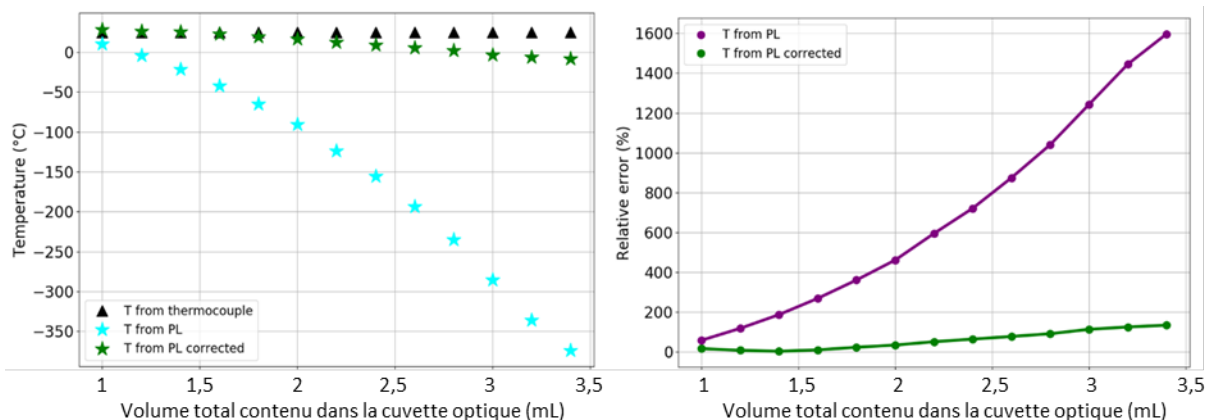


Figure IV-4 : La figure de gauche illustre la différence entre la température mesurée par la sonde à fibre optique (triangles noirs) et la température obtenue grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 à partir des spectres de photoluminescence des nanoparticules de Ag_2S dispersées dans H_2O pour des profondeurs de signal comprises entre 0,7 mL et 3,4 mL (étoiles cyan). La même étude a été réalisée avec les spectres de photoluminescence transmis corrigés (étoiles vertes) grâce à l'algorithme développé dans ce travail. La figure de droite montre que l'erreur effectuée sur la mesure de température sondée par les Ag_2S est beaucoup plus faible avec les données corrigées (points verts) qu'avec les données brutes (points mauves).

IV.2. Modèle de prédiction en température et en profondeur

IV.2.a. Description de l'expérience

Protocole expérimental

Afin de répondre aux besoins de la communauté de la nanothermométrie, nous souhaitons développer une solution capable de renvoyer deux informations à partir du spectre de photoluminescence transmis au détecteur : la température et la profondeur du signal. La méthode de calibration classique d'un nanothermomètre repose sur la mesure d'un seul paramètre de photoluminescence. Nous perdons donc un grand nombre d'informations contenues dans le signal. Pour limiter cette perte d'information, nous avons traité les signaux de photoluminescence des sulfures d'argent grâce à une approche Deep Learning en créant un réseau de neurones artificiels. Ce travail est le fruit de notre collaboration avec **Florent Moreau** (étudiant à Centrale Paris, stage M2) et **Quentin Morelle** (Data Scientist, AlchemIA Technologies).

Dans le cadre du développement de cette preuve de concept, nous avons travaillé dans l'eau. Le dispositif expérimental utilisé est présenté **figure IV-5**. Les spectres de photoluminescence des sulfures d'argent sont enregistrés à trois profondeurs différentes : 0 mm, 5 mm et 8 mm. Pour chaque profondeur de signal, les spectres de photoluminescence des Ag_2S sont enregistrés pour des températures allant de 22°C à 58°C, grâce à un support de cuve chauffant imposant à l'échantillon une rampe de montée en température de 0.7°C/min. Pour chaque profondeur de signal, un spectre de photoluminescence est enregistré toutes les 5 secondes pendant 51 min.

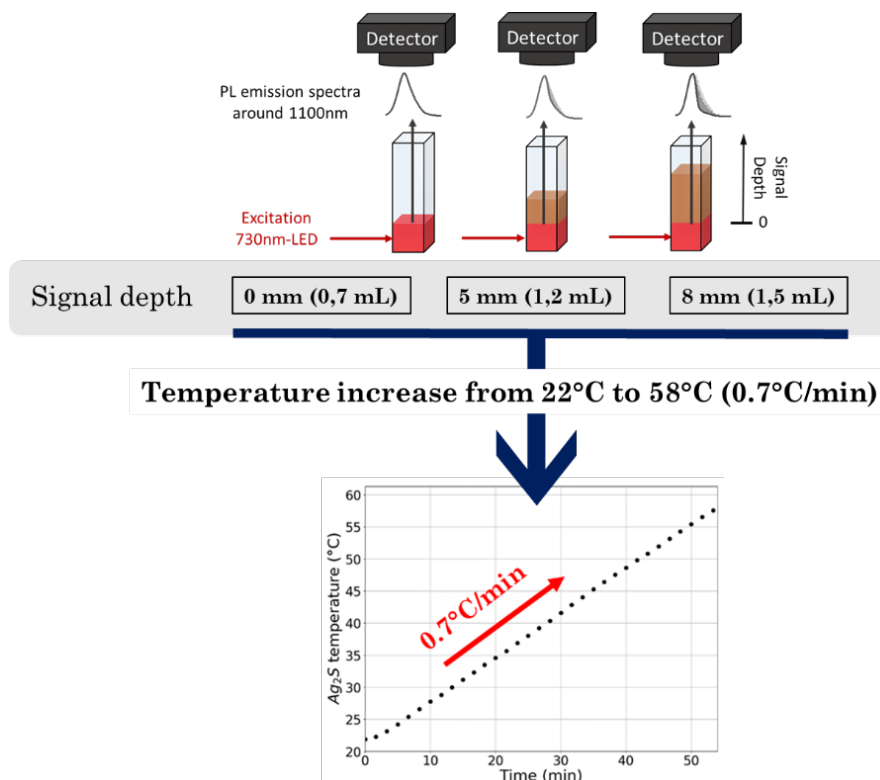


Figure IV-5 : Description du dispositif expérimental

Apprentissage de modèle

Pour une profondeur de signal donnée, nous avons accès à 720 spectres correspondant à des températures de la suspension d'Ag₂S comprises entre 22°C et 58°C. L'ensemble de notre base de données comporte donc 2160 spectres. Nous avons choisi d'exploiter 1794 spectres (83% de la base de données). Chaque spectre est associé à une température et à une profondeur de signal. Nous avons sélectionné cinq variables de prédiction correspondant à cinq paramètres caractéristiques des informations contenues dans les spectres d'émission de photoluminescence des Ag₂S. Il s'agit de la puissance de la LED (nommée Pct intensité), de la moyenne, de l'écart type, du skewness et du kurtosis. Les variables de prédictions sont définies **annexe B, section B.IV**. Les 1794 spectres que nous avons exploités sont séparés aléatoirement en deux ensemble. Le premier est utilisé pour l'entraînement du modèle. Il comporte 1435 spectres (ensemble d'entraînement). Le second est utilisé pour tester le modèle et contient 359 spectres (ensemble de validation). Nous souhaitons étudier deux modèles. Pour le premier (**modèle A**), la seule variable que nous cherchons à prédire est la **température**. La profondeur est considérée comme une variable de prédiction et vient s'ajouter aux cinq autres variables listées ci-dessus (la puissance de la LED (nommée Pct intensité), de la moyenne, de l'écart type, du skewness et du kurtosis). Pour le second modèle (**modèle B**), nous cherchons à prédire deux variables : la température et la profondeur du signal.

Précision de la méthode

La précision théorique en température des modèles de prédiction (A et B) est limitée par celle du capteur de température ayant servi à identifier les spectres de photoluminescence de la base de données. La précision du capteur de température à fibre optique plongeant dans la suspension (Opsens Solution) est de 0,3°C. Nous faisons l'hypothèse que la température de la suspension est égale à la température de cœur des sulfures d'argent. Le spectre de photoluminescence des nanocristaux semi-conducteurs Ag₂S est caractéristique de la température du cœur du matériau. Cette hypothèse peut être discutée, mais en première approximation elle nous paraît réaliste. En effet, la source d'excitation illumine la suspension de Ag₂S avec une densité de puissance de 0,7 mW.cm⁻² et nous sommes en régime dilué avec [Ag₂S] = 0,5 mg.mL⁻¹. Par ailleurs, la profondeur du signal associé à chaque spectre de photoluminescence de la base de données est déterminée à partir du volume total contenu dans la cuvette optique. La surface de la base de la cuvette est de 1 cm². Nous associons une profondeur de signal nulle (pas de déformation du signal liée à l'absorption de l'eau) à un volume de 0,7 mL. L'ajout d'un volume de 100 µL (dans notre cuvette optique dont la surface de base vaut 1 cm²) correspondant à une augmentation de la profondeur de signal de 1 mm. En considérant nos conditions expérimentales, la précision du modèle de prédiction B en profondeur ne peut donc pas être supérieure au millimètre.

IV.2.b. Évaluation des modèles de prédiction

Évaluation du modèle A : Prédiction de la température seule

Lorsque le modèle A est utilisé sur l'ensemble de validation, c'est-à-dire pour des spectres d'émission de photoluminescence qu'il n'a jamais vu et correspondant à des températures inconnues, le score (R^2) sur la prédiction en température est de 97%. La variable ayant le plus de poids dans la prédiction de température est le coefficient d'asymétrie (skewness) (figure IV-6).

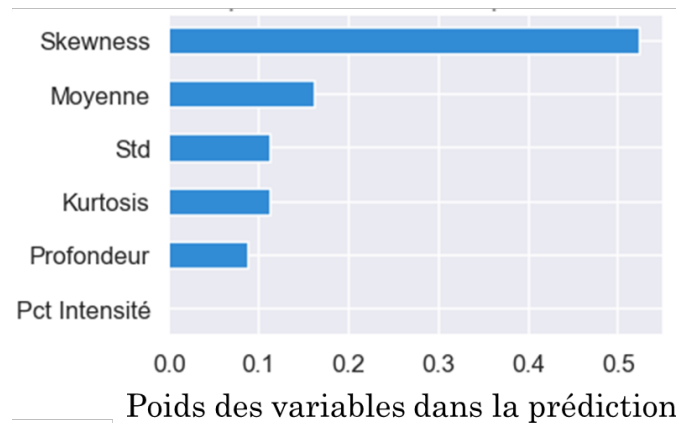


Figure IV-6 : Importance des variables dans la prédiction de température du modèle A. La variable ayant le plus de poids dans la prédiction de température est le coefficient d'asymétrie (skewness).

Évaluation du modèle B : Prédiction du couple [température, profondeur du signal]

Prédiction en température - lorsque le modèle B est utilisé sur l'ensemble de validation, c'est-à-dire pour des spectres d'émission de photoluminescence qu'il n'a jamais vu et correspondant à des températures et à des profondeurs de signaux inconnues, le score (R^2) sur la prédiction en température est de 96,97%. Ce score est de 97,01% lorsque le modèle est testé sur des données qu'il a déjà vues dans la phase d'entraînement (ensemble de tests). Le score sur la prédiction sur la température est la même que lorsque le modèle devait prédire la température seule.

Prédiction en profondeurs - Le modèle prédit avec un score de 100 % la profondeur des signaux associés à une profondeur nulle (113 données) (figure IV-7 a). Néanmoins, la performance du modèle décroît avec la profondeur du signal. Pour les données associées à une profondeur de signal de 5 mm (124 données), la prédiction du modèle est juste dans 73% des cas (figure IV-7 a). Le modèle prédit une profondeur de 6 mm et de 7 mm pour, respectivement, 15 et 18 observations de l'ensemble de validation. Ces deux valeurs sont créées par le modèle. La performance du modèle chute pour les données identifiées à une profondeur de signal de 8 mm (122 données) (figure IV-7 a). Dans ce cas, la prédiction est correcte dans seulement 51% des cas. Le modèle prédit une profondeur de 7 mm pour 53 signaux et une profondeur de 6 mm pour 7 signaux. La précision en profondeur du modèle de prédiction B est donc de 2 mm.

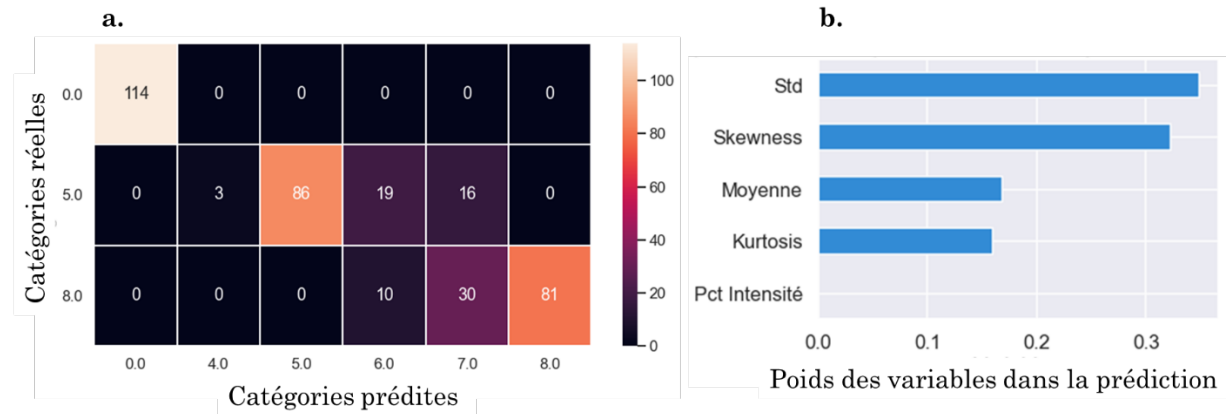


Figure IV-7 : (a) Comparaison entre les valeurs réelles et les valeurs prédites par le modèle en termes de profondeur de signal. (b) Les variables ayant le plus de poids dans la prédiction du couple [température, profondeur de signal] sont l'écart-type et le skewness.

Pour conclure

La fonctionnalité de prédiction de la profondeur supplémentaire que possède le modèle B par rapport au modèle A, n'influe pas sur la précision du modèle en température. En théorie, nous pouvons donc utiliser le modèle B, sans connaître la profondeur du signal de la sonde de température. Ceci est nécessaire pour pouvoir réaliser des mesures de température fiables en profondeur au sein des tissus biologiques grâce à la nanothermométrie. À titre de comparaison et pour illustrer le potentiel de ce modèle de prédiction, en utilisant le modèle d'étalonnage établi sur p_1 (méthode employée dans le chapitre 2 et 3 de ce manuscrit de thèse) sans avoir d'information sur la profondeur du signal, l'erreur effectuée sur la mesure de température peut être très importante. Par exemple, en utilisant le modèle d'étalonnage obtenu à une profondeur de signal nulle pour traiter un spectre enregistré à une profondeur de 5 mm, l'erreur relative faite sur la mesure de température (à 30°C) est de 30%. Cette erreur relative monte à 50% lorsque le signal exploité est enregistré à une profondeur de 8 mm (figure IV-8 b).

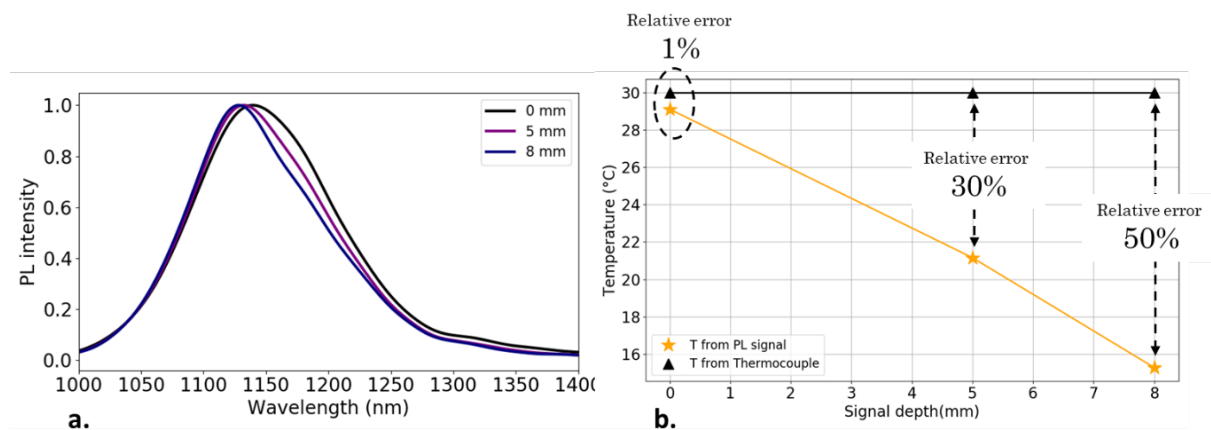


Figure IV-8 : La déformation spectrale résultant de la profondeur de signal (a) engendre une erreur sur l'information en température extraite grâce à la courbe d'étalonnage obtenue à partir de rapport d'intensité p_1 à une profondeur de signal nulle.

IV.2.c. Utilisation des modèles de prédiction

Expériences

Nous avons utilisé les deux modèles de prédiction (A et B) sur des données déjà traitées grâce à un modèle d'étalonnage en température établi à partir du rapport d'intensité p_1 (chapitre 3 de ce manuscrit de thèse). Nous avons réalisé deux expériences d'hyperthermie (optique et magnétique) avec deux échantillons, Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, dans les conditions de profondeur de signal nulle (0 mm).

Résultats

- **Modèle B**

Le modèle B de prédiction [température, profondeur de signal] prédit une profondeur de signal de 6 mm pour l'expérience réalisée avec l'échantillon Ag_2S . Une profondeur de signal de 8 mm est prédite pour l'expérience réalisée avec l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Les écarts entre les profondeurs prédites par le modèle de prédiction du couple [température, profondeur du signal] sont donc éloignées de la valeur théorique (0 mm) fixée par nos conditions expérimentales. Ceci peut être lié au fait que le rapport signal/bruit est plus faible pour les données des expériences avec les échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ que pour les données ayant servies à entraîner le modèle. En effet, d'après la **figure IV-7 b**, l'écart type et le skewness sont les variables ayant le plus de poids dans la prédiction du couple [température, profondeur du signal]. Si la contribution du bruit dans le signal augmente, l'écart type augmente indépendamment de la température et de la profondeur du signal.

En ce qui concerne la prédiction en température, nous constatons, **figure IV-9** que l'écart relatif entre les températures prédites par le modèle B et les températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage à partir de p_1 est d'environ 45% dans le cas de l'échantillon Ag_2S (figure IV-9 a) et de 11% pour l'expérience mettant en jeu l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (figure IV-9 b).

- **Modèle A**

Pour le modèle A, prédisant la température seule, la profondeur du signal sert de variable de prédiction. Nous avons donc imposé au modèle une profondeur de signal nulle (0 mm), correspondant à la valeur théorique de la profondeur des signaux de photoluminescence pour les deux échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (d'après nos conditions expérimentales). Pour l'expérience réalisée avec l'échantillon Ag_2S , l'écart relatif entre les températures prédites par le modèle A et les températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 est d'environ 4% (figure IV-9 a). Pour l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, l'écart relatif est de 9% (figure IV-9 b). Les écarts observés entre les valeurs en température prédites par les modèles A et B et les valeurs obtenues grâce au modèle d'étalonnage à partir du rapport d'intensité p_1 peuvent être liés aux réglages du montage optique (différence entre la session expérimentale CP22 et la session expérimentale où les données ayant servi à l'entraînement du modèle ont été acquises). Dans le futur, il serait donc judicieux de fixer le montage expérimental pour conserver les mêmes réglages d'une session expérimentale à l'autre.

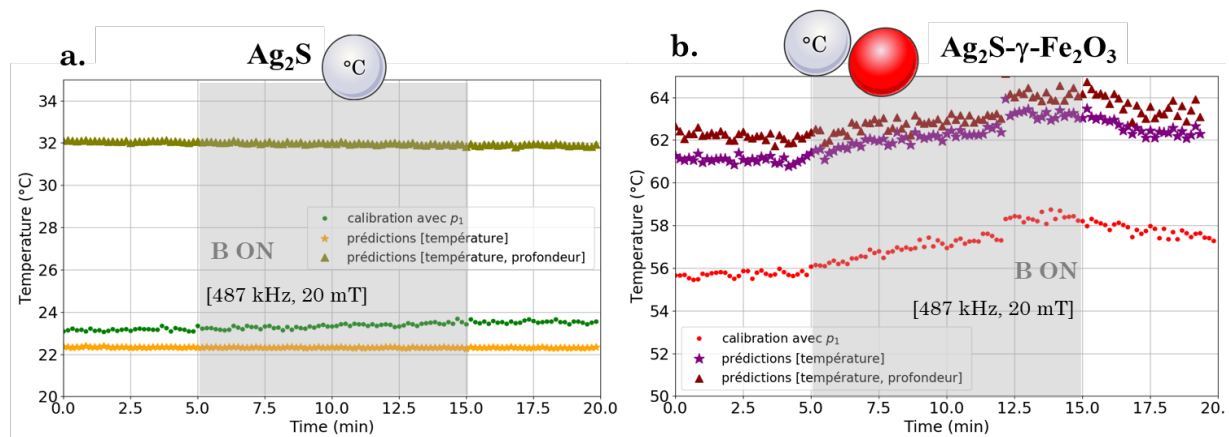


Figure IV-9 : Nous considérons deux expériences d’hyperthermie (déjà exploitées dans le chapitre 3 de ce manuscrit de thèse) mettant en jeu les échantillons (a) Ag_2S et (b) $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Pendant les 20 min d’expérience, les échantillons sont soumis à une excitation optique (LED-730 nm à $0,1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-1}$). De $t=5$ min à $t=15$ min, un champ magnétique [487 kHz, 20 mT] est mis en marche. La température est suivie localement grâce au signal de PL des Ag_2S et globalement grâce à une sonde à fibre optique plongeant dans l’échantillon. Ici, nous comparons les températures obtenues en utilisant trois méthodes différentes de traitement des signaux de photoluminescence des Ag_2S : les deux modèles de prédiction A (étoiles) et B (triangles) et le modèle d’étalonnage obtenu à partir du rapport d’intensité p_1 (points).

IV.3. Pour conclure

D’après les deux modèles de prédiction et le modèle d’étalonnage (obtenu à partir du rapport d’intensité p_1), exploitant les données de photoluminescence des nanosondes Ag_2S , la température à la surface de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ est beaucoup plus élevée que la température mesurée globalement dans le milieu grâce à la sonde à fibre optique. La présence des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (cas de l’échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) engendre une élévation importante de la température de cœur des Ag_2S lorsque l’excitation optique est mise en fonctionnement et ce dès l’instant initial, $t = 0$. De plus, les mêmes tendances d’évolution des températures sont obtenues en utilisant les trois méthodes de traitement des données de photoluminescence, pour les deux échantillons Ag_2S et $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Pour l’échantillon Ag_2S , la température reste constante pendant les 20 min d’expérience ce qui est cohérent avec le fait que Ag_2S ne soit pas sensible au champ magnétique. Pour l’échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la température est constante de l’instant initial, $t = 0$, à $t = 5$ min. La température augmente de $t = 5$ min à $t = 15$ min sous l’effet du champ magnétique [925 kHz, 12 mT]. La température diminue au moment où le champ magnétique est arrêté à $t = 15$ min.

Cette méthode de traitement de données présente un réel intérêt pour s’affranchir de l’effet de la profondeur du signal dans la précision des mesures de température. Dans ce travail, pour établir la base de données des spectres de photoluminescence de Ag_2S identifiés en température et en profondeur, nous avons utilisé l’eau comme solvant. Nous pourrions réaliser une nouvelle base de données en utilisant le lait comme milieu de dispersion des nanoparticules d’ Ag_2S . En effet, le lait possède des coefficients de diffusion et d’absorption proches de ceux des tissus biologiques [101]. L’exploitation de cette nouvelle base de données pourrait être une nouvelle étape intéressante de notre démarche expérimentale visant à établir une procédure pour effectuer des mesures de température fiables, en profondeur au sein des tissus biologiques, grâce au signal de photoluminescence des sulfures d’argent.

Partie 2 : Interactions lumière-matière et classification tissulaire

Dans les trois premiers chapitres de ce manuscrit de thèse, nous nous sommes intéressés aux sulfures d'argent en vue de leur exploitation comme nanosonde de température. Nous avons démontré que le spectre de photoluminescence des Ag_2S , transmis au détecteur, est caractéristique de la température, mais également des propriétés optiques (coefficients d'absorption et de diffusion) du milieu traversé par les photons. Ceci constitue un réel challenge pour le déploiement de la nanothermométrie de photoluminescence pour des applications biomédicales.

Dans cette partie de chapitre, nous portons un nouveau regard sur le potentiel applicatif de la nanosonde photoluminescente Ag_2S . Nous utilisons le principe de la transillumination et le signal de photoluminescence des nanoparticules d' Ag_2S pour discriminer deux types de tissus biologiques. Ce travail pourrait initier le développement d'une nouvelle méthode de diagnostic de maladies comme les cancers.

V. L'interaction entre la lumière et les tissus biologiques comme outil de diagnostic

Dans son manuscrit de thèse, Eliott Teston écrit « *Je pense qu'à l'avenir les propriétés d'absorption, de polarisation ou de fluorescence des tissus seront utilisées en clinique pour déterminer leurs caractéristiques biologiques. L'imagerie optique pourrait alors permettre de déterminer de manière non invasive les propriétés normales et pathologiques d'un tissu et, in fine, de diagnostiquer certaines pathologies ou leur évolution* » [103].

L'interaction lumière-matière peut être l'opportunité d'accéder à un grand nombre d'informations sur les tissus biologiques. En effet, un tissu sain et un tissu malade présentent des différences morphologiques, structurales et sur le plan de leur composition [104]. Dans le cas de la dysplasie, une évolution précancéreuse des cellules, une augmentation de la taille et de la forme des noyaux des cellules est observée. Ces variations structurales entraînent l'augmentation des coefficients de diffusion. Par ailleurs, la dysplasie entraîne également une baisse de la fraction volumique des fibres de collagène et une augmentation de la concentration en hémoglobine due à une forte activité d'angiogenèse. L'augmentation de la fraction sanguine dans le tissu engendre une augmentation des coefficients d'absorption [105]. Plusieurs méthodes de diagnostic reposent sur l'interaction lumière-matière et l'évolution des paramètres optiques des tissus malades par rapport aux tissus sains.

Par exemple, la spectroscopie Raman permet de discriminer un tissu sain d'un tissu malade dans le cas de maladies infectieuses (virales, bactériennes, fongiques) ou de cancers (du poumon, du sein, du cerveau et de la peau). [106] [107] (figure I-1). Les spectres Raman fournissent des informations quantitatives sur les espèces moléculaires contenues dans un échantillon biologique comme les acides aminés, les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques (ADN, ARN). Cette technique est basée sur la diffusion inélastique des photons traversant un tissu biologique. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons défini la diffusion élastique (processus de diffusion dominant) provoquant un changement de direction des photons sans changement d'énergie. Dans le cas de la diffusion inélastique, une partie de l'énergie du photon incident est échangée avec les électrons des atomes des molécules contenues dans le milieu. La diffusion inélastique donne lieu à des vibrations moléculaires dont la fréquence est caractéristique des espèces en présence [107].

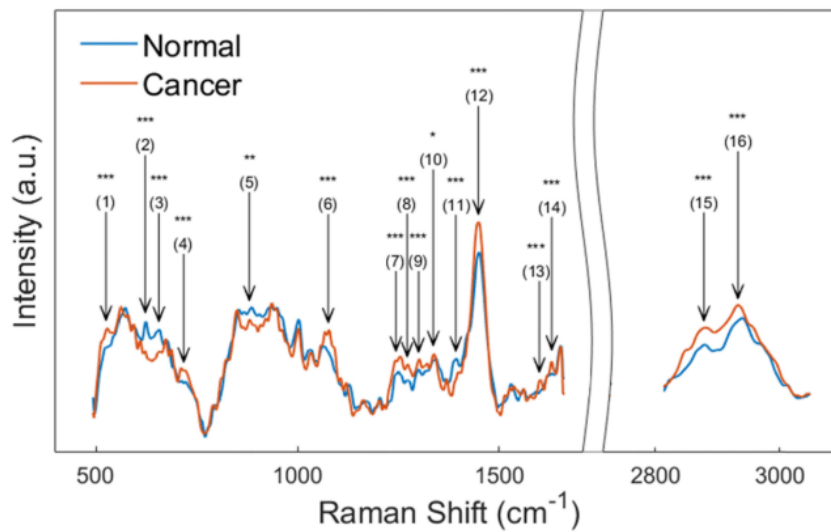


Figure V-1 : Spectres Raman caractéristique d'un tissu prostatique sain et cancéreux. Moyennes effectuées sur 393 échantillons pour le spectre Raman correspondant à l'échantillon sain et sur 84 échantillons pour celui correspondant à l'échantillon cancéreux [107].

Un autre exemple de technique de diagnostic dont le principe est basé sur l'interaction lumière-matière est la transillumination. Elle consiste à illuminer *in vitro* ou *in vivo* des tissus biologiques et à exploiter les informations contenues dans le signal optique transmis au détecteur après la traversée du milieu biologique. En 1977, Jobsis montre le potentiel de la transillumination (de 740 nm à 860 nm) d'organes pour mesurer la perfusion sanguine ou le taux d'oxygène [108]. Dans la littérature, la transillumination a également été utilisée comme aide au diagnostic de lésions cancéreuses mammaires [109].

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, la profondeur de pénétration de la lumière au sein des tissus augmente avec la longueur d'onde. Avec un matériau photoluminescent émettant dans la seconde fenêtre de transparence des tissus biologiques (entre 1000 nm et 1350 nm), telle que la nanosonde d'Ag₂S développée dans ce travail de thèse, la sensibilité et la spécificité de la transillumination pourraient être améliorées pour la détection de maladies. Dans la suite de cette partie de chapitre, nous utilisons le principe de la transillumination et le signal de photoluminescence des nanoparticules d'Ag₂S pour discriminer deux types de tissus biologiques. Ce travail pourrait initier le développement d'une nouvelle méthode de diagnostic de maladies comme les cancers.

VI. Transillumination tissulaire : Classification foie-cerveau grâce à la photoluminescence des sulfures d'argent

Ce travail est le fruit de notre collaboration avec **Joëlle Tchicaya** (doctorante à la faculté de pharmacie de Paris Descartes), **Florent Moreau** (étudiant à Centrale Paris, stage M2) et **Quentin Morelle** (Data Scientist, AlchemIA Technologies).

VI.1. Choix expérimentaux

VI.1.a. Choix des échantillons tissulaires

Nous n'avons pas facilement accès à des échantillons tissulaires cancéreux. Nous avons choisi d'établir une preuve de concept de classification tissulaire par transillumination en utilisant le foie et le cerveau comme premiers modèles de classes d'échantillons biologiques. Ces organes ont des compositions différentes. Le foie contient 5% [110] de graisse alors que le cerveau en contient 60% [102]. Ces échantillons ont été prélevés par **Joëlle Tchicaya**. Les organes ont été congelés directement après le prélèvement et avant utilisation pour l'expérience. Aucun traitement chimique (fixation) n'a été appliqué pour la conservation des tissus. Cela aurait présenté un risque de modification des propriétés optiques des tissus biologiques et aurait constitué un biais expérimental dans cette expérience.

Les organes ont été prélevés chez trois souris. En effet, le paramètre discriminant les échantillons ne doit pas être lié à la variabilité génétique des individus d'une même espèce.

Ce travail utilise 8 échantillons biologiques référencés **figure II-1** :

- **6 échantillons de foie** d'épaisseurs différentes et provenant de 3 souris
- **2 échantillons de cerveaux** d'épaisseurs différentes et provenant de 2 souris

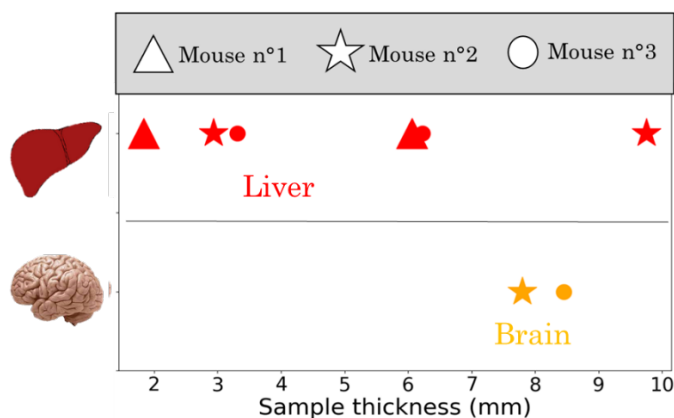


Figure VI-1 : Référencement des échantillons utilisés dans cette expérience

VI.1.b. Protocole expérimental

Le dispositif expérimental est présenté **figure II-2**. Chaque échantillon biologique est placé sur une plaque de verre, disposée au-dessus d'une cuvette contenant une suspension de nanoparticules de sulfure d'argent dispersées dans D₂O (annexe C.III.4). Les nanoparticules sont excitées grâce à une LED émettant à 730 nm. Les photons émis spontanément par la sonde de photoluminescence Ag₂S traversent les échantillons biologiques référencés dans cette étude et sont détectés par une caméra hyperspectrale opérationnelle dans la fenêtre de longueur d'onde [960 nm – 1400 nm] (PyLoN-IR, Princeton). Le spectre de photoluminescence des sulfures d'argent dépend de la température. Pour

valider la preuve de concept que nous souhaitons établir dans ce chapitre de thèse, le paramètre discriminant les tissus ne doit pas être lié à la température de cœur des sulfures d'argent. Ainsi, une rampe de température ($1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) est imposée à la suspension de sulfure d'argent grâce au support de cuve chauffant (Quantum Northwest). La température de la suspension passe de 27°C à 45°C en 18 min. La température globale de la suspension de Ag_2S est suivie en temps réel grâce à une fine sonde infrarouge plongeant dans le liquide. Nous réalisons une acquisition de spectre de photoluminescence par seconde. Nous avons donc accès à 1200 spectres par échantillon tissulaire.

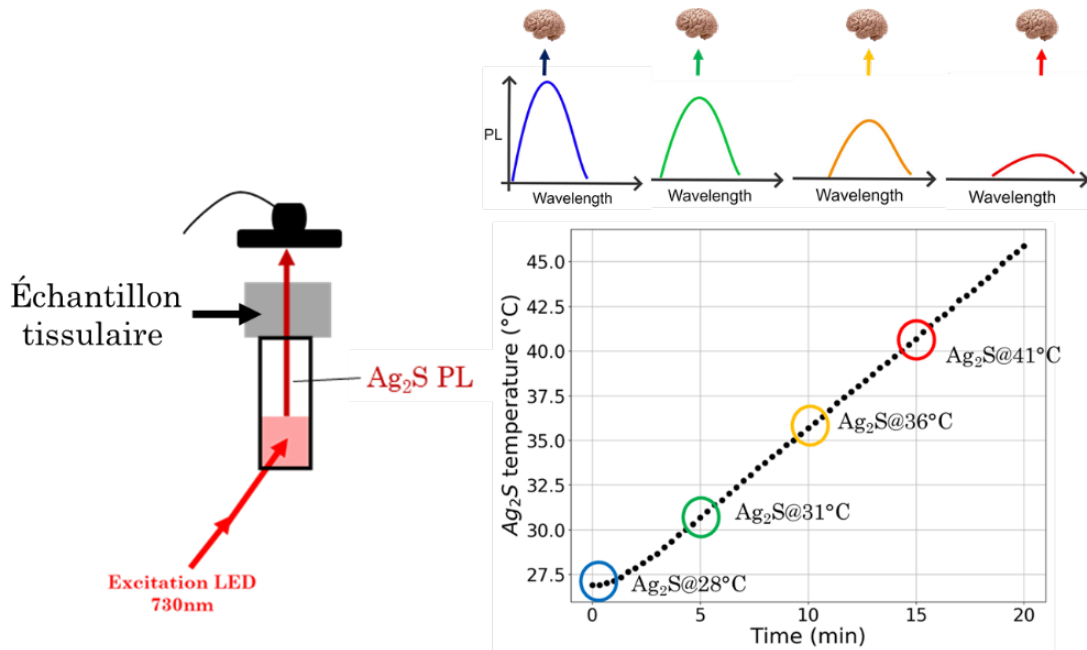


Figure VI-2 : Les nanoparticules dispersées d' Ag_2S dans D_2O sont soumises à une rampe de température de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ imposée grâce au support de cuve chauffant (Quantum Northwest). La température de la suspension passe de 27°C à 45°C en 18 min. La suspension de Ag_2S est excitée avec une LED émettant à 730nm. Les échantillons biologiques (foies et cerveaux de souris) sont placés au-dessus de la cuvette optique. Ils sont donc situés entre l'émetteur (nanoparticules de Ag_2S) et le détecteur (caméra hyperspectrale PyLoN-IR, Princeton). Nous cherchons à classer les tissus grâce au signal de photoluminescence transmis au détecteur, caractéristique de la traversée des photons émis par les Ag_2S à travers les organes.

VI.1.c. Choix de la méthode de traitement des données

Nous avons développé un algorithme de Machine Learning permettant de prendre en compte un nombre beaucoup plus important d'informations contenues dans le signal qu'en utilisant seulement un paramètre de photoluminescence. Ici, nous prenons en compte 6 paramètres : l'intensité, la position spectrale, la médiane, la largeur spectrale, le skewness et le kurtosis. Les variables de prédictions sont définies **annexe B, section B.IV**. Notre objectif est de classer les échantillons grâce à leur signature optique contenue dans les signaux de photoluminescence. Sur les 9600 (8 x 1200) spectres dont nous disposons, 8160 spectres ont été utilisés pour entraîner le modèle et 1440 spectres ont été utilisés pour le tester. De nombreux algorithmes existent et auraient pu être appliqués dans notre étude, comme la régression logistique, les séparateurs à vaste marge (SVM) ou les méthodes ensemblistes (Random Forest). Notre choix s'est porté sur une méthode ensembliste appelée XGBOOST (Extreme Gradient Boosting) dans sa version permettant d'effectuer une classification.

VI.2. Résultats et discussions

Pour une expérience donnée, les spectres de photoluminescence traversant les échantillons tissulaires sont acquis pour différentes températures de cœur des nanoparticules de Ag_2S . Grâce à la dépendance des nanoparticules de sulfures d'argent à la température, tout se passe comme si nous avions accès à une infinité de sources d'excitation émettant dans la seconde fenêtre de transparence des tissus biologiques (entre 1000 nm et 1350 nm). Les photons traversant les échantillons biologiques ont une distribution en énergie légèrement différente pour chaque acquisition de spectre de photoluminescence (une acquisition par seconde). La transillumination de l'échantillon est donc, à chaque instant, réalisée dans des conditions légèrement différentes. En revanche, les coefficients d'extinction de l'échantillon biologique (autrement dit la signature optique de l'échantillon) restent les mêmes au cours des 20 min d'expérience. En effet, la température de l'organe reste constante.

Les sulfures d'argent sont dispersés dans le D_2O . Les coefficients d'extinction de D_2O sont nuls dans la fenêtre d'émission des sulfures d'argent. Le milieu de dispersion des nanoparticules n'a donc pas de contribution dans la déformation du signal transmis au détecteur (figure VI-3 a). Par ailleurs, la plaque de verre sur laquelle reposent les échantillons biologiques est transparente aux photons émis par les sulfures d'argent. La déformation spectrale observée **figure VI-3 b et c** provient donc uniquement de la traversée des photons dans les échantillons tissulaires. D'une part, nous observons une déformation du spectre autour de 1050 nm. D'autre part, la largeur spectrale est plus faible que pour les signaux transmis au détecteur sans échantillon biologique entre la source optique (Ag_2S) et le détecteur (caméra hyperspectrale PyLoN-IR). Ces observations qualitatives effectuées « à l'œil nu », sont les mêmes les expériences réalisées avec les foies et avec les cerveaux. Elles ne permettent pas de discriminer les deux types d'organes.

Le modèle de prédiction que nous avons développé permet de prendre en compte un grand nombre d'informations contenues dans les signaux de notre base de données. Sur les 1440 spectres utilisés dans la phase de test du modèle, 360 correspondaient à des expériences réalisées avec un échantillon de cerveau et 1080 avec des échantillons de foie. Les classes prédites par le modèle correspondent dans 100% des cas aux classes réelles des échantillons (0 : cerveau et 1 : foie). Il n'y a aucun faux positif et aucun faux négatif. La déformation spectrale comporte donc une signature optique caractéristique de l'échantillon tissulaire. La performance très élevée de notre méthode de classification tissulaire peut s'expliquer par le fait que nous avons sélectionné deux types de tissus ayant des compositions très différentes. Le foie contient 5% de graisse alors que le cerveau en contient 60%. Ces deux organes ont également des structures tissulaires différentes. Par ailleurs, Lifante et al. ont montré que les signaux d'autofluorescence (sous excitation laser 808 nm) du cerveau et de la région abdominale de la souris sont différents entre 900 nm et 1200 nm [99].

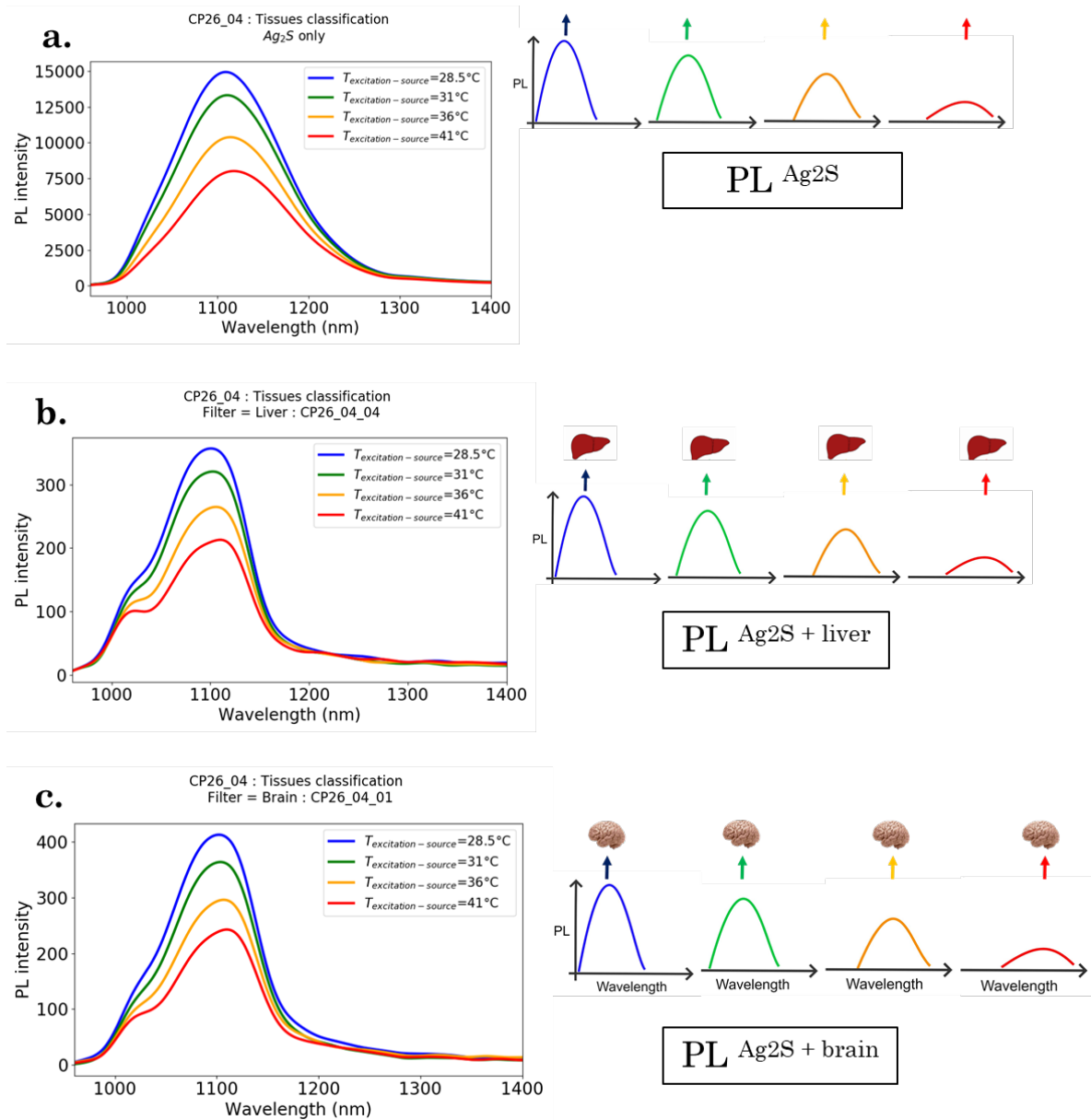


Figure VI-3 : (a) Spectres de photoluminescence des sulfures d'argent dispersés dans D₂O et à différentes températures. (b) Expériences de transillumination réalisées en utilisant Ag₂S comme source lumineuse sur (b) un cerveau de souris de 8,5 mm d'épaisseur et (c) un foie de souris de 9,8 mm d'épaisseur

VI.3. Pour conclure

Notre travail démontre que la déformation spectrale du signal de photoluminescence transmis est caractéristique de l'organe (foie ou cerveau) placé entre la source optique (Ag₂S) et le détecteur. L'interaction entre les photons émis par les sulfures d'argent et les tissus biologiques est une opportunité d'innovation biomédicale. Ce travail constitue une première preuve de concept de discrimination tissulaire grâce à la nanosonde de sulfures d'argent développée dans ce travail de thèse. Cette discrimination ne dépend pas de l'épaisseur de l'échantillon, de la température de cœur de la sonde photoluminescente ou de la variabilité génétique des individus chez lesquels ont été prélevés les échantillons. Cette preuve de concept pourrait être élargie à la discrimination tissus sains et des tissus cancéreux.

VII. Analyse de potentiel applicatif de la discrimination tissulaire par transillumination grâce aux sulfures d'argent

Le dépistage précoce des cancers est le moyen le plus efficace pour limiter l'invasivité des traitements pour le patient et d'augmenter ses chances de survie (selon l'OMS). Pour être largement utilisée, une technique de dépistage doit minimiser les risques pour le patient. Pour une personne en bonne santé, l'injection de nanoparticules comporte beaucoup plus de risques que de bénéfices. Les études sur le devenir des nanoparticules au sein du vivant sont particulièrement complexes. La toxicité à plus ou moins long terme est donc difficilement quantifiable. En revanche, pour une personne présentant un risque plus élevé vis-à-vis de la maladie, le risque lié à l'injection de nanoparticules peut devenir acceptable. Dans un article publié dans *Le Monde* le 10 novembre 2020, intitulé Oncologie : des nanoparticules pour renforcer les traitements, la société de biotechnologie Nanobiotix est interrogée sur la toxicité de son produit thérapeutique à base de nanocristaux d'oxyde d'hafnium visant à amplifier les effets de la radiothérapie localement, au niveau de la tumeur. Selon Nanobiotix : « *Le produit a été élaboré pour être le moins toxique possible. Une fois injecté, il ne peut pas se dégrader. Il reste dans la zone d'injection* ».

Il pourrait être intéressant de coupler les nanoparticules de sulfures d'argent, développées dans ce travail de thèse, à un nanoagent thérapeutique efficace pour traiter les tumeurs primaires. Cet agent thérapeutique pourrait par exemple être les produits développés par les sociétés NHTheraguix et Nanobiotix. Si la structure couplée reste dans la zone traitée après la rémission du cancer, elle pourrait resservir pour dépister, de manière précoce et grâce au signal des sulfures d'argent, une récurrence de cancer. Ceci présente un grand intérêt pour les patients. En effet, dans le cas du cancer du sein, le taux de survie dans les 5 ans suivant le diagnostic d'une tumeur primaire (dans les pays à revenu élevé) est de 87% (selon l'OMS). Ce taux de survie tombe à 50% dans le cas des récurrences de cancer [111]. Le signal de photoluminescence émis dans les tissus pourrait permettre de détecter de manière précoce l'apparition de la signature de la réapparition d'îlots tumoraux et d'augmenter le taux de survie pour les patients en rechute de cancer.

Pour valider ce potentiel applicatif, nous devons refaire l'expérience décrite dans cette partie de chapitre avec des échantillons tissulaires sains et tumoraux. Il faudrait aussi vérifier la stabilité du signal de photoluminescence émis par des sulfures d'argent au sein des tissus au cours du temps et vis-à-vis de la stratégie thérapeutique employée pour soigner le cancer.

Chapitre 5

Conclusion générale

I. Notre démarche

Ce travail de thèse peut être segmenté en trois axes visant à répondre aux besoins de la communauté de chercheurs travaillant sur l'hyperthermie au stade préclinique :

- 1. Développer une sonde de température émettant dans la seconde fenêtre des tissus biologiques avec une sensibilité à la température dans la gamme [25°C-60°C].** Nous avons fait le choix de développer une sonde photoluminescente à base de sulfure d'argent. Une littérature riche sur ce matériau montre des résultats encourageants vis-à-vis de leur utilisation en milieu biologique : absence de toxicité et émission dans la deuxième fenêtre des tissus biologiques.
- 2. Développer les dispositifs expérimentaux permettant de faire des mesures de nanothermométrie en temps réel pendant l'excitation optique et magnétique des sources de chaleur.** Les dispositifs expérimentaux à développer sont de deux natures différentes : **(i)** le système couplé de nanoparticules nanothermomètre - nanosource de chaleur ; **(ii)** le système instrumental couplant un détecteur de photoluminescence aux sources d'excitation optique et magnétique.
- 3. Assurer la robustesse des mesures de températures grâce aux nanothermomètres.**

II. Résultats

II.1. Synthèse et évaluation de nanocristaux de sulfure d'argent pour la nanothermométrie de photoluminescence appliquée au vivant

Tout d'abord, nous avons développé une synthèse de nanothermomètre de sulfure d'argent rapide et peu coûteuse, en une seule étape voie aqueuse, assistée par chauffage micro-ondes. Le composé est obtenu après un palier de chauffe de 5 min à 100°C. Il a une formulation simple : seul un ligand (acide 11 mercaptodecanoïque) et deux sels précurseurs d'argent (AgNO_3) et de soufre ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) sont utilisés dans le protocole de synthèse. La fonctionnalisation des nanoparticules les rend stables en milieu aqueux et donc directement « prêtes à l'emploi ». Un étape d'échange de ligand post-synthèse n'est pas nécessaire pour les utiliser en milieu biologique.

Ensuite, nous avons synthétisé 9 composés Ag_2S en faisant varier les proportions entre l'argent et le soufre (**Ag:S**) ainsi qu'entre le ligand et l'argent (**Surf:Ag**) ajouté au milieu réactionnel. Ce travail de synthèse et caractérisation des matériaux obtenus (MET, MEB-EDX, UV-Vis, spectroscopie d'émission de photoluminescence) nous a permis, d'une part, d'observer un effet de taille sur la composition chimique et l'énergie de la bande d'émission des nanoparticules d' Ag_2S synthétisées (confinement quantique), d'autre part de proposer des hypothèses de mécanismes de formation des nanoparticules. Nous avons mis en évidence que la croissance des nanoparticules était accélérée par la force ionique dans le milieu réactionnel. Cette étude a également mis en évidence que la photoluminescence des Ag_2S dépend de la densité de défauts de surface et de pièges localisés au niveau des lacunes d'argent. Parmi les 9 composés synthétisés, le composé Ag_2S sélectionné pour nos expériences de nanothermométrie est celui ayant le meilleur rendement quantique (**0,07 %**) et la sensibilité thermique relative la plus élevée (**1,6 %. $^{\circ}\text{C}^{-1}$ à 37°C** en considérant le rapport d'intensité p_1).

Enfin, nous avons testé notre protocole de synthèse en changeant la molécule de ligand. Les Ag_2S -PEG sont prometteurs pour les études *in vivo*, mais leur rendement quantique est trop faible (<0,01%) pour effectuer des mesures de température fiables. Les Ag_2S -DTDTPA ont un rendement quantique 10 fois plus élevé (0,7%) que les Ag_2S -11MUA optimisés (0,07%). Ils ont donc un réel potentiel applicatif pour l'imagerie dans la seconde fenêtre de transparence des tissus. Néanmoins, le paramètre

de photoluminescence p_1 n'est pas réversible lors d'un cycle de montée-descente en température. Il reste à comprendre les causes de cette irréversibilité pour en faire un nanothermomètre.

II.2. Nanothermométrie et hyperthermie magnétoinduite *in vitro*

Le nanothermomètre optimisé a été utilisé pour mesurer, en temps réel, la température locale au voisinage de nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en milieux aqueux et cellulaire, au cours d'un programme d'excitation optique et magnétique. Cette étude a été rendue possible grâce à un investissement conséquent, en termes de temps et d'énergie, dans la conception instrumentale d'un dispositif permettant de réaliser simultanément l'excitation magnétoinduite des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et la détection du signal de photoluminescence des Ag_2S pour la nanothermométrie.

La fiabilité des mesures de température effectuées grâce au spectre de photoluminescence des Ag_2S dépend fortement de la forme du signal. Nous avons donc utilisé le modèle d'étalonnage établi avec un le paramètre de photoluminescence p_1 avec précaution, en portant une attention particulière au rapport signal/bruit, aux réglages optiques (et notamment alignement caméra-monochromateur) et à l'autofluorescence des cellules lorsque nous avons travaillé avec des culots cellulaires.

Au cours du programme d'excitation optique et magnétique, la température sondée par les nanothermomètres Ag_2S au voisinage des nanosphères de maghémite est largement supérieure à la température globale mesurée dans le milieu. La littérature montre que la température peut être beaucoup plus élevée à la surface des Ag_2S et qu'elle décroît très rapidement lorsqu'on s'éloigne de la surface des sources de chaleur. Dans le cadre de notre **étude en milieu aqueux**, les deux types de nanoparticules contenues dans l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S} - \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont très proches. La distance qui les séparent est de l'ordre de la longueur de la chaîne du ligand 11MUA (1,7 nm). La différence entre la température sondée localement par les Ag_2S à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et celle mesurée globalement dans le milieu est très élevée (jusqu'à 67°C). Ce résultat pose question, car les nanosphères $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ne sont pas connues pour être des sources de chaleur performantes. Dans le cadre de notre **étude en milieu cellulaire**, le contrôle de la distance nanothermomètre – source de chaleur grâce aux compartiments cellulaires présente un réel intérêt. Les expériences décrites dans ce chapitre démontrent qu'il est possible de mesurer la température intracellulaire grâce au signal de photoluminescence des Ag_2S et au système expérimental développé dans le cadre de ce travail de thèse.

II.3. Nanothermométrie et interaction lumière-matière

Le spectre de photoluminescence des Ag_2S , transmis au détecteur, est caractéristique de la température, mais également des propriétés optiques (coefficients d'absorption et de diffusion) du milieu traversé par les photons. Ceci constitue un réel challenge pour le déploiement de la nanothermométrie de photoluminescence en recherche préclinique. Jusqu'à présent, dans la littérature, les effets de l'interaction lumière-matière ont été décrits qualitativement, mais aucune étude quantitative n'a encore été réalisée. Nous avons souhaité modéliser l'interaction entre les photons émis par les nanoparticules de sulfure d'argent et l'eau grâce à la loi de Beer-Lambert. Tout au long de ce travail de thèse, des programmes en langage Python ont été développés pour automatiser le traitement des spectres de photoluminescence. Cette approche rapide et adaptable nous a permis de réaliser une étude métrologique poussée vis-à-vis de la mesure de température effectuée grâce aux nanoparticules de sulfure d'argent.

Nous proposons donc un changement de paradigme concernant le traitement de signal de photoluminescence dans le cas où les nanothermomètres sont contenus dans un milieu absorbant (H_2O). Cette méthode, basé sur un modèle de prédiction de machine learning permet de remonter à une mesure de température dont la fiabilité (score de 97%) n'est pas impactée par la profondeur du signal. Cette méthode de traitement des spectres de photoluminescence prend en compte une quantité

Conclusion générale

d'informations plus importantes que le rapport d'intensité p_1 . Elle nous a permis de confirmer l'ordre de grandeur des températures sondées par les Ag_2S à la surface des $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans le chapitre 3 avec le modèle d'étalonnage établi sur p_1 .

Les interactions lumière-matière représentent un frein important au déploiement de la nanothermométrie en recherche préclinique, mais elles peuvent être également l'opportunité d'accéder à un grand nombre d'informations sur les tissus biologiques. Nous avons porté un nouveau regard sur le potentiel applicatif de la nanosonde photoluminescente Ag_2S . Nous avons utilisé le signal de photoluminescence des Ag_2S pour discriminer deux types de tissus biologiques (cerveau et foie) par transillumination.

III. Perspectives de travail

III.1. Ag_2S -PEG

Nous avons souhaité étudier l'effet du ligand sur la performance du nanocrystal d' Ag_2S pour la nanothermométrie. Pour cela, nous avons synthétisé des nanoparticules de sulfure d'argent décorées de polyéthylène glycol méthyl éther thiol (6 kDa) en suivant le même procédé de synthèse en voie aqueuse, que celui décrit pour le ligand 11MUA. Le polyéthylène glycol est un ligand de référence en termes de revêtement de surface des nanoparticules développées pour des applications *in vivo*. C'est un composé neutre (contrairement au 11MUA dans des conditions de $\text{pH} \geq 4,5$) qui confère aux nanoparticules une biodisponibilité importante au sein du vivant en permettant un temps de circulation plus long des nanoparticules dans le système sanguin.

Une étude préliminaire de biodistribution *in vivo* par imagerie optique (figure III-1) a montré une absence d'accumulation des nanoparticules Ag_2S -PEG dans les poumons et le foie 24 h après l'injection. C'est un résultat encourageant vis-à-vis de la sécurité de cette formulation. Néanmoins, le rendement quantique ($< 1\%$) et la sensibilité relative à la température ($< 1\%.\text{°C}^{-1}$) de ces nanoparticules sont inférieurs aux seuils fixés par notre cahier des charges fonctionnelles. Le nanothermomètre candidat Ag_2S -PEG n'a donc pas été sélectionné pour les expériences de nanothermométrie rapportées dans ce travail de thèse. Il serait intéressant d'optimiser ce matériau pour de futures expériences d'imagerie optique et de nanothermométrie *in vivo*. Dans le futur, je propose d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne et de la quantité de polyéthylène glycol ajouté au milieu réactionnel, sur le rendement quantique et la sensibilité thermique relative des nanoparticules.

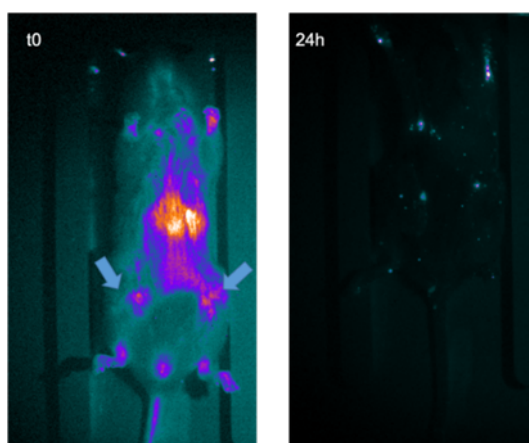


Figure III-1 : Imagerie optique (Princeton NIR-II) de photoluminescence réalisée pour une souris sous anesthésie générale par voie gazeuse (isoflurane) à $t = 0$ et à $t = 24\text{h}$ après une injection intraorbitale de $300\ \mu\text{L}$ de Ag_2S -PEG à $0.6\ \text{mg.mL}^{-1}$ en suspension dans $\text{NaCl}\ 0.9\%$. Sur le cliché à $t=0$, les flèches bleues localisent deux tumeurs sous-cutanées. À $t = 24\ \text{h}$, les nanoparticules ne sont pas retenues dans les tumeurs, mais elles ont été complètement éliminées du foie et de la rate ce qui est encourageant vis-à-vis de la sécurité de la formulation des nanoparticules

III.2. Ag₂S –NF

Grâce à **Rana BAZZI** et **Stéphane ROUX** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté), les nanoparticules de Ag₂S-DTDTPA ont été greffées à des nanofleurs de maghémite pour former la nanoplateforme Ag₂S-DTDTPA- γ -Fe₂O₃^{nanofleurs}. Nous avons montré que les Ag₂S-DTDTPA (présentés dans la troisième partie du chapitre 2 de ce manuscrit) seules émettent un signal centré autour de 1050 nm à 25°C. Ces nanoparticules ont un rendement quantique 10 fois supérieur (0,66%) au nanothermomètre de référence (0,07%) (optimisé dans le chapitre 2 du document principal). Néanmoins, lorsque les Ag₂S-DTDTPA sont greffées aux nanofleurs de maghémite, aucun signal de photoluminescence n'est détecté. Dans le futur, il serait intéressant d'effectuer de nouveaux essais de greffage des Ag₂S-DTDTPA à la surface des nanofleurs de maghémite en diminuant le rapport Fe/Ag₂S. Dans le cadre de l'essai que nous avons réalisé, le rapport massique théorique Fe/Ag₂S de la nanoplateforme Ag₂S-DTDTPA- γ -Fe₂O₃^{nanofleurs} vaut 2,3. Il est probable que les γ -Fe₂O₃^{nanofleurs} absorbent toute l'énergie apportée au système Ag₂S-DTDTPA- γ -Fe₂O₃^{nanofleurs} par la source d'excitation optique (LED-730 nm à 0,1 mW.cm⁻²). Diminuer la quantité de γ -Fe₂O₃^{nanofleurs} par rapport aux Ag₂S pourrait donc permettre aux nanothermomètres d'absorber plus de photons provenant de la source d'excitation et donc d'augmenter leur intensité de photoluminescence.

III.3. Utilisation du nanothermomètre

Selon moi, la nanothermométrie a un réel potentiel pour les études *in vitro*. Il serait intéressant de contrôler l'organisation entre les nanothermomètres et les sources de chaleur grâce aux cellules. Les deux types de nanoparticules pourraient être internalisées dans deux types de cellules différentes. Ces cellules pourraient être choisies de sorte à mimer la composition du microenvironnement tumoral. Cela permettrait de développer un modèle de tumeur au sein duquel il serait possible de mesurer des gradients de température, résultant de l'excitation (optique et/ou magnétique) de nanosources de chaleur grâce aux nanothermomètres.

Postface

La thèse est un cadre qui permet de mener des activités passionnantes et d'apprendre très vite. Grâce à cette expérience, j'ai pris conscience que chaque problème est une opportunité de découverte et de progrès.

Après ma thèse, je souhaite m'investir dans des projets avec une ambition : innover en Santé pour rendre accessible les innovations thérapeutiques à tous les citoyens.

Selon les mots de la sociologue Éva Illouz : « *Une vocation professionnelle, c'est un peu comme une histoire d'amour, c'est à la fois le fruit du destin et du hasard* » ...

Valorisation scientifique

I. Communications orales

I.1. Conférences internationales

- Juin 2019 Nanohybrids 16
Towards a novel nanoplateform for hyperthermia applications
Lise Abiven, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac
- Décembre 2019 The first edition of SF Nano – C’Nano joint meeting (Flash talk)
Towards a novel temperature probe for hyperthermia treatment
Lise Abiven, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac

Prix du meilleur poster
- Janvier 2020 Winter School on Nanothermometry for biomedical applications
Towards a novel luminescent probe for nanothermometry to monitor and control hyperthermia treatment
Lise Abiven, Victor Castaing Florence Gazeau, Bruno Viana
Corinne Chanéac
- Janvier 2020 NALS 2020
Towards a novel luminescent probe for nanothermometry to monitor and control hyperthermia treatment
Lise Abiven, Victor Castaing Florence Gazeau, Bruno Viana
Corinne Chanéac

Prix du meilleur oral
- Juillet 2020 2nd international conference on phosphor thermometry
Metrology for temperature sensing using Ag₂S nanothermometers
Lise Abiven, Victor Castaing Florence Gazeau, Bruno Viana
Corinne Chanéac

Prix du meilleur oral
- Novembre 2021 C’NANO 2021
Ag₂S nanoparticle-based thermal sensing for hyperthermia therapy
Lise Abiven, Sonia Becharef, Sabrina Benbabaali, Bruno Viana, Corinne Chanéac, Florence Gazeau

I.2. Séminaires

- Décembre 2019 Séminaire au laboratoire Recherche et Innovation de l'hôpital Marie Lannelongue (92)
- La nanothermométrie : une solution pour contrôler les traitements par hyperthermie**
Lise Abiven, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac
- Janvier 2020 Séminaire de laboratoire au LCMCP
- Towards a novel luminescent probe for nanothermometry to monitor and control hyperthermia treatment**
Lise Abiven, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac
- Décembre 2020 Webinar organisé par le consortium NanoTBtech⁴⁶
- Ag₂S nanoparticles-based thermal sensing: from photoluminescence signal to reliable temperature readings**
Lise Abiven, Victor Castaing Florence Gazeau, Bruno Viana
Corinne Chanéac
- Janvier 2021 Séminaire de laboratoire MSC MED
- Ag₂S nanoparticles-based thermal sensing: From photoluminescence signal to reliable temperature readings**
Lise Abiven, Victor Castaing Florence Gazeau, Bruno Viana
Corinne Chanéac
- Octobre 2021 Séminaire de laboratoire au LCMCP – Équipe MAT BIO
- Tissue discrimination using Ag₂S-photoluminescence emission signal**
Quentin Morel, Joelle Tchikaya, Florence Gazeau, Corinne Chanéac, Bruno Viana, Lise Abiven

⁴⁶ <http://nanotbtech.web.ua.pt/videos/video11.mp4>

II. Communications écrites

II.1. Poster

Décembre 2019 The first edition of SF Nano – C’Nano joint meeting

Nanothermometry for biomedical applications with low-cost and green Ag₂S Quantum Dots

Lise Abiven, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac

Prix du meilleur poster dans la catégorie Bio-engineering & nanoconfinement

II.2. Publications

Temperature dependence of water absorption in the biomedical spectral window: Effects on quantum dot fluorescence nanothermometers En cours de soumission

Tamara Muñoz-Ortiz, Lise Abiven, Riccardo Marin, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac, Emma Martín Rodríguez, José García Solé

Paradigm shift for Ag₂S nanoparticles-based thermal sensing En cours de rédaction

Lise Abiven, Quentin Morel, Victor Castaing, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac

Reliable intracellular temperature sensing in real time during magnetic hyperthermia En cours de rédaction

Lise Abiven, Sonia Becharef, Bruno Viana, Corinne Chanéac, Florence Gazeau

From a technical challenge to a biomedical innovation opportunity: Tissue discrimination using Ag₂S-photoluminescence emission signal En cours de rédaction

Quentin Morel, Joelle Tchikaya, Florence Gazeau, Corinne Chanéac, Bruno Viana, Lise Abiven

Synthesis and evaluation of Ag₂S-11MUA for nanothermometry En cours de rédaction

Lise Abiven, Sabrina Benbabaali, Florence Gazeau, Bruno Viana, Corinne Chanéac

Bibliographie

Bibliographie

- [1] S. W. Kim and D. Khang, "Multiple cues on the physiochemical, mesenchymal, and intracellular trafficking interactions with nanocarriers to maximize tumor target efficiency," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 3989–4008, 2015.
- [2] F. Lu *et al.*, "Aqueous synthesis of PEGylated Ag₂S quantum dots and their in vivo tumor targeting behavior," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 529, no. 4, pp. 930–935, 2020.
- [3] F. Hu, C. Li, Y. Zhang, M. Wang, D. Wu, and Q. Wang, "Real-time in vivo visualization of tumor therapy by a near-infrared-II Ag₂S quantum dot-based theranostic nanoplatform," *Nano Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 1637–1647, 2015.
- [4] S. I. Sadovnikov and A. I. Gusev, "Recent progress in nanostructured silver sulfide: From synthesis and nonstoichiometry to properties," *J. Mater. Chem. A*, vol. 5, no. 34, pp. 17676–17704, 2017.
- [5] R. Han, J. Peng, Y. Xiao, Y. Hao, Y. Jia, and Z. Qian, "Ag₂S nanoparticles as an emerging single-component theranostic agent," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 31, no. 7, pp. 1717–1728, 2020.
- [6] M. Semmler-Behnke *et al.*, "Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats," *Small*, vol. 4, no. 12, pp. 2108–2111, 2008.
- [7] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, and F. Baneyx, "Molecular biomimetics: Nanotechnology through biology," *Nat. Mater.*, vol. 2, no. 9, pp. 577–585, 2003.
- [8] M. De, P. S. Ghosh, and V. M. Rotello, "Applications of nanoparticles in biology," *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 22, pp. 4225–4241, 2008.
- [9] A. Gaudin *et al.*, "Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1054–1062, 2014.
- [10] R. J. Reeder, M. A. A. Schoonen, and A. Lanzirrotti, "Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability," *Rev. Mineral. Geochemistry*, vol. 64, pp. 59–113, 2006.
- [11] D. M. McKnight and F. M. M. Morel, "Release of weak and strong copper-complexing agents by algae," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 24, no. 5, pp. 823–837, 1979.
- [12] T. Leonardo, "Mécanismes d'accumulation et impact biologique de l'argent et du cobalt chez la micro-algue *Coccomyxa actinabiotis*," 2014.
- [13] J. T. Buchman, N. V. Hudson-Smith, K. M. Landy, and C. L. Haynes, "Understanding Nanoparticle Toxicity Mechanisms to Inform Redesign Strategies to Reduce Environmental Impact," *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 6, pp. 1632–1642, 2019.
- [14] J. M. Moulis, "Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals," *BioMetals*, vol. 23, no. 5, pp. 877–896, 2010.
- [15] V. Adler, Z. Yin, K. D. Tew, and Z. Ronai, "Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling," *Oncogene*, vol. 18, no. 45, pp. 6104–6111, 1999.
- [16] A. Balfourier *et al.*, "Unexpected intracellular biodegradation and recrystallization of gold nanoparticles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 1, pp. 103–113, 2020.
- [17] R. Piñol *et al.*, "Real-Time Intracellular Temperature Imaging Using Lanthanide-Bearing Polymeric Micelles," *Nano Lett.*, vol. 20, no. 9, pp. 6466–6472, 2020.
- [18] N. Lane, "Hot mitochondria?," *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–6, 2018.
- [19] G. Baffou, H. Rigneault, D. Marguet, and L. Jullien, "Reply to 'Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors' and 'The 105 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry'," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 7, 2015.
- [20] V. Umadevi, S. V. Raghavan, and S. Jaipurkar, "Framework for estimating tumour parameters

Bibliographie

- using thermal imaging,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 134, no. 11, pp. 725–731, 2011.
- [21] A. Nicolas-Boluda *et al.*, “Self-Assemblies of Fe₃O₄ Nanocrystals: Toward Nanoscale Precision of Photothermal Effects in the Tumor Microenvironment,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 31, no. 4, pp. 1–17, 2021.
- [22] F. Curnis, A. Sacchi, and A. Corti, “Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration,” *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 4, pp. 475–482, 2002.
- [23] M. Yamauchi, T. H. Barker, D. L. Gibbons, and J. M. Kurie, “The fibrotic tumor stroma,” *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 1, pp. 16–25, 2018.
- [24] M. Bañobre-López, A. Teijeiro, and J. Rivas, “Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment,” *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 18, no. 6, pp. 397–400, 2013.
- [25] A. Nicolás-Boluda *et al.*, “Photothermal Depletion of Cancer-Associated Fibroblasts Normalizes Tumor Stiffness in Desmoplastic Cholangiocarcinoma,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 5, pp. 5738–5753, 2020.
- [26] A. Nicolas-Boluda, J. Vaquero, G. Laurent, G. Renault, R. Bazzi, and E. Donnadieu, “Photothermal Depletion of Cancer-Associated Fibroblasts Normalizes Tumor Stiffness in Desmoplastic Cholangiocarcinoma,” 2020.
- [27] A. Nicolas-Boluda *et al.*, “Intracellular Fate of Hydrophobic Nanocrystal Self-Assemblies in Tumor Cells,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 40, pp. 1–15, 2020.
- [28] M. Levy *et al.*, “Nanomagnetism reveals the intracellular clustering of iron oxide nanoparticles in the organism,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 10, pp. 4402–4410, 2011.
- [29] G. F. Goya, L. Asín, and M. R. Ibarra, “Cell death induced by alternating magnetic fields and magnetic nanoparticles: Current state and perspectives,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 29, no. 8, pp. 810–818, 2013.
- [30] C. Le Ster *et al.*, “RF heating measurement using MR thermometry and field monitoring: Methodological considerations and first in vivo results,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 85, no. 3, pp. 1282–1293, 2021.
- [31] E. Glais *et al.*, “Luminescence properties of ZnGa₂O₄:Cr³⁺, Bi³⁺ nanophosphors for thermometry applications,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 73, pp. 41767–41774, 2018.
- [32] T. Maldiney, “Nanocristaux à luminescence persistante : nouveaux concepts pour l’imagerie in vivo,” 2012.
- [33] A. Bednarkiewicz, L. Marciniak, L. D. Carlos, and D. Jaque, “Standardizing luminescence nanothermometry for biomedical applications,” *Nanoscale*, vol. 12, no. 27, pp. 14405–14421, 2020.
- [34] D. Jaque and F. Vetrone, “Luminescence nanothermometry,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 15, pp. 4301–4326, 2012.
- [35] L. Labrador-Páez, M. Pedroni, A. Speghini, J. García-Solé, P. Haro-González, and D. Jaque, “Reliability of rare-earth-doped infrared luminescent nanothermometers,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 47, pp. 22319–22328, 2018.
- [36] E. C. Ximendes *et al.*, “In Vivo Subcutaneous Thermal Video Recording by Supersensitive Infrared Nanothermometers,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 38, 2017.
- [37] Y. Shen, J. Lifante, N. Fernández, D. Jaque, and E. Ximendes, “In Vivo Spectral Distortions of Infrared Luminescent Nanothermometers Compromise Their Reliability,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 4, pp. 4122–4133, 2020.

Bibliographie

- [38] E. Glais, A. Maître, B. Viana, and C. Chanéac, “Experimental measurement of local high temperature at the surface of gold nanorods using doped ZnGa₂O₄ as a nanothermometer,” *Nanoscale Adv.*, vol. 3, no. 10, pp. 2862–2869, 2021.
- [39] A. Benayas, *Near Infrared- Emitting Nanoparticles for Biomedical Applications*. 2020.
- [40] G. M. Van Dam *et al.*, “Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: First in-human results,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 10, pp. 1315–1319, 2011.
- [41] G. Hong *et al.*, “In vivo fluorescence imaging with Ag₂S quantum dots in the second near-infrared region,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 39, pp. 9818–9821, 2012.
- [42] Y. Zhang *et al.*, “Biomaterials Biodistribution , pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 14, pp. 3639–3646, 2013.
- [43] B. del Rosal *et al.*, “In Vivo Contactless Brain Nanothermometry,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 52, pp. 1–7, 2018.
- [44] Y. Wang and X. P. Yan, “Fabrication of vascular endothelial growth factor antibody bioconjugated ultrasmall near-infrared fluorescent Ag₂S quantum dots for targeted cancer imaging in vivo,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 32, pp. 3324–3326, 2013.
- [45] Z. Tao *et al.*, “Biological imaging using nanoparticles of small organic molecules with fluorescence emission at wavelengths longer than 1000 nm,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 49, pp. 13002–13006, 2013.
- [46] D. J. Naczynski *et al.*, “Rare-earth-doped biological composites as in vivo shortwave infrared reporters,” *Nat. Commun.*, vol. 4, 2013.
- [47] T. Huff, “Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2008.
- [48] J. Kolosnjaj-Tabi *et al.*, “Heat-generating iron oxide nanocubes: Subtle ‘destructorators’ of the tumoral microenvironment,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 5, pp. 4268–4283, 2014.
- [49] Y. Du *et al.*, “Near-Infrared Photoluminescent Ag₂S Quantum Dots from a Single Source,” pp. 1470–1471, 2010.
- [50] A. Ortega-Rodríguez *et al.*, “10-Fold Quantum Yield Improvement of Ag₂S Nanoparticles by Fine Compositional Tuning,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 11, pp. 12500–12509, 2020.
- [51] J. P. Jolivet, É. Tronc, and C. Chanéac, “Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 5, no. 10, pp. 659–664, 2002.
- [52] D. H. Ortgies *et al.*, “Infrared fluorescence imaging of infarcted hearts with Ag₂S nanodots,” *Nano Res.*, vol. 12, no. 4, 2019.
- [53] C. Li *et al.*, “In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 393–400, 2014.
- [54] D. Aydemir, M. Hashemkhani, H. Y. Acar, and N. N. Ulusu, “Evaluation of the biocompatibility of the GSH-coated Ag₂S quantum dots in vitro: a perfect example for the non-toxic optical probes,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 6, pp. 4117–4129, 2020.
- [55] C. Wang *et al.*, “Facile aqueous-phase synthesis of biocompatible and fluorescent Ag₂S nanoclusters for bioimaging: Tunable photoluminescence from red to near infrared,” *Small*, vol. 8, no. 20, pp. 3137–3142, 2012.
- [56] P. Jiang, C. Zhu, Z. Zhang, Z. Tian, and D. Pang, “Biomaterials Water-soluble Ag₂S quantum

Bibliographie

- dots for near-infrared fluorescence imaging in vivo,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 20, pp. 5130–5135, 2012.
- [57] H. Y. Yang, Y. W. Zhao, Z. Y. Zhang, H. M. Xiong, and S. N. Yu, “One-pot synthesis of water-dispersible Ag₂S quantum dots with bright fluorescent emission in the second near-infrared window,” *Nanotechnology*, vol. 24, no. 5, pp. 2–4, 2013.
- [58] T. Du *et al.*, “Glutathione-Capped Ag₂S Nanoclusters Inhibit Coronavirus Proliferation through Blockage of Viral RNA Synthesis and Budding,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 5, pp. 4369–4378, 2018.
- [59] I. Hocaoglu *et al.*, “Development of highly luminescent and cytocompatible near-IR-emitting aqueous Ag₂S quantum dots,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 29, pp. 14674–14681, 2012.
- [60] R. Tang, J. Xue, B. Xu, D. Shen, G. P. Sudlow, and S. Achilefu, “Tunable ultrasmall visible-to-extended near-infrared emitting silver sulfide quantum dots for integrin-targeted cancer imaging,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 1, pp. 220–230, 2015.
- [61] R. Gui, A. Wan, X. Liu, W. Yuan, and H. Jin, “Water-soluble multidentate polymers compactly coating Ag₂S quantum dots with minimized hydrodynamic size and bright emission tunable from red to second near-infrared region,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 10, pp. 5467–5473, 2014.
- [62] T. Yang *et al.*, “Size-Dependent Ag₂S Nanodots for Second Near-Infrared Fluorescence/Photoacoustics Imaging and Simultaneous Photothermal Therapy,” *ACS Nano*, vol. 11, no. 2, pp. 1848–1857, 2017.
- [63] L. Tan, A. Wan, and H. Li, “Conjugating S-nitrosothiols with glutathione stabilized silver sulfide quantum dots for controlled nitric oxide release and near-infrared fluorescence imaging,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 21, pp. 11163–11171, 2013.
- [64] P. Miao, Y. Tang, B. Wang, and F. Meng, “Near-Infrared Ag₂S Quantum Dots-Based DNA Logic Gate Platform for miRNA Diagnostics,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 15, pp. 7567–7573, 2016.
- [65] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, and U. Resch-Genger, “Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 8, pp. 1535–1550, 2013.
- [66] Y. Zhang, G. Hong, Y. Zhang, G. Chen, F. Li, and H. Dai, “Ag₂S Quantum Dot: A Bright and Biocompatible Fluorescent Nanoprobe in the Second Near-Infrared Window,” no. 5, pp. 3695–3702, 2012.
- [67] M. Karimipour, N. Moradi, and M. Molaei, “Strong NIR luminescent Ag₂S@ZnS core-shells synthesized by a novel one pot pulsed microwave irradiation,” *J. Lumin.*, vol. 182, pp. 91–97, 2017.
- [68] H. D. A. Santos *et al.*, “Ultrafast photochemistry produces superbright short-wave infrared dots for low-dose in vivo imaging,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [69] S. I. Sadovnikov, A. I. Gusev, and A. A. Rempel, “Structure and stoichiometry of nanocrystalline silver sulfide,” *Dokl. Phys. Chem.*, vol. 464, no. 2, pp. 238–243, 2015.
- [70] C. Du, J. Tian, and X. Liu, “Effect of intrinsic vacancy defects on the electronic properties of monoclinic Ag₂S,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 249, no. December 2019, p. 122961, 2020.
- [71] B. Kim, C. S. Park, M. Murayama, and M. F. Hochella, “Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 19, pp. 7509–7514, 2010.
- [72] D. Moodelly, “Synthèse et caractérisation de nanocristaux fluorescents chalcopyrites et Ag₂S,” 2020.

Bibliographie

- [73] S. I. Sadovnikov, Y. V Kuznetsova, and A. A. Rempel, "Nano-Structures & Nano-Objects Ag₂S silver sulfide nanoparticles and colloidal solutions: Synthesis and properties," *Nano-Structures & Nano-Objects*, vol. 7, pp. 81–91, 2016.
- [74] L. E. Brus, "Electron – electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 1984, 1984.
- [75] Y. Zhang, Y. Liu, C. Li, X. Chen, and Q. Wang, "Controlled synthesis of Ag₂S quantum dots and experimental determination of the exciton bohr radius," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 9, pp. 4918–4923, 2014.
- [76] L. Kong, W. Liu, X. Chu, Y. Yao, P. Zhu, and X. Ling, "Glutathione-directed synthesis of luminescent Ag₂S nanoclusters as nanosensors for copper(II) ions and temperature," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 98, pp. 80530–80535, 2015.
- [77] D. Ruiz *et al.*, "Ag/Ag₂S Nanocrystals for High Sensitivity Near-Infrared Luminescence Nanothermometry," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 6, 2017.
- [78] L. Jing *et al.*, "Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 18, pp. 10623–10730, 2016.
- [79] P. Jing *et al.*, "Temperature-Dependent Photoluminescence of CdSe-Core CdS / CdZnS / ZnS-Multishell Quantum Dots," no. 6 MI, pp. 13545–13550, 2009.
- [80] H. LaMer Dinegar, "Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 8, pp. 4847–4854, 1950.
- [81] M. Baghbanzadeh, L. Carbone, P. D. Cozzoli, and C. O. Kappe, "Microwave-assisted synthesis of colloidal inorganic nanocrystals," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 48, pp. 11312–11359, 2011.
- [82] C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, B. S. J. Halstead, and D. Michael P Mingos, "Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 27, no. 3, pp. 213–223, 1998.
- [83] I. Bilecka and M. Niederberger, "Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis," *Nanoscale*, vol. 2, no. 8, pp. 1358–1374, 2010.
- [84] F. Dufour, S. Cassaignon, O. Durupthy, C. Colbeau-Justin, and C. Chanéac, "Do TiO₂ nanoparticles really taste better when cooked in a microwave oven?," *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 16, pp. 2707–2715, 2012.
- [85] G. A. Martínez-Castañón, M. G. Sánchez-Loredo, H. J. Dorantes, J. R. Martínez-Mendoza, G. Ortega-Zarzosa, and F. Ruiz, "Characterization of silver sulfide nanoparticles synthesized by a simple precipitation method," *Mater. Lett.*, vol. 59, no. 4, pp. 529–534, 2005.
- [86] S. M. Ansar, S. Chakraborty, and C. L. Kitchens, "pH-responsive mercaptoundecanoic acid functionalized gold nanoparticles and applications in catalysis," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 5, pp. 1–12, 2018.
- [87] Y. Zhao, C. Riemersma, F. Pietra, R. Koole, C. De Mello Donegá, and A. Meijerink, "High-temperature luminescence quenching of colloidal quantum dots," *ACS Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 9058–9067, 2012.
- [88] K. Jia, P. Wang, L. Yuan, X. Zhou, W. Chen, and X. Liu, "Facile synthesis of luminescent silver nanoparticles and fluorescence interactions with blue-emitting polyarylene ether nitrile," *J. Mater. Chem. C*, vol. 3, no. 15, pp. 3522–3529, 2015.
- [89] P. J. Debouttière *et al.*, "Design of gold nanoparticles for magnetic resonance imaging," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, no. 18, pp. 2330–2339, 2006.

Bibliographie

- [90] M. Lévy, C. Wilhelm, J. M. Siaugue, O. Horner, J. C. Bacri, and F. Gazeau, “Magnetically induced hyperthermia: Size-dependent heating power of γ -Fe₂O₃ nanoparticles,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 20, no. 20, 2008.
- [91] J. Fortin *et al.*, “Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia,” *JACS*, vol. 129, no. 14, pp. 2628–2635, 2006.
- [92] M. Jeun, Y. J. Kim, K. H. Park, S. H. Paek, and S. Bae, “Physical contribution of néel and brown relaxation to interpreting intracellular hyperthermia characteristics using superparamagnetic nanofluids,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 13, no. 8, pp. 5719–5725, 2013.
- [93] O. Ekici, “Thermal analysis of gold nanorods heated with femtosecond laser pulses,” 2008.
- [94] E. Glais, “Nanostructures à propriétés optiques et thermiques pour l ’ élaboration de ‘ Nanothermomètres , ’ ” 2018.
- [95] J. Dong and J. I. Zink, “Taking the temperature of the interiors of magnetically heated nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 5, pp. 5199–5207, 2014.
- [96] R. Piñol *et al.*, “Joining time-resolved thermometry and magnetic-induced heating in a single nanoparticle unveils intriguing thermal properties,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 3, pp. 3134–3142, 2015.
- [97] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, and M. Lämmerhofer, “Quantifying thiol ligand density of self-assembled monolayers on gold nanoparticles by inductively coupled plasma-mass spectrometry,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 2, pp. 1129–1136, 2013.
- [98] R. Di Corato *et al.*, “Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 24, pp. 6400–6411, 2014.
- [99] J. Lifante, B. del Rosal, I. Chaves-Coira, N. Fernández, D. Jaque, and E. Ximendes, “The near-infrared autofluorescence fingerprint of the brain,” *J. Biophotonics*, vol. 13, no. 11, pp. 1–10, 2020.
- [100] M. Suta and A. Meijerink, “A Theoretical Framework for Ratiometric Single Ion Luminescent Thermometers—Thermodynamic and Kinetic Guidelines for Optimized Performance,” *Adv. Theory Simulations*, vol. 3, no. 12, pp. 1–32, 2020.
- [101] C. Bordier, “Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l’équation de transfert radiatif vectorielle,” 2007.
- [102] C.-Y. Chang, D.-S. Ke, and J.-Y. Chen, “Essential fatty acids and human nutrition,” *Acta Neurol. Taiwan.*, vol. 18, no. 4, 2009.
- [103] E. Teston, “Nanohybrides superparamagnétiques à luminescence persistante : conception et application au marquage cellulaire pour la vectorisation magnétique in vivo,” 2016.
- [104] R. H. Riddell *et al.*, “Perspectives in Pathology Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease :,” p. 931, 1967.
- [105] D. Arifler, R. Schwarz, S. Chang, and R. Richards-Kortum, “Reflectance spectroscopy for diagnosis of epithelial precancer: model-based analysis of fiber-optic probe designs to resolve spectral information from epithelium and stroma,” *J. Appl. Opt.*, vol. 44, no. 20, pp. 4291–4305, 2005.
- [106] K. Aubertin *et al.*, “Mesoscopic characterization of prostate cancer using Raman spectroscopy: potential for diagnostics and therapeutics,” *BJU Int.*, vol. 122, no. 2, pp. 326–336, 2018.
- [107] K. Aubertin *et al.*, “Combining high wavenumber and fingerprint Raman spectroscopy for the detection of prostate cancer during radical prostatectomy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, no. 9,

Bibliographie

p. 4294, 2018.

- [108] F. Jöbsis, “Noninvasive , Infrared Monitoring of Cerebral and Myocardial Oxygen Sufficiency and Circulatory Parameters Author (s): Frans F . Jöbsis,” *Am. Assoc. Adv. Sci.*, vol. 198, no. 4323, pp. 1264–1267, 1977.
- [109] B. Ohlsson, J. Gundersen, and D. M. Nilsson, “Diaphanography: A method for evaluation of the female breast,” *World J. Surg.*, vol. 4, no. 6, pp. 701–705, 1980.
- [110] G. Ferraiolli, “Quantification of Liver Fat Content with Ultrasound,” *J. Ultrasound Med. Biol.*, vol. 47, no. 10, pp. 2803–2820, 2021.
- [111] A. Fourquet, A. Renard, A. Savignoni, A. De Rochefordière, and R. J. Salmon, “Récidives locales après traitement du cancer du sein : implications pour le suivi des patientes traitées
Patterns of local recurrences after treatment of breast cancer : implications for follow-up,” pp. 7–9, 2005.

Annexes

ANNEXE A : METHODES EXPERIMENTALES

A.I. INSTRUMENTATION	6
A.I.1. Les fours micro-ondes	6
A.I.2. La caméra hyperspectrale	7
A.I.3. Le dispositif d'hyperthermie magnétoinduite	9
A.II. TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES MATERIAUX	11
A.II.1. Microscopie Electronique en transmission	11
A.II.2. Spectromètre UV-Vis-NIR	11
A.II.3. Spectroscopie à énergie dissipative	11
A.II.4. Rendement quantique	11
A.III. ETALONNAGE, EVALUATION ET UTILISATION DES NANOTHERMOMETRES	12
A.III.1. Mesure des températures globales	12
A.III.2. Acquisition des spectres d'émission de photoluminescence	12
A.III.3. Étalonnage du nanothermomètre	12
A.III.4. Test de Répétabilité et réversibilité	13
A.IV. LA CULTURE CELLULAIRE	14
I.1. Le passage	14
I.2. Test de viabilité cellulaire	14
I.3. Le marquage des cellules réalisé dans notre étude	15

ANNEXE B : METHODES DE TRAITEMENT DES DONNEES

B.I. FILTRAGE DES DONNÉES	18
B.II. ETALONNAGE MONOVARIE EN TEMPERATURE	20
B.II.1. Construction du modèle d'étalonnage	20
B.II.2. Utilisation du modèle d'étalonnage	21
B.III. ALGORITHME DE CALCUL DE LA PROFONDEUR DU SIGNAL GRACE A LA LOI DE BEER-LAMBERT	24
B.III.1. Calcul des coefficients d'absorption de l'eau	24
B.III.2. Calcul de la profondeur apparente du signal dans l'eau	26

ANNEXE C : INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

C.I. CHAPITRE 2	28
C.I.1. Échantillons synthétisés	28
C.I.2. Calcul de la masse théorique de nanoparticules de Ag₂S obtenues par synthèse	28
C.I.3. Diffraction des rayons X	28
C.I.4. Spectres d'absorption UV-Vis	29
C.I.5. Caractérisations complémentaires pour le nanothermomètre de référence Ag₂S-11MUA-[2; 3 ; 5]	30
C.II. CHAPITRE 3	33
C.III. CHAPITRE 4	35
C.III.1. Métrologie de la mesure de température locale	35
C.III.2. Les variables de prédiction des modèles de machine learning	36
C.III.3. Calibration multivariée en température et en profondeur	38
C.III.4. Classification tissulaire par transillumination	38

ANNEXE D : POUR APPROFONDIR NOTRE COMPREHENSION DES MECANISMES DE PHOTOLUMINESCENCE

D.I. EFFET DU PH DU MILIEU SUR LES PROPRIETES OPTIQUES	44
D.II. EFFET DE L'ENVIRONNEMENT BIOLOGIQUE SUR LES MECANISMES DE PHOTOLUMINESCENCE	44

ANNEXE E : NANOTHERMOMETRIE ET HYPERTHERMIE IN VIVO

E.I. PHOTOHYPERTHERMIE <i>IN-VIVO</i>	48
E.I.1. Description de l'expérience	48
E.I.2. Résultats	48
E.II. HYPERTHERMIE MAGNETOINDUITE <i>IN VIVO</i>	51
E.II.1. Dispositif expérimental	51
E.II.2. Description de l'expérience	52
E.II.3. Résultats	53
E.III. BILAN	55

ANNEXE F : LA NANOPATEFORME $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{NANOFLEURS}}$

F.I. CONTEXTE	58
F.II. EXPÉRIENCE	58
F.II.1. Démarche expérimentale	58
F.II.2. Résultats	59

A. Méthodes expérimentales

A.I. Instrumentation

A.I.1. Les fours micro-ondes

A.I.1.a. Principe de fonctionnement

Les fours micro-ondes dédiés aux synthèses sont des systèmes fermés, résistant à la pression et permettant de travailler dans des conditions solvothermales. Un agitateur magnétique et deux capteurs de température sont intégrés à ces fours micro-ondes (figure I.A.1). La température interne du réacteur est contrôlée grâce à une sonde à fibre optique (sonde rubis). La température externe à la surface du réacteur est suivie grâce à un capteur infrarouge (figure A.I-2. droite). Les deux paramètres, température et pression, au sein du réacteur sont suivis en temps réel grâce à un logiciel intégré au four micro-ondes. Deux types de fours micro-ondes dédiés à la synthèse sont disponibles sur le marché. Les fours micro-ondes monomodes permettent de focaliser le rayonnement micro-onde au niveau de la cavité dans laquelle est inséré le réacteur (figure A.I-1 droite). Toute l'énergie apportée par le rayonnement micro-onde atteint de manière homogène l'échantillon. Cela n'est pas le cas pour les fours micro-ondes multimodes (figure A.I-1 gauche).

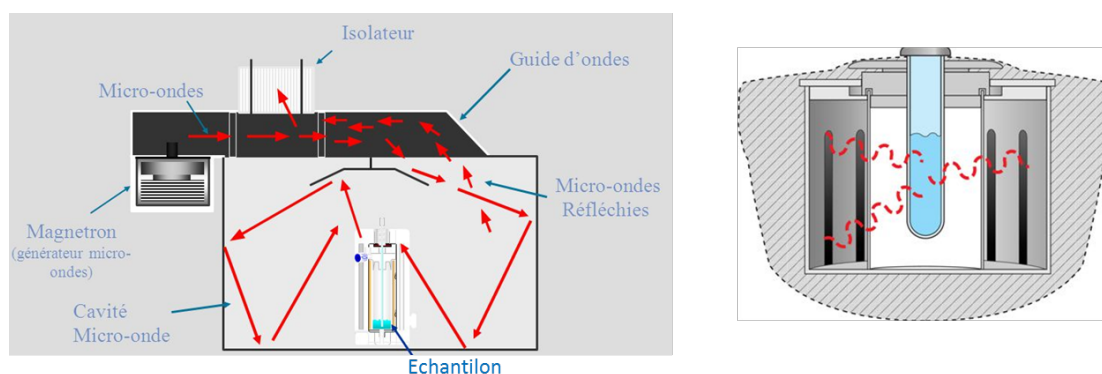


Figure A.I-1 : Répartition des ondes micro-ondes dans un four micro-ondes multimodes (à gauche) et monomode (à droite). Au sein d'un four micro-ondes monomode, toute l'énergie apportée par les micro-ondes est focalisée sur l'échantillon. En revanche, dans le cas du four à micro-ondes multimodes, seulement une partie de l'énergie disponible atteint l'échantillon.

A.I.1.b. Four micro-ondes monomode

Les échantillons étudiés dans le deuxième chapitre du manuscrit sont obtenus avec un four micro-ondes monomode (Monowave 300, Anton Paar, figure A.I-2 a et b). Une température de 100°C est atteinte au sein du réacteur (le solvant utilisé est H₂O) en moins d'une minute (figure A.I-2 c). Pour atteindre une telle performance, la puissance délivrée par le four est de 300 W. L'ordre de grandeur de la pression au sein du réacteur pendant le palier en température à 100°C est de 10 bars (le seuil de sécurité fixé par le constructeur est de 30 bars). À la fin du palier en température (5 min à 100°C), le refroidissement du réacteur est assuré grâce à un flux d'air comprimé. Cela permet une diminution rapide de la température (50°C en 4 min) du milieu réactionnel (figure A.I-2 c).

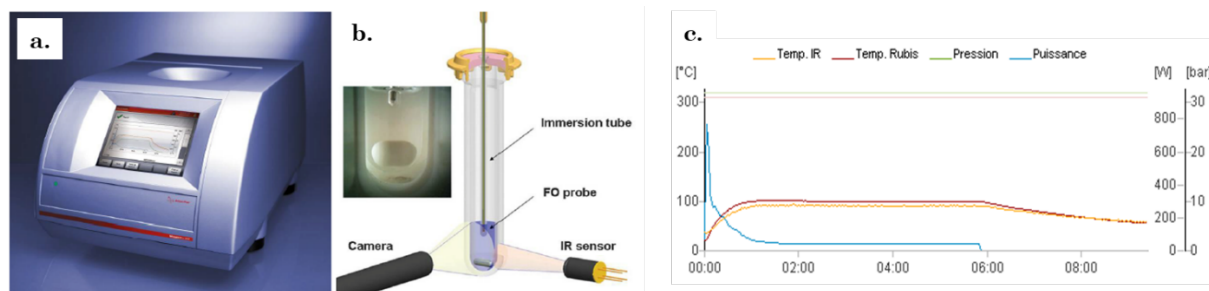


Figure A.I-2 : a) Four micro-onde monomode Anton Paar Monowave 300. b) Image d'un réacteur avec contrôles de température externe (capteur infrarouge) et interne (sonde de température plongeante rubis)¹. c) Profils de puissance (courbe bleue), de pression (courbe verte) et de température mesurée par capteur externe (Temp IR, courbe jaune) et sonde interne (Temp Rubis, courbe rouge), obtenus dans le cadre de la synthèse d'Ag₂S développée dans ce travail de thèse (annexe A.I.1), pour un milieu réactionnel de 16 mL (le solvant est H₂O), chauffé à 100°C.

A.I.1.c. Four micro-ondes multimodes

Dans ce projet de thèse, des essais de synthèse ont également été effectués grâce à un four micro-ondes multimodes (Synthos 3000, Anton Paar, figure A.I-3 a). Ce four permet des synthèses à plus grande échelle que le micro-ondes monomode. Il possède huit réacteurs pouvant contenir 40 mL de milieu réactionnel (figure A.I-3 b). Grâce à ce four micro-ondes, nous avons la possibilité de multiplier par 20 le volume de production par programme de chauffe. En effet, lorsque nous travaillons avec le four micro-ondes monomode, le volume de production est de 16,7 mL. Nous réalisons trois programmes de chauffe pour traiter la totalité du volume (50 mL) du batch de synthèse. Grâce au four à micro-ondes multimode, nous pouvons passer à un volume de production de 320 mL (8 réacteurs de 40 ml).



Figure A.I-3 : a) Four à micro-onde multimode Synthos 3000 et b) un des huit réacteurs²

A.I.2. La caméra hyperspectrale

A.I.2.a. Description du dispositif optique

La caméra hyperspectrale que nous utilisons (PyLoN-IR, Princeton) pour détecter le signal de photoluminescence des Ag₂S est munie d'un capteur InGaAs (figure A.I-3 a). Elle permet de détecter le signal de sondes photoluminescentes émettant entre 1000 nm et 1400 nm. Les photons émis par le sulfure d'argent sont collectés par une fibre optique équipée d'un filtre passe-haut 1000 nm. Les photons sont ensuite envoyés vers un monochromateur. Le réglage monochromateur – caméra hyperspectrale a un impact sur la forme du signal détecté comme illustré sur la figure A.I-3 b qui montre la superposition de plusieurs enregistrements du même échantillon lors de différentes sessions

¹ www.anton-paar.com

d'acquisition. L'étape de montage de la caméra hyperspectrale sur le monochromateur a donc une grande importance vis-à-vis de la robustesse des mesures de température. Dans les travaux référencés dans le document principal, une calibration du nanothermomètre a été réalisée au début de chaque session expérimentale, c'est-à-dire à chaque fois que la caméra était montée sur le monochromateur.

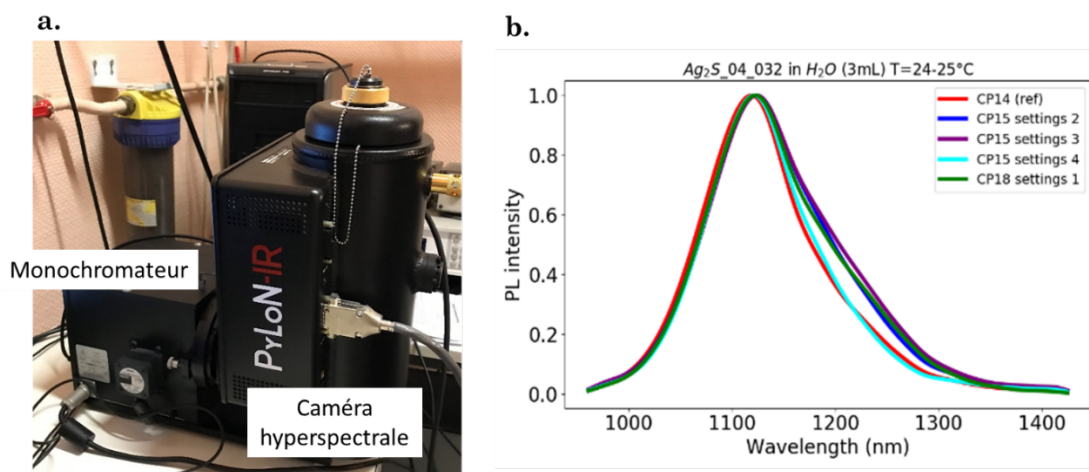


Figure A.I-4 : (a) La caméra hyperspectrale est montée sur un monochromateur. (b) Le réglage caméra hyperspectrale – monochromateur a un impact important sur la forme spectrale du signal détecté et constitue donc une étape importante vis-à-vis de la robustesse des mesures de températures.

A.I.2.b. Le principe du monochromateur

Un faisceau lumineux polychromatique issu de la source (A) (dans notre étude il s'agit du signal émis par les nanoparticules d'Ag₂S entre 1000 nm et 1300 nm) traverse une fente d'entrée (B) (figure A.I-4). A ce stade, la quantité d'énergie lumineuse disponible dépend de l'énergie du faisceau issu de la source lumineuse (Ag₂S) traversant la fente et de la largeur de la fente. Dans notre dispositif expérimental, la largeur de la fente d'entrée (B) est de 2 mm pour maximiser l'énergie lumineuse disponible. La fente est située au point focal d'un miroir incurvé (C). Les rayons réfléchis par le miroir (C) sont parallèles. Le faisceau parallèle polychromatique est ensuite diffracté par le réseau de diffraction (D). C'est un dispositif optique composé d'une série de fentes parallèles, espacées de manière régulière. Cet espacement est appelé le « pas » du réseau. L'angle de diffraction de chaque composante monochromatique du faisceau polychromatique incident dépend de sa longueur d'onde. Le faisceau polychromatique incident est donc décomposé en faisceaux monochromatiques par le réseau. Les faisceaux monochromatiques sont ensuite collectés par un miroir (E) qui les focalise sur la fente de sortie (F) (figure A.I-4). Chaque faisceau monochromatique est focalisé en un point spécifique de la fente de sortie (F). La fente de sortie est connectée à la caméra hyperspectrale (PyLoN-IR, Princeton) (figure A.I-3).

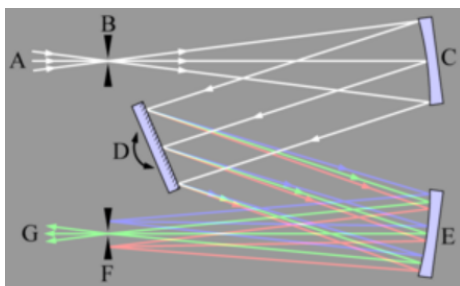


Figure A.I-4 : Principe du monochromateur (de type Czerny-Turner).

A.I.2.c. Le principe du détecteur

Plusieurs matériaux peuvent être utilisés pour détecter les photons issus de sources lumineuses, mais leur sensibilité dépend de la longueur d'onde. Le matériau le plus sensible pour détecter des photons dans la deuxième fenêtre de transparence des tissus biologiques (1000 nm – 1350 nm) est l'arséniure de gallium et d'indium (InGaAs) (figure A.I-5). C'est ce type de détecteur présent dans la caméra hyperspectrale que nous utilisons dans nos expériences (PyLoN-IR, Princeton). Grâce au monochromateur, le faisceau lumineux émis par les Ag₂S est décomposé en 1024 composantes monochromatiques de longueurs d'onde comprises entre 960 nm et 1400 nm. Dans notre cas, les composantes « monochromatiques » correspondent à des fenêtres d'intégration des photons de 0,43 nm de largeur. La fente de sortie du monochromateur est fixée à l'entrée de la caméra hyperspectrale (PyLoN-IR, Princeton) (figure A.I-4 a). Le détecteur InGaAs est une photodiode, permettant de convertir un signal lumineux en courant. Pour chaque plage de longueur d'onde de 0,43 nm de largeur, les photons sont absorbés par le photodétecteur InGaAs. La mesure du courant induit par l'absorption des photons permet de remonter au nombre de photons détectés pour une plage de longueur d'onde donnée. Le monochromateur couplé au photodétecteur InGaAs permet donc d'obtenir le spectre d'émission de photoluminescence du sulfure d'argent avec une résolution spectrale de 0,43 nm (figure A.I-4 b). Le courant circulant dans le détecteur InGaAs est bruité. La nature du bruit est thermique et est lié à la mobilité des porteurs de charge dans la structure du photodétecteur [112]. Pour limiter cette mobilité, le détecteur est refroidi à la température de -100°C, par ajout d'azote liquide dans un réservoir intégré au dispositif de la caméra hyperspectrale.

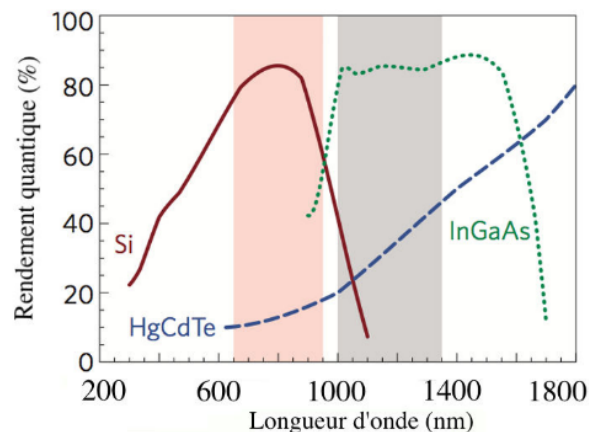


Figure A.I-5 : Les gammes de sensibilité de différents matériaux utilisés comme détecteurs de rayonnement allant de l'UV à l'infrarouge. La bande rose correspond à la première fenêtre de transparence des tissus biologiques et la bande bleue à la seconde. L'arséniure de gallium et d'indium (InGaAs) présente une meilleure sensibilité dans la deuxième fenêtre de transparence des tissus biologiques que le silicium (Si) ou le tellurure de mercure-cadmium (HgCdTe) [113].

A.I.3. Le dispositif d'hyperthermie magnétoinduite

Pour mener nos expériences d'hyperthermie magnétoinduite, nous utilisons le dispositif magneTherm développé par la société nanoTherics pour les essais précliniques (figure A.I-6). Nous l'avons adapté pour nos expériences de nanothermométrie (figure A.I-7). Nous pouvons changer l'amplitude et la fréquence du champ magnétique en changeant la bobine et la capacité dans le circuit RLC du montage électrique. Un générateur de tension permet de régler le courant et la tension circulant dans le circuit. Pour chaque couple bobine-capacité, des indications du courant et du voltage maximal sont données. La fréquence de résonance (fréquence maximale) du circuit RLC (pour un couple bobine-capacité donné) est repérée grâce à un oscilloscope. La fréquence du courant (périodique sinusoïdal) circulant dans le circuit est ajustée grâce à un générateur de hautes fréquences.

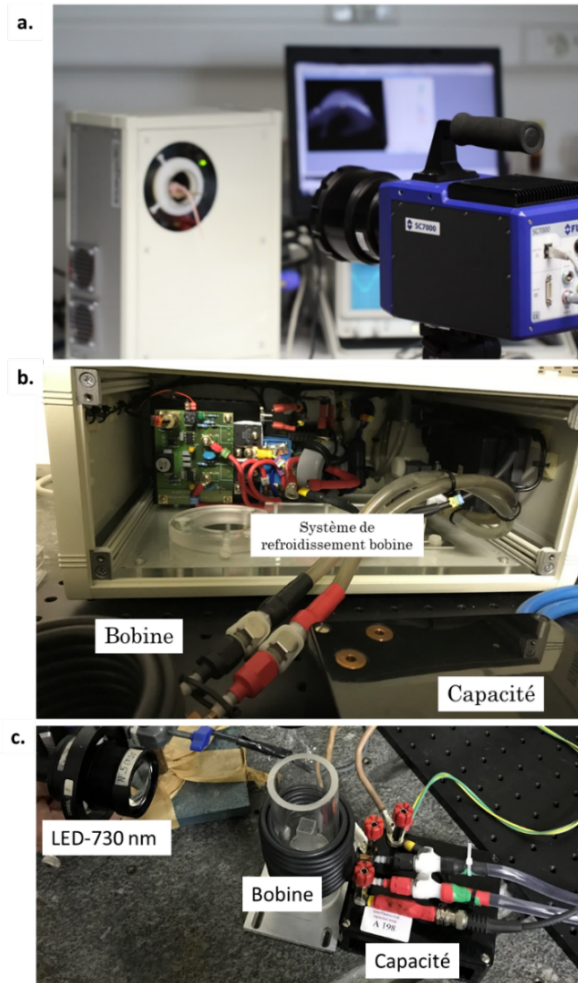


Figure A.I-6 : Dispositif d'hyperthermie magnétoinduite (magneTherm) commercialisé par la société nanoTherics

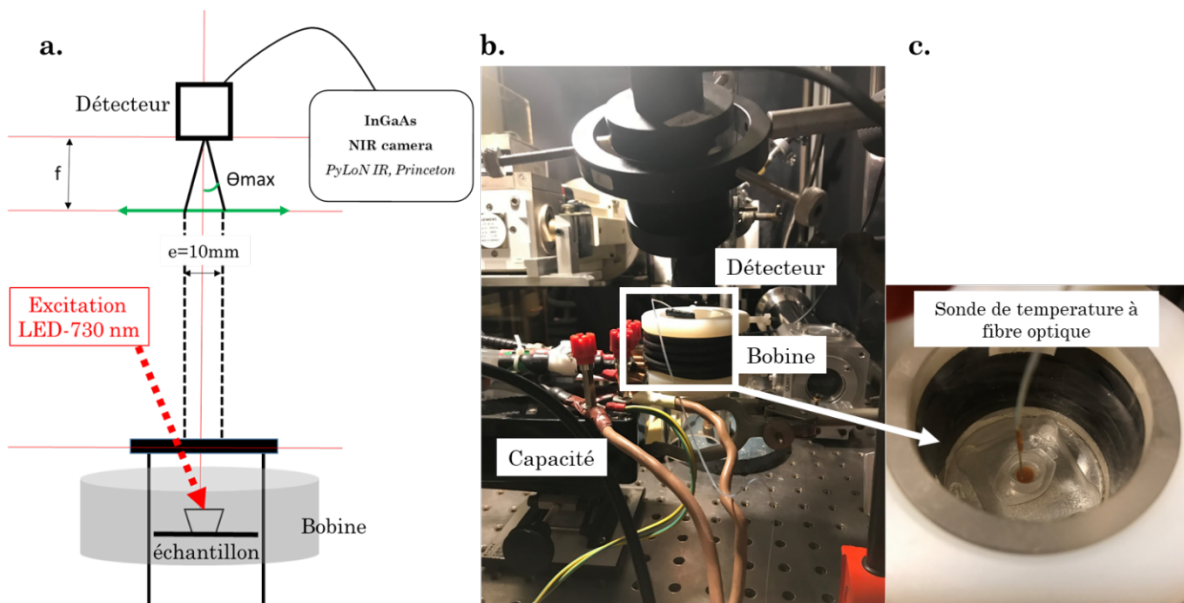


Figure A.I-7 : Dispositif d'hyperthermie magnétoinduite développé par la société nanoTherics adapté pour nos expériences.

A.II. Techniques de caractérisation des matériaux

A.II.1. Microscopie Electronique en transmission

Les échantillons sont préparés par dépôt d'une goutte de suspension aqueuse du composé à caractériser sur une grille de cuivre recouverte d'une fine couche de carbone. L'analyse de la morphologie des nanoparticules est ensuite réalisée par observation de l'échantillon en microscopie électronique en transmission (MET) (Tecnai G2 Spirit Twin) avec une tension d'accélération de 120 kV. Une analyse statique est effectuée sur les mesures de l'axe court et de l'axe long pour tous les composés étudiés. Le traitement des clichés MET est réalisé grâce au logiciel open source Image J.

A.II.2. Spectromètre UV-Vis-NIR

Les spectres d'absorption sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre UV-Vis-NIR CARY 5000 du fabricant Agilent Technologies, opérant entre 200 nm et 1400 nm.

A.II.3. Spectroscopie à énergie dissipative

L'analyse de la composition chimique des nanoparticules est réalisée grâce à une sonde de spectroscopie à énergie dissipative (EDX Oxford Instruments – X-max) couplée au microscope électronique à balayage (MEB-EDX Hitachi S-3400N). Le dosage des éléments argent, soufre et oxygène est effectué pour chaque composé.

A.II.4. Rendement quantique

Deux méthodes expérimentales existent pour mesurer le rendement quantique [65]. La première est relative à un échantillon référence, la seconde est absolue. La mesure relative de rendement quantique est basée sur la comparaison du spectre d'émission de l'échantillon étudié avec celui d'un échantillon référence (dont le rendement quantique est connu). Les deux spectres d'émission sont obtenus dans les mêmes conditions expérimentales grâce à un détecteur conventionnel de photoluminescence. Ce dernier ne détecte pas tous les photons émis par les échantillons. La fraction de photons détectés dépend de la taille de l'ouverture numérique d'excitation, de l'angle solide de détection et des propriétés optiques des échantillons (coefficients d'absorption et de diffusion). Ainsi, afin d'effectuer une mesure relative de rendement quantique fiable, les coefficients d'absorption de l'échantillon étudié et de l'échantillon référence doivent être proches et connus précisément à la longueur d'onde d'excitation.

Dans le cadre de la mesure absolue de rendement quantique, une sphère intégrante est utilisée. Ce dispositif expérimental permet la détection des photons émis par un échantillon dans toutes les directions de l'espace. Il permet de comparer directement, pour l'échantillon étudié, le nombre de photons émis au nombre de photons absorbés, sans avoir besoin d'échantillon référence. Les mesures de rendement quantique présentées dans le premier chapitre du document principal sont des mesures absolues de rendement quantique. Elles ont été effectuées à l'institut des matériaux de l'Université de Aveiro au Portugal par **Carlos Brites** et **Miguel Hernandez** appartenant à l'équipe du Professeur **Luís Carlos**. Le rendement quantique d'émission absolu a été mesuré à 808 nm et à température ambiante grâce à un spectromètre (Quantaury-QY Plus UV/NIR) et une sphère intégrante (C13534-31, Hamamatsu). Le détecteur VIS-NIR (InGaAs) opère dans la fenêtre 900 nm – 1650 nm. Les valeurs de rendement quantique d'émission ont été obtenues en intégrant l'émission entre 948 nm et 1451 nm. Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. La source d'excitation utilisée est un laser 808 nm. La valeur rapportée dans notre étude est la moyenne des trois mesures. La précision de la mesure est de 10%.

A.III. Étalonnage, évaluation et utilisation des nanothermomètres

A.III.1. Mesure des températures globales

Un capteur de température à fibre optique (OTG-MPK5 d'Opsens Solutions) est utilisé pour effectuer les mesures des températures globales en temps réel pendant nos expériences de nanothermométrie. La technologie de l'instrument est basée sur la dépendance de la largeur du bandgap du cristal semi-conducteur d'arséniure de gallium (GaAs) à la température. Le cristal semi-conducteur est localisé au bout de la fibre optique pour la prise de mesure par contact avec le milieu d'étude. La sonde de température permet de réaliser des mesures de température fiables et reproductibles dans la gamme de température 0-150°C sous champ magnétique. Elle est connectée à un conditionneur de signal pour suivre et enregistrer les données de température sur un ordinateur. Une mesure de température est effectuée toutes les 0,02 secondes.

A.III.2. Acquisition des spectres d'émission de photoluminescence

L'acquisition des spectres de photoluminescence se fait grâce à une caméra hyperspectrale opérant entre 1000 nm et 1400 nm (PyLoN-IR, Princeton) couplée à un monochromateur. Tous les spectres de photoluminescence sont acquis à 25°C pour un volume de suspension aqueuse de 0,7 mL. La température de l'échantillon est contrôlée à l'aide d'un support de cuve chauffant (Quantum Northwest). Une LED-730 nm est utilisée comme source d'excitation (figure A.III-1). Pour éviter la détection des photons parasites provenant de la LED à 730 nm et maximiser le rapport signal/bruit, la direction d'excitation de l'échantillon est orthogonale à la direction de détection des photons émis par les Ag₂S. Un filtre passe-haut 1000 nm est utilisé dans le montage à l'entrée de la fibre optique pour s'affranchir de la détection de signaux parasites.

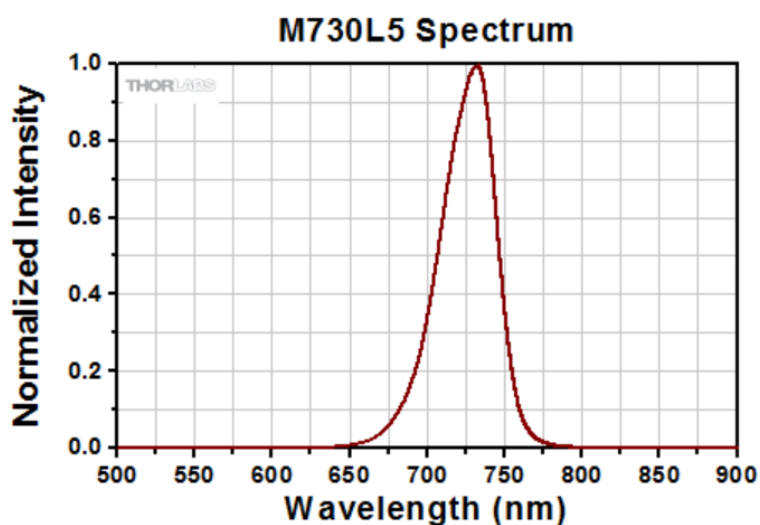


Figure A.III-1 : Spectre d'émission de la source d'excitation optique utilisée dans ce travail de thèse. Il s'agit d'une LED émettant à 730 nm du fabricant ThorLabs.

A.III.3. Étalonnage du nanothermomètre

Pour réaliser la calibration du nanothermomètre (figure A.III-2), une cuvette optique contenant 0,7 mL de suspension du nanothermomètre étudié, à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹, est placée dans le support de cuve chauffant (Quantum Northwest). L'échantillon est illuminé grâce à une LED-730 nm (1 mW.cm⁻²). La détection du signal de photoluminescence se fait grâce à une fibre optique placée avec un angle de 90° par rapport à la direction d'illumination de l'échantillon. Un filtre passe-haut 1000 nm est utilisé à l'entrée de la fibre optique pour s'affranchir de la détection de signaux parasites. La température initiale (contrôlée grâce au support de cuve chauffant) de la suspension est de 25°C. À

partir de cet état initial, une rampe de montée en température de $0,7^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ est imposée à l'échantillon grâce au support de cuve chauffant (Quantum Northwest). La vitesse de montée en température est suffisamment lente pour que la chaleur ait le temps de diffuser par convection dans le volume de la suspension (0,7 mL). Une mesure de température globale est réalisée, grâce à la sonde de température à fibre optique (OTG-MPK5 d'Opsens Solutions), toutes les 0,02 secondes. Un spectre de photoluminescence est enregistré toutes les 10 secondes. Pour chaque spectre de photoluminescence enregistré, un paramètre de photoluminescence est calculé. Le paramètre de photoluminescence considéré est ensuite tracé en fonction de la température globale mesurée par la sonde de température à fibre optique. La correspondance entre la température globale et le paramètre de photoluminescence se fait grâce à leur temps de prise de mesure. En pratique, le paramètre de photoluminescence sélectionné est le rapport d'intensité p_1 . La dépendance du rapport d'intensité p_1 à la température est modélisée par une fonction affine. Ce modèle d'étalonnage nous permet, dans la phase d'utilisation du nanothermomètre, de remonter à la température de cœur des nanothermomètres à partir du rapport d'intensité p_1 extrait du spectre d'émission de photoluminescence.

$$p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

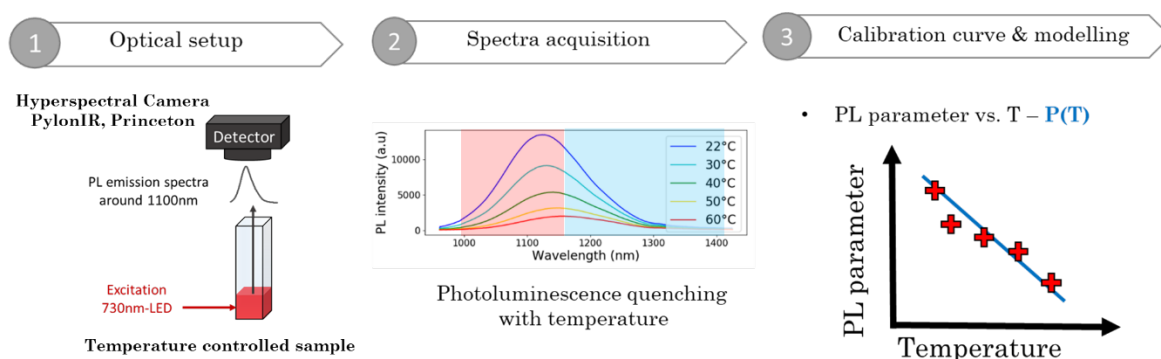


Figure A.III-2 : Procédure de calibration d'un nanothermomètre.

A.III.4. Test de Répétabilité et réversibilité

Pour effectuer les tests de répétabilité et de réversibilité, le protocole expérimental de la calibration est répété plusieurs fois au cours de cycles de montée et descente en température. Une cuvette optique contenant 0,7 mL de suspension du nanothermomètre étudié (à une concentration maximale de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) est placée dans le support de cuve chauffant (Quantum Northwest). La température de la suspension augmente de 38°C à 58°C en 57 min avec une rampe de $0,7^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La mesure de température globale de la suspension est réalisée grâce à la sonde de température à fibre optique (OTG-MPK5 d'Opsens Solutions). Un spectre de photoluminescence est enregistré toutes les 10 secondes. La même rampe de température ($0,7^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) est ensuite directement imposée au système pour une redescende en température de 58°C à 38°C . Un spectre de photoluminescence est également enregistré toutes les 10 secondes et le suivi en température globale de la suspension est réalisé de manière simultanée grâce à la sonde de température à fibre optique. Pour chaque spectre de photoluminescence enregistré, un paramètre de photoluminescence (par exemple le rapport d'intensité p_1) est calculé. Le paramètre de photoluminescence considéré est ensuite tracé en fonction de la température globale mesurée par la sonde de température à fibre optique. La correspondance entre la température globale et le paramètre de photoluminescence se fait grâce à leur temps de prise de mesure. Au cours des cycles, plus les valeurs du paramètre de photoluminescence sont proches plus le caractère réversible-répétable du nanothermomètre est satisfaisant.

A.IV. La culture cellulaire

I.1. Le passage

I.1.a. Définition

En culture cellulaire, le **passage (ou amplification)** est le procédé permettant d'amplifier le nombre des cellules qui se divisent à partir de cellules pré existantes qui recouvrent toute la surface de la flasque de culture. Les conditions de culture (type de milieu de culture, % de sérum, antibiotique) peuvent dépendre du type cellulaire. Néanmoins l'étape de croissance cellulaire (division) a lieu dans tous les cas dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂.

Dans notre étude, nous utilisons une lignée cellulaire de fibroblastes cultivée dans un milieu DMEM GlutaMAX™ (Gibco ref: 12077549) dans lequel a été ajouté 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% de streptomycine/pénicilline (Gibco™ ref: 15140122). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans 5% de CO₂.

I.1.b. Protocole expérimental pour la culture cellulaire

Le protocole de passage des cellules donné ici s'applique à des cellules adhérentes en tapis sur des flasques de culture.

1. Aspirer le milieu de culture cellulaire
2. Laver le tapis cellulaire avec 10 mL (pour une flasque de 75 cm²) de PBS 1X. Il faut veiller à ne pas abimer le tapis cellulaire lors de l'ajout du PBS dans la flasque ou les puits. Le PBS est utilisé afin de retirer les cellules mortes et enlever toutes traces de protéases contenues dans le milieu cellulaire complet. Les protéases inhibent l'action de la trypsine.
3. Ajouter 4mL (pour une flasque de 75 cm²) de trypsine (Fisher ref : 11580626). La trypsine est utilisée pour détacher les cellules du fond de la flasque. Bien répartir sur la surface de la flasque et homogénéiser. Incuber à 37°C quelques minutes jusqu'à détachement du tapis cellulaire (la température d'action de la trypsine est de 37°C).
4. La dilution des cellules tient compte des surfaces du contenant de départ et d'arrivée. La flasque T75 (75cm²) sort de l'étuve avec 4mL de trypsine. C'est-à-dire que toutes les cellules tapissant une surface de 75 cm² sont concentrées dans un volume de 4 ml. Pour initier une nouvelle sous-culture cellulaire (avec un facteur de dilution de 1/20) prélever 200 µL et transférer ce volume dans une nouvelle flasque T75. On rajoute un grand volume de milieu de culture complet pour inhiber l'effet de la trypsine et permettre l'adhésion des cellules sur la flasque. Les cellules en densité réduite vont pouvoir à nouveau se diviser jusqu'à recouvrir toute la surface de la flasque. On réalise alors un nouveau passage.

I.2. Test de viabilité cellulaire

I.2.a. Le principe du test AlamarBlue

Le test Alamar blue (Fisher scientific, ref 10161053) est un test qui mesure l'activité métabolique mitochondriale des cellules. Le composé chimique principal de l'Alamar blue est la résazurine qui sous sa forme oxydée est de couleur bleue non fluorescente. Si un traitement n'est pas toxique alors l'activité mitochondriale de la cellule restera la même et la résazurine sera réduite chimiquement par les mitochondries en résorufin de couleur rose et fluorescente (Ex 530-560nm Em 590 nm). Cependant, lors d'un traitement induisant de la toxicité cellulaire, l'activité mitochondriale de la cellule sera diminuée et la résazurine restera bleue. On mesure la fluorescence de la résazurine pour quantifier l'activité mitochondriale des cellules. Afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire, des contrôles sont ajoutés à l'expérience. Le contrôle positif est constitué de cellules n'ayant reçu aucun traitement en considérant que ces cellules sont à 100% de viabilité. Le contrôle négatif est constitué de cellules traitées au triton 0.3% durant 30 minutes afin d'induire une mortalité cellulaire de

Méthodes expérimentales

100%. Le calcul ci-dessous est ensuite appliqué afin de déterminer le pourcentage de viabilité. Ce test permet donc de suivre la viabilité cellulaire par la mesure de l'activité métabolique des mitochondries.

% Viabilité cellulaire = (fluorescence échantillon - fluorescence contrôle négatif) / (fluorescence contrôle positif - fluorescence contrôle négatif) * 100.

I.2.b. Protocole expérimental

1. Diluer l'Alamar Blue (AB) avec du DMEM blanc (sans Redphenol) pour ne pas biaiser l'expérience (basée sur une intensité de fluorescence). **Facteur de dilution 1/10.**
2. Aspirer le milieu de culture cellulaire pour chaque puit de la plaque 24 puits
3. Placer 250 μL de solution diluée d'AB dans chaque puit cultivé
4. Incuber la plaque à 37°C dans l'obscurité jusqu'à ce que l'AB des puits contrôle positif (cellules non traitées) deviennent rose.
5. Lire la fluorescence (Excitation : 530-560nm et Émission : 590 nm).

I.3. Le marquage des cellules réalisé dans notre étude

Le marquage des cellules a été réalisé en collaboration par **Sonia Becharef** (MSC Med).

Le premier jour (à J1), les cellules ont été exposées aux nanoparticules d'Ag₂S ou de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Les conditions sont données dans le **tableau A.IV-1**. L'incubation à 37°C et 5% CO₂ des cellules avec les nanoparticules dure 24h. Le lendemain (à J2), les cellules sont fixées. Pour cela le milieu de culture cellulaire a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X puis détachées de la flasque à l'aide de trypsine afin de les remettre en suspension dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml. Après une étape de centrifugation à 300g, 5 minutes, les cellules sont resuspendues dans du paraformaldéhyde 4% puis incubées 1h à température ambiante. Trois lavages au PBS 1X ont été effectués avant de resuspendre les culots cellulaires dans PBS 1X.

A J2, pour obtenir l'échantillon **Ag₂S IN + $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ OUT**, nous avons ajouté 1,9 μL d'une suspension aqueuse de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ à 42 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$ (soit 80 μg de fer) au culot cellulaire de cellules incubées avec les nanoparticules de Ag₂S.

Tableau A.IV-1 : Conditions d'incubation des cellules avec les nanoparticules à J1.

Échantillon	[cellules]	Ag ₂ S			$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$			RPMI complet	Viabilité à 5h
		μL	$\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$	μg	μL	$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	μg		
Ctrl	2,65	x	x	x	x	x	x	7	96
Ag ₂ S IN	2,89	35	5	175	x	x	x	6,96	93
Fe ₂ O ₃ IN	2,62	x	x	x	250	42	??	6,75	97
Ag ₂ S IN + Fe ₂ O ₃ OUT	2,39	35	5	175	x	x	x	6,96	99

B. Méthodes de traitement des données

B.I. Filtrage des données

Les spectres enregistrés avec la caméra hyperspectrale (PyLoN-IR, Princeton) sont bruités (spectre vert, figure B.I.1). La nature du bruit est thermique et résulte de la mobilité des porteurs de charges au sein du photodétecteur InGaAs. Les spectres d'émission de photoluminescence apparaissant dans le document principal sont des données nettoyées grâce à un filtre. Le bruit thermique a une fréquence (spatiale) plus élevée que le signal d'intérêt, il peut être supprimé grâce à un filtre passe-bas (spectre rouge, figure B.I.1).

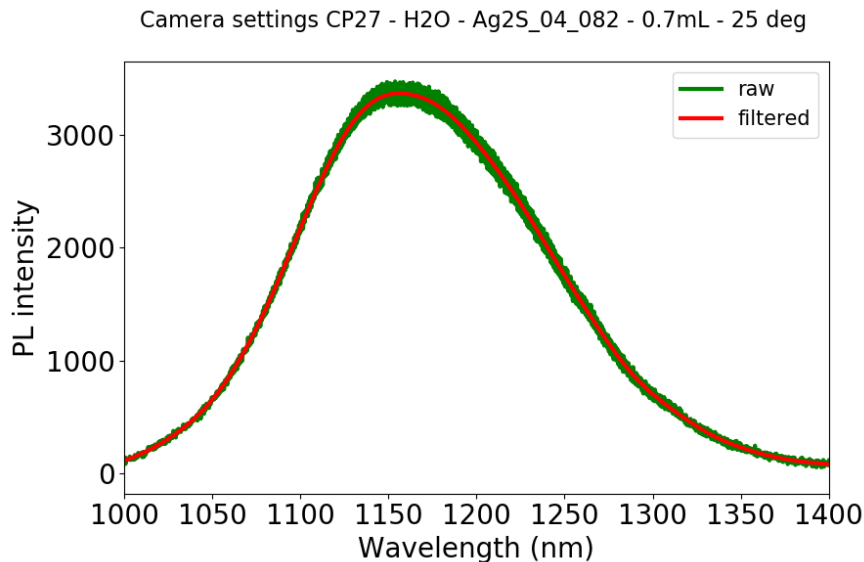


Figure B.I-1 : Visualisation d'un spectre bruité (bruit thermique lié au photodétecteur InGaAs) (spectre vert) et d'un spectre débruité grâce au filtre passe-bas (spectre rouge).

L'algorithme du filtre utilisé est disponible en open source :

```
def low_pass_filter(data_path):
    ### Nous importons les données à filtrer

    os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
    files2=os.listdir(data_path)
    os.chdir(data_path)

    data=np.genfromtxt(files2[0], delimiter=',')
    X=len(data[:,0])
    Y=len(files2)

    WL=data[:,0]
    M=np.zeros((Y,X))

    for i in range (Y):
        data=np.genfromtxt(files2[i], delimiter=',')
        M[i,:]=data[:,2]

    ### Le filtre passe-bas

    fc = 0.01 # Cutoff frequency as a fraction of the sampling rate (in (0,
0.5)).
    b = 0.08 # 0Transition band, as a fraction of the sampling rate (in (0,
0.5)).
    N=len(WL)/4
```

Méthodes de traitement des données

```
# Make sure that N is odd
if not N % 2: N += 1
n = np.arange(N)

# Compute sinc filter
h = np.sinc(2 * fc * (n - (N - 1) / 2))

# Compute Blackman window
w = 0.42 - 0.5 * np.cos(2 * np.pi * n / (N - 1)) + \
    0.08 * np.cos(4 * np.pi * n / (N - 1))

# Multiply sinc filter by window
h = h * w

# Normalize to get unity gain
h = h / np.sum(h)

# apply filter to raw datas
XN=X+len(n)-1
s=np.zeros((Y,XN))
p=np.zeros((Y,X))
s1=[]
g=len(s[0])-1

for j in range (len(M)):
    s[j] = np.convolve(M[j], h)

for j in range (len(s)):
    for i in range (128,len(p[0])+128):
        p[j,i-128]=s[j,i]

return WL, p
```

B.II. Étalonnage monovarié en température

B.II.1. Construction du modèle d'étalonnage

Ce programme est utilisé pour traiter les données acquises après avoir mis en œuvre le protocole expérimental d'étalonnage du nanothermomètre décrit dans l'annexe A, partie A.III.3. Il permet d'obtenir les modèles donnés figure B.II-1.

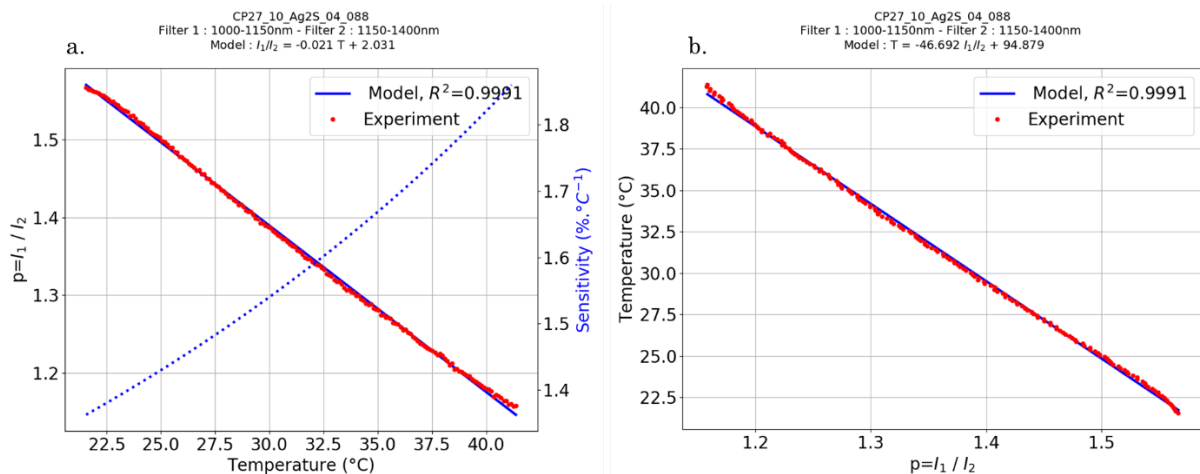


Figure B.II-1 : (a) Modèle $p_1(T)$ d'étalonnage du nanothermomètre de référence obtenu pour des températures comprises entre 22°C et 43°C. Le modèle $p_1(T)$ permet de calculer la sensibilité relative du nanothermomètre (pointillés bleus). (b) En pratique nous utilisons le modèle $T(p_1)$ pour obtenir les données de température à partir du rapport d'intensité p_1 . Les codes permettant d'obtenir les modèles $p_1(T)$, $T(p_1)$ et de calculer la sensibilité thermique relative sont donnés ci-dessous.

```
### Nous importons les spectres de photoluminescence enregistrés avec la caméra hyperspectrale
```

```
os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
w=r'..\files\CP27\CP27_10_calib'
```

```
O=fbp_1150(w) # cette fonction permet d'obtenir, pour chaque spectre enregistré à une température cible, le temps d'acquisition (en minute) grâce à son index en sachant que 1 spectre est enregistré toutes les 10 secondes (première colonne O[0]) et le rapport d'intensité  $p_1$  (deuxième colonne O[1]).
```

```
time_min=O[0] # La première colonne de la matrice O correspond aux temps d'enregistrement de chaque spectre de photoluminescence
```

```
L=len(O[0]) # Nous notons L la longueur de la première colonne. L correspond donc au nombre de spectres de photoluminescence enregistrés.
```

```
### Nous importons les données en températures globales mesurées grâce à la sonde à fibre optique
```

```
os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
d=r'..\temperature_vs_frame\ramping\CP27_calib'
```

```
files=os.listdir(d)
os.chdir(d)
```

```
Temp=np.genfromtxt(files[1], delimiter=',')
L1=len(Temp)
```

```

%% Nous construisons le modèle de variation de la température de la suspension en fonction du temps

T=np.polyfit(Temp[:,0],Temp[:,1],1)
xfit_time_min=np.linspace(Temp[0][0],Temp[L1-1][0],L1)
yfit_temp_calc=np.polyval(T,xfit_time_min)
rs_T=r_square(Temp[:,1],yfit_temp_calc)

Ta=T[0]
Tb=T[1]
print (T)

%% Nous générons les données en température correspond au temps d'enregistrement des spectres de photoluminescence

temp_manip=[]
for i in range (L):
    temp_manip.append(Ta*time_min[i]+Tb)

%% Nous construisons le modèle d'étalonnage  $p_1(T)$ 

p=np.polyfit(temp_manip,O[1],1) # pour obtenir le  $T(p_1)$ , il suffit de poser
p=np.polyfit(O[1],temp_manip,1)

p1=p[0]
p2=p[1]

%% Calcul de la sensibilité thermique relative  $S_r(T)$ 

xfit=np.linspace(temp_manip[0],temp_manip[L-1],100)
yfit=np.polyval(p,xfit)
dydx=np.diff(yfit)/np.diff(xfit)

k=1
S=[]
X=[]
for k in range (len(dydx)):
    X.append(xfit[k])
    S.append(abs(100*dydx[k]/yfit[k]))

```

B.II.2. Utilisation du modèle d'étalonnage

```

%% Choix du dossier à traiter

d=r'..\files\CP27\CP27_08_01a'

%% Mise en forme des données brutes de photoluminescence : génération d'une matrice de taille (Y,X)

os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
files=os.listdir(d)
os.chdir(d)

data=np.genfromtxt(files[0], delimiter=',')
X=len(data[:,0])
Y=len(files)

K=np.zeros((Y,X)) # initialisation de la matrice

```



```

M=np.zeros((Y,X))
for i in range (Y):
    data=np.genfromtxt(files[i], delimiter=',') # importation des données
    K[i,:]=data[:,2]

### Traitement pour tracer les spectres

WL=low_pass_filter(d)[0] # Application d'un filtre passe-bas
D=low_pass_filter(d)[1]

datanorm=np.zeros((Y,X)) # Normalisation par rapport au maximum de chaque spectre
for i in range (Y):
    datanorm[i]=D[i]/max(D[i])

### Rapport p1

# Sélection des deux fenêtres de longueur d'onde correspondant aux deux filtres
considérés

i=0
k=0
Filtre1=[]
Filtre2=[]
index=[]
indexG=[]

for i in range (X):
    if WL[i]>=1000 and WL[i]<=1150:
        Filtre1.append(WL[i])
        index.append(i)

for k in range (X):
    if WL[k]>1150 and WL[k]<=1400:
        Filtre2.append(WL[k])
        indexG.append(k)

# Sélection des intensités de PL correspondant aux deux fenêtres de longueur
d'onde

i=0
k=0
z=len(Filtre1)
y=len(Filtre2)
I1=index[0] #premier indice
F1=index[-1] #dernier indice
I2=indexG[0] #premier indice
F2=indexG[-1] #dernier indice

P=np.zeros((Y,z))
G=np.zeros((Y,y))
for i in range (Y):
    for j in range (I1,F1+1):
        P[i][j-I1]=K[i][j]

For k in range (Y):
    for j in range (I2,F2+1):
        G[k][j-I2]=K[k][j]

# Intégration

intP=[]
intG=[]
res=[]
index=[]
time_min=[]
for i in range (Y):
    intP.append(scipy.integrate.trapz(P[i], Filtre1))
    intG.append(scipy.integrate.trapz(G[i], Filtre2))

```

```
res.append(intP[i]/intG[i])

## Température obtenues grâce au modèle d'étalonnage sur  $p_1$  (voir partie B.III.1)
en fonction du temps en minutes

# Un spectre est enregistré toutes les 10 secondes

for i in range (Y):
    time_min.append(i*10/60

# Nous utilisons le modèle de calibration obtenu dans la partie B.III.1, voir
figure B.III-1.b

temp_calc=[]
for j in range (Y):
    temp_calc.append(-46.69*res[j]+ 94.87)
```

B.III. Algorithme de calcul de la profondeur du signal grâce à la loi de Beer-Lambert

B.III.1. Calcul des coefficients d'absorption de l'eau

```
### Chemins d'accès aux spectres d'émission de photoluminescence dans H2O et dans D2O pour plusieurs profondeurs de signal

d=r'..\files\Ag2S_04_015_D2O_2'
d1=r'..\files\Ag2S_04_015_H2O_2'

### Importation des données enregistrées dans D2O

os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
files=os.listdir(d)
os.chdir(d)
data=np.genfromtxt(files[0], delimiter=',')
WL=data[:,0]
X=len(data[:,0])
Y=len(files)

M=np.zeros((Y,X))

for i in range (Y):
    data=np.genfromtxt(files[i], delimiter=',')
    M[i,:]=data[:,2]

### Importation des données enregistrées dans H2O

os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')

files1=os.listdir(d1)
os.chdir(d1)
data1=np.genfromtxt(files1[0], delimiter=',')

Y1=len(files1)
M1=np.zeros((Y1,X))

for i in range (Y1):
    data1=np.genfromtxt(files1[i], delimiter=',')
    M1[i,:]=data1[:,2]

### Renseignement des profondeurs

os.chdir(r'C:\Users\Lise ABIVEN\Desktop\py_data_treatment')
thickness=[16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3,2,1]
Y0=len(thickness)

### Débitage des données

D=low_pass_filter(d)[1]
D1=low_pass_filter(d1)[1]

### Calcul des coefficients d'extinction de l'eau grâce à la loi de Beer-Lambert

H=np.zeros((Y,X))
G=np.zeros((Y,X))
for j in range (Y):
    for i in range (X):
        G[j,i]=abs(M1[j,i]/M[j,i])

for j in range (Y):
    for i in range (X):
        H[j,i]=(log(G[j,i]))

p=np.zeros((X,2))
```

```
for i in range (X):  
    p[i]=np.polyfit(thickness,H[:,i],1)  
  
coeff=-p[:,0]  
A=p[:,1]  
  
logcoeff=[]  
for i in range (X):  
    logcoeff.append(math.log10(coeff[i]))
```

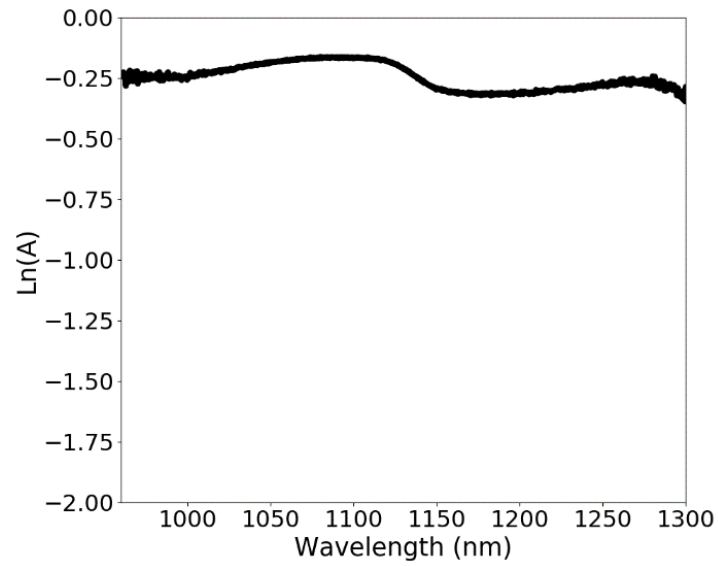


Figure B.III-1 : L'ordonnée à l'origine $\ln(A)$ ne dépend pas de la longueur d'onde

B.III.2. Calcul de la profondeur apparente du signal dans l'eau

B.III.2.a. Corps de l'algorithme

On cherche la profondeur (**e**) comprise entre 0 et 30 mm maximisant le coefficient de corrélation entre le spectre de photoluminescence incident (acquis dans D₂O) (**check**) et le spectre de photoluminescence transmis (**transmitted**) corrigé par la loi de Beer-Lambert. Un test est réalisé pour chaque valeur de **e** (100 valeurs comprises entre 0 mm et 30 mm). Pour chaque test, nous utilisons les coefficients d'absorption de l'eau, calculés dans la section B.III.1 (**coeff**)

```
def apparent_depth_4 (transmitted, check, coeff):

    e=np.linspace(0,30,100)
    X=len(check)
    Y=len(e)

    inci=np.zeros((Y,X))
    incin=np.zeros((Y,X))
    num=np.zeros((Y,1))

    Rs=0
    I=0
    E=0

    for i in range (Y):
        for j in range (X):
            inci[i,j]=transmitted[j]*exp(coeff[j] * e[i])
    for i in range (Y):
        for j in range (X):
            incin[i,j]=inci[i,j]/max(inci[i])

    for i in range (Y):
        R=r_square(check,incin[i])
        if R > Rs:
            Rs=R
            I=i
            E=e[i]

    return Rs, I, E
```

B.III.2.b. Calcul du coefficient de corrélation

```
def r_square(y, y_mod):

    Y=len(y)
    meany=mean(y)
    meany_mod=mean(y_mod)

    residus=y-y_mod
    vary=0
    vary_mod=0
    cov=0

    for i in range (Y):
        vary_mod +=(y_mod[i]-meany_mod)**2
        vary +=(y[i]-meany)**2
        cov +=(y[i]-meany)*(y_mod[i]-meany_mod)

    R_square=cov*cov/vary_mod/vary

    return R_square
```

C. Informations complémentaires

C.I. Chapitre 2

C.I.1. Échantillons synthétisés

Tableau C.I-1 : Quantités massiques des réactifs mis en jeu. Le paramètre de synthèse Ag:S (molaire) est ajusté grâce à la quantité de sulfure de sodium (Na₂S) ajouté au milieu réactionnel. Le paramètre de synthèse Surf:Ag (molaire) varie grâce à la quantité de ligands acide 11-mercaptodécanoïque (11MUA) ajoutés au milieu réactionnel.

Échantillon	m(AgNO ₃) (mg)	m(Na ₂ S) (mg)	m(11MUA) (mg)	Volume total (mL)
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 1 ; 5]	42,5	60,0	54,6	50
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 3 ; 5]	42,5	60,0	163,8	50
Ag ₂ S-11MUA-[1 ; 5 ; 5]	42,5	60,0	273,0	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 1 ; 5]	42,5	30,0	54,6	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 3 ; 5]	42,5	30,0	163,8	50
Ag ₂ S-11MUA-[2 ; 5 ; 5]	42,5	30,0	273,0	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 1 ; 5]	42,5	15,0	54,6	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 3 ; 5]	42,5	15,0	163,8	50
Ag ₂ S-11MUA-[4 ; 5 ; 5]	42,5	15,0	273,0	50

Tableau C.I-2 : Présentation des réactifs de synthèse et masses molaires associées

Précurseur d'argent	Précurseur de soufre	Ligand
Nitrate d'argent	Sulfure de sodium	Acide 11-Mercaptodécanoïque
Ag(NO₃)	Na₂S - 9H₂O	11MUA
169,9 g mol ⁻¹	240,182 g mol ⁻¹	218,4 g mol ⁻¹

C.I.2. Calcul de la masse théorique de nanoparticules de Ag₂S obtenues par synthèse

Pour connaître l'ordre de grandeur de la masse de nanoparticules Ag₂S obtenues dans nos conditions de synthèse, nous réalisons trois hypothèses simplificatrices. Tout d'abord, nous considérons que tout l'argent ajouté au milieu réactionnel réagit pour former les nanoparticules d'Ag₂S. Ensuite, nous nous plaçons dans les conditions stœchiométriques où 2 moles d'argent réagissent pour former 1 mole d'Ag₂S. Nous l'avons vu dans l'étude présentée dans le chapitre 1 du document principal, les nanoparticules obtenues ne sont pas stœchiométriques. Néanmoins, dans le cas du nanothermomètre de référence, le rapport Ag:S mesuré par analyse MEB EDX est proche de 2, il vaut 1,7. Enfin, l'ordre de grandeur obtenu ne prend pas en compte la masse de ligands greffés à la surface des nanoparticules.

Dans nos conditions de synthèse, $2,5 \cdot 10^{-4}$ moles d'AgNO₃ sont ajoutées au milieu réactionnel, la quantité d'éléments argent disponible est donc de $2,5 \cdot 10^{-4}$ moles. La quantité de nanoparticules d'Ag₂S obtenues est alors deux fois moins importante et vaut $1,25 \cdot 10^{-4}$ moles. La masse molaire d'Ag₂S est 248 g mol⁻¹. La masse théorique de nanoparticules d'Ag₂S obtenue pour un batch de synthèse est de **31 mg**.

C.I.3. Diffraction des rayons X

Les nanoparticules sont séchées à l'étude à vide à 50°C pendant 12h. Le solide obtenu est ensuite broyé avec un mortier et un pilon jusqu'à obtenir une fine poudre. Le diffractomètre disponible au laboratoire est un diffractomètre Bruker DS Advance (Cu-Kα, λ=1,5406 Å) à 30 kV et 40 mA.

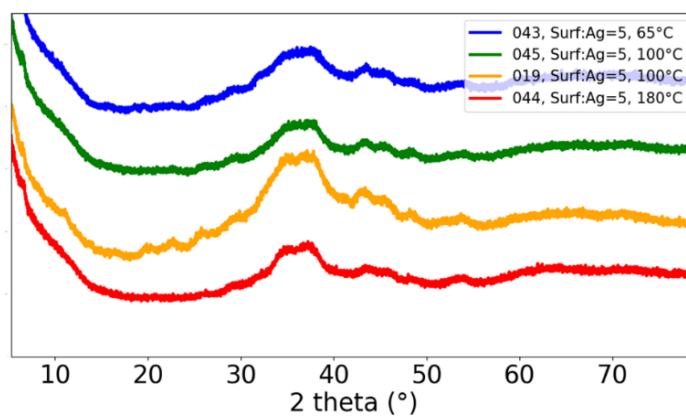


Figure C.I-1 : Diffractogrammes des rayons X de certains échantillons de notre étude. La phase est difficile à identifier, car les diffractogrammes sont larges compte tenu de la petite taille des particules. Les diffractogrammes ont été obtenus avec un temps d'accumulation de 2h.

C.I.4. Spectres d'absorption UV-Vis

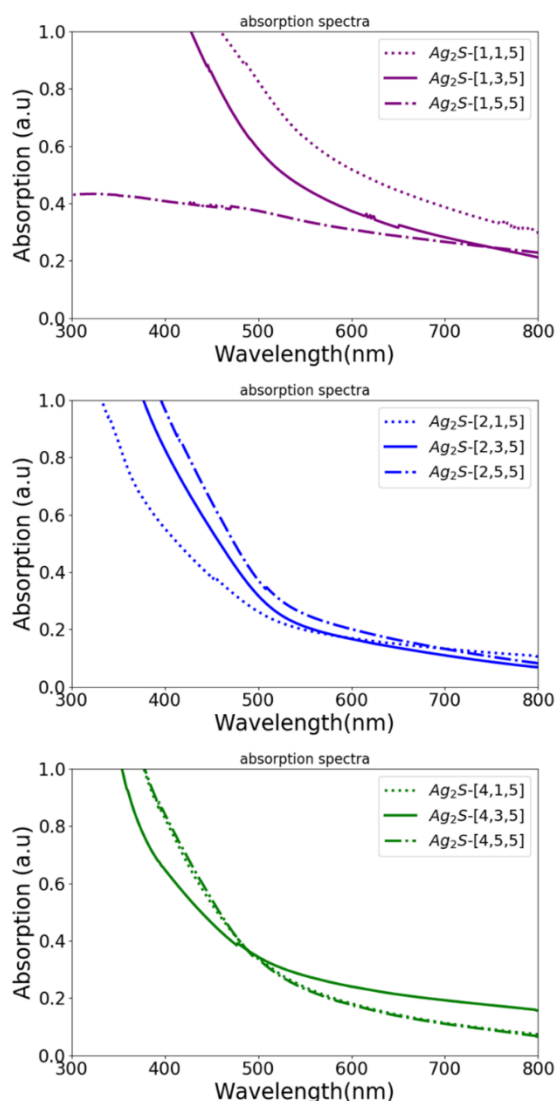


Figure C.I-2 : Les spectres d'absorbance UV-Vis des échantillons étudiés dans le chapitre 2 du manuscrit ont été effectués avec un spectrophotomètre UV-Vis-NIR.

C.I.5. Caractérisations complémentaires pour le nanothermomètre de référence Ag₂S-11MUA-[2; 3 ; 5]

C.I.5.a. Reproductibilité de la synthèse

La reproductibilité des propriétés optiques est un enjeu crucial en vue de l'utilisation du nanothermomètre Ag₂S pour mesurer la température. Pour tester la reproductibilité des propriétés optiques du nanothermomètre de référence, nous avons préparé deux batchs de matériaux dans les conditions de synthèse de référence ($T = 100^{\circ}\text{C}$; $t = 5\text{min}$; $[\text{Ag}] = 5\text{mM}$; Surf : Ag = 3 ; Ag : S = 2). Nous observons un léger écart entre les spectres de photoluminescence normalisés par rapport au maximum d'intensité des batchs 1 et 2 (figure C.I-3). Les températures calculées avec le modèle d'étalonnage considérant le rapport d'intensité p_1 à partir de ces deux spectres de photoluminescence présentent un écart inférieur à 0,2% par rapport à la température théorique du sulfure d'argent (25°C). Cet écart est bien inférieur à l'incertitude de la température imposée à l'échantillon par le support de cuve chauffant (1%). Nous validons donc la reproductibilité des propriétés optiques du nanothermomètre sélectionné.

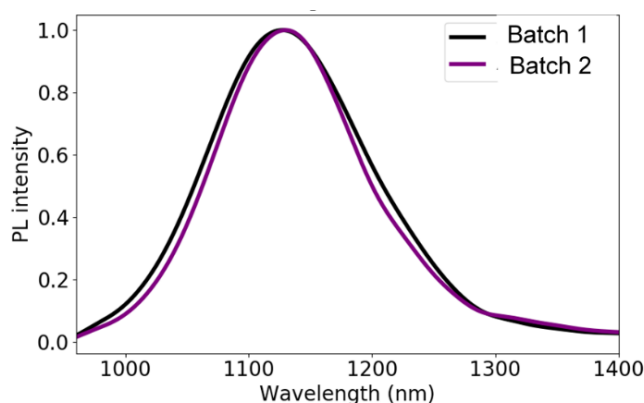


Figure C.I-3 : Les spectres de photoluminescence normalisés des deux batchs obtenus dans les mêmes conditions de synthèse sont représentés. Le volume des suspensions aqueuses ayant servies à effectuer la mesure est de 0,7mL. La totalité du volume de la suspension étudiée est excitée par la LED-730nm. La température de travail est de 25°C .

C.I.5.b. Effet du temps de palier lors du chauffage microonde

En considérant les paramètres de synthèse $[\text{Ag}] = 5\text{mM}$, Ag:S = 2, Surf:Ag = 3, $T = 100^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{min}$, nous avons testé différents temps de palier à 100°C . Un temps de palier supérieur à 5 min (10 min et de 15 min) n'induit pas d'évolution des propriétés optiques des nanoparticules obtenues. Ceci est illustré sur la figure C.I-4. En revanche, un temps de palier inférieur à 5 min permet d'obtenir des nanoparticules avec un rendement quantique légèrement supérieur à 0,06%. Il vaut 0,08% pour les nanoparticules obtenues après 1 min à 100°C et 0,07% pour celles synthétisées après 3 min à 100°C . (808 nm, $532\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)

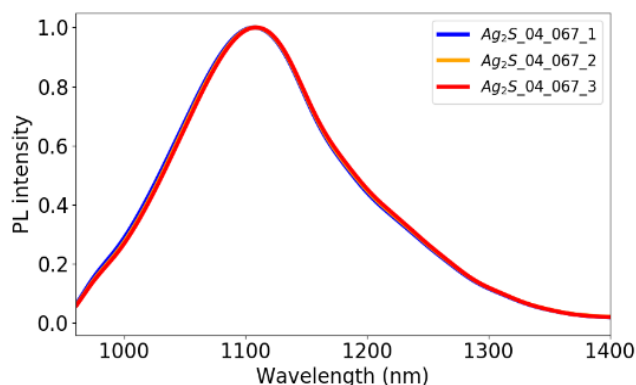


Figure C.I-4 ; Effet du temps de chauffage microonde sur le spectre de photoluminescence des nanoparticules Ag₂S-11MUA-[2; 3 ; 5]. Temps de pallier pour Ag₂S_04_067_1 : 5 min ; pour Ag₂S_04_067_2 : 10 min ; pour Ag₂S_04_067_3 : 15 min

C.I.5.c. Stockage des nanoparticules

Les suspensions aqueuses sont conservées au frigo à -4°C. La concentration théorique de stockage du sulfure d'argent est de 8,3 mg.mL⁻¹. La stabilité colloïdale reste très satisfaisante même 2 ans après la synthèse. En vue de l'utilisation de la nanosonde Ag₂S pour mesurer la température, nous montrons que le spectre de photoluminescence des nanoparticules n'évolue pas entre 30 jours et 100 jours après la synthèse (figure C.I-5).

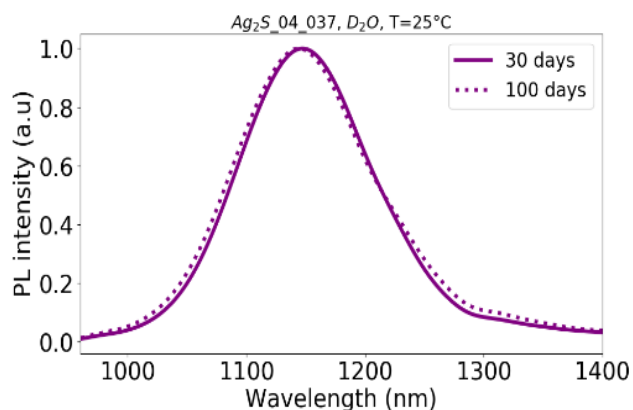


Figure C.I-5 : Les spectres de photoluminescence correspondent au même composé. Ils ont été enregistrés à 70 jours d'intervalle. Nous observons une très bonne correspondance entre eux. Le volume des suspensions aqueuses ayant servies à effectuer la mesure est de 0,7mL. La totalité du volume de la suspension étudiée est excitée par la LED-730nm. La température de travail est de 25°C.

C.I.5.d. Effet des paramètres d'excitation sur les propriétés optiques

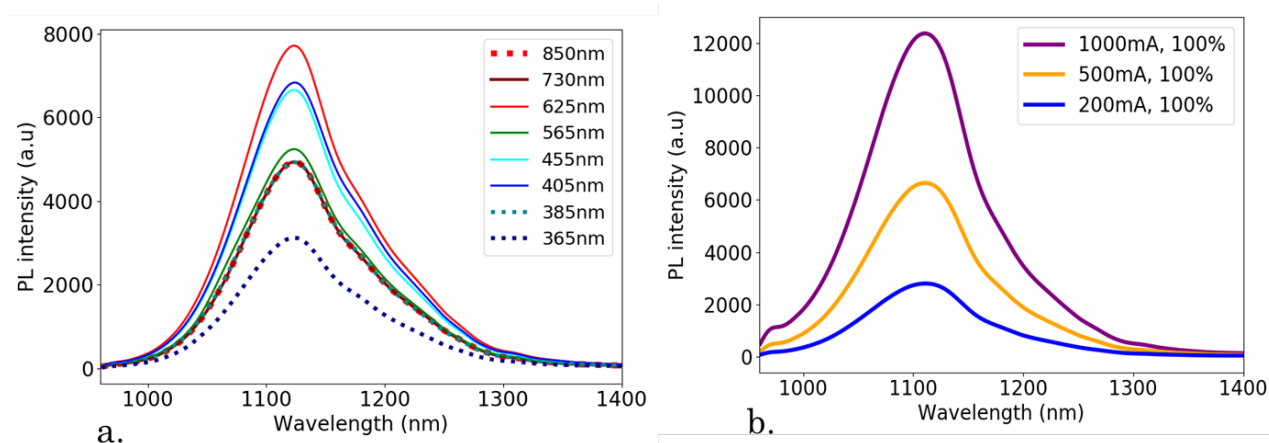


Figure C.I-6 : Effet de la longueur d'onde de la LED sur le spectre PL Ag₂S_{04_015} à 25°C. (b) Effet de la puissance de la LED 730nm sur le spectre de PL de Ag₂S_{04_015} à 25,4°C

C.II. Chapitre 3

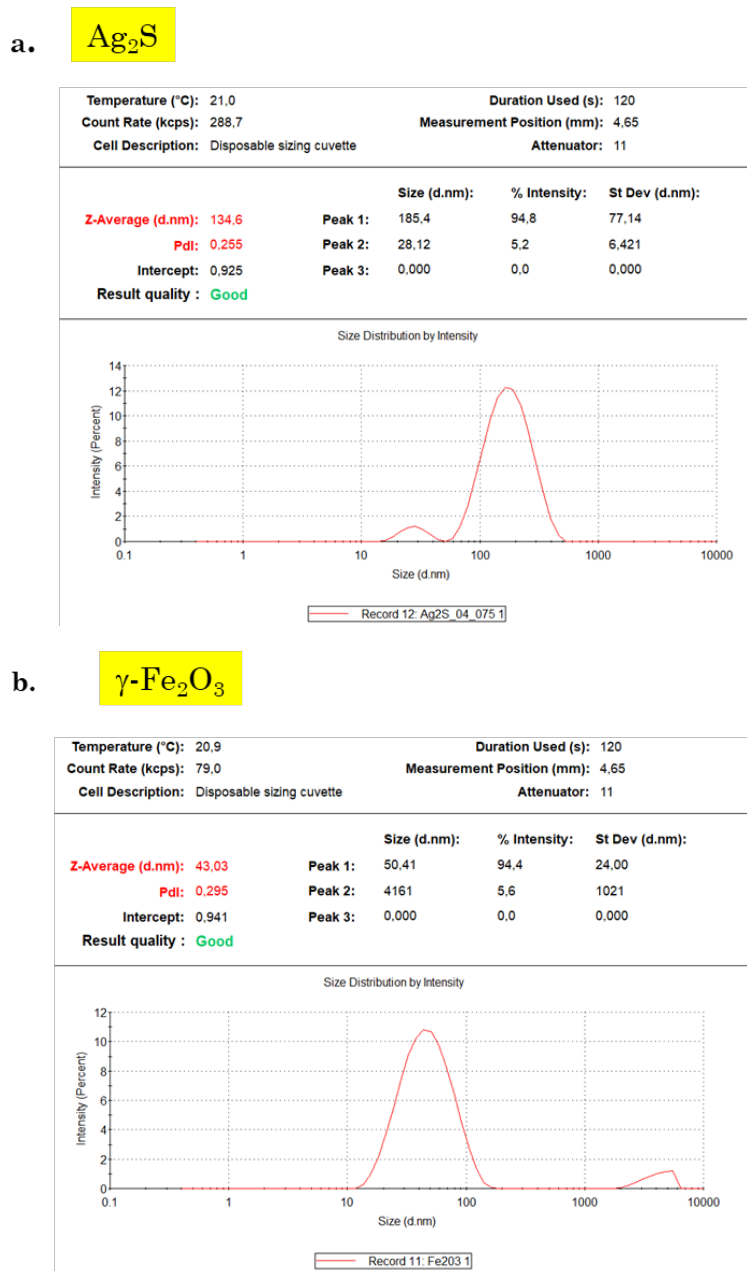
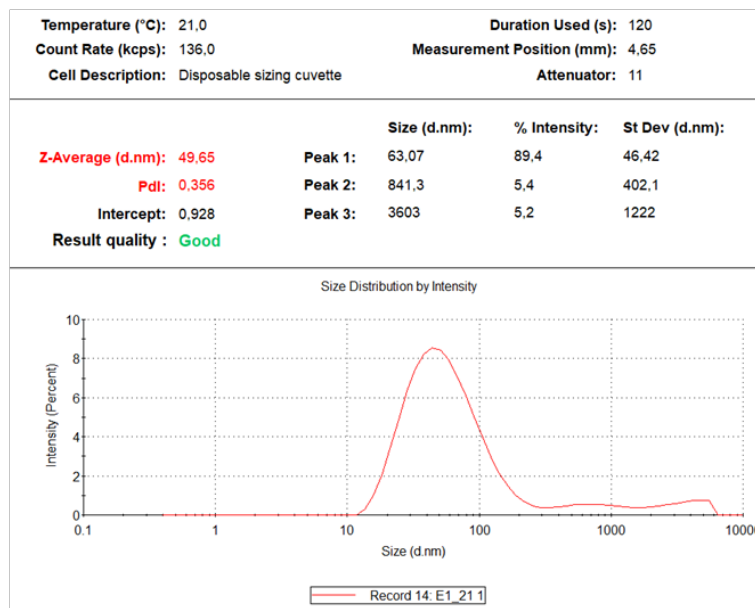


Figure C.II-1 : Analyses par DLS (Dynamic Light Scattering) des nanoparticules d'Ag₂S et de γ-Fe₂O₃ en suspension aqueuse

c. **Ag₂S-γ-Fe₂O₃** Fe/Ag₂S = 21



d. **Ag₂S-γ-Fe₂O₃** Fe/Ag₂S = 5

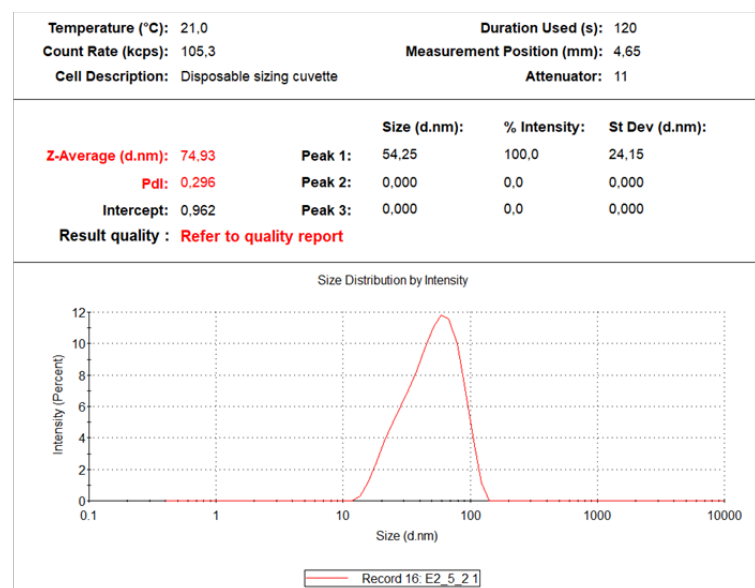


Figure C.II-2 : Analyse DLS (Dynamic Light Scattering) des mélanges de nanoparticules Ag₂S et γ-Fe₂O₃ en suspension aqueuse

C.III. Chapitre 4

C.III.1. Métrologie de la mesure de température locale

I.3.a. Métrologie de la mesure de température locale

Tableau C.III-1 : Variations des rapports d'intensités p_1 , p_2 et p_3 en fonction de la température pour les trois suspensions de nanoparticules de Ag_2S dispersées dans H_2O , de volumes différents. Nous remarquons que la dispersion des mesures par rapport à la droite de régression linéaire dépend du rapport d'intensité. En fonction des rapports d'intensités choisis, nous intégrons plus ou moins de photons. Moins il y a de photons intégrés, plus le bruit a une contribution importante dans la mesure du rapport d'intensité. La précision de la mesure de température locale dépend donc du rapport d'intensité considéré. Pour le rapport d'intensité p_1 , l'erreur effectuée sur la mesure de température, liée à la dispersion des points autour de la droite de régression linéaire est de l'ordre de 1%. Elle est de l'ordre de 3% pour p_2 et 7% pour p_3 .

Rapports d'intensités

$p_1(T)$

$$p_1(T) = \frac{I_{1-1}(T)}{I_{1-2}(T)} = \frac{\int_{1000nm}^{1150nm} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150nm}^{1400nm} i(\lambda, T) d\lambda}$$

$p_2(T)$

$$p_2(T) = \frac{I_{2-1}(T)}{I_{2-2}(T)} = \frac{\int_{1150nm}^{1200nm} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1250nm}^{1300nm} i(\lambda, T) d\lambda}$$

$p_3(T)$

$$p_3(T) = \frac{I_{3-1}(T)}{I_{3-2}(T)} = \frac{\int_{1200nm}^{1250nm} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1250nm}^{1300nm} i(\lambda, T) d\lambda}$$

Variation du rapport d'intensité en fonction de la température

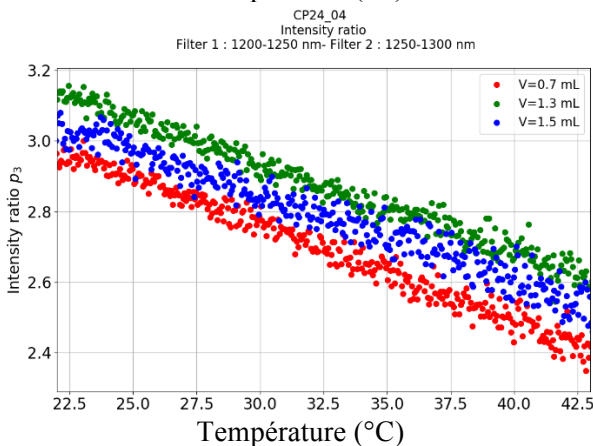
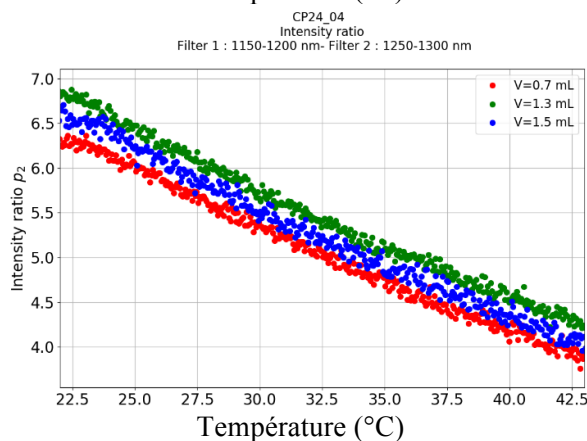
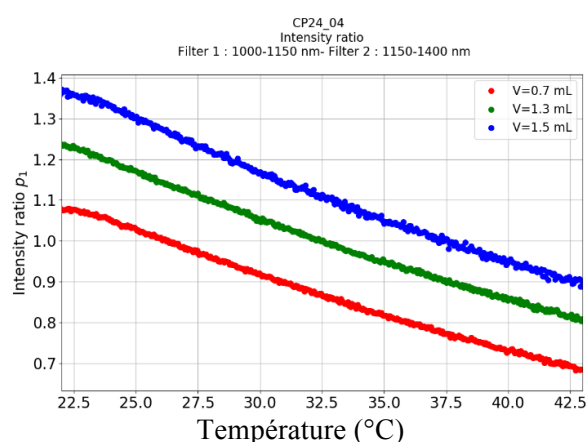


Tableau C.III-2 : La précision de la mesure de température dépend du rapport d'intensité considéré et du volume de l'échantillon (profondeur du signal). L'erreur relative est définie de la manière suivante :

$$\frac{T_{max} - T_{min}}{T_{min}}$$

Mesure de p ₁	Volume	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	$\frac{T_{max} - T_{min}}{T_{min}}$
0,9	0,7	30,5	31	1,6 %
	1,3	37,3	37,6	0,8%
	1,5	41,9	42,6	1%
1,0	0,7	25,8	26,2	1,5%
	1,3	32,0	32,4	1,2%
	1,5	36,8	37,6	2,1%

Mesure de p ₂	Volume	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	$\frac{T_{max} - T_{min}}{T_{min}}$
4,5	0,7	35,9	37	3%
	1,3	37,2	40	7,5%
	1,5	39,8	40,9	2,3%
6,0	0,7	24,4	25,4	4,1%
	1,3	26,2	26,9	2,6%
	1,5	27,6	28,5	3,3%

Mesure de p ₃	Volume	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	$\frac{T_{max} - T_{min}}{T_{min}}$
2,6	0,7	34,5	36,5	5,8%
	1,3	38,3	41,3	7,8%
	1,5	42,4	43	1,4%
2,8	0,7	27,5	29,6	7,6%
	1,3	29,9	34,8	16%
	1,5	33,9	36,7	8,2%

C.III.2. Les variables de prédiction des modèles de machine learning

Tableau C.III-3 : Définition des variables de prédiction utilisées dans les modèles de machines learning pour la calibration multivariée et la classification tissulaire.

Moyenne (Arithmétique)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2$$

Écart-type

L'écart type est une mesure de la dispersion des valeurs d'un échantillon statistique ou d'une distribution de probabilité. Il est défini comme la racine carrée de la variance ou, de manière équivalente, comme la moyenne quadratique des écarts par rapport à la moyenne.

$$\sigma = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2 - \bar{x}^2}$$

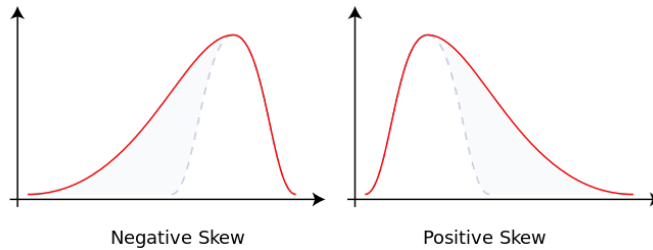
Médiane

La médiane est telle que 50 % des individus d'une population de données ont une valeur inférieure ou égale à la médiane et 50 % des unités ont une valeur supérieure ou égale

Informations complémentaires

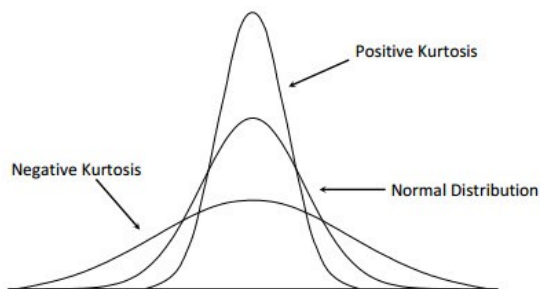
Coefficient d'asymétrie
-
Skewness

Il évalue le défaut de symétrie d'une distribution. Il est nul pour une distribution symétrique (par exemple une distribution normale). Il est positif pour une distribution "étalée à droite" et négatif pour une distribution étalée à gauche.



Coefficient d'aplatissement
-
Kurtosis

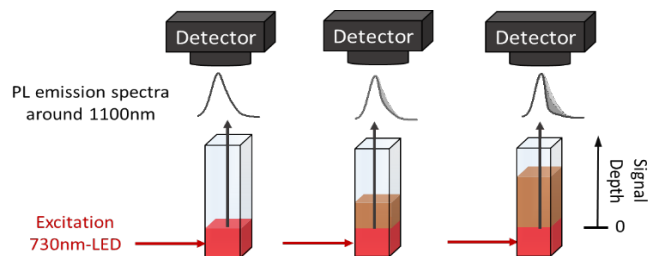
Il évalue la dispersion des valeurs "extrêmes" par référence à la loi normale. Il est nul pour une distribution normale, négatif pour une distribution moins "aplatie" qu'une distribution normale et positif sur une distribution plus aplatie qu'une distribution normale



Amplitude Maximum d'intensité de photoluminescence

Pct intensité Puissance de la source d'excitation LED-730 nm

Profondeur Profondeur du signal dans H₂O



Épaisseur Épaisseur de l'organe placé entre la suspension de Ag₂S et le détecteur

C.III.3. Calibration multivariée en température et en profondeur

	T°C	Profondeur	Températures prédites	Profondeurs prédites
0	29.3	0.0	28.160913	0.000000
1	27.4	8.0	26.667238	7.568915
2	49.7	8.0	51.789421	6.116872
3	23.7	5.0	22.728086	4.803169
4	42.6	0.0	41.013180	0.000000
5	57.0	5.0	53.893719	6.248471
6	51.6	0.0	51.263645	0.000000
7	38.0	0.0	36.990685	0.000000
8	49.0	0.0	49.340191	0.000000

Figure C.III-1 : Pour l'ensemble de validation, les 9 premières valeurs des températures réelles et prédites ainsi que des profondeurs réelles et prédites sont données.

C.III.4. Classification tissulaire par transillumination

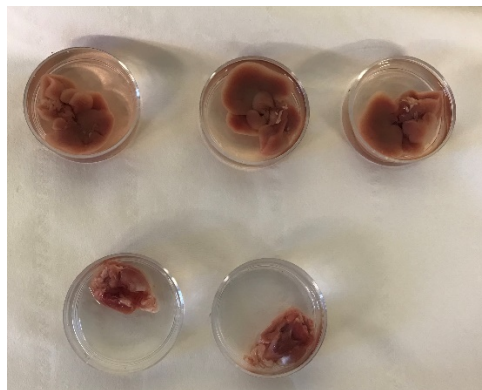
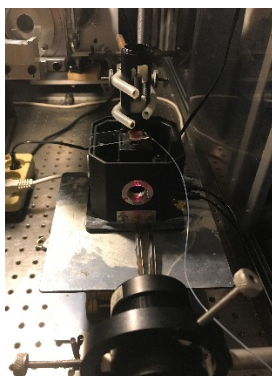
C.III.4.a. Expérience

Paramètres expérimentaux Échantillons biologiques : 2 cerveaux et 3 foies d'épaisseurs différentes

Sonde Ag₂S dispersée dans le D₂O :

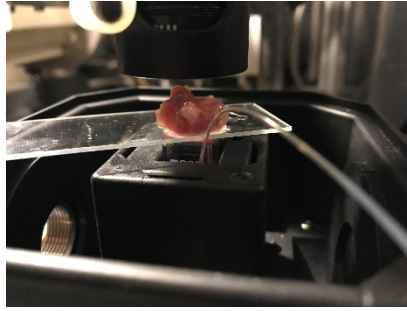
- Contrôle en température grâce au support de cuve chauffant de 25°C à 45°C avec une rampe en température : 1°C.min⁻¹.
- Mesure de températures globales de la suspension Ag₂S dans D₂O grâce à la sonde de température à fibre optique (OTG-MPK5, Opsens Solutions)

Acquisition des spectres PL : 1200 spectres 1spectre/s pendant 20min

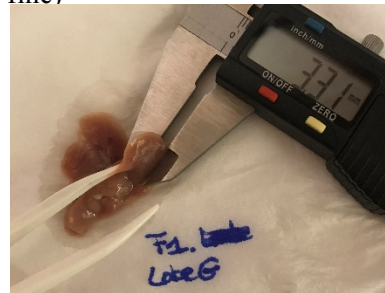
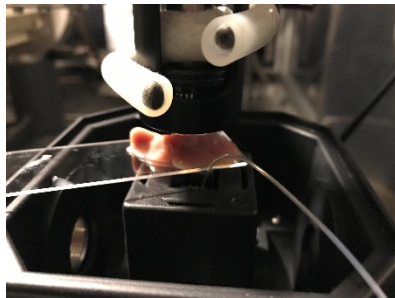


CP26_04_01 Cerveau I (C1)
Épaisseur : 8,45 mm

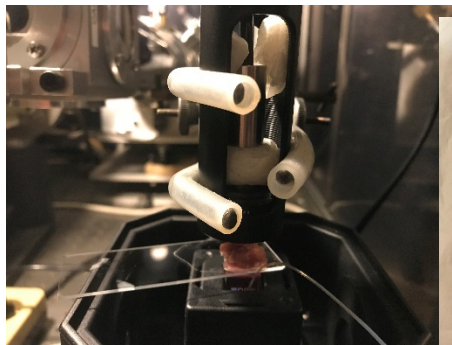
Informations complémentaires



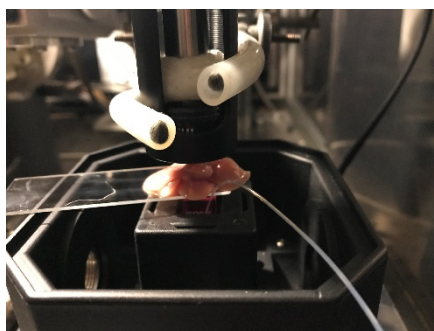
CP26_04_02 Foie 1 (F1)
Épaisseur : 3,31 mm
Position : lobe gauche (partie la plus fine)



CP26_04_03 Cerveau 2 (C2)
Épaisseur : 7,80 mm



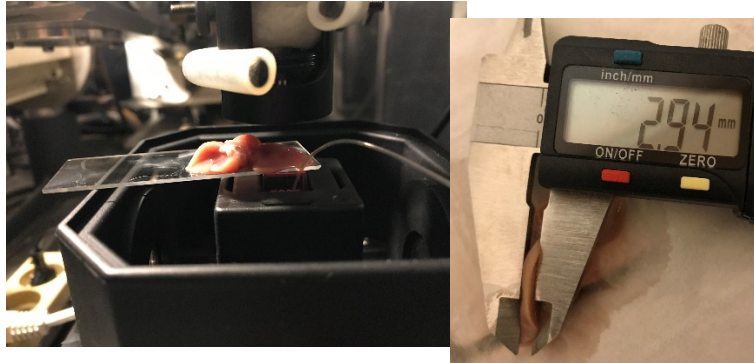
CP26_04_04 Foie 2 (F2)
Épaisseur : 9,75 mm
Position : partie centrale (partie la plus épaisse)



CP26_04_05 Foie 2 (F2)
Épaisseur : 2,94 mm

Informations complémentaires

Position : lobe gauche (partie la plus fine)

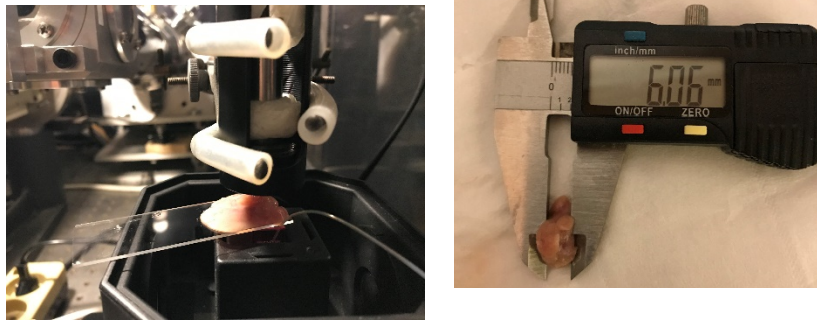


CP26_04_06 Foie 3 (F3)

Ce foie a été découpé en plusieurs morceaux

Épaisseur : 6,06 mm

Position : partie centrale (partie la plus épaisse)



CP26_04_07 Foie 3 (F3)

Ce foie a été découpé en plusieurs morceaux

Épaisseur : 1,84 mm

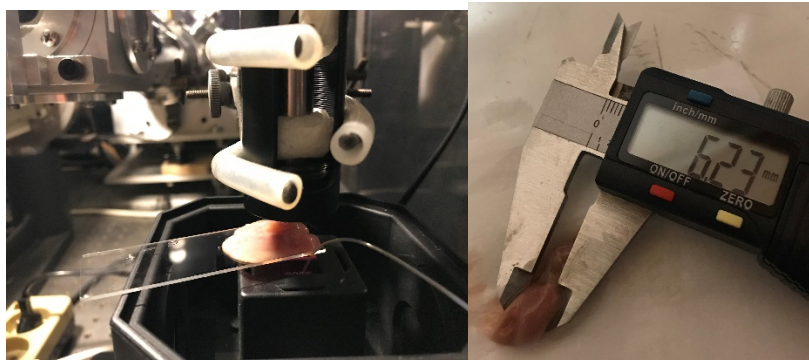
Position : partie plus fine (sectionnée)



CP26_04_08 Foie 1 (F1)

Épaisseur : 6,23 mm

Position : partie centrale (partie la plus épaisse)



CP26_04_09 Ag2S_04_015 seules (sans lame de verre et sans organe)
Même programme de montée en température

C.III.4.b. Modèle de classification tissulaire

	T	Epaisseur	Label	Skewness	Kurtosis	Amplitude	Moyenne	Median	Std
0	25.000000	8.45	0	1.265082	0.140561	479.0	109.690752	34.0	138.607173
1	25.016667	8.45	0	1.267067	0.149208	483.0	109.669460	36.0	138.806752
2	25.033333	8.45	0	1.276359	0.185429	477.0	106.597815	33.0	136.956399
3	25.050000	8.45	0	1.241455	0.259727	279.0	62.929265	30.0	70.515228
4	25.066667	8.45	0	1.249281	0.285891	273.0	62.574663	30.0	70.588840
...
9595	44.916667	6.23	1	1.158505	0.002990	527.0	134.760958	65.0	145.514058
9596	44.933333	6.23	1	1.157118	-0.011926	508.0	135.461539	62.0	145.266259
9597	44.950000	6.23	1	1.147528	-0.025411	506.0	137.429556	67.0	145.616039
9598	44.966667	6.23	1	1.144929	-0.040145	505.0	136.417928	67.0	145.506084
9599	44.983333	6.23	1	1.156169	-0.009703	527.0	132.676705	62.0	144.922406

9600 rows × 9 columns

Figure C.III-2 : Donnée et variables utilisées pour le modèle de classification tissulaire par transillumination : 8160 valeurs d'entraînement, 1440 valeurs de test.

D. Pour approfondir notre compréhension des mécanismes de photoluminescence

Pour approfondir notre compréhension des mécanismes de photoluminescence

D.I. Effet du pH du milieu sur les propriétés optiques

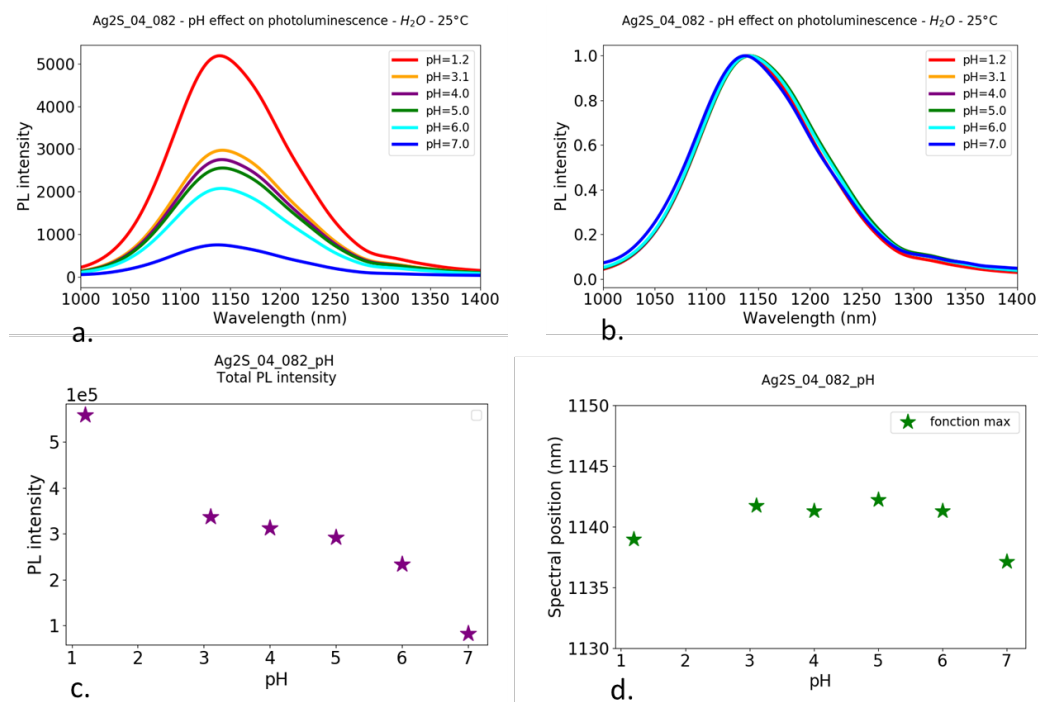


Figure D.I-1 : Le pH est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (HCl). Les suspensions sont stables pour des valeurs de pH de 5, 6 et 7. Une précipitation des nanoparticules est observée pour les suspensions à pH 1,2, 3,1 et 4. L'intensité de photoluminescence augmente avec le pH. Superpositions des spectres de l'échantillon Ag₂S-11MUA-[2 ; 3 ; 5] à différentes valeurs de pH bruts (a) et normalisés (b). Variation de l'intensité de PL (c) et de la position spectrale (d) en fonction du pH pour cet échantillon.

D.II. Effet de l'environnement biologique sur les mécanismes de photoluminescence

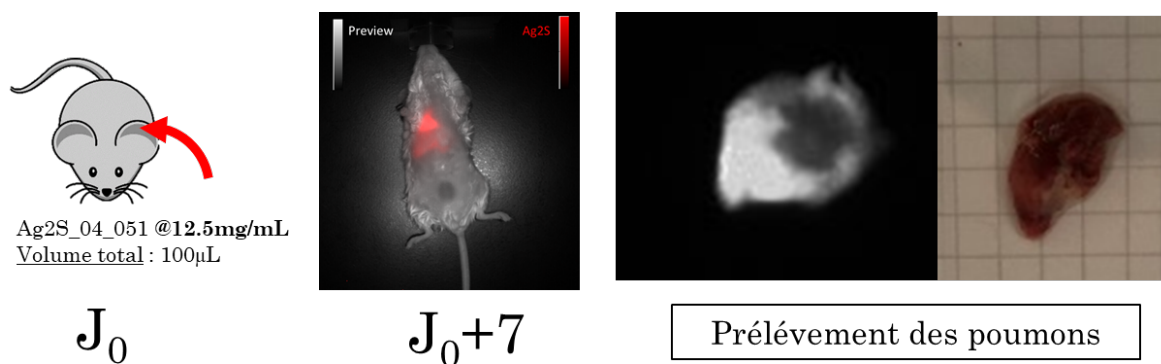


Figure D.II-1 : Une souris reçoit une injection intraveineuse de 100 μL d'Ag₂S à 12,5 mg.mL⁻¹. Une semaine après l'injection, l'imagerie proche infrarouge montre une accumulation des nanoparticules d'Ag₂S dans les poumons. La souris est sacrifiée (7 jours après l'injection initiale des nanoparticules) et les poumons sont prélevés. Les organes sont placés 30 min au frigo à -4°C.

Pour approfondir notre compréhension des mécanismes de photoluminescence

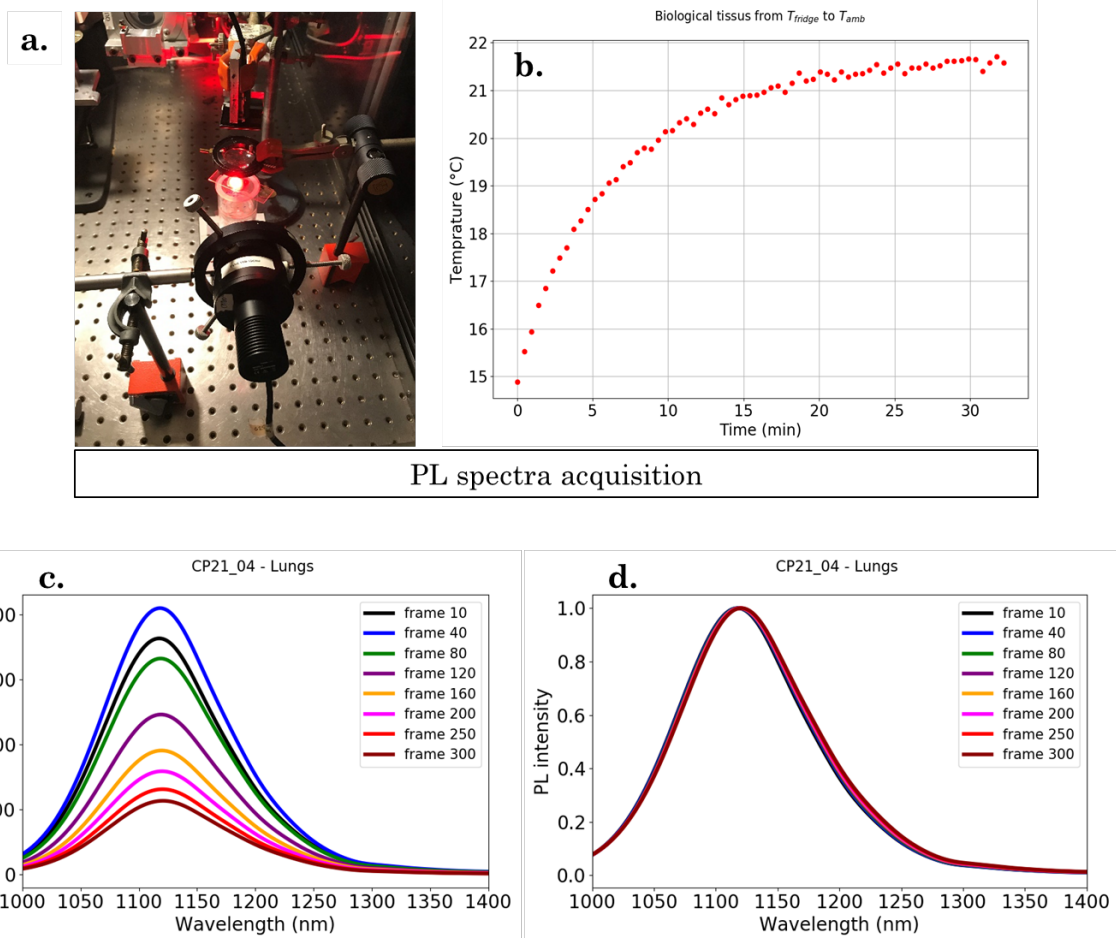


Figure D.II-2 : (a) au bout de 30 min, les poumons sont installés sur le dispositif optique d'imagerie hyperspectrale et illuminés par une LED-730 nm ($0,1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). (b) La température des organes passe de 15°C à 22°C en 30 min. Pendant ces 30 min d'expérience, les spectres d'émission des nanoparticules d' Ag_2S contenues au sein des poumons sont enregistrés. (c) Nous observons une extinction de photoluminescence caractéristique de l'augmentation de la température de cœur des Ag_2S . (d) En revanche, nous n'observons pas d'évolution de l'énergie du pic d'émission de photoluminescence des Ag_2S , ce qui est le cas lorsque les Ag_2S sont dispersés en suspension aqueuse (figure D.II-1).

Pour approfondir notre compréhension des mécanismes de photoluminescence

E. Nanothermométrie et Hyperthermie *in vivo*

E.I. Photohyperthermie *in-vivo*

E.I.1. Description de l'expérience

Une injection intratumorale de 50 μL de nanoparticules de sulfure d'argent (nanothermomètres de référence optimisé dans le chapitre 2 du document principal) à $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ est effectuée sous anesthésie générale (voie chimique par isoflurane) chez une souris porteuse d'une tumeur sous-cutanée. La souris est ensuite placée sur une plaque chauffante réglée à 38°C , à l'intérieur du dispositif d'imagerie développé par la société BiospaceLab. La souris est soumise à trois courts pulses laser haute puissance (1 min à $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Chaque pulse laser est suivi de 5 min d'illumination laser faible puissance ($15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Au cours de ce régime basse puissance laser, la photoluminescence du sulfure d'argent est enregistrée au cours du temps³. Le signal des nanosondes de température permet un suivi en temps réel de la température locale au sein de la tumeur. La température à la surface de la tumeur est suivie de manière simultanée grâce à une caméra thermique. Au cours de cette expérience, quatre périodes de 5 min d'illumination faible puissance ($15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) sont étudiées (périodes notées a, b, c et d).

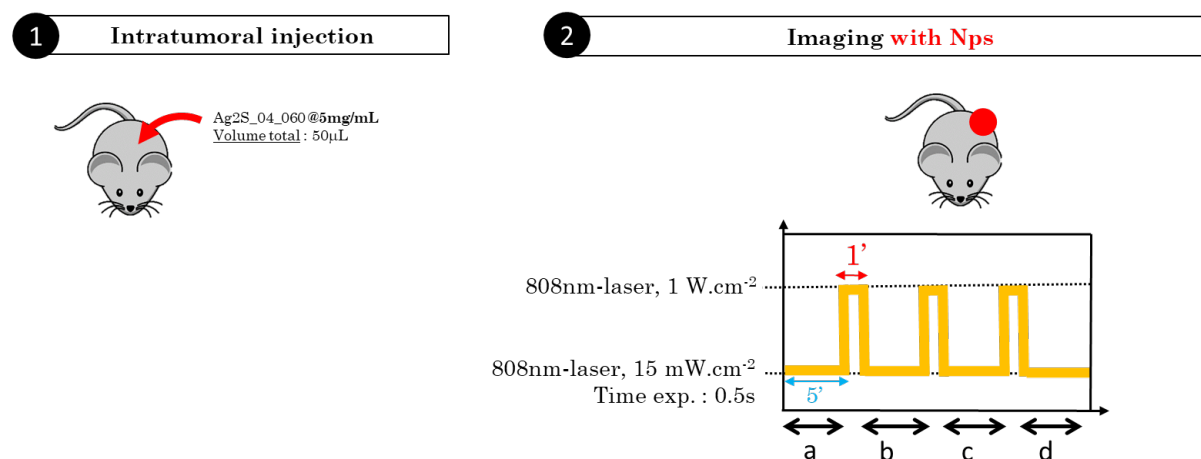


Figure E.I-1 : Description de l'expérience d'hyperthermie avec des nanoparticules de sulfure d'argent développées dans ce travail de thèse

E.I.2. Résultats

La température mesurée, grâce à la caméra thermique, à la surface de la tumeur augmente après chaque pulse laser haute puissance. Avant le premier pulse laser, la température mesurée au niveau de la peau de l'animal est de 30°C . Après le premier pulse laser, la température se stabilise à 34°C , puis à 37°C après le second pulse et à 38°C après le troisième pulse laser (figure E.I-2). Le signal de photoluminescence des Ag_2S est suivi avec la caméra d'imagerie (Widy Sens 640 V-ST, New Imaging Technologies) intégrée au dispositif développé par la société BiospaceLab. Le dispositif est muni d'une roue à filtre avec un filtre passe-bande $1000 \text{ nm} - 1150 \text{ nm}$ et un filtre passe-haut 1150 nm . Un cliché est acquis avec chaque filtre positionné devant le détecteur de sorte à pouvoir remonter au rapport d'intensité p_1 . Pour chaque filtre, le temps d'acquisition est de $0,5 \text{ s}$ et le changement de filtre se fait en $0,3 \text{ s}$. La température à la surface de la tumeur est suivie en simultané grâce à une caméra thermique. Nous rappelons que le rapport d'intensité p_1 est tel que :

$$p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda, T) d\lambda}$$

³ La photoluminescence des sulfures d'argent n'est pas enregistrée au cours du régime haute puissance laser (1 min à $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), car le détecteur est saturé.

Avant le premier pulse haute puissance laser (période a), le rapport d'intensité mesuré est constant au cours des 5 min de régime « basse puissance laser ». La température des nanoparticules de sulfure d'argent correspondant aux rapports d'intensité mesurés est de l'ordre de -200°C ce qui est incohérent avec nos conditions expérimentales et les mesures de températures effectuées avec la caméra thermique (figure F.I-3).

Pour les périodes b, c et d, au cours de la première minute des régimes « basse puissance laser », nous observons une augmentation rapide du rapport d'intensité correspondant à une diminution rapide de la température de cœur des nanoparticules de sulfure d'argent localisées à l'intérieur de la tumeur. Ce profil de variation de température est également observé avec la caméra thermique. Cette phase correspond à la relaxation thermique des tissus après le régime haute puissance laser qui a induit une forte élévation de température des tissus. Entre $t = 1$ min et $t = 3$ min, le rapport d'intensité de photoluminescence se stabilise pour les périodes b, c et d (figure E.I-3). Néanmoins, la valeur de stabilisation atteinte par le rapport d'intensité p_1 diminue après chaque pulse laser. Les paliers de rapport d'intensité mesurée correspondent à une stabilisation de la température de cœur du sulfure d'argent (présent dans l'environnement tumoral) à 35°C après le premier pulse laser, 65°C après le second pulse laser et 75°C après le troisième pulse laser (figure E.I-3). Par ailleurs, pour les périodes b, c et d, nous pouvons observer que le rapport d'intensité p_1 diminue légèrement de $t = 3$ min à $t = 5$ min, correspondant, d'après le modèle d'étalonnage obtenu à partir de p_1 (figure E.I-4), à une augmentation de la température de cœur des Ag_2S . Cela pourrait être lié à l'absorption des nanoparticules Ag_2S excités optiquement par le laser illuminant avec une densité de puissance de $15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cette élévation de la température de cœur des nanothermomètres n'est pas détectée à la surface des tissus grâce à la caméra thermique. La température de surface atteint un palier à partir de 1 min 30 (figure E.I-2).

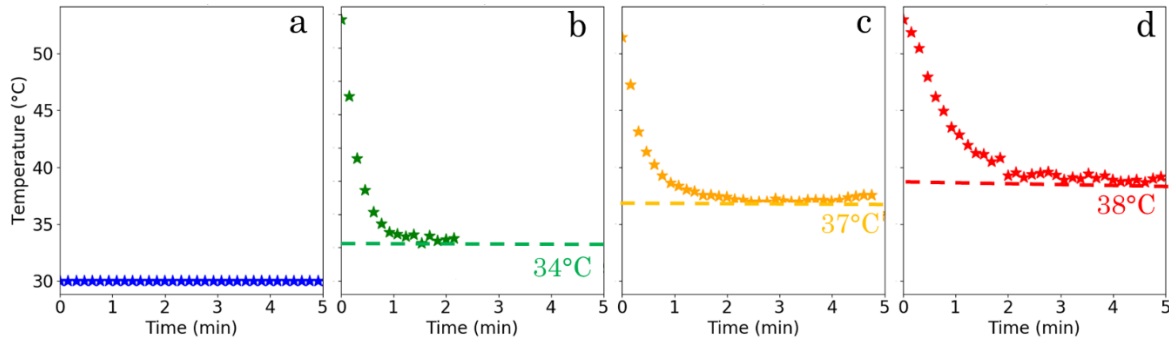


Figure E.I-2 : Évolution de la température à la surface de la peau de l'animal pendant les phases a, b, c et d d'exposition laser faible puissance.

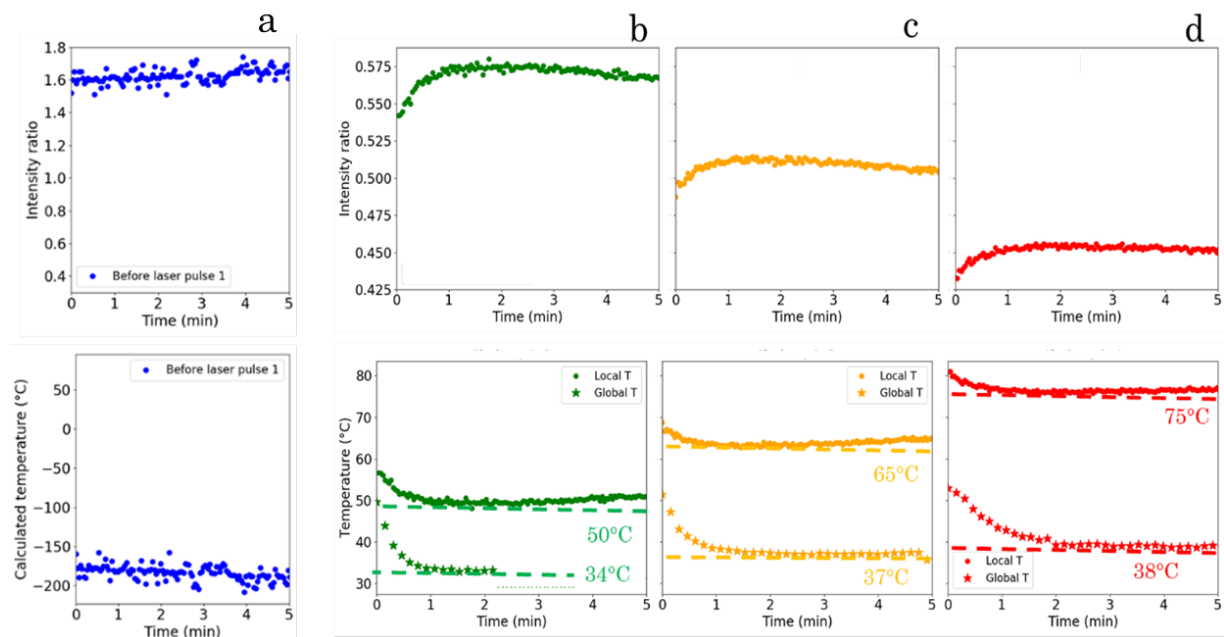


Figure E.I-3 : Pendant les phases a, b, c et d d'exposition laser faible puissance, évolution des rapports d'intensité p_1 (ligne du dessus) et des températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage (figure F.I-4) sur p_1 (ligne du dessous). Pour faciliter la lecture des résultats, les températures globales mesurées grâce à la caméra sont également représentées sur cette figure (ligne du dessous, pointillés étoiles)

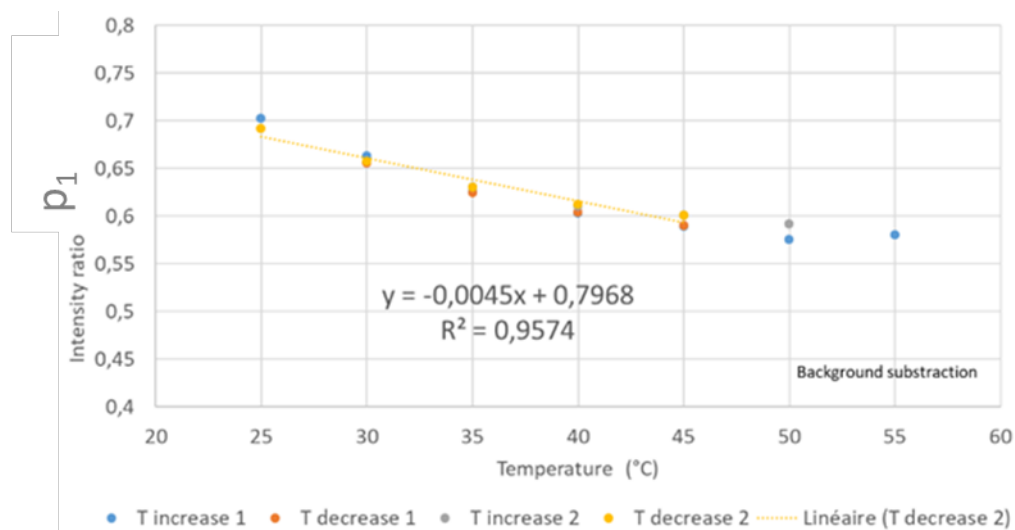


Figure E.I-4 : Calibration de la sonde de température avec le dispositif d'imagerie développé par BiospaceLab. La température de la suspension de nanothermomètres Ag_2S à ($0,7 \text{ mL}$ à $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) est contrôlée et ajustée de 25°C à 55°C par pas de 5°C grâce au support de cuve chauffant. Ce dernier est muni d'une roue à filtre avec un filtre passe-bande $1000 \text{ nm} - 1150 \text{ nm}$ et un filtre passe-haut 1150 nm . Pour chaque température cible, un cliché est acquis pour chaque filtre positionné devant le détecteur (Widy Sens 640 V-ST, New Imaging Technologies) de sorte à pouvoir remonter au rapport d'intensité p_1 . Le rapport p_1 est tracé en fonction de la température de la suspension. Nous considérons en première approximation qu'elle est égale à la température de cœur des nanothermomètres. Cette hypothèse de travail est acceptable si nous nous plaçons en régime dilué (c'est le cas ici, la concentration de la suspension d' Ag_2S est de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) et si la puissance d'excitation optique n'est pas trop élevée. Or, ici, la densité de puissance du laser vaut $0,09 \text{ W.cm}^{-2}$ (cette densité de puissance a été ajustée jusqu'à obtenir un signal suffisamment intense pour pouvoir travailler) ce qui est presque 1000 fois plus élevé que la puissance d'excitation avec laquelle nous travaillons en routine (conditions expérimentales dans le document principal) avec la LED-730 nm ($0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$).

E.II. Hyperthermie magnétoinduite *in vivo*

E.II.1. Dispositif expérimental

Grâce à la richesse des savoirs et du matériel disponible au sein du consortium européen NanoTBtech, nous avons eu l'opportunité de réaliser une preuve de concept de l'utilisation de la nanothermométrie pour mesurer la température locale, au sein d'un environnement tumoral, en temps réel au cours d'un programme d'hyperthermie magnétoinduite *in vivo*. L'ergonomie du dispositif d'imagerie développé par BiospaceLab, nous a permis d'utiliser le dispositif d'hyperthermique magnétoinduite (magneTherm de nanoTherics) que nous avons adapté au laboratoire pour nos expériences *in vitro* (voir chapitre 3 du document principal) (figure E.II-1). Un support pour la souris a été conçu sur mesure (figures E.II-2 et E.II-3).

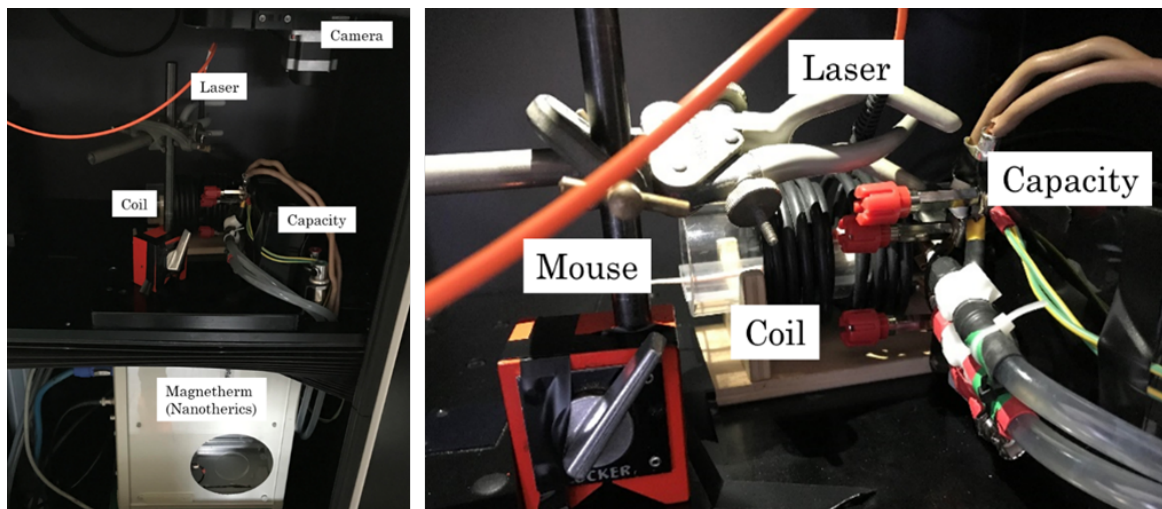


Figure E.II-1 : Dispositif d'hyperthermie magnétoinduite *in vivo*

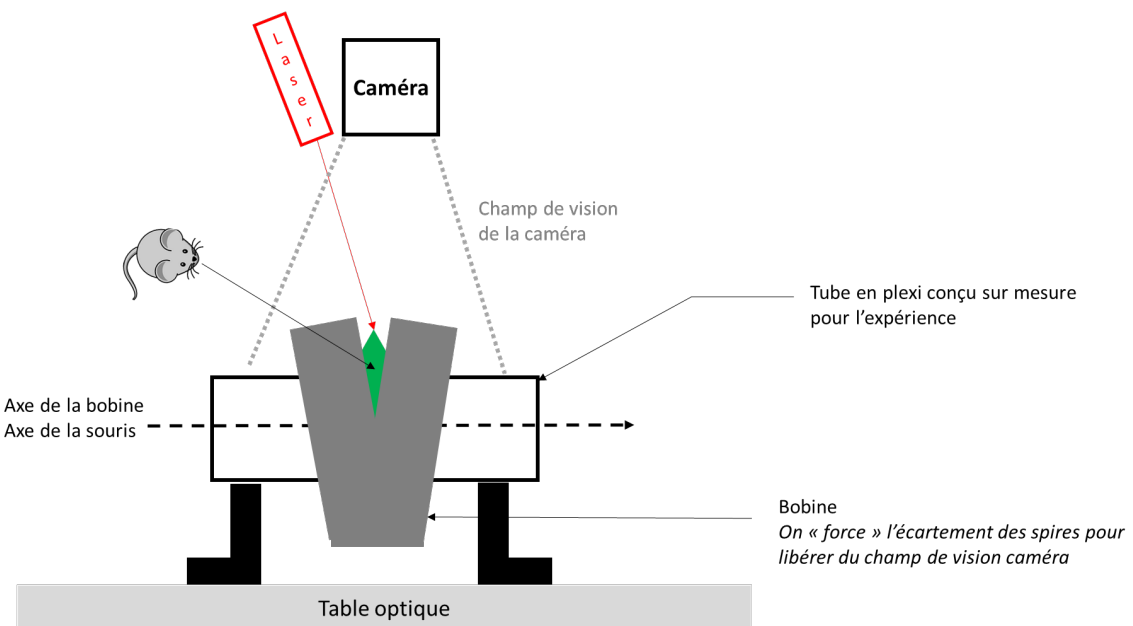


Figure E.II-2 : Support pour la souris conçu sur mesure pour l'expérience d'hyperthermie magnétoinduite *in vivo*

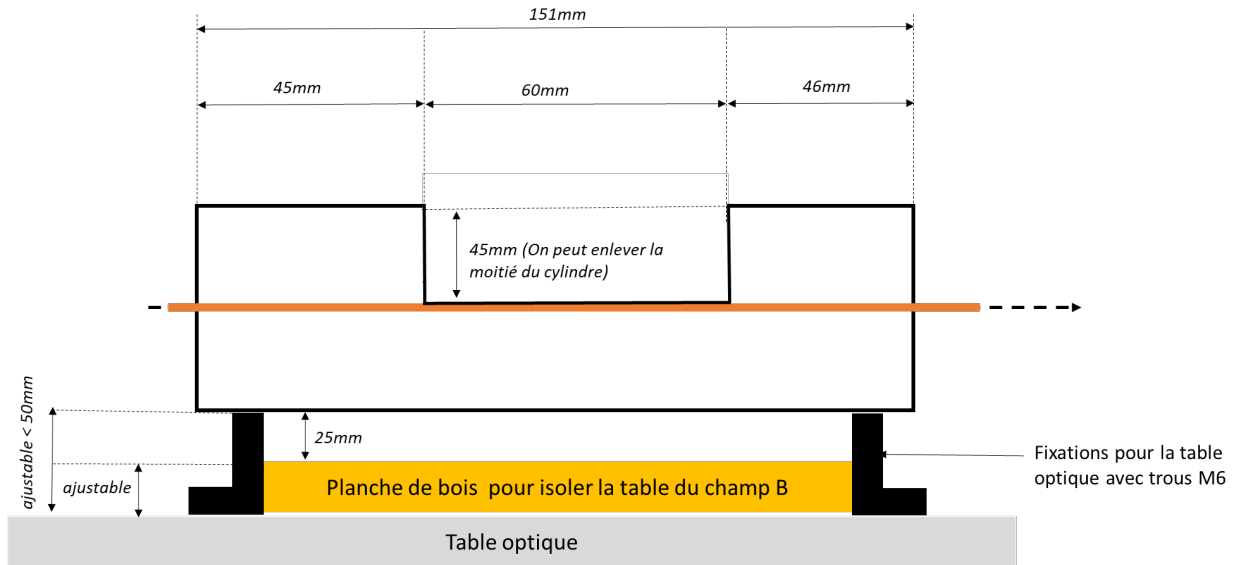


Figure E.II-3 : Cotations du support pour la souris conçu sur mesure pour l'expérience d'hyperthermie magnétoinduite *in vivo*

E.II.2. Description de l'expérience

Dans cette étude, nous avons suivi la température locale *in vivo*, grâce au signal de photoluminescence du sulfure d'argent, au voisinage de sources de chaleur excitées par un champ magnétique. Les nanothermomètres utilisés pour ce travail sont les nanoparticules de sulfure d'argent optimisées dans le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse. Les sources de chaleur sélectionnées pour cette étude sont les nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{Nanofleurs}}$) développées par l'équipe de **Stéphane Roux** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté).

Dans ce travail nous suivons, au cours d'un programme d'excitation optique et magnétique, la température intratumorale (grâce à la photoluminescence du sulfure d'argent) et à la surface de tumeurs (grâce à une caméra thermique) pour deux souris (nommées souris A et souris B) (figure E.II-4). La souris A, reçoit une injection intratumorale de 50 μL de nanoparticules de sulfure d'argent (2 mg.mL^{-1}) dispersées dans le PBS. La souris B reçoit une injection intratumorale de 50 μL d'une suspension contenant des nanothermomètres Ag_2S (2 mg.mL^{-1}) et des sources de chaleur $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{Nanofleurs}}$ ($25,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) dispersées dans le PBS (figure F.II-4). Pour chaque expérience, les souris, sous anesthésie générale (voie chimique), sont placées sur une plaque de Plexiglas coulissant à l'intérieur de la bobine (figure E.II-2). La température de l'eau circulant à l'intérieur de la bobine du générateur de champ magnétique est réglée à 38°C pour que la température interne des animaux reste stable pendant la période d'anesthésie. Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux sont irradiés à 31 mW.cm^{-2} avec un laser émettant à 808 nm. Le signal de photoluminescence des Ag_2S est suivi avec la caméra d'imagerie (Widy Sens 640 V-ST, New Imaging Technologies) intégrée au dispositif développé par la société BiospaceLab. Un cliché est acquis avec chaque filtre positionné devant le détecteur de sorte à pouvoir remonter au rapport d'intensité p_1 . Pour chaque filtre, le temps d'acquisition est de 0,5 s et le changement de filtre se fait en 0,3s. La température à la surface de la tumeur est suivie en simultanée grâce à une caméra thermique. Nous rappelons que le rapport d'intensité p_1 est tel que :

$$p_1(T) = \frac{\int_{1000\text{nm}}^{1150\text{nm}} i(\lambda,T)d\lambda}{\int_{1150\text{nm}}^{1400\text{nm}} i(\lambda,T)d\lambda}$$

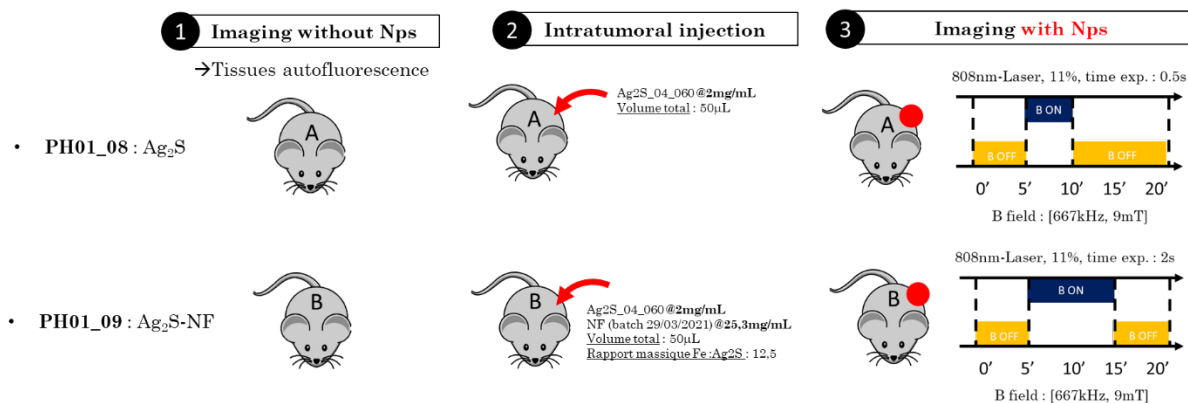


Figure E.II-4 : Description de l'expérience de couplage nanothermométrie – hyperthermie magnétique

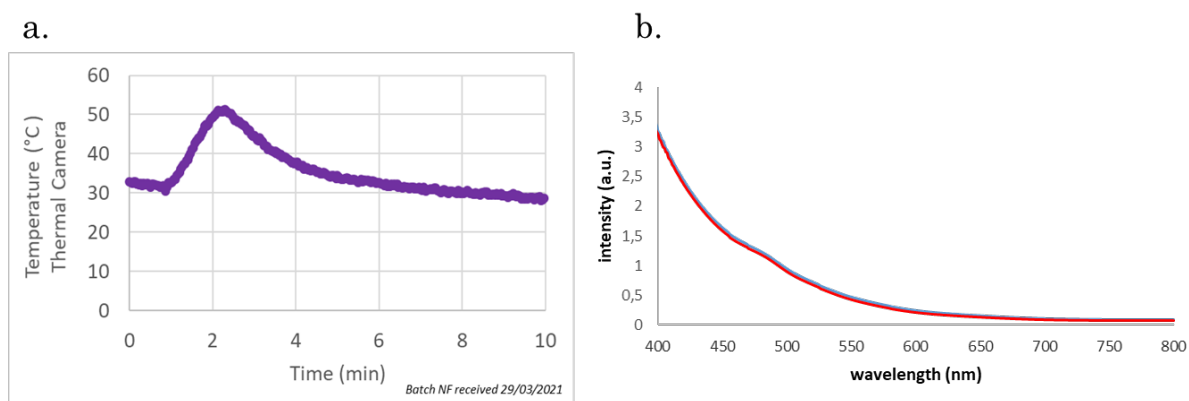


Figure E.II-5 : (a) Test de la sensibilité des nanofleurs de maghémite dispersées dans l'eau (33.8mg/mL) au champ magnétique [667 kHz, 9 mT]. La source d'excitation optique (laser 808 nm, 31 mW.cm⁻²) fonctionne pendant les 10 min d'expérience. Le champ magnétique est allumé entre t = 1 min et t = 2 min. L'excitation magnétique de la suspension aqueuse de maghémite induit une élévation de température de 20°C. (b) Spectres d'absorption des nanofleurs de maghémite un jour (bleu) et 100 jours (rouge) après la synthèse. Nous pouvons noter que les nanofleurs de maghémite absorbent très peu autour de 800 nm.

E.II.3. Résultats

Les souris A et B ont reçu la même quantité de nanoparticules de sulfure d'argent et sont soumises au même programme d'excitation optique et magnétique. La température à la surface de la tumeur de la souris A reste constante et égale à 35°C pendant toute la durée de l'expérience. En revanche, pour la souris B, ayant reçu une injection de Ag₂S et de nanofleurs de maghémite, des variations de température au cours du programme d'excitation sont observées. A t = 5 min, nous mesurons, grâce à la caméra thermique, une diminution brutale de 1,5°C (44,5°C à 43°C) de la température à la surface de la tumeur de la souris B. La température reste ensuite stable de t = 5 min à t = 9 min (figure E.II-6). Une augmentation de la température à la surface des tissus est mesurée à partir de t = 9 min soit 4 min après la mise en marche du champ magnétique (667 kHz, 9 mT). La température à la surface de la tumeur de la souris B passe alors de 43°C à 48°C entre t = 9 min et t = 11 min (2,5°C.min⁻¹) (figure E.II-6). L'excitation optique et magnétique des sources de chaleur engendre donc une élévation de la température à la surface de la tumeur trois fois plus rapide que l'excitation optique seule. En effet, lorsque la souris B est soumise à l'excitation optique seule (laser 808 nm, 31 mW.cm⁻²) (de t = 0 à t = 5 min et de t = 15 min à t = 20 min), la température à la surface de la tumeur augmente avec une rampe de 0,8°C.min⁻¹. D'après les mesures effectuées grâce à la caméra thermique, les nanofleurs de

maghémite sont donc sensibles à l'excitation optique (laser 808nm, 31 mW.cm⁻²) et à l'excitation magnétique (667 kHz, 9 mT) (figure E.II-6).

Les rapports d'intensité mesurés grâce au signal de photoluminescence du sulfure d'argent (figure E.II-7) sont très élevés par rapport aux rapports d'intensité mesurés pour établir le modèle d'étalonnage de la sonde de température Ag₂S (figure E.I-4). Pour la souris B, p₁ est stable autour de 1,2 et il varie entre 0,95 et 0,90 pour l'expérience réalisée avec la souris A⁴. D'après le modèle d'étalonnage (figure E.I-4), plus le rapport d'intensité p₁ est élevé, plus la température de cœur des Ag₂S est faible. Dans le cas des souris A et B, les températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage sur p₁ sont donc très faibles et sont même négatives (figure E.II-7). Ces valeurs de température sont incohérentes avec les conditions expérimentales et les mesures de température effectuées grâce à la caméra thermique (figure E.II-6).

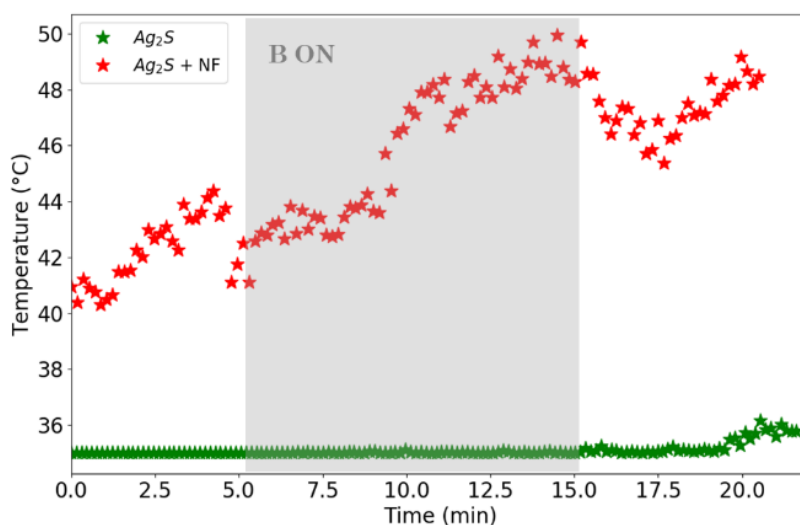


Figure E.II-6 : Mesure par caméra thermique de la température à la surface de la tumeur de la souris A (injection intratumorale des Ag₂S seules) et de la souris B (injection intratumorale de Ag₂S + γ -Fe₂O₃^{Nanofleurs}). Pendant les 20 min d'expérience, la source d'excitation optique est en marche (laser 808 nm, 31 mW.cm⁻²). La période d'excitation magnétique (667 kHz, 9 mT) se situe entre t = 5 min et t = 15 min.

⁴ Lorsque nous avons établi le modèle de calibration, avec le même lot de nanoparticules de sulfure d'argent que celui utilisé dans le cadre de cette étude, le rapport d'intensité p₁ valait 0,7 à 25°C et 0,6 à 40°C.

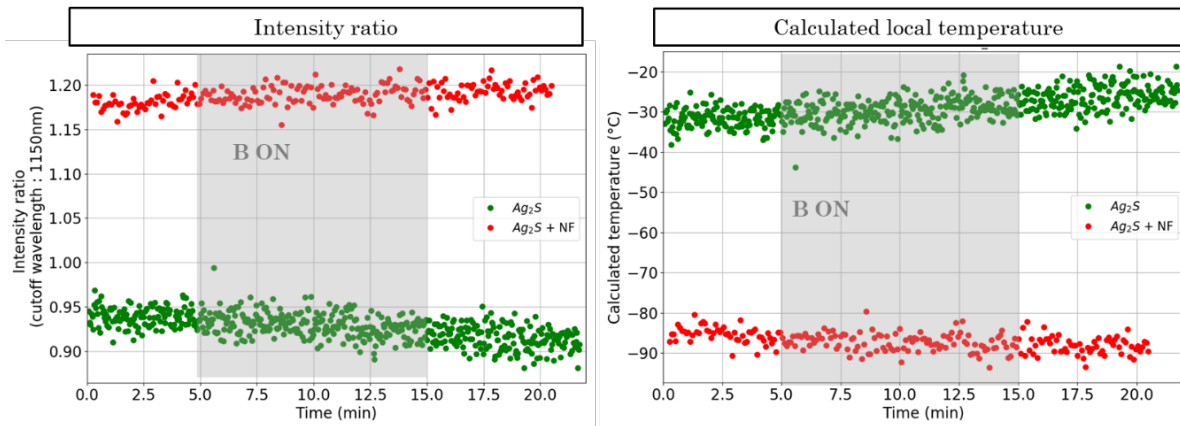


Figure E.II-7 : Évolution des rapports d'intensité p_1 (à gauche) et des températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage (figure F.I-4) sur p_1 (à droite). Pendant les 20 min d'expérience, la source d'excitation optique est en marche (laser 808 nm, 31 $mW.cm^{-2}$). La période d'excitation magnétique (667 kHz, 9 mT) se situe entre $t = 5$ min et $t = 15$ min.

E.III. Bilan

Nous avons eu l'opportunité de mener des expériences de nanothermométrie *in vivo* (modèle murin) en collaboration avec **Anikitos GAROFALAKIS** (BiospaceLab) et **Johanne SEGUIN** (UTCBS), membres du consortium NanoTBTech. Ces expériences ont permis de mettre en lumière les verrous technologiques nous empêchant actuellement d'effectuer une mesure de température robuste en profondeur dans les tissus biologiques.

Pour les expériences d'hyperthermie *in vivo*, certaines températures obtenues grâce au modèle d'étalonnage sur p_1 , à partir des spectres de photoluminescence des particules d' Ag_2S , ne sont pas cohérentes avec nos conditions expérimentales et les mesures de températures effectuées grâce à la caméra thermique. Cela peut être expliqué par plusieurs facteurs. Tout d'abord, le rapport signal/bruit est très faible pour les expériences *in vivo*. Le bruit a donc une contribution beaucoup plus importante dans les rapports d'intensité mesurés au cours de l'expérience *in vivo* que dans ceux mesurés pour construire le modèle d'étalonnage. Ensuite, l'interaction des photons émis par le sulfure d'argent avec les tissus tumoraux n'est pas prise en compte par le modèle d'étalonnage établi grâce à une suspension aqueuse de particules d' Ag_2S . Enfin, l'étalonnage de la sonde de température pour les expériences d'hyperthermie *in vivo* est effectué avec une densité de puissance laser (laser 808 nm à 0,09 $W.cm^{-2}$) presque 1000 fois plus élevée que dans les conditions expérimentales standards mises en jeu dans le document principal (LED-730 nm à 0,1 $mW.cm^{-2}$). Cela peut induire une élévation de la température de cœur du sulfure d'argent. L'hypothèse de travail consistant à admettre que la température de cœur du sulfure d'argent est égale à la température du milieu n'est donc pas valable ici.

F. Nanoplateforme nanothermomètre-nanosource de chaleur

Ag_2S -DTDTPA- γ - Fe_2O_3 nanofleurs

F.I. Contexte

Dans le chapitre 3 du document principal, nous avons étudié un système couplé $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En suspension aqueuse, nous avons montré que les deux nanoparticules étaient couplées grâce aux interactions électrostatiques, mais aucune organisation spatiale n'a été observée grâce à la microscopie électronique en transmission. Nous avons souhaité travailler sur un système couplé nanothermomètre-nanosource de chaleur avec lequel nous avons un meilleur contrôle de l'organisation spatiale.

Grâce à **Rana Bazzi** et **Stéphane Roux** (Institut UTINAM, Université Franche-Comté), les nanoparticules de Ag_2S -DTDTPA ont été greffées à des nanofleurs de maghémite pour former la nanoplateforme Ag_2S -DTDTPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$ (figure F-II-2). Nous avons montré que les Ag_2S -DTDTPA (présentés dans la troisième partie du chapitre 2 de ce manuscrit) seules émettent un signal centré autour de 1050 nm à 25°C. Ces nanoparticules ont un rendement quantique 10 fois supérieur (0,66%) au nanothermomètre de référence (0,07%) (optimisé dans le chapitre 2 du document principal). Néanmoins, lorsque les Ag_2S -DTDTPA sont greffées aux nanofleurs de maghémite, aucun signal de photoluminescence n'est détecté. Dans le futur, il serait intéressant d'effectuer de nouveaux essais de greffage des Ag_2S -DTDTPA à la surface des nanofleurs de maghémite en diminuant le rapport Fe/ Ag_2S . L'augmentation du nombre de nanoparticules de Ag_2S à la surface des sources de chaleur pourrait augmenter le rendement quantique de la nanoplateforme nanothermomètre-nanosource de chaleur.

F.II. Expérience

F.II.1. Démarche expérimentale

Nous avons étudié la sensibilité de la nanoplateforme Ag_2S -DTDTPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$ à l'excitation optique et magnétique, dans le cadre du programme d'excitation n°2, en mélangeant la nanoplateforme au nanothermomètre de référence (optimisé dans le chapitre 2 du manuscrit) en suspension aqueuse.

Un échantillon de 100 μL est placé dans le porte-échantillon, positionné au centre de la bobine. 20 μL d'une suspension aqueuse de nanothermomètre de référence (avec $[\text{Ag}_2\text{S}]=8,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ soit 166 μg de Ag_2S) sont mélangés à 80 μL d'une suspension aqueuse de nanoplateforme Ag_2S -DTDTPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$ (avec $[\text{Fe}]=8 \text{ mg.mL}^{-1}$ soit 640 μg de Fe). La photoluminescence du nanothermomètre de référence est suivie en temps réel au cours du programme d'excitation optique (LED-730 nm, 0,1 mW.cm^{-2}) et magnétique (487 kHz, 20 mT). La température locale (points orange) est obtenue grâce au signal de photoluminescence du nanothermomètre de référence et au modèle d'étalonnage (ii) établi sur p_1 . La température globale (étoiles orange) est mesurée dans la suspension aqueuse grâce à la sonde à fibre optique plongeant dans le milieu. La température locale mesurée grâce au nanothermomètre de référence est plus élevée que celle mesurée globalement dans le milieu.

F.II.2. Résultats

Les résultats sont présentés **figure F.II-1**. Dès l'instant initial $t=0$ (instant où la source d'excitation optique est mise en fonctionnement), la température sondée par les sulfures d'argent (35°C) est 15°C plus élevée que la température globale mesurée dans le milieu grâce à la sonde à fibre optique (20°C). Le régime permanent (localement et globalement) lié à l'excitation optique est atteint 5 min après le moment où la LED-730 nm est mise en fonctionnement. Au moment où le champ magnétique [487 kHz, 20 mT] est mis en marche, la température locale augmente avec une vitesse de $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les 20 min d'hyperthermie magnétoinduite engendrent une élévation de 10°C de la température sondée par les nanothermomètres. Dans les mêmes conditions, la température mesurée par la sonde à fibre optique augmente de 2°C globalement dans le milieu.

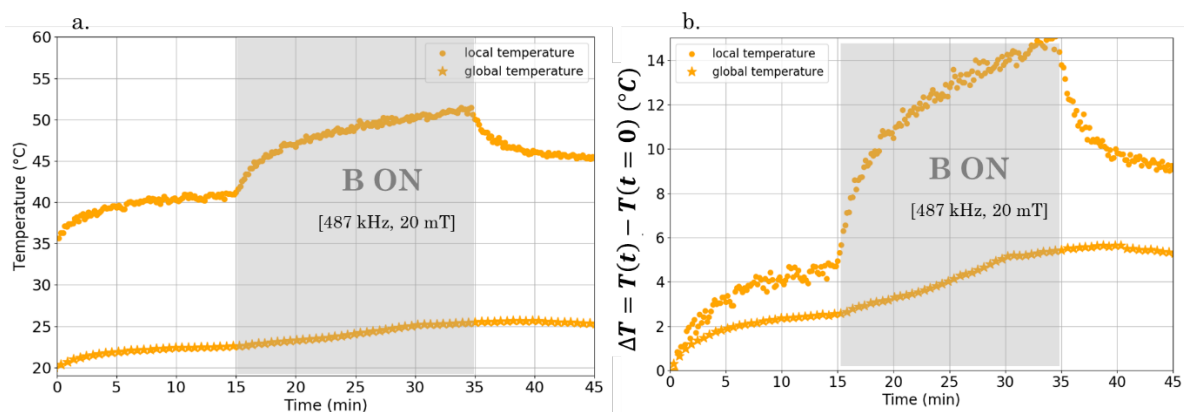


Figure F.II-1 : Un échantillon de $100\ \mu\text{L}$ est placé dans le porte-échantillon, positionné au centre de la bobine. $20\ \mu\text{L}$ d'une suspension aqueuse de nanothermomètre de référence (avec $[\text{Ag}_2\text{S}]=8,3\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ soit $166\ \mu\text{g}$ de Ag_2S) sont mélangés à $80\ \mu\text{L}$ d'une suspension aqueuse de nanoplateforme Ag_2S -DTDTPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanofleurs (avec $[\text{Fe}]=8\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ soit $640\ \mu\text{g}$ de Fe). La photoluminescence du nanothermomètre de référence est suivie en temps réel au cours du programme d'excitation optique (LED-730 nm, $0,1\ \text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) et magnétique (487 kHz, 20 mT). La température locale (points orange) est obtenue grâce au signal de photoluminescence du nanothermomètre de référence et au modèle d'étalonnage (ii) établi sur p_1 . La température globale (étoiles orange) est mesurée dans la suspension aqueuse grâce à la sonde à fibre optique plongeant dans le milieu. La température locale mesurée grâce au nanothermomètre de référence est plus élevée que celle mesurée globalement dans le milieu. La figure (a) représente les mesures de températures absolues et la figure (b) la différence entre la température mesurée à tout instant $T(t)$ et la température à l'instant initial $T(t=0)$.

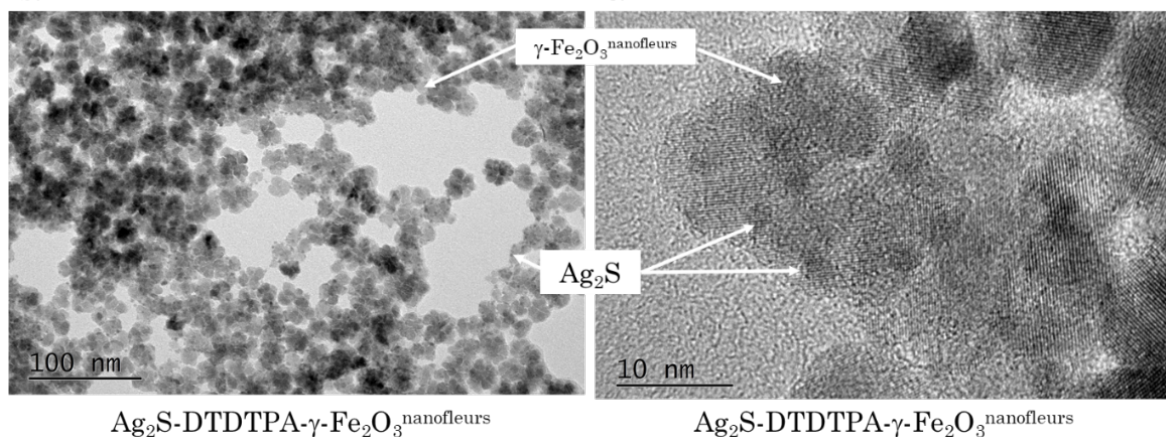


Figure F.II-2 : Cliché de Microscopie électronique en Transmission de (a) Ag_2S -DTDTPA et de (b et c) la nanoplateforme couplant Ag_2S -DTDTPA et les nanofleurs de maghémites (Ag_2S -DTDTPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanofleurs). Le rapport massique théorique $\text{Fe}/\text{Ag}_2\text{S}$ de la nanoplateforme vaut 2,3.

Comparons les résultats présentés dans le chapitre 3, obtenus dans le cadre du programme d'excitation n°2 de l'échantillon $\text{Ag}_2\text{S}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ avec les résultats de cette étude où les nanothermomètres Ag_2S sont au voisinage de la nanoplateforme $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$. Tout d'abord, la température sondée par les Ag_2S au voisinage des sources de chaleur est plus élevée que la température globale mesurée grâce à la sonde à fibre optique, et ce dès l'instant où la source d'excitation optique est mise en marche. Dans l'expérience réalisée avec les nanosphères $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la température initiale (à $t=0$ au moment de la mise en fonctionnement de la source d'excitation optique) sondée par les Ag_2S vaut 56°C (pour une température globale 20°C) ; au même instant, elle vaut 35°C (pour une température globale 22°C) dans l'étude réalisée avec $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$. Il est important de noter que la proportion massique source de chaleur/nanothermomètre est moins élevée dans l'expérience avec $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$ ($\text{Fe}/\text{Ag}_2\text{S}=4$)⁵ que dans celle réalisée avec les nanosphères $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\text{Fe}/\text{Ag}_2\text{S}=21$). Ensuite, après 15 min d'excitation optique (LED-730 nm, $0,1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$), l'augmentation de température mesurée par les Ag_2S au voisinage des nanofleurs de maghémite est de 4°C alors qu'elle est de 3°C au voisinage des nanosphères de maghémite. Enfin, après 15 min d'excitation magnétique [487 kHz, 20 mT], l'augmentation de température mesurée par les Ag_2S au voisinage des nanofleurs de maghémite est de 10°C alors qu'elle est de 8°C au voisinage des nanosphères de maghémite.

Pour cette étude, il est difficile de réaliser une étude critique quantitative des résultats obtenus, car l'organisation entre les nanothermomètres (Ag_2S) et les sources de chaleur ($\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$) n'est pas connue. Néanmoins, qualitativement, nous observons des tendances d'évolutions en température similaires à celle reportée pour les expériences menées avec les nanosphères $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

⁵ Dans ce rapport, on prend en compte la quantité de Ag_2S provenant du nanothermomètre ($\text{Ag}_2\text{S-11MUA}$ optimisé dans le chapitre 2) et la quantité de fer provenant du composé $\text{Ag}_2\text{S-DTDTPA}-\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3^{\text{nanofleurs}}$

Résumé

Nous avons développé une nanosonde de température basée sur la photoluminescence du sulfure d'argent. La mesure de température locale repose sur la dépendance du spectre d'émission du nanothermomètre à sa température de cœur. **Tout d'abord**, nous avons développé une méthode de production de nanocristal semiconducteur d'Ag₂S à faible impact environnemental. Les nanoparticules sont formées directement dans l'eau sous l'effet d'un court chauffage micro-ondes (5min). Nos matériaux sont « prêts à l'emploi », en une seule étape, grâce à l'utilisation d'un surfactant biocompatible et hydrophile. Le nanothermomètre optimisé dans ce travail (par rapport au rendement quantique et à la sensibilité thermique relative) a, **ensuite**, été utilisé pour mesurer, en temps réel, la température locale au voisinage de nanoparticules de maghémite (γ -Fe₂O₃) en milieux aqueux et cellulaire, au cours d'un programme d'excitation optique et magnétique. Notre étude montre que la température à la surface des sources de chaleur est 30°C plus élevée que la température globale mesurée en suspension aqueuse. **Enfin**, dans ce travail, une place centrale a été accordée à la métrologie de la mesure de température grâce aux nanosondes Ag₂S. En effet, le signal de photoluminescence exploité pour la nanothermométrie est caractéristique de la température, mais il dépend aussi de l'épaisseur et des propriétés optiques du milieu traversé par les photons. Nous proposons une méthode originale de traitement des données, permettant de prendre en compte l'interaction lumière-matière, pour un accès fiable à une résolution en température au sein du vivant, grâce au signal de photoluminescence des nanoparticules de sulfure d'argent.

Abstract

In the present work, we design a novel Ag₂S-based nanothermometer. **First**, we develop a method for the production of silver sulphide semiconductor nanocrystals with low environmental impact. Ag₂S nanoparticles are synthesised directly in water after a short microwave heating pulse (5 min). They are "ready to use", in a single step, thanks to a biocompatible and hydrophilic surfactant. **Then**, the Ag₂S nanothermometer optimised in this work (with respect to quantum efficiency and relative thermal sensitivity) is used to measure, in real time, the local temperature in the vicinity of maghemite nanoparticles in aqueous and cellular media, during an optical and magnetic excitation programme. Our study shows that the temperature at the surface of the heat sources is 30°C higher than the overall temperature measured in aqueous suspension. Ag₂S photoluminescence emission spectra, used for nanothermometry, is temperature specific, but it also depends on the thickness and optical properties of the medium crossed by photons before being transmitted to the detector. Thus, **eventually**, we develop an original method of data processing, allowing the light-matter interaction to be taken into account, for reliable access to temperature reading in biological media.