



HAL
open science

Microstructuration 2D de boites quantiques : biofonctionnalisation et imagerie NEF

Paul Robineau

► **To cite this version:**

Paul Robineau. Microstructuration 2D de boites quantiques: biofonctionnalisation et imagerie NEF. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. UTT-Université de Technologie de Troyes, 2022. Français. NNT: 2022TROY0039 . tel-04280646

HAL Id: tel-04280646

<https://hal.science/tel-04280646v1>

Submitted on 11 Nov 2023

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.

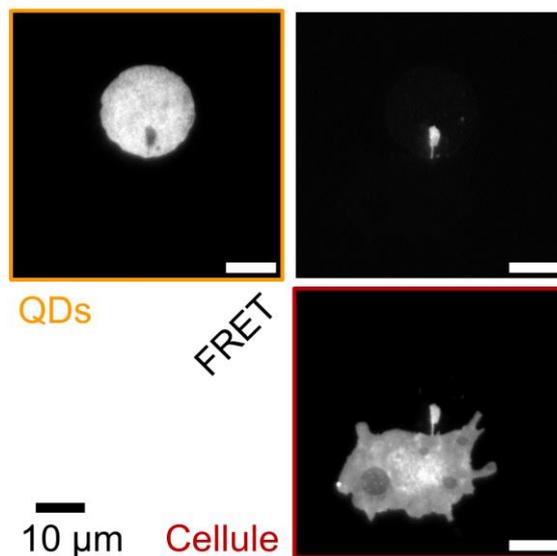


Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Thèse
de doctorat
de l'UTT

Paul ROBINEAU

Microstructuration 2D de boîtes quantiques : biofonctionnalisation & imagerie NEF



Champ disciplinaire :
Sciences pour l'Ingénieur

2022TROY0039

Année 2022

THESE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR
de l'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE TROYES
en SCIENCES POUR L'INGENIEUR

Spécialité : MATERIAUX, MECANIQUE, OPTIQUE ET NANOTECHNOLOGIE

présentée et soutenue par

Paul ROBINEAU

le 16 décembre 2022

**Microstructuration 2D de boîtes quantiques :
biofonctionnalisation et imagerie NEF**

JURY

M. Michaël MOLINARI	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Président
Mme Hélène DELANOË-AYARI	MAITRE DE CONFERENCES - HDR	Rapporteure
M. Ngoc Diep LAI	MAITRE DE CONFERENCES - HDR	Rapporteur
M. Pascal DIDIER	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Examineur
Mme Aurélie DUPONT	CHARGÉE DE RECHERCHE CNRS - HDR	Examinatrice
M. Rodolphe JAFFIOL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Directeur de thèse

Personnalités invitées

M. Thomas PONS	CHARGE DE RECHERCHE INSERM - HDR	
M. Cyrille VEZY	PROFESSEUR ASSISTANT UTT	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Hélène Delanoë-Ayari et Ngoc Diep Lai, pour avoir accepté de contribuer à la qualité de ce document par le rôle de rapportrice et rapporteur ; ainsi que Pascal Didier, Aurélie Dupont, et Michael Molinari pour leur participation à mon jury de soutenance.

Ce travail de doctorat a été mené dans l'unité recherche L2n¹ de l'Université de technologie de Troyes, et à ce titre mes pensées vont à l'ensemble des personnes y travaillant où y ayant travaillé sur le temps de ce projet de recherche. Cela aura été un cadre humain particulièrement confortable pour développer mes travaux, tant sur l'accompagnement entre pairs que pour les discussions au-delà du cadre scientifique. J'adresse en particulier ma reconnaissance à Régis Deturche, Jérémie Béal et Serguei Kochtcheev pour leurs contributions directes et indirectes à mes recherches, par leur bonhomie quotidienne et, plus prosaïquement, leur gestion de la plateforme Nano'Mat – on oublie souvent de reconnaître à leur juste valeur l'importance de l'infrastructure proprement technique de la recherche². Merci à William pour son amitié ; Anna pour son enthousiasme permanent ; Théo, Anisha ; Agnieszka ; pour le temps pris à échanger sur divers processus expérimentaux ; et un remerciement tout particulier à Aurélie Brousier pour son humour, et pour m'avoir donné l'occasion de contribuer à des travaux connexes à mon sujet principal. Enfin, je salue Christophe Couteau et Jérôme Plain, respectivement directeur de l'unité de recherche et directeur adjoint de l'UTT, pour leur accueil, leur capacité d'écoute, et nos échanges sur la nécessité de prise en compte des enjeux socio-écologiques dans le milieu académique.

Impossible d'ailleurs de ne pas mentionner que ces 3 années de doctorat n'ont pas seulement été un temps de recherche, mais aussi un temps d'enseignement et d'engagement associatif. À ce titre, je remercie Lou Grimal, Claudine Gillot et Tatiana Reyes, de l'unité de recherche InSyTE³ de l'UTT, pour m'avoir accordé leur confiance, me permettant de contribuer à la création de l'unité d'enseignement "Modélisation des interactions Humain-e-s – Systèmes techniques – Nature". Je remercie aussi Davy Gérard, responsable du programme d'ingénierie MTE⁴, d'avoir acté la création de cet enseignement ; ainsi que Timothée Toury, initiateur et secrétaire général de l'EUT+⁵, pour m'avoir permis de participer à la formalisation de ce projet, et pour son accompagnement dans mon parcours. Ma gratitude va enfin au collectif UTTransition et l'association Ulisse⁶, déterminés depuis longtemps à faire vivre la discussion des enjeux socio-écologiques à l'UTT.

1. *Light, nanomaterials & nanotechnologies.*

2. De manière analogue, une personne comme Alexandra Elbakyan est sans aucun doute une, si ce n'est la contributrice majeure à la possibilité même de faire des sciences au XXI^{ème} siècle.

3. *Interdisciplinary research on Society-Technology-Environment interactions.*

4. Matériaux : technologie et économie.

5. *European University of Technology.*

6. Union locale d'ingénierie sociale, solidaire et environnementale.

Ces détours ne sauraient faire oublier la contribution déterminante de mes directeurs de thèse, Cyrille Vézy et Rodolphe Jaffiol, sur tous les plans. Je vous remercie infiniment pour votre éthique d'encadrement, qui vous conduit à privilégier la qualité du suivi au nombre de doctorant·e·s ou stagiaires sous votre responsabilité. Et cela, sans sacrifier mon autonomie dans l'organisation de mes activités ; me donnant ainsi l'occasion de proposer des *designs* d'expérimentation ou de poursuivre des fils de recherche connexes. Cette qualité d'encadrement s'est aussi manifestée dans le fait de m'avoir laissé errer quand il le fallait, de manière à me faire développer des compétences intimement liées certaines expériences spécifiques⁷. J'admire votre détermination à continuer de faire vous-mêmes les manipulations expérimentales les plus "basiques" et à maîtriser l'intégralité des processus pratiques impliqués, sans jamais rogner sur les exigences de compréhension théorique et de rigueur interprétative. Toutes les discussions liées ont été extrêmement importantes pour moi. Merci, enfin, pour tous les échanges extra-scientifiques qui ont jalonné ce travail commun durant 3 ans.

Je tiens aussi à tout particulièrement remercier Thomas Pons du LPEM⁸ de l'ESPCI Paris. Ton accompagnement de ces travaux, ta gentillesse et ta disponibilité pour répondre à mes questions les plus diverses – sur les détails les plus théoriques des boîtes quantiques, notamment au printemps 2020, jusqu'aux aspects les plus pratiques – me conduisent à te considérer comme un quasi 3^e directeur de thèse.

Bien que ce soit particulièrement convenu, je ne peux pas ne pas adresser ma reconnaissance à ma famille, en particulier mes parents comme mon frère et ma sœur, pour leur soutien malgré le peu de temps que je leur ai accordé.

Pour finir, je manifeste ma fierté de pouvoir compter parmi mes ami·e·s et amours des personnes aussi extraordinaires, avec qui l'expression "famille choisie" prend tout son sens. Merci à Adam, Adrien, Aliou, Audrey, Axel, Baptiste, Camille, Charles, Clément, Eddy, Éloi, Juliette, Marianne, Marius, Morghane, Pierre, Pierre-Louis, Valentin, Simon ; au Croc'llectif devenu compagnie Grande ; et tout·e·s les autres qui se reconnaîtront, pour tous ces moments et projets collectifs partagés – depuis plus de 10 ans pour certain·e·s. À Maya-Lune et Quentin : merci, pour tout.

7. Je pense, au particulier, au montage du dispositif TIRF, qui m'a permis de dépasser mon aversion pré-existante pour l'optique géométrique.

8. Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux.

Table des matières

INTRODUCTION 7

1 ÉLÉMENTS DE BIOPHYSIQUE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE 11

1.1 DYNAMIQUES DU VIVANT 11

1.1.1 Généralités 11

1.1.2 Adhésion cellule/substrat 13

1.2 TECHNIQUES POUR ÉTUDIER L'ADHÉSION 17

1.2.1 Méthodes pour l'étude des forces d'adhésion 17

1.2.2 Méthodes d'imagerie optique pour l'étude de l'adhésion 19

1.2.3 Contrôle de l'adhésion et migration cellulaire 24

1.3 CONCLUSIONS SUR L'ÉTUDE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE 26

2 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL : PRINCIPES, THÉORIE, ET MONTAGE 27

2.1 FLUORESCENCE & LUMINESCENCE 27

2.1.1 Introduction 27

2.1.2 Bases de la théorie quantique de la fluorescence 27

2.2 TRANSFERT D'ÉNERGIE NON-RADIATIF DE TYPE FÖRSTER 30

2.2.1 FRET : formalisme théorique 30

2.2.2 Exemples d'imagerie FRET en biologie 35

2.2.3 Analyse quantitative en FRET 36

2.3 IMAGERIE DE FLUORESCENCE GRAND-CHAMP 39

2.3.1 Imagerie en épifluorescence 39

2.3.2 Principes de l'imagerie TIRF 40

2.4 MONTAGE EXPÉRIMENTAL 41

2.4.1 Description du montage 41

2.4.2 Caractérisation du dispositif TIRF 45

2.5 CONCLUSIONS SUR LE DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL NEFI 49

3 BOITES QUANTIQUES (QDs) : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS 51

3.1 PROPRIÉTÉS FONDAMENTALES 51

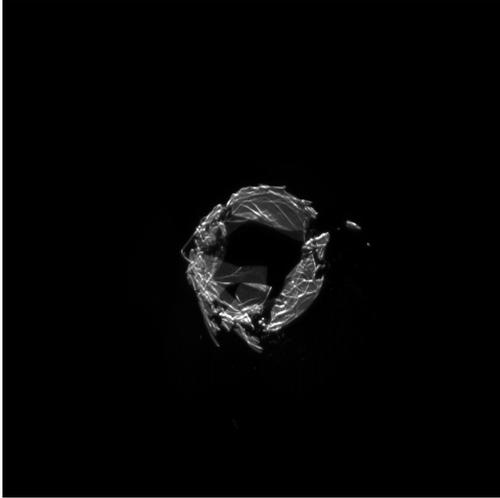
3.1.1 Structure et confinement électronique 51

3.1.2 Propriétés photophysiques des QDs 53

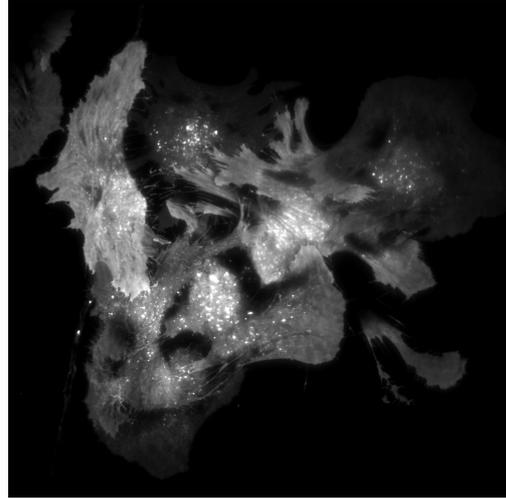
3.2	SYNTHÈSES ET CARACTÉRISATIONS EN SOLUTION	56
3.2.1	Banc de synthèse	56
3.2.2	Synthèses réalisées	57
3.2.3	Caractérisations photo-physiques	64
3.3	ÉCHANGES DE LIGANDS DE SURFACE	70
3.3.1	Diversité des molécules et applications	70
3.3.2	Protocoles d'échanges de ligands	75
3.3.3	Caractérisations spectrales en solution et sur surfaces	76
3.4	CONCLUSIONS SUR LES BOITES QUANTIQUES	79
4	MICROSTRUCTURATION DES SURFACES	81
4.1	FONCTIONNALISATION À GRANDE ÉCHELLE DE LAMELLES DE VERRE	81
4.1.1	Méthodes de fonctionnalisation existantes	81
4.1.2	Nettoyage et activation des surfaces	82
4.1.3	Silanisation de lamelles de verre	83
4.1.4	Adsorption des QDs	89
4.2	MICROSTRUCTURATION DES QDs	95
4.2.1	Choix du procédé	95
4.2.2	Photo-lithographie UV avec PRIMO	96
4.2.3	Développement du protocole de microstructuration	98
4.2.4	Résolution et homogénéité des micro-motifs 2D de QDs	104
4.3	CONCLUSIONS SUR LA MICROSTRUCTURATION DES QDs	106
5	SURFACES ACTIVES POUR L'IMAGERIE NEF	107
5.1	PRINCIPE	107
5.1.1	Chélation et complexes de coordination	107
5.1.2	Ligands à ancrage Imidazole	108
5.2	FRET EN SOLUTION AQUEUSE	110
5.2.1	Méthodologie	110
5.2.2	Absence de FRET avec les QDs[DHLA-SB]	110
5.2.3	FRET avec les QDs[MPA]	111
5.3	FRET SUR SURFACES MICROSTRUCTURÉES	115
5.3.1	Signal d'excitation directe l'accepteur à 458 nm	115
5.3.2	Compétition entre chélation et adsorption résiduelle	116
5.3.3	Mise en évidence du FRET sur les microstructures	120
5.4	CONCLUSIONS SUR LES SURFACES ACTIVES POUR NEFI	130
6	APPLICATIONS À L'ÉTUDE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE	131
6.1	ADHÉSION CELLULAIRE SPÉCIFIQUE SUR MICROSTRUCTURES	131
6.1.1	Dynamique d'étalement sur surfaces homogènes	131

6.1.2 Adhésion cellulaire sur microstructures	134
6.2 OBSERVATION DU RÉCEPTEUR EGFR	135
6.2.1 Marquages cellulaires	135
6.2.2 Résultats de l'étude NEFI	137
6.3 PERSPECTIVES	140
6.3.1 FRET sur cellules vivantes par marquage membranaire	140
6.3.2 Super-résolution latérale par clignotement de l'accepteur	142
6.4 CONCLUSIONS SUR L'APPLICATION AUX ÉTUDES D'ADHÉSION CELLULAIRE	147
CONCLUSION	149
BIBLIOGRAPHIE	155

À toutes ces expériences "ratées" qui, néanmoins, produisent des images incomparables...



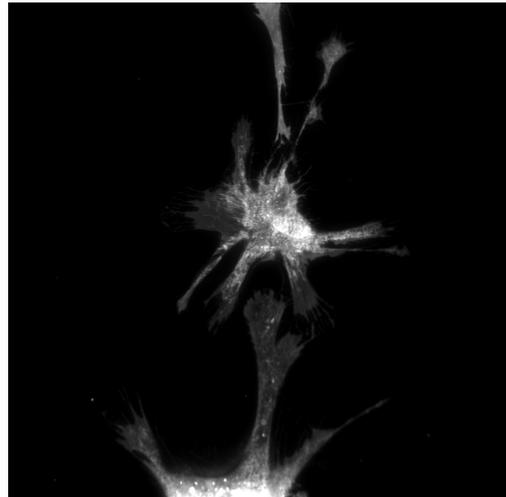
Cristal



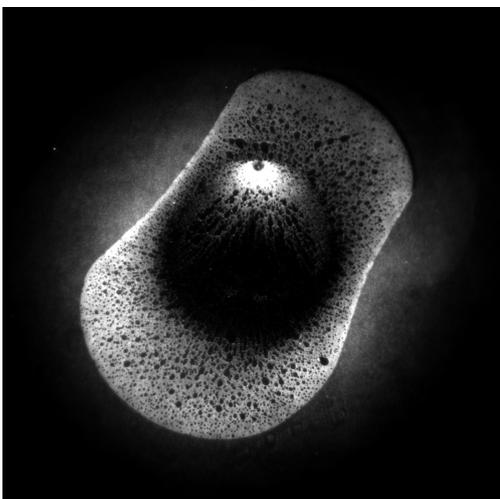
Dragon



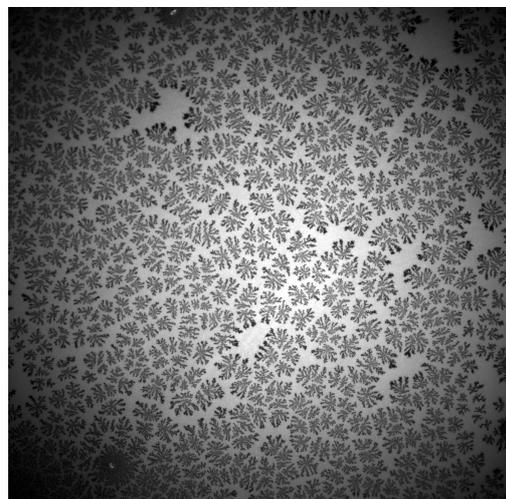
Pégase



Fleur



Abyss



Léopard

Introduction

CONTEXTE

L'imagerie optique est un champ de recherche important des sciences du vivant, et tout particulièrement de la biologie cellulaire. Les dimensions caractéristiques des phénomènes mis en jeu sont très variées : les tailles des cellules de mammifères vont typiquement de 1 à 100 μm de diamètre, l'ordre de grandeur des tailles des protéines est plutôt le nm [1]. Ainsi, l'un des défis importants de l'imagerie contemporaine en biologie cellulaire est d'accéder à des informations relatives à des phénomènes de dimensions nanométriques, tout en conservant une vue d'ensemble des cellules et donc un large champ d'observation.

Le cas de l'adhésion cellulaire est, à ce titre, représentatif. Ce phénomène met en jeu un ensemble d'interactions spécifiques et non-spécifiques¹. La spécificité est liée à la reconnaissance entre un *ligand* et un *récepteur* transmembranaire. Dans le cadre de l'adhésion cellulaire, les cadhérines sont des récepteurs impliqués dans l'adhésion intercellulaire, et les intégrines dans l'adhésion avec le micro-environnement des cellules [2]. Ce milieu, aussi appelé matrice extra-cellulaire (ECM²), est constitué de l'agencement complexe de diverses molécules et protéines [2, 3]. L'interaction spécifique des intégrines avec certaines de ces protéines constitue la base de la formation de plaques d'adhésion reliant le cytosquelette des cellules à l'ECM – Figure 1. L'adhésion est associée à l'ouverture de multiples canaux de signalisation à double-sens, qui affectent l'intégralité du comportement cellulaire [4].

La compréhension fine de ces phénomènes bio-physico-chimiques nécessite des outils permettant de rendre compte de l'articulation entre les interactions protéiques et le comportement global de la cellule, ce qui met en avant les aspects dynamiques de l'adhésion. Or, comme j'aurais l'occasion de le détailler durant le chapitre 1, les techniques majoritairement utilisées actuellement permettent d'étudier un ou plusieurs aspects du phénomène, mais au prix de compromis parfois très importants. Par exemple, la microscopie optique, comme le contraste de phase, permet d'accéder aux comportements globaux grâce à son grand champ d'observation et à une vitesse d'acquisition élevée, mais l'étude précise des zones d'adhésion est impossible en raison de la limite de résolution due à la diffraction (~ 250 nm dans le visible). À l'opposé, les méthodes modernes dépassant la limite de diffraction³ sont limitées en termes de champ d'observation, de dynamiques temporelles accessibles et, de façon plus cruciale, elles sont généralement incompatibles avec l'étude de cellules vivantes en raison des fortes irradiances d'excitation utilisées.

1. Interactions de Van der Waals, interactions électrostatiques, répulsion stérique, hydrophobe, etc.

2. *Extra Cellular Matrix*.

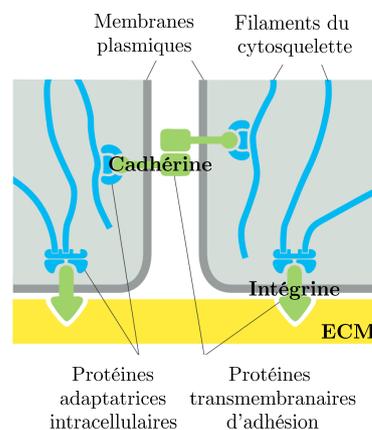


FIGURE 1 – Illustration des protéines d'adhésion transmembranaires reliant le cytosquelette aux structures extracellulaires. Adapté de [2].

3. Que l'on considère le cas des techniques dites de super-résolution optique ou même la microscopie électronique.

L'imagerie NEF, pour *Non-radiative Excitation Fluorescence*⁴, est une proposition de technique s'inscrivant dans la famille des méthodes optiques utilisées pour étudier l'adhésion cellulaire, qui vise à s'affranchir de la limite de diffraction [5]. Basée sur le phénomène de transfert d'énergie non-radiatif de type Förster (FRET), l'imagerie NEF se propose de donner accès à la dynamique spatio-temporelle des points focaux d'adhésion de cellules vivantes. Cette technique repose sur l'utilisation de surfaces de verre rendues "optiquement actives" *via* leur fonctionnalisation par des boîtes quantiques (QDs). Ces dernières jouent le rôle de donneurs dans le cadre du FRET. Ce phénomène de transfert à courte portée – quelques nm – permet alors de détecter des molécules fluorescentes⁵ lorsqu'elles sont à grande proximité du substrat. Les précédents travaux de l'équipe ont ainsi démontré la possibilité de mesurer la hauteur d'une membrane lipidique avec une résolution axiale nanométrique, pour des temps d'acquisition faibles et des puissances lasers minimales [6].

Parallèlement à ces enjeux, la diversité des comportements d'adhésion des cellules sur un substrat 2D – y compris au sein d'une même lignée cellulaire – a conduit au développement de surfaces permettant de contrôler l'adhésion, comme le *micropatterning* [7]. L'idée est de reproduire les contraintes géométriques et mécaniques, ainsi que la composition de la matrice extra-cellulaire, en microstructurant la répartition des protéines d'adhésion à la surface de substrats plus ou moins rigides.

L'enjeu de cette thèse a donc été de poursuivre le développement de l'imagerie NEF au regard de ces exigences. À partir de la maîtrise de la synthèse et des échanges de ligands de surface des boîtes quantiques, j'ai développé une méthode de microstructuration 2D de ces dernières en conjuguant une fonctionnalisation covalente *bottom-up* et une microstructuration *top-down* par photolithographie dans le proche UV. L'étape de microstructuration, à l'aide d'un dispositif numérique à micro-miroirs (DMD), permet d'obtenir des monocouches de QDs denses, dont on peut aisément contrôler la forme, avec une résolution micrométrique. Je montre ensuite la possibilité de biofonctionnaliser ces motifs de façon spécifique avec un ligand chélatant le zinc en surface des QDs. Ce ligand terminé RGD permet l'adhésion spécifique des cellules sur les micro-motifs de QDs. Outre la mise en évidence du FRET entre des cellules et nos substrats, j'ai également exploré l'association de l'imagerie NEF avec une méthode de super-résolution, basée sur la fluctuation de l'émission de l'accepteur FRET, pour augmenter la résolution latérale.

4. Qu'on abrégera donc parfois NEFI, avec I pour *Imaging*. Précédemment nommée NEFM, le M renvoyant à *Microscopy*.

5. Typiquement au niveau de la membrane cellulaire, ou marquant une protéine impliquée dans les points focaux d'adhésion.

APERÇU DE LA THÈSE

CE DOCUMENT EST DIVISÉ EN SIX CHAPITRES.

LE CHAPITRE 1 présente le contexte scientifique de la biophysique de l'adhésion cellulaire. Il s'attarde en particulier sur les méthodes employées pour son étude.

LE CHAPITRE 2 sert d'introduction au cadre théorique de l'imagerie NEF : la luminescence/fluorescence et le transfert d'énergie non radiatif de type Förster. Y sont aussi décrits les principes de l'imagerie grand-champ de type TIRF, ainsi que la mise en place du montage optique utilisé durant le projet doctoral.

LE CHAPITRE 3 expose les propriétés générales des boîtes quantiques (QDs), nanocristaux de semi-conducteurs particulièrement intéressants pour l'imagerie NEF. Il détaille la prise en main de leur synthèse et la modification de leurs ligands, ainsi que les différentes caractérisations photophysiques réalisées.

LE CHAPITRE 4 présente le développement et la caractérisation de la fonctionnalisation et de la microstructuration de surfaces de verre par nos QDs, afin d'obtenir des substrats adaptés à l'imagerie NEF.

LE CHAPITRE 5 se focalise sur la démonstration de la possibilité de fonctionnalisation des surfaces microstructurées pour l'imagerie NEF. Je présente notamment la nécessité de passiver le verre autour des micro-motifs, ainsi qu'une analyse de FRET quantitatif dans une situation modèle.

LE CHAPITRE 6 expose les travaux réalisés sur le *multipatterning* cellulaire, et les enjeux d'une étude NEFI en situation réelle. Je poursuis en élaborant autour des perspectives de localisation XY super-résolue des accepteurs FRET, à partir de la fluctuation de leur émission.

LA CONCLUSION synthétise les apports de mon travail et discute les possibilités d'optimisation écologique du processus de microstructuration développé.

Éléments de biophysique de l'adhésion cellulaire

1

Dans ce chapitre, je vais présenter plus en détail le contexte scientifique de la thèse. Je vais introduire les bases de l'adhésion cellulaire, puis je recenserai les principaux types de méthodes employées pour étudier et mesurer l'adhésion de cellules vivantes.

1.1 DYNAMIQUES DU VIVANT

1.1.1 GÉNÉRALITÉS

1.1.1.1 Omniprésence de l'adhésion et de la migration

L'adhésion cellulaire joue un rôle de premier plan dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques¹. Ainsi, la prolifération cellulaire, le développement embryonnaire, ou la réponse inflammatoire contrôlent la manière dont les cellules adhèrent et migrent dans l'organisme [2]. Ces différents processus résultent d'interactions complexes entre les cellules et leur milieu : la matrice extra-cellulaire (ECM). Par ces interactions, diverses voies de signalisation intracellulaires sont activées et régulent l'adhésion par l'intermédiaire du cytosquelette.

Les situations où l'adhésion joue un rôle crucial sont nombreuses. Les phénomènes de croissance tumorale², de vascularisation tumorale³, et la métastatisation des cancers⁴ sont des exemples classiques de pathologies associés à des dérèglements de l'adhésion et de la migration. L'évolution des interactions entre cellules et matrice extra-cellulaire est ainsi essentiel pour chaque aspect de l'organisation, de la fonction et de la dynamique des structures multicellulaires, ce qui motive l'étude de ces phénomènes jusqu'à l'échelle de cellules uniques. Ici, je présenterais essentiellement des éléments relatifs à l'adhésion de cellules uniques avec la matrice extra-cellulaire⁵

1.1.1.2 La matrice extra-cellulaire (ECM)

Le milieu des cellules est un mélange complexe de différentes macromolécules, produites par les cellules elles-mêmes. On y trouve en premier lieu des glycosaminoglycanes (GAGs) – polysaccharides fortement chargés négativement se liant aux protéines pour former des protéoglycanes – et des protéines fibreuses longues et rigides : les collagènes. Ces composants structurent l'architecture et les propriétés mécaniques de la matrice – Figure 1.1 (a) et (b). Le 3^{ème} groupe est constitué de glycoprotéines, la plus connue étant la fibronectine, formée de 2 grandes sous-unités jointes par un pont di-sulfure – Figure 1.1 (c).

1.1 Dynamiques du vivant	11
Généralités	
Adhésion cellule/substrat	
1.2 Techniques pour étudier l'adhésion	17
Méthodes pour l'étude des forces d'adhésion	
Méthodes d'imagerie optique pour l'étude de l'adhésion	
Contrôle de l'adhésion et migration cellulaire	
1.3 Conclusions sur l'étude de l'adhésion cellulaire	26

1. Cette partie de chapitre a été construite essentiellement à partir des références [2, 8, 9].

2. Dérèglement de la prolifération cellulaire et du comportement migratoire.

3. Migration des cellules endothéliales vers la tumeur.

4. Migration des cellules tumorales de la tumeur primaire via le réseau sanguin.

5. En situation physiologique, les cellules adhèrent entre elles, et les adhésions cellule-ECM et cellule-cellule interagissent [10, 11].

Ce dernier type de protéines est notamment étudié en synthétisant des séquences peptidiques particulières, dont on teste l'interaction avec les récepteurs transmembranaires associés à l'adhésion. C'est ainsi que la séquence peptidique RGD (tri-peptide Arginine – Glycine – Acide aspartatique) a pu être identifiée comme interagissant spécifiquement (*ligand*) avec certaines intégrines (*récepteur*) des cellules [2, 12, 13]. Enfin, diverses enzymes et facteurs de croissance jouent un rôle homéostatique dans la matrice, en régulant les interactions cellules-ECM. Les enzymes activent ou clivent les protéines, ce qui réorganise continuellement la matrice extra-cellulaire. Les facteurs de croissance, synthétisés dans l'ECM, peuvent être libérés par l'activité enzymatique et influencent la croissance, la différenciation, le métabolisme, ainsi que l'adhésion et la migration. En particulier, le facteur de croissance EGF est présenté plus en détail dans le chapitre 6, section 6.2.1.2, car sur-exprimé par une lignée cellulaire que j'ai pu étudier.

1.1.1.3 Rôle du micro-environnement

Les facteurs environnementaux sont ainsi déterminants pour comprendre les dynamiques de l'adhésion et de la migration des cellules [8]. Les principales influences sont illustrées sur la Figure 1.2 avec leurs voies de signalisation [14]. Les facteurs influençant les cellules peuvent être bio-chimiques, comme on vient de le voir :

- On parle alors de *chimiotaixie* lorsque ces derniers diffusent dans l'environnement des cellules. La distribution de ces espèces chimiques peut être isotrope ou sous la forme de gradients de concentration, auquel cas il est possible d'observer un phénomène de migration dirigée.
- Lorsque les marqueurs biochimiques sont liés à une surface, comme c'est typiquement le cas pour une matrice extra-cellulaire supportant des cellules épithéliales, le terme employé est *haptotaixie*. Ce champ n'est actuellement compris que très incomplètement, en raison de la complexité des interactions entre les cellules (qui produisent et modifient l'ECM) et l'ECM (qui influence le comportement des cellules).
- Les cellules ont aussi la capacité de détecter des différences de rigidité de leur substrat – *durotaixie*. Une variation de cette rigidité peut ainsi promouvoir la croissance et vascularisation tumorale.
- La *topotaixie* est un processus parallèle, où les cellules détectent les variations topologiques de leur substrat.
- Enfin, pour donner un exemple d'influence moins évidente, il a aussi pu être montré que les cellules réagissaient à des champs électriques transitoires – *galvanotaixie* – comme par exemple dans le cas de la cicatrisation.

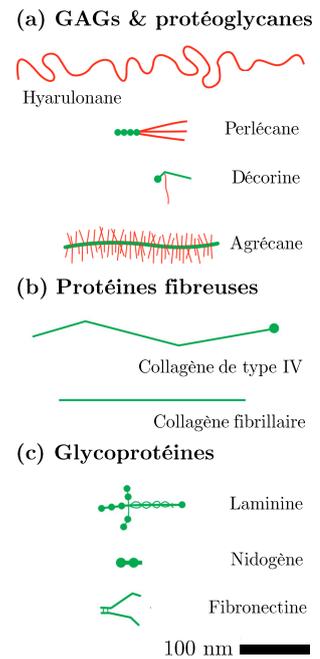
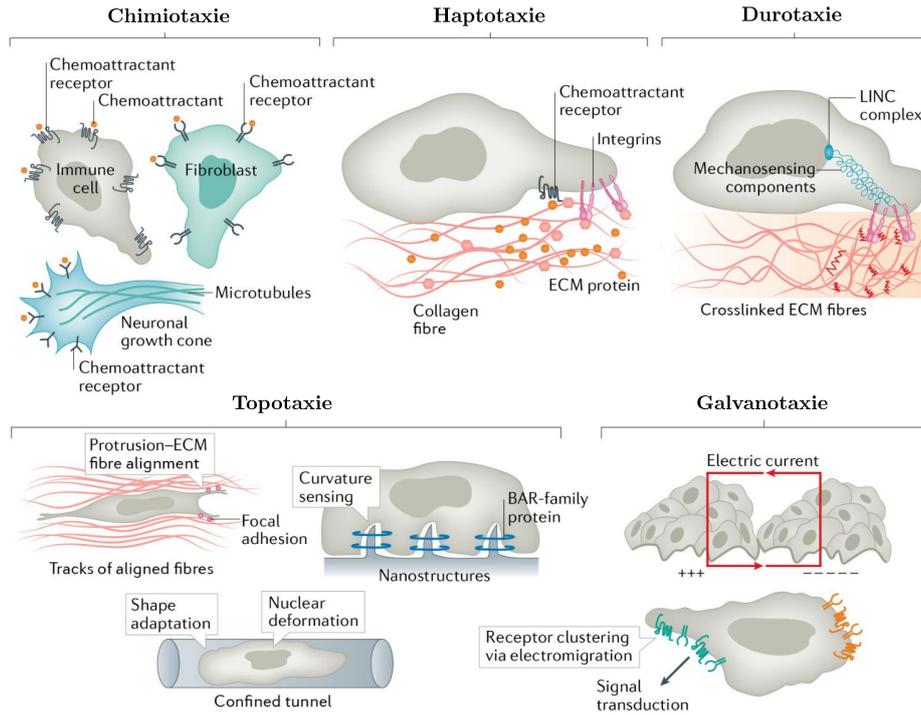


FIGURE 1.1 – Comparaison des formes et tailles des composants majeurs de l'ECM, distinguant GAGs (rouge) et protéines (vert). Adapté de [2].



- **Chemiotaxie** : les cellules détectent le signal par l'intermédiaire de récepteurs membranaires fixant les signaux chimiques solubles.
- **Haptotaxie** : les cellules détectent les signaux liés à la surface à l'aide de leurs récepteurs, notamment les intégrines.
- **Durotaxie** : la rigidité du substrat est détectée par un ensemble de composants couplés mécaniquement dans le cortex cellulaire, dans le cytosol ou au niveau de l'enveloppe nucléaire.
- **Topotaxie** : les cellules détectent la géométrie de l'espace disponible et adaptent leur forme en modifiant l'orientation des protubérances membranaires parallèlement aux fibres alignées de la matrice extracellulaire (ECM), en détectant la courbure membranaire induite par la topographie grâce aux protéines de la famille BAR, ou en mesurant la déformation nucléaire résultant de la compression et du changement de forme.
- **Galvanotaxie** : le champ électrique est détecté par l'électromigration des composants de la membrane (y compris les récepteurs de signalisation) vers la cathode (+) ou l'anode (-).

FIGURE 1.2 – Détection par les cellules des principaux facteurs environnementaux.
Adapté de [14].

1.1.2 ADHÉSION CELLULE/SUBSTRAT

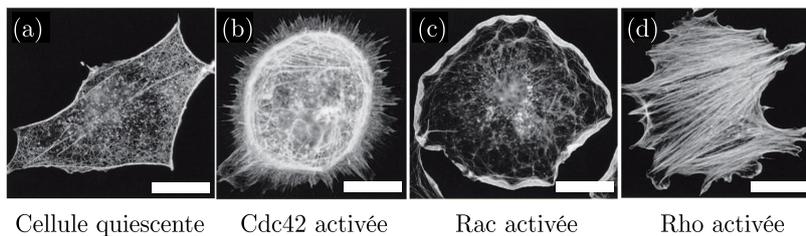
1.1.2.1 Adhésion et motilité

Adhésion et migration sont deux processus intrinsèquement liés car ils ont en commun un grand nombre de voies de signalisation cellulaire. Il a pu être montré qu'en l'absence d'autres facteurs que l'haptotaxie, la migration dirigée de fibroblastes était principalement déterminée par la dynamique collective des *adhésions focales* (FA) et du cytosquelette d'actine [15]. Les *contacts focaux* sont des zones particulières où un récepteur membranaire – e.g. les intégrines – est lié d'une part à un composant de la matrice extra-cellulaire, d'autre part au cytosquelette d'actine, par l'intermédiaire d'autres protéines⁶. Leur mise en évidence date de la fin des années 1970 / début 1980, par les travaux de Izzard & Lochner [16] ainsi que d'Abercrombie [17]. Dès cette époque, il était aussi remarqué que les contacts focaux étaient associés à une grande proximité entre la membrane des cellules et le substrat.

6. Voir section 1.1.2.2.

Le processus de migration 2D peut ainsi être schématisé en 3 étapes principales – Figure 1.3. Lors de la *protusion*, ou étalement, la cellule se polarise, avec l'apparition d'extensions de la membrane plasmique à l'avant de la cellule, formées par polymérisation de l'actine. Au niveau de ces extensions, on voit se former des contacts focaux – *adhésion* – permettant à la cellule de disposer de points d'ancrage pour son déplacement. L'arrière de la cellule est alors ramené vers l'avant par la contraction du cytosquelette : c'est la *rétraction*. L'adhésion cellulaire implique donc une reconnaissance entre ligands et récepteurs au niveau de la membrane, ce qui va promouvoir 2 types de forces générées par les structures d'actines : une force de protusion associée à la polymérisation de l'actine à la périphérie de la cellule, et une force contractile (force de traction) associée à l'élaboration de longues fibres d'actine que l'on nomme fibres de stress.

La polymérisation de l'actine a fait l'objet d'un modèle physique nommé tapis roulant (*treadmilling*) avec un mécanisme de nucléation de type *brownian ratchet* [18, 19]. De plus, de nombreuses protéines – rassemblées sous le nom ABP, pour *Actine Binding Proteins* – peuvent se lier à l'actine pour modifier son architecture. Un autre groupe de protéines, les GTPases, est impliqué dans des rôles plus spécifiques de détermination des structures de l'actine – Figure 1.4. Lors de la rétraction, une diminution de la contractilité du cytosquelette à l'arrière de la cellule se fait par dépolymérisation de l'actine, sous l'influence de plusieurs interactions faisant par exemple intervenir la protéine nommée myosine [9].



(a) Les fibroblastes cultivés dans un milieu appauvri en sérum manifestent de l'actine corticale et quelques fibres de stress. (b) Cdc42 provoque l'apparition de structures nommées filopodes à la périphérie de la cellule. (c) Rac génère la formation de lamellipodes s'étendant sur toute la circonférence cellulaire. (d) Rho provoque l'assemblage de fibres de stress denses.

L'équilibre entre les forces exercées par la polymérisation de l'actine et la tension de la membrane plasmique [9] influence également l'adhésion cellulaire. La membrane plasmique des cellules est une bicouche de lipides très hétérogène, traversée par de nombreuses protéines et organisée en micro-domaines liés au cortex d'actine de la cellule. La tension de la membrane plasmique des cellules dépend de la polymérisation du cytosquelette d'actine et des adhésions déjà présentes entre la cellule et le substrat [22]. En effet, une cellule s'étale pour adhérer : cela augmente la tension membranaire, ce qui en retour mo-

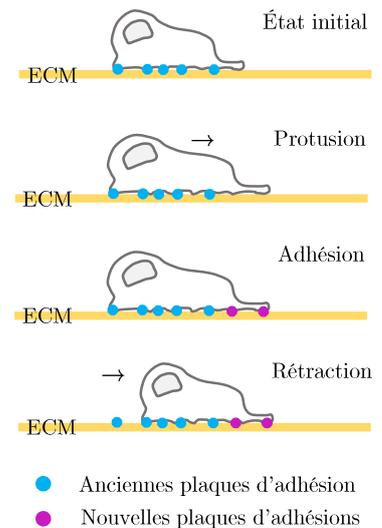


FIGURE 1.3 – Schéma des étapes principales de la mésenchymateuse des fibroblastes.

FIGURE 1.4 – Influence de l'injection de protéines Rho GT-Pases (Cdc42, Rac, Rho) sur l'organisation de l'actine de fibroblastes fixés. Marquage à la phalloïdine fluorescente. Adapté de [20] citant [21].

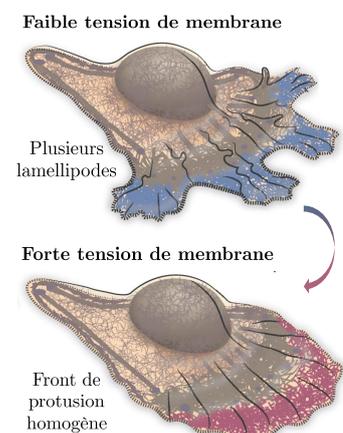


FIGURE 1.5 – Allures des polarisations cellulaires possibles selon la tension de la membrane plasmique. Adapté de [22]

difie la polymérisation de l'actine. En général, une faible tension de membrane est associée à la formation de plusieurs protusions nommées lamellipodes, tandis qu'une forte tension membranaire est associée à un front de protusion plus large – Figure 1.5.

1.1.2.2 Transmission des forces

Les adhésions focales font la jonction entre la cellule et la matrice extra-cellulaire. Elles sont composées d'un grand nombre de protéines dont la dynamique d'organisation n'est pas encore élucidée, même si les techniques d'imagerie récentes laissent deviner une structure à plusieurs couches [23]. Les protéines assurant la liaison des cellules au substrat sont les intégrines – comme mentionné précédemment. Il s'agit de protéines transmembranaires composées de 2 feuilletts glyprotéiques qu'on note α et β . On a dénombré 24 types d'intégrines dans l'espèce humaine, issus des combinaisons entre les 18 feuilletts α et les 8 feuilletts β recensés [2]. La Figure 1.6 illustre de manière simplifiée l'assemblage de protéines auquel un dimère d'intégrine participe afin de relier le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire. La taline est généralement présente comme adaptateur, mais n'est souvent pas seule. Une même intégrine peut présenter des variations d'affinités avec différents composants de la matrice extra-cellulaire, et cette liaison est notamment affectée par la concentration d'ions Mg^{2+} et dans une moindre mesure Ca^{2+} . Les adhésions focales formées à l'aide des intégrines manifestent une diversité en taille : elles peuvent être petites, discrètes et transitoires – à la limite de diffraction, et de quelques min de durée de vie [24] – ou grandes, proéminentes et durables – d'environ 0,5-1,5 μm selon leur maturité, pour une durée de vie de 10 à 20 min [25].

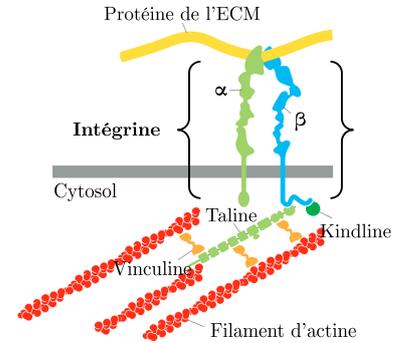
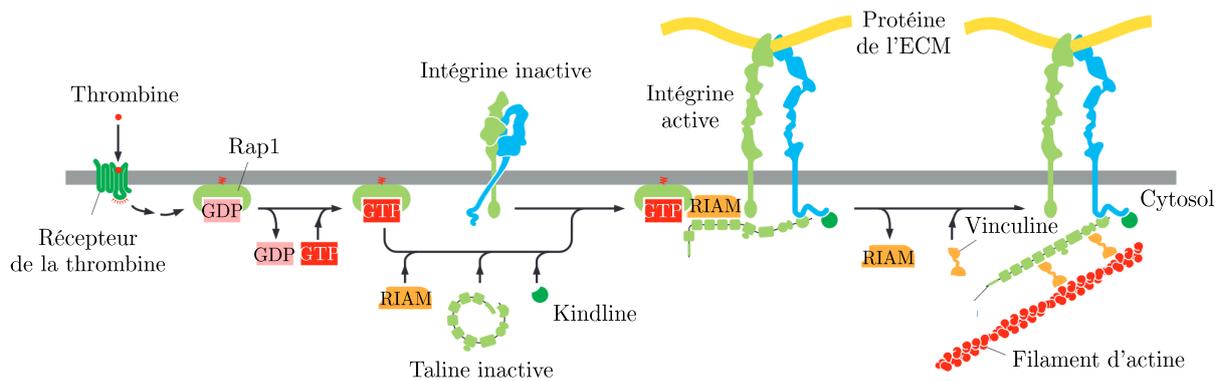


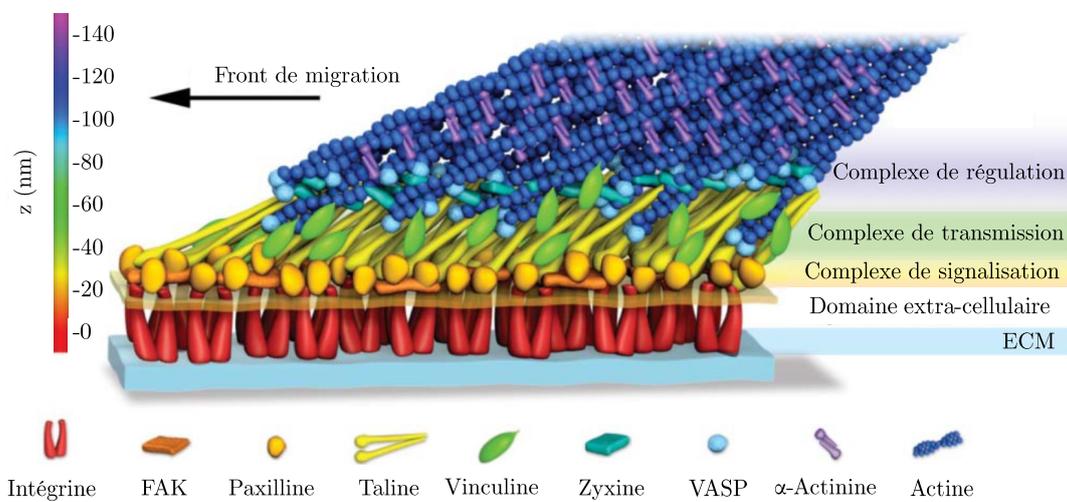
FIGURE 1.6 – Intégrine active, reliant l'ECM à l'actine du cytosquelette. Adapté de [2].



Les signaux reçus de l'extérieur de la cellule peuvent agir par le biais de divers mécanismes intracellulaires pour stimuler l'activation des intégrines. Dans les plaquettes, comme illustré ici, la protéine de signal extra-cellulaire nommée thrombine active un récepteur couplé à une protéine G à la surface de la cellule, initiant une voie de signalisation qui conduit à l'activation de Rap1, un membre de la famille des GTPases monomériques. Rap1 activé interagit avec la protéine RIAM, qui recrute ensuite la taline à la membrane plasmique, avec une autre protéine appelée kindline. La taline interagit avec la kindline et la chaîne β de l'intégrine pour déclencher l'activation. La taline interagit ensuite avec des protéines adaptatrices telles que la vinculine, ce qui entraîne la formation d'un lien avec l'actine du cytosquelette.

FIGURE 1.7 – Exemple d'une voie de signalisation pour l'activation des intégrines. Adapté de [2].

Diverses études comme celles utilisant la microscopie électronique et la diffraction des rayons X suggèrent que intégrines se présentent dans 2 conformations, une forme active ou inactive [2]. La transmission effective des forces⁷ résultant notamment de la polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette d'actine requiert la formation de liens avec l'ECM, donc l'activation des intégrines, ce qui peut se produire par diverses voies de signalisations internes comme externes [4]. La Figure 1.7 donne l'exemple d'une voie de signalisation interne. La liaison des intégrines au ligand RGD (voie de signalisation externe) peut elle aussi promouvoir l'activation de nouvelles intégrines, ce qui renforce l'adhésion focale [2] et conduit à la formation de plaques d'adhésion focales denses et structurées – Figure 1.8.



7. Le modèle de référence de la transmission des forces stabilisant les cellules en adhésion ou créant du mouvement est celui du *molecular clutch* [9, 26, 27]. Les différents mécanismes mentionnés dans cette section sont fortement couplés [4] et contribuent ensemble aux comportements des cellules [9, 28, 29].

1.1.2.3 L'adhésion sur substrat *in vitro*

Lorsque des lignées cellulaires sont étudiées en laboratoire, elles sont entretenues et observées dans un milieu de culture approprié. La préparation des cellules nécessite leur détachement, à l'aide d'une enzyme par exemple. La suspension de cellules obtenue est ensuite déposée sur une lamelle d'observation souvent recouverte de fibronectine, la protéine de l'ECM à laquelle se lie un certain nombre d'intégrines des cellules. On observe alors un processus d'adhésion qui peut être découpé en 3 phases – Figure 1.9. Lors de la *sédimentation*, le corps cellulaire interagit avec le substrat de façon non spécifique. La formation de contacts focaux transitoires à l'aide des intégrines permet l'*étalement* progressif des cellules, ce qui s'accompagne de la polymérisation de l'actine. Une fois bien étalées, les cellules poursuivent la *maturation* des contacts focaux en plaques d'adhésion focales tout en réorganisant leur cytosquelette. Selon le type cellulaire et le type de substrat utilisé, on observera alors des comportements de migration ou bien d'adhésion renforcée, qui s'accompagnent, après un certain temps, de la production par les cellules de leur propre matrice extra-cellulaire – on parle alors d'adhésion fibrillaire.

FIGURE 1.8 – Représentation de la structure moléculaire (à un instant t) d'une plaque d'adhésion focale, reconstituée à partir d'observations en microscopie super-résolue. Adapté de [23].

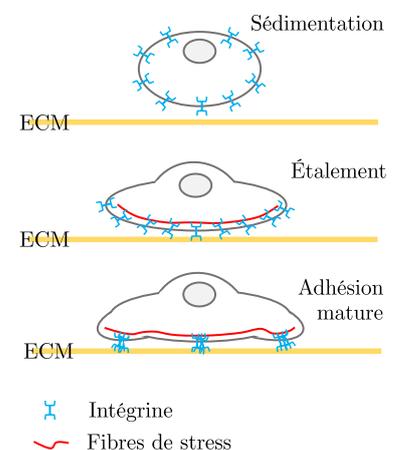
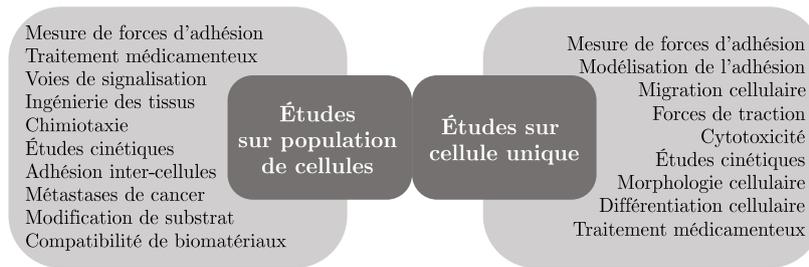


FIGURE 1.9 – Schéma des étapes principales de l'adhésion cellulaire *in vitro*.

1.2 TECHNIQUES POUR ÉTUDIER L'ADHÉSION

Du fait de la richesse des interactions mises en jeu, de nombreuses méthodes sont utilisées pour étudier l'adhésion, que ce soit par la mesure de force ou par l'imagerie de leurs comportements. Je me contenterai de présenter les méthodes utilisées pour l'analyse à l'échelle des cellules uniques⁸. La Figure 1.10 présente un résumé des grands types d'applications de l'étude de l'adhésion.



8. Il existe aussi de nombreuses méthodes où l'étude se fait à l'échelle de populations de cellules, comme les tests de rinçage, les chambres à flux et la microfluidique, etc. [30].

FIGURE 1.10 – Résumé de la diversité des applications de l'étude de l'adhésion cellulaire. Adapté de [30].

1.2.1 MÉTHODES POUR L'ÉTUDE DES FORCES D'ADHÉSION

L'ensemble des techniques consistant à mesurer les forces d'adhésion à l'échelle locale – voire de la molécule unique – sur des cellules individuelles est regroupé sous l'acronyme SCFS⁹. Une revue récente de Roca-Cusachs *et al.* présente ces différentes méthodes [31]. Dans cette section, je présenterais quelques exemples choisis, représentatifs des approches actuellement utilisées.

1.2.1.1 Mesure par interaction directe avec les cellules

L'emploi d'une micropipette est une méthode déjà ancienne [33, 34] et elle est encore largement utilisée [30, 35]. Elle permet, par aspiration locale, de mesurer la tension du cortex cellulaire. Cela permet également de détacher une cellule par l'application d'une force – Figure 1.11. Le détachement est produit par augmentation progressive de la force d'aspiration ou par un déplacement de la micropipette. Dans le même temps, la cellule est observée au microscope pour rendre compte des évolutions globales. La sensibilité va de la fraction de pN au nN [36]. Cela a par exemple permis d'étudier la force d'adhésion de cellules sur de la fibronectine [37], ou les différences de forces d'adhésion entre cellules normales et cancéreuses [38]. Il existe de nombreuses variantes¹⁰ permettant de mesurer la tension de membrane ou la tension corticale [35], ou de caractériser des interactions ligand-récepteur. Des montages plus sophistiqués combinant cette méthode avec la microscopie de fluorescence ont permis le suivi de voies de signalisation déclenchées par la réponse des cellules à la force d'aspiration [39]. Les principales limites de cette méthode sont sa faible résolution temporelle et son aspect souvent invasif sur les cellules étudiées.

9. *Single Cell Force Spectroscopy*.

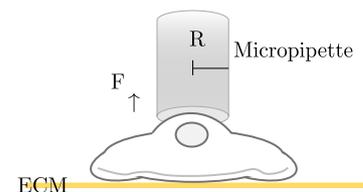


FIGURE 1.11 – Principe d'une étude par aspiration à l'aide d'une micropipette. Inspiré de [32].

10. Montage avec plusieurs micropipettes, avec cellule ou vésicules attachées à des billes fonctionnalisées par un ligand, etc.

Les pinces optiques, proposées en 1986 par Ashkin *et al.* [40] permettent de faire des mesures à l'échelle de la molécule unique, comme un récepteur membranaire. Un laser focalisé permet de piéger et déplacer des billes diélectriques microscopiques, ou même des cellules – Figure 1.12. Le contrôle de la force est extrêmement précis et permet d'étudier une grande variété de phénomènes biologiques, sur une gamme allant des fN aux pN, et avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. Cet outil très versatile a pu être utilisé de nombreuses manières, comme par exemple pour l'étude de la liaison d'un complexe ligand-récepteur purifié [41], ou la réponse mécanique locale de cellules en adhésion [42, 43]. Tout comme l'aspiration par micropipettes, il existe diverses configurations d'expériences, dont certaines utilisant plusieurs pièges optiques [44]. Leur limite se situe au niveau de leur principe même : la focalisation du laser implique des irradiances d'illumination élevées, difficilement compatibles avec des expériences de suivis de cellules vivantes sur des temps longs.

Dans le cadre de l'étude de l'adhésion, la microscopie à force atomique (AFM) a initialement été utilisée pour quantifier la force de liaison de complexes ligands-récepteurs [46], puis peu de temps après pour étudier l'adhésion de cellules fixées directement sur le levier AFM, et servant directement de sonde lorsque mises en contact avec un substrat fonctionnalisé avec une espèce chimique contenant le tri-peptide RGD [47]. Des agencements cellule-cellule ont aussi été utilisés – Figure 1.13. Le principe est d'opérer une mise en contact précise pendant un temps donné, puis de retirer la pointe de l'AFM. Les ruptures sur l'évolution de la force selon la distance donnent accès aux forces d'adhésion avec une sensibilité de l'ordre du pN. Il a ainsi été possible d'étudier la liaison fibronectine-intégrine $\alpha_5\beta_1$ [48]. Dans une situation type substrat-cellule, il est de plus possible de sonder un couple ligand-récepteur présent sur la partie dorsale d'une cellule alors même que cette dernière est en adhésion sur un substrat par le biais d'un autre couple ligand-récepteur [49]. Comme les méthodes précédentes, il s'agit d'une technique limitée par son aspect invasif.

1.2.1.2 Mesure par la déformation de l'environnement

En utilisant des substrats de rigidité très faible, les forces exercées par les cellules sur leur environnement peuvent conduire à des déformations mesurables. La microscopie de force de traction (TFM) est la première des méthodes ayant étudié ce phénomène [50, 51]. Elle repose sur l'imagerie des variations de la position de marqueurs fluorescents incorporés dans le substrat ou attachés à sa surface – Figure 1.14. Cela permet alors d'établir une cartographie des forces de traction générées par une cellule¹¹, sur un large champ. Si les mises en œuvre initiales avaient recours à une image de référence pour effectuer les comparaisons, il est possible de s'en passer par un contrôle précis de la régularité du positionnement des marqueurs [52, 53]. Il s'agit de plus d'une méthode compatible avec l'étude dynamique de

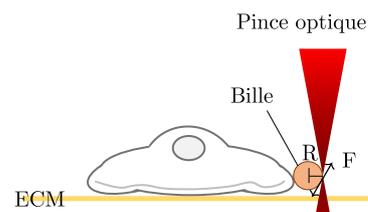


FIGURE 1.12 – Principe d'une étude à l'aide de pinces optiques.

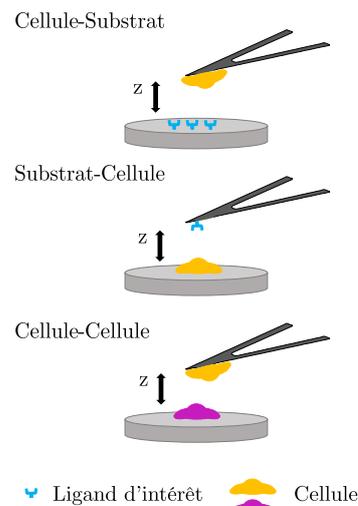


FIGURE 1.13 – Principes de base des montages expérimentaux basés sur l'AFM pour l'étude de l'adhésion cellulaire. Inspiré de [45].

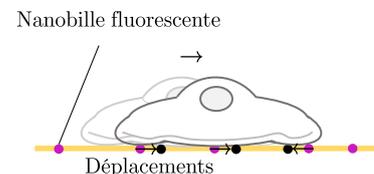


FIGURE 1.14 – Principe de base d'une étude par microscopie de force de traction.

11. On mesure en réalité une force par unité de surface, i.e. une pression en Pa. La sensibilité est d'environ 1 Pa.

l'adhésion en 3D de cellules, ce qui a permis de mettre en évidence l'évolution des tensions corticales lors du phénomène de migration [54] ; la différence de directionnalité des forces exercées selon que les cellules soient cancéreuses ou non [55] ; ou encore, une différence notable de comportement des adhésions focales par rapport à la situation sur substrat [56]. C'est une méthode dont les combinaisons avec d'autres techniques d'imageries [57-60] sont très prometteuses, qui est essentiellement limitée par la complexité de l'analyse des données [61].

Une autre manière de procéder repose sur l'utilisation de micro-piliers – Figure 1.15. Les déformations de ces derniers étant seulement fonction de la force exercée, les calculs permettant d'obtenir les forces mises en jeu sont simplifiés tout en permettant une sensibilité de l'ordre de 10 pN. Il est de plus possible de fabriquer des micro-piliers magnétiques pour exercer une stimulation mécanique contrôlée [62, 63], ou créer des paliers de raideur variables de manière à diriger la migration des cellules [64]. Cependant, cette structuration du substrat peut affecter le comportement cellulaire selon les dimensions des micro-piliers [65]. Le potentiel de combinaison avec d'autres méthodes d'imagerie est identique à la TFM. La méthode est cependant limitée par son caractère discret, et le faible intervalle de raideurs actuellement accessibles.

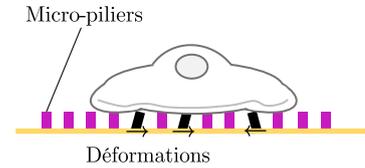


FIGURE 1.15 – Principe d'une étude à l'aide de micro-piliers.

1.2.2 MÉTHODES D'IMAGERIE OPTIQUE POUR L'ÉTUDE DE L'ADHÉSION

Il existe un ensemble de méthodes d'imageries n'ayant pas pour centre d'intérêt la mesure des forces d'adhésion, mais l'identification des structures biologiques impliquées dans l'adhésion cellulaire et leur dynamique. On peut les distinguer en 2 grandes catégories : techniques avec ou sans fluorescence.

1.2.2.1 Méthodes sans fluorescence

Tout d'abord, on trouve plusieurs techniques d'imagerie interférométriques dont l'utilisation est largement répandue dans le contexte de l'adhésion. La microscopie à contraste de phase est une méthode optique ancienne [66], mais très utile pour les études de morphologie cellulaire au cours de l'étalement [67]. À l'aide d'un objectif adapté, les différences d'indices de réfraction créent le contraste des images obtenues – Figure 1.16. Ainsi, même des échantillons transparents comme les cellules peuvent être étudiés.

Cependant, un halo est observable sur le pourtour des cellules. Afin de s'en affranchir, on peut utiliser deux autres méthodes interférentielles – Figure 1.17. La première de ces méthodes, RICM (*Reflection Interference Contrast Microscopy*), repose sur l'observation des interférences produites par les réflexions aux interfaces entre le verre et le milieu d'observation, ainsi qu'entre le milieu d'observation et la cellule – plus exactement, dans le gap entre le substrat et la membrane plasmique. C'est d'ailleurs à l'aide d'une méthode très proche de la RICM – mais n'utilisant pas de faisceau polarisé circulairement

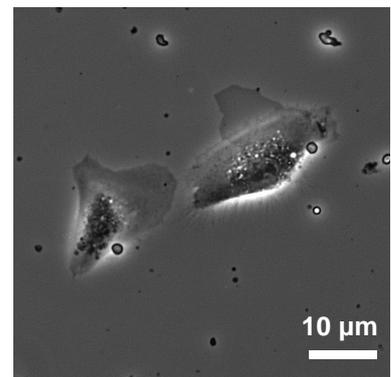


FIGURE 1.16 – Exemple d'image en contraste de phase, sur cellules U87MG à 37°C.

– que l'on a pu réaliser les premières mises en évidence des adhésions focales [16, 17]. Même si cette méthode est latéralement limitée par diffraction, elle est axialement très résolue, et permet de remonter à des distances membrane-substrat avec une précision nanométrique, tout en bénéficiant d'une bonne vitesse d'acquisition. Elle est de plus compatible avec de longs suivis des cellules [68, 69]. Cela étant dit, l'absence de marquage fluorescent empêche de réaliser l'observation spécifique des protéines d'adhésion, et les fortes hétérogénéités d'indices de réfraction du cytoplasme empêchent des quantifications rigoureuses des distances. En transmission, une méthode très utilisée est l'imagerie à contraste interférentiel différentiel – abrégée DIC, pour *Differential Interference Contrast*. En utilisant un prisme de Nomarski et une lumière polarisée linéairement, il est possible d'imager de façon très nette les contours de cellules et étudier leur comportement global sur de long temps d'observation [70].

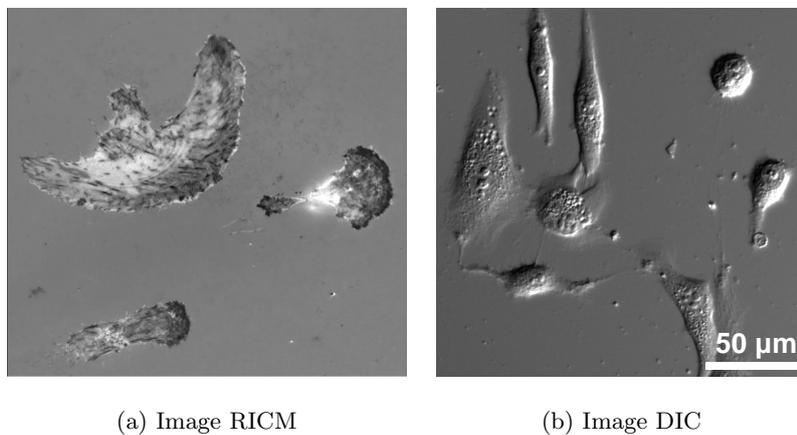


FIGURE 1.17 – Exemples d'images obtenues par contraste à interférence.

(a) Cellules MDA-MB-231.

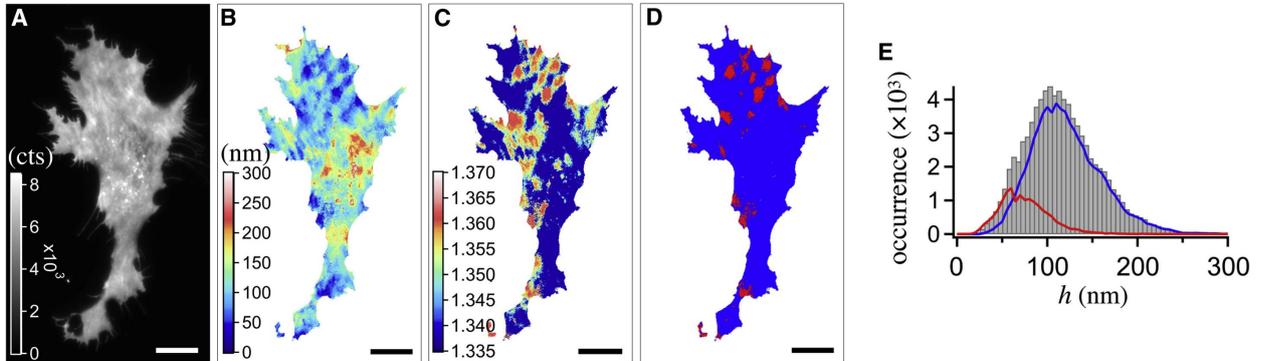
(b) Cellules WPMY-1.

1.2.2.2 Méthodes utilisant la fluorescence

Les méthodes optiques par marquage fluorescent sont très répandues, en particulier les approches par immunofluorescence récentes qui permettent d'observer les protéines d'adhésion par imagerie confocale ou épifluorescence. La microscopie TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) est à ce titre idéale pour étudier l'adhésion. C'est une méthode qui utilise le principe de réflexion totale interne dans le substrat en verre [71]. En générant une excitation par onde évanescente¹², elle permet de réduire l'illumination à la partie ventrale des cellules, ce qui permet d'imager avec un très bon rapport signal sur bruit. Dans sa version classique, l'imagerie TIRF est avant tout qualitative, mais il est possible d'accéder à des mesures de distance cellule-substrat par son extension nommée *vaTIRF* (*variable angle TIRF*). Dans ce type de montage, sur lequel travaille notre équipe depuis une dizaine d'années [20, 72], l'acquisition d'une succession d'images en faisant varier l'angle d'incidence de l'illumination permet d'accéder à une cartographie des distances avec une résolution axiale nanométrique, mais

12. Une présentation détaillée du TIRF est donnée dans le chapitre suivant, section 2.3.2.

aussi à la cartographie des indices de réfraction effectifs [73, 74]. En combinant ces 2 informations – hauteur de membrane et indice – il est possible de cartographier les interactions spécifiques et non-spécifiques, les aires de contact cellules-substrat, et surtout les énergies d'adhésion, permettant alors de quantifier finement l'adhésion des cellules.



(A) Une des images TIRF de la série utilisée pour le calcul – la membrane plasmique a été marquée au DiO. (B) Topographie de la membrane cellulaire correspondante. (C) Indice de réfraction n_{cortex} . (D) Localisation 2D des forts contacts d'adhésion (tâches rouges sur fond bleu). (E) Histogramme des distances obtenu à partir de l'image (B). Les sous-populations correspondant aux forts et faibles contacts d'adhésion sont respectivement représentées en rouge et en bleu. Barres d'échelle : 10 μm .

La microscopie par illumination structurée, ou SIM (*Structured Illumination Microscopy*), est une manière astucieuse de s'affranchir de la limite de diffraction et d'observer l'adhésion cellulaire [75]. L'utilisation de multiples motifs d'illumination différents pour chaque plan focal permet d'obtenir par reconstruction numérique des images avec une résolution 3D environ égale à la limite de diffraction divisée par 2 ou 3 [76]. Pour augmenter la compatibilité de cette méthode avec les cellules vivantes, et diminuer sa sensibilité aux phénomènes de diffusion lors de l'étude de cellules, elle peut être combinée avec une illumination de type TIRF [77-79], ce qui a permis d'étudier les dynamiques du cytosquelette de cellules ou des protéines impliquées dans l'adhésion focale – Figure 1.19. On obtient ainsi une réduction du volume d'observation et une augmentation de la vitesse d'acquisition, jusqu'à plus de 100 images/s [80]. L'absence de faiblesse majeure de cette méthode en fait un outil très prometteur.

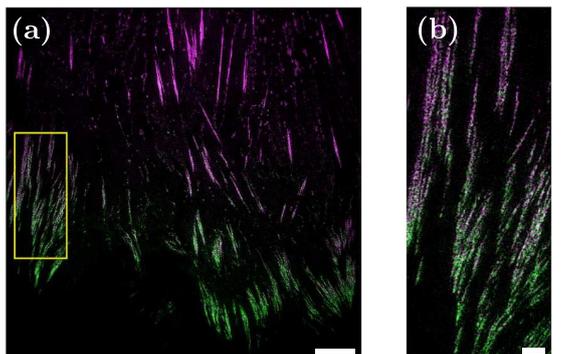


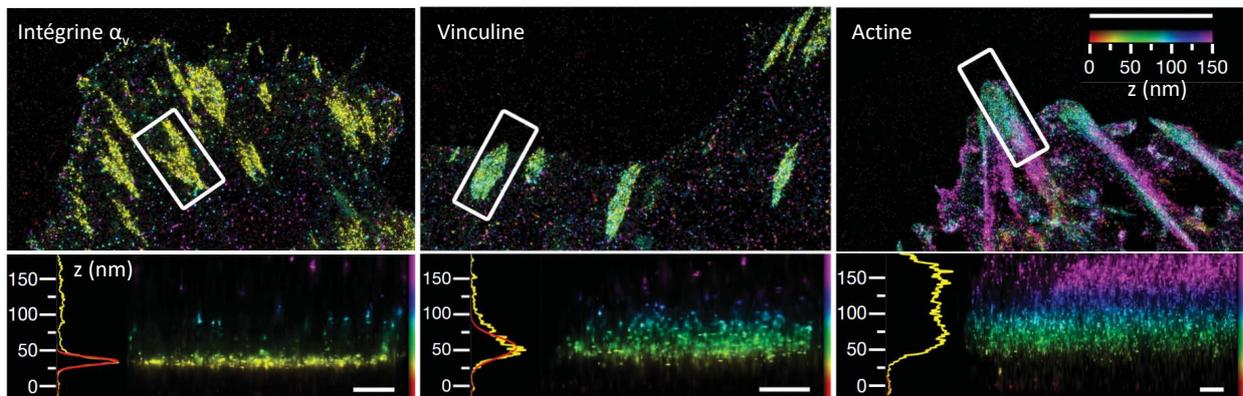
FIGURE 1.19 – Image SIM des protéines d'adhésion focale mTagRFP-vinculine (violet) et mEmerald-paxilline (vert) dans une cellule HFF-1. Adapté de [78].

La région encadrée en (a) est donnée agrandie en (b), montrant un gradient de concentration accrue de paxilline vers la périphérie de la cellule. Acquisition de 1,67 s sous une illumination de 30 à 100 W/cm^2 . Barres d'échelle : (a) 5 μm (b) 1 μm .

Les méthodes d'imagerie par localisation de molécules uniques, abrégées SMLM (*Single-Molecule Localization Microscopy*), ont initialement été développées en parallèle sous des noms différents : PALM [81] (*Photo-Activated Localization Microscopy*) et STORM [82] (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Dans les 2 cas, il s'agit d'enregistrer des dizaines de milliers d'images de l'émission fluctuante de molécules fluorescentes individuelles sous une forte irradiance d'illumination, puis de construire numériquement une image unique super-résolue représentant la localisation des molécules¹³. Ces techniques permettent d'obtenir une résolution d'environ 10 nm [84]. Il existe plusieurs variantes de ces techniques, comme le dSTORM¹⁴, qui simplifie considérablement la technique en permettant d'utiliser cette méthode avec des molécules fluorescentes organiques classiques [85]. L'iPALM est une autre variante, qui utilise le phénomène d'interférence pour étendre l'acquisition en 3D – on atteint ainsi une résolution axiale de 20 à 30 nm. C'est notamment l'usage de l'iPALM qui a permis la reconstruction nanométrique des plaques d'adhésions focales [23] illustrée en Figure 1.8. Quelques unes des images ayant permis cette reconstruction sont données Figure 1.20 à titre d'exemple. Dans tous les cas, les irradiances d'illuminations importantes et le très grand nombre d'images nécessaires à acquérir restreignent essentiellement ces techniques à des études de cellules fixées.

13. Pour les échantillons denses en fluorophores, il est nécessaire de n'avoir excité qu'une partie des émetteurs pour chaque image expérimentale, ce qui est obtenu en induisant un clignotement de l'émission à l'aide d'une solution tampon adéquate, ou avec un couple d'émetteurs se transférant alternativement l'énergie d'excitation, ou en utilisant des molécules fluorescentes photo-commutables [83].

14. Employant une excitation à 2 lasers.



Les images du haut représentent la vue d'ensemble, et celles du bas les histogrammes *fités* de distribution de présence selon l'axe vertical, à partir de la zone encadrée. Barres d'échelle : (haut) 5 μm (bas) 500 nm.

Une alternative à cette famille de méthodes pour les études structurales de l'adhésion est l'imagerie par déplétion émission-stimulée [86], ou STED (*STimulated Emission Depletion*). Elle repose sur un montage optique confocal où l'échantillon est scanné, sous une haute puissance laser, avec 2 faisceaux femtoseconde synchronisés dont l'un produit un volume d'observation creux en forme de *donut*. L'émission des molécules fluorescentes en périphérie est désactivée par émission-stimulée, ce qui réduit la zone fluorescente à un *spot* de taille inférieure à la limite de diffraction – Figure 1.21. La résolution ainsi atteinte, sans post-traitement des images, est alors typiquement d'environ quelques dizaines de nm en 3D [87, 88]. La combinaison de cette technique

FIGURE 1.20 – Exemples d'images iPALM des protéines d'adhésion focale. Adapté de [23].

avec les méthodes de localisation photo-activée, décrites au paragraphe précédent, a donné lieu à des développements récents sous les noms de MINFLUX [89] et MINSTED [90], où la résolution dans les 3 dimensions est de l'ordre du nm.

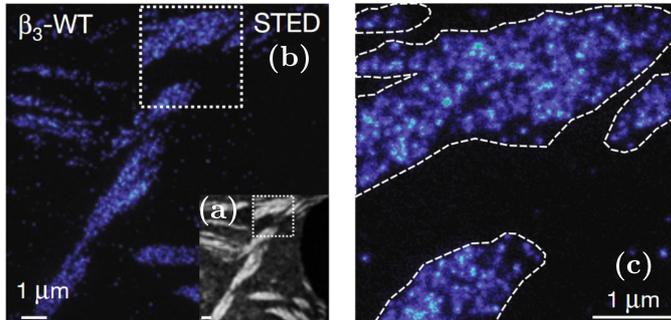
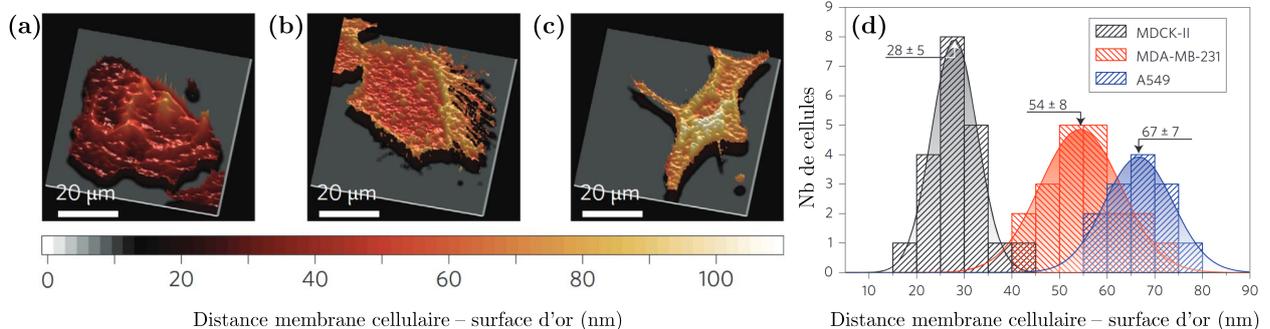


FIGURE 1.21 – Étude STED de la localisation d'intégrines β_3 . Adapté de [91].

L'image (a) donne pour comparaison une image confocale (noir et blanc). L'image (c) est un grandissement de la zone encadrée en pointillée sur (b).

Enfin, il existe une méthode d'imagerie plus récente, basée sur le transfert d'énergie métal-induit [92]. De manière analogue à l'imagerie NEF, l'imagerie MIET (*Metal-Induced Energy Transfert*) utilise un transfert d'énergie non-radiatif pour sonder des distances entre des molécules fluorescentes et ici une surface recouverte d'une couche métallique. En pratique, il s'agit de mesurer les variations de durée de vie d'un émetteur selon leur interaction plasmonique avec un substrat recouvert d'une fine couche d'or – Figure 1.22. Il s'agit donc d'une amélioration de la méthode FLIM [93] (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), mais qui nécessite des traitements de données parfois complexes. L'imagerie MIET possède une résolution axiale nanométrique sur des distances d'observation complémentaires¹⁵ au FRET [94-97]. La combinaison du MIET avec de l'imagerie FRET de colocalisation a notamment été employée pour reproduire les résultats obtenus en iPALM par Kanchanawong *et al.* [23] concernant la structure de plaques d'adhésions focales [98]. Le montage optique utilise cependant un microscope confocal, et implique des puissances d'excitations importantes non-adaptées au suivi dynamique de cellules vivantes avec un large champ d'observation.

15. Le phénomène employé étant particulièrement notable pour des distances au-delà de 20 nm.



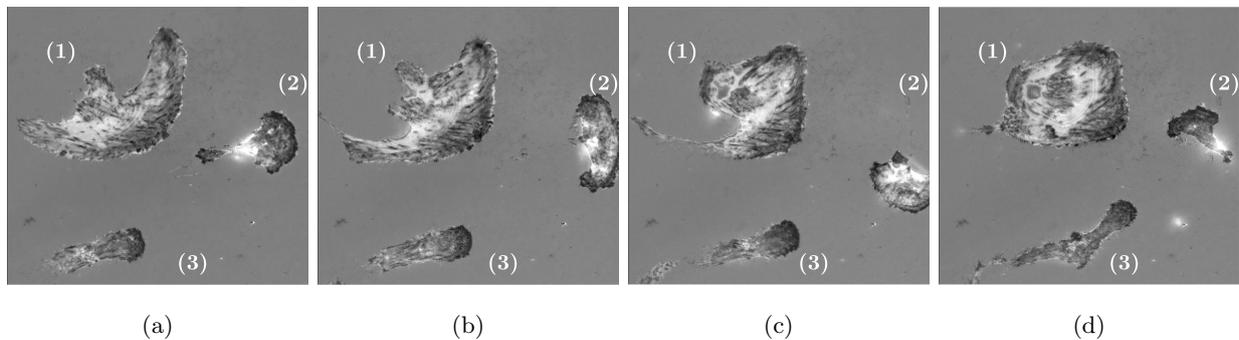
(a-c) Exemples de reconstructions tridimensionnelles de la membrane ventrale des cellules (a) MDCK-II, (b) MDA-MB-231, et (c) A549. (d) Distance moyenne entre la membrane ventrale et la surface d'or pour les 3 lignées cellulaires, avec *fit* gaussien.

FIGURE 1.22 – Comparaison de 3 lignées cellulaires par imagerie MIET. Adapté de [94].

1.2.3 CONTRÔLE DE L'ADHÉSION ET MIGRATION CELLULAIRE

1.2.3.1 Variabilité des comportements sur substrat homogène

In situ, les cellules sont entourées par des cellules voisines et/ou la matrice extra-cellulaire, ce qui impose des limites géométriques et mécaniques spécifiques influençant la morphologie des cellules, mais aussi les diverses facettes de leur comportement. À l'inverse, les cellules étudiées *in vitro* sont considérées comme des systèmes vivants "artificiels", où l'organisation de l'environnement et des autres cellules peut donner naissance à des comportements aléatoires, comme nous pouvons le voir sur la Figure 1.23. L'étude de ce type de situations produit des résultats non-immédiatement transposables à des cellules en situation physiologique *in vivo*, et augmente le risque de résultats artefactuels. Pour outrepasser limitations, il faut généralement observer un grand nombre de cellules ou contrôler l'adhésion et/ou la migration cellulaire.



La cellule (1) est très étalée et déplace simplement le barycentre de sa position. La cellule (2) fait globalement des allers-retours successifs entre 2 positions. La cellule (3) montre une migration dirigée vers la cellule (2).

FIGURE 1.23 – Images RCM successives de cellules MDA-MB-231 en adhésion sur du collagène de type I.

1.2.3.2 Méthodes de contrôle du comportement cellulaire

Plusieurs stratégies ont été mises au point pour contrôler le micro-environnement des cellules et donc leur comportement. La méthode classique est celle des chambres à flux, qui a beaucoup été utilisée pour les études d'adhérence sur des populations de cellules [30] mais aussi l'étude des forces d'adhésion, à l'échelle d'un couple ligand-récepteur [99]. Sa version moderne repose sur la microfluidique, avec un apport majeur en termes de miniaturisation, d'intégration et de possibilités de contrôle et d'automatisation [100]. Avec ce type de dispositifs, on étudie par exemple le processus d'adhésion dans une situation mimant la circulation sanguine [101], ou les capacités de métastatisation de cellules tumorales [102]. Les études sur cellules uniques sont elles aussi possibles [103], et aussi sur des modèles artificiels de membranes comme les vésicules [104].

Une méthode plus compatible avec la plupart des méthodes d'imagerie présentées dans les sections précédentes est le *micropatterning* cellulaire, dont M. Théry a fait une revue d'ensemble [7]. Comme l'illustre la Figure 1.24, le principe est de mimer les contraintes du

micro-environnement *in vivo* de manière à ce que les cellules étudiées *in vitro* manifestent des comportements les plus proches possible des conditions physiologiques.

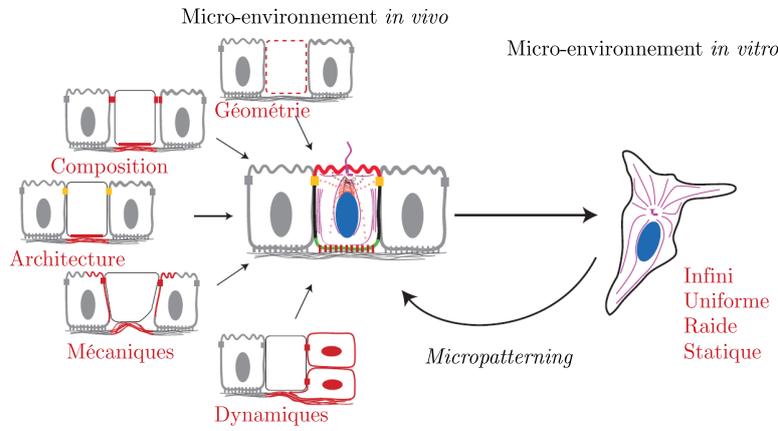


FIGURE 1.24 – Le micro-environnement cellulaire *in vivo* et *in vitro*. Adapté de [7].

En structurant le dépôt de la couche d'adhérence – typiquement, une protéine de l'ECM comme la fibronectine – on peut dans une certaine mesure contrôler la morphologie des cellules et la contractilité de leur cytosquelette, comme présenté sur la Figure 1.25. Cette méthode a donné lieu à de nombreuses études¹⁶ sur l'adhésion cellule-substrat, l'adhésion cellule-cellule, ou encore la polarité cellulaire, la croissance et la différenciation, etc. Bien qu'il existe des *designs* bien connus pour leurs effets, notamment sur la structure du cytosquelette, il est néanmoins nécessaire de sélectionner un motif bien adapté au type cellulaire que l'on souhaite étudier, comme on aura l'occasion de le montrer dans le chapitre 6.

16. Un résultat original et amusant est la *World Cell Race*, où un collectif de laboratoires a réalisé une évaluation standardisée de la vitesse de migration entre différents types cellulaires [105].

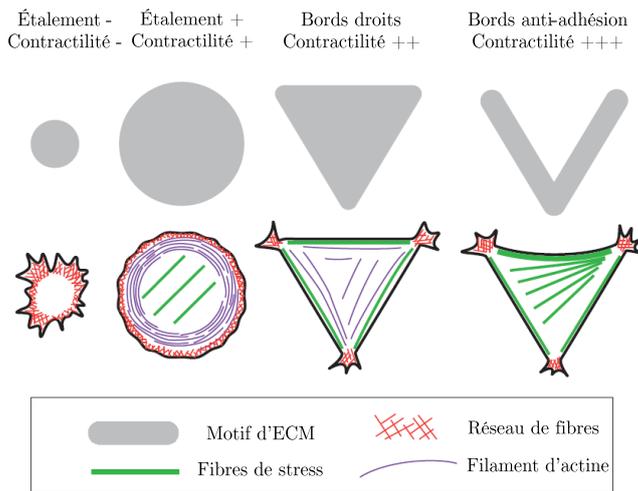


FIGURE 1.25 – Création de motifs d'ECM et conséquences sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Adapté de [7].

Enfin, comme mentionné précédemment, les micro-piliers peuvent aussi permettre un contrôle du comportement cellulaire. Lee *et al.* [64] ont notamment montré qu'un gradient de raideur du substrat¹⁷, conduisait à une migration dirigée des cellules mais aussi à une augmentation de la vitesse de migration suivant la raideur perçue par la cellule.

17. À l'aide de micro-piliers de base variable, dont la partie supérieure était recouverte de fibronectine pour permettre l'adhésion des cellules.

1.3 CONCLUSIONS SUR L'ÉTUDE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE

L'adhésion cellulaire est un phénomène riche qui peut être étudié de multiples manières. Chaque dispositif expérimental a ainsi ses points forts et ses points faibles, ce qui donne lieu à des possibilités de combinaisons entre méthodes. Dans le cas de l'imagerie, qui vise notamment à observer les points focaux d'adhésion, il existe effectivement un gap à relier entre les méthodes permettant une bonne vitesse d'acquisition, un large champ d'observation – compatibles avec les cellules vivantes – et les méthodes permettant une grande résolution spatiale mais généralement plus performantes sur de petits champs d'observations et des cellules fixées – Table 1.1. L'imagerie RICM est la seule méthode permettant à la fois d'étudier des interactions très proches du substrat avec une bonne résolution temporelle, tout en restant compatible avec les cellules vivantes. Cependant, en l'absence de marquage, elle ne permet pas d'imager de façon spécifique des éléments particuliers des contacts focaux d'adhésion. L'imagerie basée sur le FRET permet cette sélection : la présentation des éléments théoriques et expérimentaux spécifiques à ces méthodes – et notamment l'imagerie NEF – sont donc l'objet du chapitre suivant.

Méthode	Rés. XY (nm)	Rés. Z (nm)	Source d'excitation	Observation sur cellules	Profondeur de champ	Marquage fluorescent
RICM	250	10	LED ou lampe à vapeur	Vivantes	∞	Non
TIRF	250	20	Laser	Vivantes	0-300 nm	Quelconque
SIM	100	100	Laser	Vivantes	0-10 μm	Quelconque
SMLM	10-20	20	Laser	Fixées	0-1 μm	Plutôt spécifique
STED	1-20	1-100	Laser	Fixées	0-10 μm	Plutôt spécifique
MIET	250	3	Laser	Vivantes	10-100 nm	Quelconque

TABLE 1.1 – Récapitulatif des caractéristiques typiques pour les différentes familles de méthodes d'imageries.

Dispositif expérimental : principes, théorie, et montage

2

Dans ce chapitre, je vais introduire la théorie de l'imagerie NEF, c'est-à-dire la luminescence et le transfert d'énergie non-radiatif de type Förster. Je décrirai aussi les principes de l'imagerie grand-champ TIRF ainsi que le montage optique utilisé dans mon travail de thèse.

2.1 FLUORESCENCE & LUMINESCENCE

2.1.1 INTRODUCTION

Comme je l'ai introduit dans le chapitre précédent, un grand nombre de méthodes d'imagerie du vivant utilisent des marqueurs fluorescents comme agents de contraste. L'imagerie de fluorescence offre également une certaine sélectivité en biologie par l'intermédiaire de différentes molécules de liaisons – des anticorps, par exemple. La proposition d'imagerie NEF s'inscrit dans cette famille de méthodes.

Une légère confusion existe quant à l'utilisation des termes *luminescence* et *fluorescence*. L'usage du mot luminescence est attribué au physicien et historien des sciences Eilhardt Wiedemann, qui l'introduisit en 1888 pour qualifier l'émission de lumière n'étant pas conditionnée à une élévation de température, par opposition à l'incandescence [106, 107]. On rajoute communément un préfixe au terme luminescence, pour désigner son origine¹. Ainsi, la photoluminescence est l'émission de lumière spontanée résultant d'une excitation elle-même lumineuse. Le terme de fluorescence² a été introduit par G. G. Stokes en 1852 [106, 107] pour décrire un cas de photoluminescence provenant d'un cristal de fluorite appartenant à la famille générale des *fluorspar/fluorspath*, par analogie avec le terme "opalescence"³. La luminescence et la fluorescence correspondent au même processus physique : l'émission spontanée. À l'heure actuelle, on réserve plutôt le terme *luminescence* lorsque l'émission provient d'atomes ou d'ions en phase condensée – cristalline ou amorphe – et le terme *fluorescence* lorsque l'émission est produite par des molécules organiques en phase diluée.

2.1.2 BASES DE LA THÉORIE QUANTIQUE DE LA FLUORESCENCE

2.1.2.1 Diagramme d'énergie schématique

Dans ce cadre théorique⁴, la lumière est considérée comme un ensemble de photons, dont l'énergie est définie par l'Éq. (2.1.1), où h est la constante de Planck ($\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$); ν la fréquence d'oscillation du champ électromagnétique (Hz), c la vitesse de la lumière dans le vide

2.1 Fluorescence & luminescence	27
Introduction	
Bases de la théorie quantique de la fluorescence	
2.2 Transfert d'énergie non-radiatif de type Förster	30
FRET : formalisme théorique	
Exemples d'imagerie FRET en biologie	
Analyse quantitative en FRET	
2.3 Imagerie de fluorescence grand-champ	39
Imagerie en épifluorescence	
Principes de l'imagerie TIRF	
2.4 Montage expérimental	41
Description du montage	
Caractérisation du dispositif TIRF	
2.5 Conclusions sur le dispositif expérimental NEFI	49

1. Quelques exemples : la chimiluminescence lorsque l'émission résulte d'une réaction chimique; la bioluminescence, lorsque cette réaction s'inscrit dans des processus biologiques; mais aussi la mécaluminescence qui se divise en plusieurs types selon la forme de la stimulation mécanique.

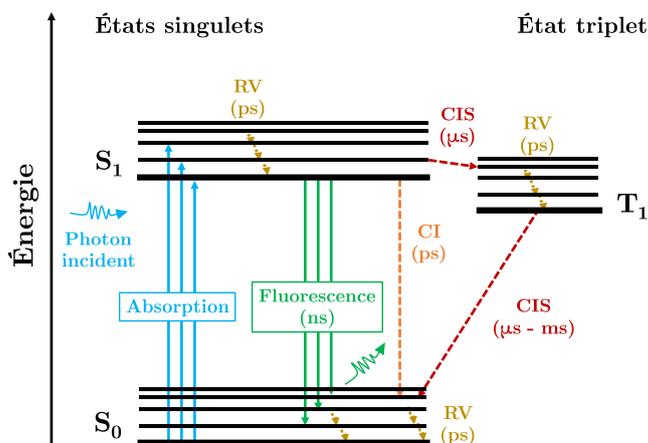
2. Même si la première observation rapportée de fluorescence revient à N. Monardes en 1565 [107].

3. La présence du préfixe "fluor" n'est donc pas lié à l'élément Fluor – qui ne luminesce d'ailleurs pas – mais à une généalogie partagée : le terme fluor, dérivé du latin *fluere*, était employé pour exprimer l'idée d'une fluidité, et donc accolé à ces pierres que l'on pouvait aisément fondre [106].

4. Cette section s'appuie essentiellement sur les références [108, 109].

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (2.1.1)$$

($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) et λ la longueur d'onde du rayonnement (m). Pour présenter synthétiquement la dynamique intra-moléculaire associée à la fluorescence, il est convenu de recourir à un diagramme d'énergie simplifié permettant de visualiser les principales transitions entre les niveaux d'énergie – Figure 2.1. Chaque ligne horizontale principale du diagramme représente un niveau d'énergie E_i ⁵, identifié par sa multiplicité de *spin* M_s , définie par l'Éq. (2.1.2), où s est la résultante des *spins* électroniques s_j – Éq. (2.1.3) et (2.1.4). Dans un cas simple à 2 électrons délocalisés, les *spins* peuvent être parallèles ($\uparrow\uparrow$) ou anti-parallèles ($\uparrow\downarrow$), ce qui entraîne une résultante des *spins* électroniques $s = 0$ ou 1. Les valeurs de M_s seront alors respectivement de 1 (état singulet S) ou 3 (état triplet T). Lorsqu'on excite à résonance la transition $S_0 \rightarrow S_1$ avec un photon d'énergie $E = h\nu \approx E_1 - E_0$, la molécule passe de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1 en absorbant le photon incident. La molécule ainsi excitée peut redescendre dans son état fondamental soit par émission spontanée⁶ soit par différents processus non-radiatifs. Ces derniers peuvent impliquer des transitions $S_1 \rightarrow S_0$ (conversion interne CI) ou des transitions $S_1 \rightarrow T_1$, puis $T_1 \rightarrow S_0$ (croisement inter-systèmes CIS). Des cascades de relaxations vibrationnelles rapides peuvent également se produire au sein des états électroniques eux-mêmes.



L'émission spontanée s'effectue nécessairement entre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état singulet S_1 vers l'état fondamental S_0 – loi dite de Kasha. Par conséquent, la longueur d'onde du photon émis est toujours plus grande que celle du photon incident. Il en résulte un décalage entre les spectres d'absorption et d'émission, qu'on nomme décalage de Stokes – cf. Figure 2.2.

La conversion inter-systèmes est une transition non-radiative peu probable, car elle nécessite un changement de *spin* de l'électron excité. Sachant que la durée de vie de l'état excité S_1 est de l'ordre de la nanoseconde, une molécule soumise à une excitation continue va cycler un grand nombre de fois entre S_0 et S_1 . Dans ces conditions, la transition $S_1 \rightarrow T_1$, même peu probable, pourra se réaliser. La relaxation de la molécule est alors fortement retardée car le temps de

5. Les lignes horizontales secondaires correspondent aux différents sous-états vibrationnels.

$$M_s = 2s + 1 \quad (2.1.2)$$

$$s = \sum s_j \quad (2.1.3)$$

$$s_j = \pm \frac{1}{2} \quad (2.1.4)$$

6. La fluorescence, qui est la seule voie de relaxation radiative.

FIGURE 2.1 – Diagramme d'énergie simplifié pour une molécule organique fluorescente.

Les processus radiatifs sont représentés en traits pleins, les processus non-radiatifs en pointillés.

CI : Conversion interne

CIS : Croisement inter-systèmes

RV : Relaxation Vibrationnelle

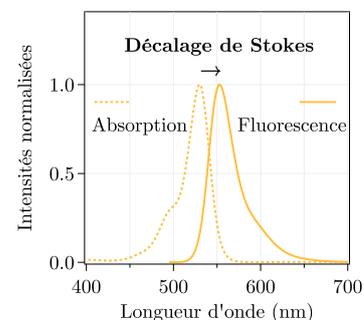


FIGURE 2.2 – Spectres d'absorption et de fluorescence de la Rhodamine 6G

vie de l'état T_1 est typiquement de l'ordre de la microseconde à la milliseconde. Puisque la relaxation $T_1 \rightarrow S_0$ est non-radiative dans les molécules organiques, le passage par l'état triplet interrompt les cycles absorption/émission pendant un laps de temps défini par le taux de croisement inter-systèmes et la durée de vie de T_1 .

2.1.2.2 Propriétés photophysiques des fluorophores

Dans le système à 3 niveaux représenté sur la Figure 2.1, et sous l'approximation d'une faible excitation laser à la longueur d'onde λ_e , l'intensité du signal de fluorescence I émis par une molécule fluorescente sous excitation est égal au produit du taux d'excitation k_{λ_e} et du rendement quantique ϕ – Éq. (2.1.5). Le premier terme quantifie la probabilité de passer de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1 , et est défini par l'Éq. (2.1.6). Il dépend de la section efficace d'absorption $\sigma_{abs}^{\lambda_e}$ (cm^2), qui correspond à la probabilité des photons incidents de longueur d'onde λ_e d'être absorbés par le fluorophore ; ainsi que du rapport entre l'irradiance d'excitation laser L^{λ_e} (W/cm^2) et l'énergie $h\nu_e$ (J) des photons incidents. Cette section efficace $\sigma_{abs}^{\lambda_e}$ peut être déterminée à partir du coefficient d'extinction molaire ε^{λ_e} ($\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$) – cf. Éq. (2.1.7), où N_A est le nombre d'Avogadro. Le rendement quantique ϕ correspond à la probabilité que la relaxation de la molécule excitée se fasse par recombinaison radiative plutôt que par un processus non radiatif. Sa définition formelle – Éq. (2.1.8) – est donc le rapport entre le taux de recombinaisons radiatives et la somme des taux de relaxation radiatives et non-radiatives, respectivement notés k_r et k_{nr} . Le taux de recombinaisons non-radiatives k_{nr} correspond à la probabilité de l'ensemble des processus CI et CIS définis en section précédente – cf. Éq. (2.1.9). Il est également possible d'explicitier ϕ en fonction de la durée de vie de fluorescence τ , définie par l'Éq. (2.1.10). Ainsi les espèces chimiques à grand rendement quantique et forte extinction molaire seront toujours privilégiées en imagerie de fluorescence traditionnelle – e.g. la Rhodamine 6G, avec $\phi = 0,95$ et $\varepsilon_{max}^{530\text{ nm}} = 115\,000$ $\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$ dans l'éthanol.

Comme expliqué durant la section précédente, les cycles absorption/émission peuvent être interrompus par le passage dans l'état triplet T_1 . Plus l'irradiance d'excitation est élevée, plus le nombre de passages par T_1 augmente. L'état T_1 ayant une durée de vie plus longue, on observe alors un clignotement [110] de l'émission des fluorophores, comme illustré en Figure 2.3. Le peuplement de l'état triplet T_1 augmente la réactivité chimique des fluorophores, qui peuvent subir des transformations structurales conduisant à la perte irréversible de leurs propriétés d'émission [111] : on parle de photo-dégradation⁷. Dans les cas les plus simples, cette dynamique s'exprime sous la forme d'un déclin exponentiel de la fluorescence $I(t)$ auquel on peut associer un temps caractéristique τ_{pd} dépendant de l'irradiance d'excitation et de la photo-stabilité du fluorophore concerné – cf. Éq. (2.1.11).

$$I = k_{\lambda_e} \phi \quad (2.1.5)$$

$$k_{\lambda_e} = \sigma_{abs}^{\lambda_e} \frac{L^{\lambda_e}}{h\nu_e} \quad (2.1.6)$$

$$\sigma_{abs}^{\lambda_e} = \frac{10^3 \ln(10)}{N_A} \varepsilon^{\lambda_e} \quad (2.1.7)$$

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (2.1.8)$$

$$k_{nr} = k_{CI} + k_{CIS} \quad (2.1.9)$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.1.10)$$

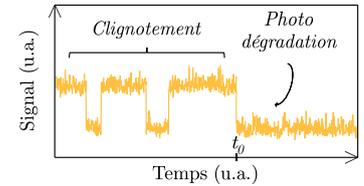


FIGURE 2.3 – Allure générale d'un signal mesuré pour un émetteur unique en situation de clignotement puis photo-dégradé à $t = t_0$.

7. Dans la littérature, les termes *photo-degradation* ou *photobleaching* (photo-blanchiment) sont utilisés de manière interchangeable.

$$I(t) = I(0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{pd}}} \quad (2.1.11)$$

2.2 TRANSFERT D'ÉNERGIE NON-RADIATIF DE TYPE FÖRSTER

Une molécule fluorescente peut être approximée par un dipôle oscillant [109, 112]. L'onde électromagnétique rayonnée par un tel dipôle contient plusieurs termes dont l'amplitude dépend de la distance. Ainsi, l'environnement de la molécule peut être découpé en 4 zones – cf. Figure 2.4 – à l'aide de la distance caractéristique b définie en Éq. (2.2.1) ; où λ (nm) est la longueur d'onde de l'émission de l'espèce chimique excitée et n l'indice de réfraction du milieu [112]. En règle générale, les valeurs de λ et n se situant respectivement dans les intervalles 300-800 nm et 1,3-1,6, la valeur de b vaut environ 100 nm.

Sur ces 4 zones, 2 sont particulièrement importantes ici : la zone de champ lointain (CL) et celle de champ proche (CP). Le rayonnement électromagnétique en champ lointain (*far-field*) peut éventuellement être ré-absorbé par un autre espèce chimique, ce qui correspond à un phénomène de transfert d'énergie radiatif : le transfert est médié par un photon. Si une espèce chimique compatible avec l'espèce excitée est présente dans la zone de champ-proche (*near-field*), un couplage dipôle-dipôle direct peut se produire sous certaines conditions. Un transfert d'énergie se fait alors sans photon : on parle de transfert non-radiatif. Ce régime spatial définit le domaine de validité de la théorie du FRET (Förster Resonance Energy Transfert), qui repose sur le couplage de dipôles ponctuels.

2.2.1 FRET : FORMALISME THÉORIQUE

2.2.1.1 Développements historiques

La naissance de cette théorie a notamment pour trame l'effort de compréhension du phénomène de photosynthèse [109, 112]. Plusieurs observations avaient en effet suggéré, au début du XX^e siècle, que les espèces chimiques excitées pouvaient transférer leur énergie autrement que par échange d'électron lors d'une collision, ou par formation de complexes entre espèces chimiques. Les solutions de fluorophores dans des solvants très visqueux ont été beaucoup utilisées, dans la mesure où elles permettaient l'étude de ces phénomènes *via* les modifications de polarisation de la lumière. Dans une solution visqueuse minimisant la rotation des espèces chimiques, on s'attend à ce que la polarisation de l'excitation lumineuse soit conservée lors de l'émission⁸ ; et c'est bien ce qui est observé pour des solutions diluées. Cependant, l'augmentation de la concentration donne lieu à une dépoliarisation de l'émission. L'explication par transfert radiatif ne pouvait rendre compte des quantités de signal mesurées en raison du décalage de Stokes entre l'émission et l'absorption d'un même fluorophore. Les travaux effectués par Jean et Francis Perrin ont abouti à la proposition du concept de transfert non-radiatif, qui correspond à l'ouverture d'un processus de relaxation pour l'espèce chimique excitée (donneur) et d'un processus d'excitation pour l'espèce chimique à portée de transfert (accepteur) – cf. Figure 2.5.

$$b = \frac{\lambda}{2\pi n} \quad (2.2.1)$$

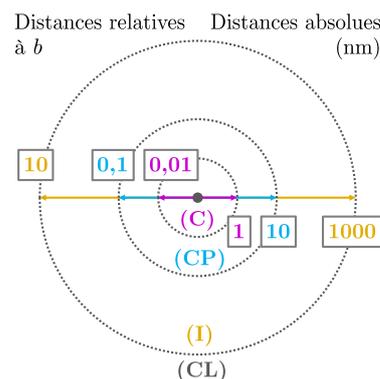


FIGURE 2.4 – Schéma de l'espace autour d'un fluorophore excité pour $b = 100$ nm.

Adapté de [112].

- (C) : zone de contact
- (CP) : zone de champ proche
- (I) : zone intermédiaire
- (CL) : zone de champ lointain

8. L'excitation sélectionne une population d'émetteurs dans la bonne conformation spatiale.

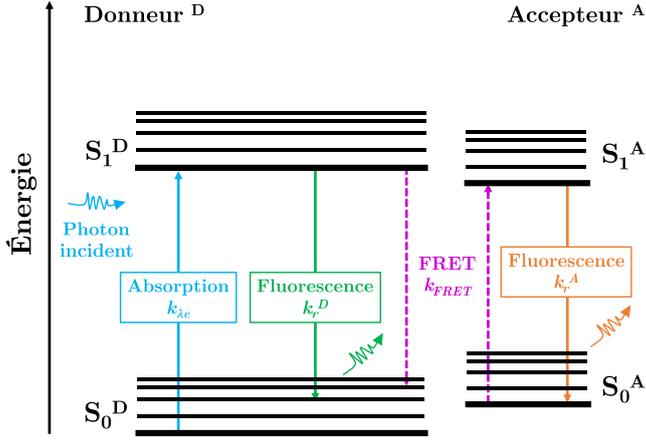


FIGURE 2.5 – Transfert d'énergie non-radiatif entre 2 molécules.

Les lettres D et A identifient respectivement le donneur et l'accepteur. Les processus radiatifs sont représentés en traits pleins. Pour simplifier la lecture, seul le processus non-radiatif FRET est représenté, en pointillés.

Cela a donné lieu à une première formalisation de la distance critique pour qu'un transfert non-radiatif ait lieu, notée R_0 . Son expression est donnée par l'Éq. (2.2.2), où λ est la longueur d'onde d'émission du fluorophore; $\langle t \rangle$ le temps moyen entre collisions des espèces chimiques, et τ_D la durée de vie du donneur. Plus précisément, R_0 correspond à la séparation spatiale entre donneur et accepteur où l'efficacité de transfert non-radiatif est de 50 %. Le travail de Théodore Förster s'inscrit à la suite de ces recherches. Sa publication initiale de 1946 – dont on peut trouver une traduction récente en langue anglaise [113] – en corrige un des postulats : les fluorophores impliqués, mêmes identiques, peuvent présenter des fréquences d'oscillation significativement différentes en raison des dispersions spectrales d'absorption et d'émission⁹. Il faut donc *a minima* corriger R_0 par le recouvrement réel des spectres, ce qui conduit à l'Éq. (2.2.3); où Ω représente la largeur des spectres d'absorption et d'émission et Ω' le recouvrement entre les deux spectres. Le rapport des 2 grandeurs représente ainsi la probabilité qu'un donneur et un accepteur oscillent à la même fréquence, condition de résonance du transfert d'énergie. La seconde contribution majeure de Förster réside dans la formalisation du taux de transfert k_{FRET} , permise par l'articulation de la théorie de l'efficacité de transfert par interaction coulombienne à diverses constantes et termes relativement simples. Ce résultat a permis les premiers tests expérimentaux de la dépendance en distance de ce phénomène de transfert, puis fait l'objet de diverses reformulations pour aboutir au formalisme actuel du FRET¹⁰.

2.2.1.2 Formalisations contemporaines du FRET

Le taux de transfert d'énergie non-radiatif k_{FRET} est donné par l'Éq. (2.2.4), où κ^2 est le facteur d'orientation des dipôles moléculaires; ϕ_D le rendement quantique du donneur; N_A le nombre d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$); et r la distance de séparation donneur-accepteur. La grandeur τ_D reste associée à la durée de vie du donneur, et $\overline{F_D}(\lambda)$ représente l'émission du donneur normalisée telle que $\int \overline{F_D} d\lambda = 1$; $\varepsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur (L/cm/mol).

$$R_0 = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt[6]{\frac{\langle t \rangle}{\tau_D}} \quad (2.2.2)$$

9. F. Perrin ne prenait en compte que la dispersion liée aux collisions entre molécules, ce qui a pour conséquence de sous-estimer la dépendance de l'efficacité de transfert à la distance donneur-accepteur.

$$R_0 = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt[6]{\frac{\Omega'}{\tau_D \Omega^2}} \quad (2.2.3)$$

10. Pour une revue de ces travaux, voir [112].

$$k_{FRET}(r) = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A r^6 \tau_D} \int \overline{F_D} \varepsilon_A \lambda^4 d\lambda \quad (2.2.4)$$

Cette relation peut être simplifiée, comme le montre l'Éq. (2.2.5), où la distance critique R_0 , aussi nommée *rayon de Förster*, est reformulée à partir des différentes constantes – Éq. (2.2.6). La version proposée par l'Éq. (2.2.7) combine ces différentes constantes pour une expression aussi simplifiée que possible. Le terme $J(\lambda)$, défini en Éq. (2.2.8), représente l'intégrale de recouvrement spectral du donneur et de l'accepteur. Lorsque la longueur d'onde λ est exprimée en nm, la valeur de R_0 est obtenue en Å. L'efficacité du phénomène de transfert, notée E , est définie par le poids relatif du taux de transfert k_{FRET} par rapport à l'ensemble des taux de recombinaisons du donneur – cf. Éq. (2.2.9) – ce qui permet d'obtenir en Éq. (2.2.10) la relation reliant E et R_0 . Sur le plan empirique, cette efficacité de transfert peut être mesurée de 2 manières principales : *via* l'émission dite "sensibilisée" de l'accepteur – voir section 2.2.3.2; ou *via* la diminution du signal du donneur en présence de l'accepteur $I_D^{[DA]}$ par rapport au signal du donneur seul $I_D^{[D]}$ (*quenching*), selon la relation donnée en Éq. (2.2.11). Les grandeurs I_i^j peuvent d'ailleurs être remplacées par les valeurs de durée de vie d'émission τ_i^j correspondantes, ce qui est la base de l'imagerie FRET à l'aide d'un dispositif FLIM.

$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.2.5)$$

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9ln(10)\kappa^2\phi_D}{128\pi^5n^4N_A}J(\lambda)} \quad (2.2.6)$$

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-5} \frac{\kappa^2\phi_D}{n^4} J(\lambda) \quad (2.2.7)$$

$$J(\lambda) = \int \overline{F_D} \varepsilon_A \lambda^4 d\lambda \quad (2.2.8)$$

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_r + k_{nr}} \quad (2.2.9)$$

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (2.2.10)$$

$$E = 1 - \frac{I_D^{[DA]}}{I_D^{[D]}} \quad (2.2.11)$$

2.2.1.3 Dépendances spatiale, spectrale et orientationnelle

(a) Influence de la distance donneur-accepteur

Dans le cas simple d'un couple donneur-accepteur, l'efficacité E du FRET dépend de l'inverse de la distance r à la puissance 6, selon l'Éq. (2.2.10), tracée Figure 2.6. Pour une valeur typique de ~ 5 nm pour R_0 , l'efficacité du FRET devient très faible au-delà de 10 nm. La probabilité du FRET augmente rapidement en-dessous de 10 nm, ce qui fait de ce transfert d'énergie un indicateur de choix pour sonder des variations de distances dans le champ proche à partir d'une mesure en champ lointain. L'allure de E et sa dérivée par rapport à r montrent que E varie notablement autour de R_0 . Autrement dit, une étude FRET des variations de distances entre 2 espèces chimiques sera particulièrement sensible pour les distances proches de R_0 .

Trois phénomènes peuvent affecter la dépendance spatiale de E : la stœchiométrie des donneurs et accepteurs; les configurations géométriques restreignant les degrés de liberté orientationnelle des espèces chimiques en jeu; et la diffusion des accepteurs. Ce dernier cas n'est significatif que si la durée de vie de l'émission du donneur est bien plus longue que le temps de diffusion de l'accepteur dans le volume d'interaction. Dans le cas d'une variation de la stœchiométrie des donneurs et accepteurs, Clapp *et al.* [114] ont proposé et confirmé expérimentalement une variante de l'expression de l'efficacité de transfert, notée E_{MA} . Cette expression est donnée en Éq. (2.2.12), où $n^{A/D}$ représente le nombre d'accepteurs par donneur. La partie supérieure de la Figure 2.7 (a) schématise la modélisation sous-jacente et le graphe correspondant sur la Figure 2.7 (b) donne l'évolution de E_{MA} en fonction de $n^{A/D}$. En ce qui concerne les configurations géométriques parti-

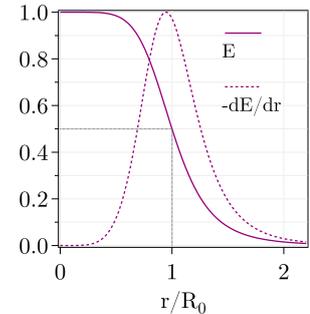
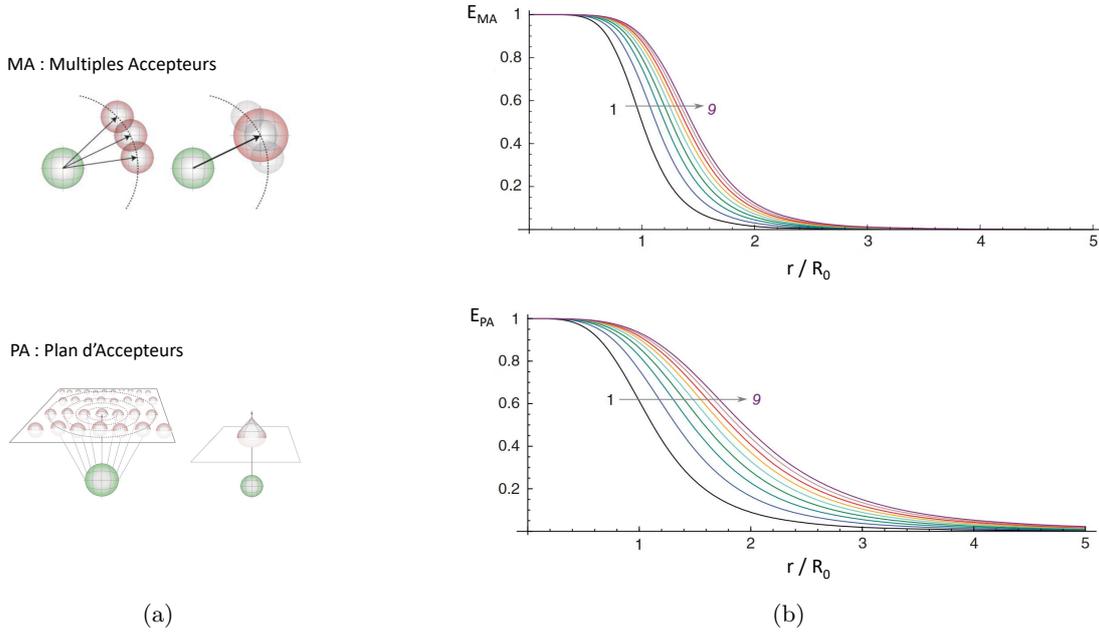


FIGURE 2.6 – Évolution théorique de l'efficacité du FRET selon la distance, pour un couple donneur-accepteur.

$$E_{MA} = \frac{R_0^6}{\frac{1}{n^{A/D}} r^6 + R_0^6} \quad (2.2.12)$$

culières, la dérivation analytique effectuée par Wolber & Hudson [115] pour le cas d'un donneur en présence d'un plan d'accepteurs est particulièrement importante. L'efficacité E_{PA} correspondante est donnée par l'Éq. (2.2.13), où ρ_A correspond à la densité d'accepteurs dans le plan considéré. Dans cette situation, l'efficacité du FRET dépend de l'inverse de r à la puissance 4, ce qui conduit à un étalement de la courbe plus important que dans le cas d'une simple variation de la stœchiométrie donneurs-accepteurs, comme illustré dans la partie inférieure de la Figure 2.7 (b). Dans les 2 cas, l'augmentation du nombre d'accepteurs implique une augmentation de la portée du FRET.

$$E_{PA} = \frac{R_0^6}{\frac{1}{2\pi\rho_A}r^4 + R_0^6} \quad (2.2.13)$$



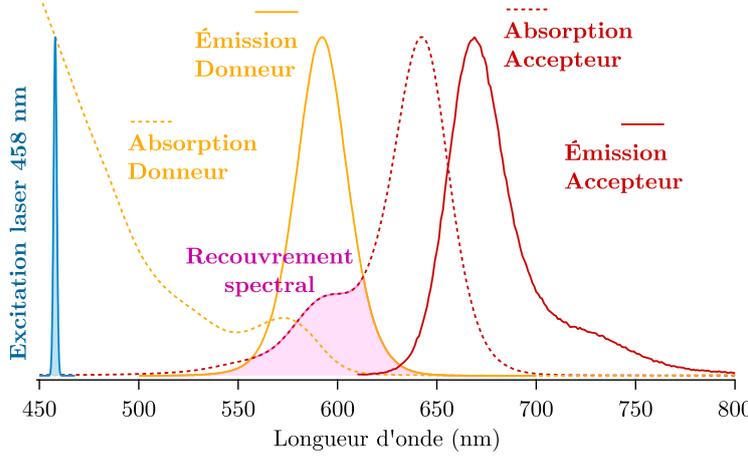
(a) Lorsqu'un donneur (vert) peut se coupler avec plusieurs accepteurs (rouges) dans son volume d'interaction FRET, l'augmentation de l'efficacité E qui en résulte peut être envisagée comme l'addition des influences des accepteurs individuels. La taille accrue de l'accepteur virtuel résultant représente la force de couplage améliorée. Dans le cas du plan d'accepteurs, la logique est identique mais la forme en "goutte" représente l'effet de la contribution d'accepteurs plus éloignés. (b) Variation de E selon $n^{A/D}$ et ρ_A sur l'intervalle 1-9. Dans le cas du plan d'accepteurs, la densité d'accepteurs est donnée sous la forme du nombre d'accepteurs 1-9 présents à la distance R_0 .

(b) Influence de l'intégrale de recouvrement spectral $J(\lambda)$

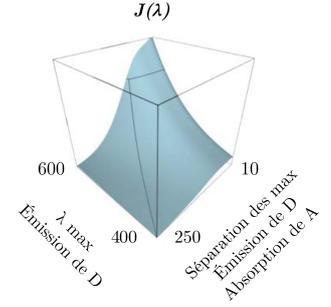
Le recouvrement spectral des 2 espèces chimiques donneur et accepteur est un autre paramètre particulièrement déterminant du FRET. Contrairement à ce que son nom laisse suggérer, l'intégrale de recouvrement spectral $J(\lambda)$ ne correspond pas strictement à l'intégrale du recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, illustré en Figure 2.8 (a). Comme en atteste sa définition formelle, donnée en Éq. (2.2.8), le terme $J(\lambda)$ dépend aussi à la puissance 4 de la longueur d'onde considérée sur l'intervalle de recouvrement. Les couples donneur-accepteur décalés vers le rouge présentent donc généralement des efficacités FRET plus élevées que ce

FIGURE 2.7 – Influence de la stœchiométrie des donneurs et accepteurs sur E . Adapté de [109].

que l'on pourrait attendre de leur seul strict recouvrement spectral. La Figure 2.8 (b) illustre la double évolution de $J(\lambda)$ selon le recouvrement, dont l'indicateur est ici la séparation (nm) des pics d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur; et la longueur d'onde λ (nm), représentée par le maximum d'émission du donneur.



(a) Configuration spectrale favorable au FRET avec des QDs (donneur) et l'Alexa Fluor 647 (accepteur).



(b) Évolution de $J(\lambda)$ selon le recouvrement spectral strict et la longueur d'onde. Adapté de [109].

(c) Contribution du facteur d'orientation κ^2

Pour qu'un transfert résonant puisse se produire, il ne suffit pas que les dipôles électroniques des espèces chimiques en présence oscillent à la même fréquence : l'orientation des moments dipolaires $\vec{\mu}_D$ (donneur) et $\vec{\mu}_A$ (accepteur) joue un grand rôle sur la force du couplage. Cet élément est pris en compte *via* le facteur κ^2 défini en Éq. (2.2.14) et (2.2.15), et illustré Figure 2.9. Le phénomène de FRET est maximisé lorsque les moments dipolaires des 2 espèces chimiques sont colinéaires ($\kappa^2 = 4$), et au contraire inexistant en cas d'orientation orthogonale ($\kappa^2 = 0$). Les orientations parallèles/anti-parallèles ($\kappa^2 = 1$) créent elles aussi des conditions bien moins optimales. Dans les expériences réalisées en solution, le postulat de liberté de mouvement et rotation des molécules permet de considérer κ^2 comme égal à $\frac{2}{3}$, valeur correspondant à la moyenne statistique des configurations possibles. Dans ce cas, il est impératif de contrôler la polarisation de l'émission des donneurs et accepteurs pour aboutir à une quantification rigoureuse des distances entre les 2 membres du couple FRET. En effet, R_0 varie de 7 % lorsque κ^2 varie de $\frac{2}{3}$ à 1, et de 26 % lorsque κ^2 varie de 1 à 4.

Si ce facteur est souvent vu comme une "nuisance" introduisant une incertitude sur l'évaluation de R_0 , les travaux de Van der Meer [116] ont fourni une base sur laquelle s'appuyer pour au contraire mobiliser κ^2 de manière à étudier l'orientation et la rotation de molécules.

$$\kappa = \vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A - 3(\vec{\mu}_D \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_A \cdot \vec{r}) \quad (2.2.14)$$

$$\kappa^2 = (\cos\theta_{DA} - 3 \cdot \cos\theta_D \cdot \cos\theta_A)^2 \quad (2.2.15)$$

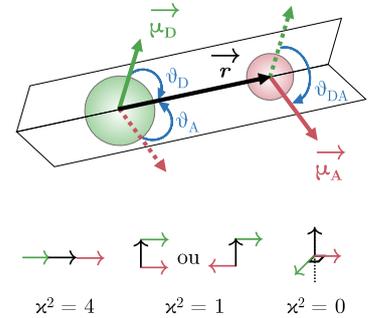


FIGURE 2.9 – Schéma des angles entre moments dipolaires $\vec{\mu}_D$ (donneur) et $\vec{\mu}_A$ (accepteur), et valeurs remarquables du facteur d'orientation κ^2 .

Adapté de [109, 112].

2.2.2 EXEMPLES D'IMAGERIE FRET EN BIOLOGIE

La très grande sélectivité spatiale du phénomène de FRET en fait un outil de choix pour étudier les structures et les interactions intervenant en biologie. Les premières utilisations du FRET datent des années 1970 [117]. L'existence du phénomène étant essentiellement restreinte à l'intervalle 1-10 nm, cela permet de dépasser de très loin la résolution spatiale de la microscopie optique conventionnelle ($\sim\lambda/2$). Ses implémentations sont nombreuses : elles vont du marquage des éléments étudiés à des techniques d'amplification du signal [118, 119]. Nous nous contenterons ici de donner quelques exemples d'études FRET représentatives, avant de présenter l'originalité de la méthode d'imagerie NEF.

2.2.2.1 Co-localisation d'espèces biochimiques en 3D

Le FRET a ainsi été utilisé pour étudier et visualiser l'activité enzymatique de kinases [120], de protéases/peptidases [121-123], ou les dynamiques intercellulaires d'ions calcium Ca^{2+} [124]. Dans ces situations, il n'est souvent pas nécessaire d'avoir accès à des mesures fines de distance entre les espèces chimiques du couple FRET : la présence ou non du transfert renseigne sur l'occurrence du phénomène étudié. Le couple donneur-accepteur sélectionné peut être utilisé sur 2 éléments marqués entrant en présence, comme lors de l'hybridation de brins d'ADN ; ou présent sur une même espèce, comme un peptide clivé par une enzyme – Figure 2.10. Il existe aussi des travaux où le calcul des distances entre les donneurs et accepteurs permet de sonder une force ou une tension à l'échelle moléculaire, dont une revue récente a été réalisée par Gayraud & Borghi [125]. Ces méthodes tentent de sonder les forces contractiles générées par le cytosquelette des cellules afin d'étudier l'adhésion cellule-substrat [126] ou l'adhésion intercellulaire [127].

2.2.2.2 Imagerie NEF

Contrairement aux méthodes précédentes, l'imagerie NEF développée dans notre équipe depuis plus d'une dizaine d'année repose sur l'idée de fixer les donneurs de manière à sonder les interactions d'interface. Dans la publication initiale [5], la méthode utilisait une couche de boîtes quantiques immobilisées dans du PMMA¹¹. La molécule acceptrice pouvait diffuser librement en solution¹² ou être présente sur la membrane de cellules vivantes, permettant alors d'imager l'adhésion de cellules uniques sur un substrat, lors de la formation de points focaux d'adhésion (FA). Comme je l'ai présenté dans le chapitre 1, cette approche a ensuite été poursuivie et il a été démontré qu'il était possible de mesurer des distances avec une précision nanométrique dans le cas de membranes supportées [6]. Les boîtes quantiques sont depuis liées au substrat sans matrice d'immobilisation¹³, ce qui ouvre la voie à leur biofonctionnalisation par des protéines promouvant l'adhésion cellulaire¹⁴.

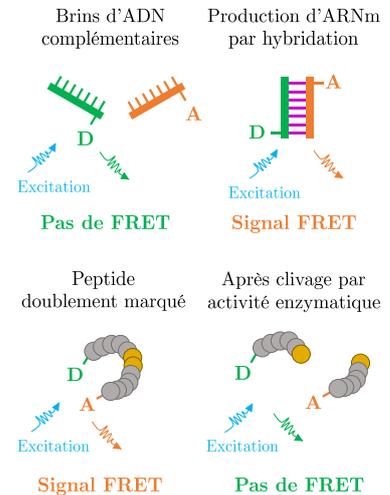


FIGURE 2.10 – Exemples typiques de principes d'étude FRET par co-localisation sans mesure de distance.

11. Polyméthacrylate de méthyle acrylique.

12. Étudiée par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).

13. Voir chapitre 4

14. Voir chapitres 5 et 6.

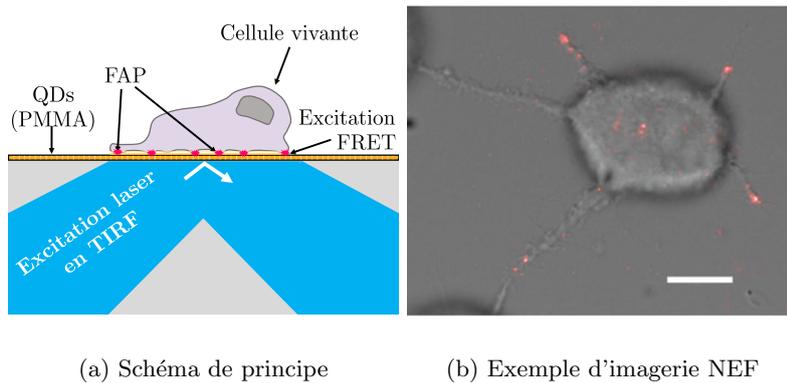


FIGURE 2.11 – Principe et exemple d'imagerie NEF. Extrait et adapté de [5].

(a) Illustre le principe d'illumination grand-champ donnant accès au signal caractéristique d'une adhésion focale.

(b) Superposition d'une image DIC (niveaux de gris) d'une cellule MCF-7 et du signal FRET de l'accepteur DiD marquant la membrane (rouge). Barre d'échelle : 10 μm .

2.2.3 ANALYSE QUANTITATIVE EN FRET

2.2.3.1 Une problématique méthodologique fondamentale

L'étude des conditions dans lesquelles l'utilisation du FRET peut être prolongée d'une analyse proprement quantitative des distances entre donneurs et accepteurs relève d'un champ de recherche à part entière, car cela nécessite d'obtenir des valeurs fiables et précises de l'efficacité E du FRET. Pour une revue synthétique de l'étendue des méthodes étudiées il y a de cela 10 ans déjà, on peut se rapporter au travail de Zeug *et al.* [128].

Les méthodes basées sur la durée de vie de l'émission des donneurs¹⁵ sont reconnues comme quantitatives, tout en nécessitant une instrumentation et des calculs analytiques sophistiqués. Les méthodes basées sur l'intensité de l'émission elle-même impliquent des stratégies variées pour tenir compte de facteurs comme les différents bruits de fond. Les éléments apparaissant immédiatement comme critiques à prendre en compte sont : (a) le signal de débordement spectral des donneurs, collecté dans la fenêtre de détection des accepteurs; et (b) l'excitation directe de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation des donneurs. Ces signaux doivent être déterminés pour que leurs contributions soient soustraites au signal détecté. Gordon *et al.* [130] avaient à ce titre formalisé en 1998 une normalisation nommée FRETN, passant par l'obtention d'un triplet d'images séparant : signal des donneurs; signal FRET des accepteurs; et signal des accepteurs seul, *via* une excitation de longueur d'onde adaptée¹⁶. Cependant, comme l'ont vite montré Xia *et al.* [133] en 2001, les valeurs de E_{FRET} obtenues sont si dépendantes de la concentration des espèces chimiques en jeu que cette méthode est limitée à des configurations où les donneurs et accepteurs sont présents dans des concentrations comparables. Leur proposition de normalisation, N_{FRET} , reprend certains éléments de cette étude fondatrice, en particulier l'utilisation d'un triplet d'images adéquat, mais n'était cependant pas suffisante. Hochreiter *et al.* [134] ont notamment montré en 2019 que ces 2 normalisations échouaient à prédire un plateau de E lors d'une grande augmentation du ratio accepteur / donneur, et ont proposé leur propre méthode de normalisation : DFRET¹⁷.

15. Nous avons eu l'occasion d'évoquer ces dispositifs, dits FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) en partie 1.2.2.2. La publication de Thaler *et al.* [129] est un exemple d'application de ces méthodes dans le cadre d'expérimentations FRET.

16. Sous l'inspiration de Youvan *et al.* [131, 132], dont le *design* expérimental initial donnera son nom à cette famille de méthodologies, dites stratégies *3-cube*.

17. Notons que les auteurs ont pris soin de rendre les procédures *ImageJ*, *RStudio*, et *MS-Excel* développées disponibles en accès libre : <https://github.com/BHochreiter>.

De nombreuses méthodes différentes ont ainsi été proposées, avec chacune ses avantages et inconvénients¹⁸. Sur la base des équations données en section 2.2.1.2, il est en effet possible de dériver diverses méthodes d'obtention de E [135] selon que l'on sélectionne l'émission des donneurs ou des accepteurs¹⁹; selon que l'on procède à une analyse spectrale [136, 137]; que l'on réalise une comparaison avant/après photo-blanchiment d'une des espèces en jeu [138] ou en utilisant un standard de référence [139]; ou encore que l'on emploie plusieurs excitations laser [140]. Chaque équipe introduisant de plus ses propres notations pour leurs calculs de correction des bruits de fond, la comparaison directe de valeurs de E obtenues dans différents contextes expérimentaux devenait difficile, alors même que le champ d'étude des molécules uniques²⁰ montrait qu'une harmonisation des pratiques était tout à fait susceptible de produire des résultats consistants [141].

2.2.3.2 L'apport du cadre QuantI-FRET

C'est dans ce contexte qu'il faut situer le travail de Coullomb *et al.* [142, 143]. L'objectif annoncé est de repartir des équations physiques pour déterminer l'origine du signal dans les 3 grandes configurations d'imagerie FRET, de manière à prendre en compte au mieux les artefacts photo-physiques; et de proposer une méthode expérimentale simple de calibration à même de déterminer aisément les facteurs de correction à appliquer. Cette méthode repose sur l'utilisation de 2 sources d'excitation – chacune spécifique au donneur et accepteur utilisé – et la séparation des signaux I_i mesurés, *via* un jeu de filtres adéquats. Chacun de ces signaux est défini par le nombre de donneurs et d'accepteurs n^D et n^A , l'efficacité du phénomène de FRET notée E , ainsi que les différents paramètres photo-physiques et instrumentaux mis en jeu – Éq. (2.2.16) à (2.2.18). $L_i/h\nu_i$ désigne le flux d'excitation à la longueur d'onde choisie pour l'excitation de l'émetteur i ; σ_i^j la section efficace d'absorption de j à la longueur d'onde d'excitation de i ; ϕ_i le rendement quantique de i ; et η_i^j est l'efficacité de détection des photons émis par j dans la fenêtre de détection de i . Dans le détail, les images correspondant aux signaux à acquérir sont donc :

- I_{AA} : le signal mesuré dans la fenêtre de détection de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur – Éq. (2.2.16). On reconnaît les composantes de la définition du signal de fluorescence en section 2.1.2.2, complétées par l'efficacité de détection η_{Adet}^{Aem} du signal de l'accepteur dans sa fenêtre de détection dédiée.
- I_{DD} : le signal mesuré dans la fenêtre de détection du donneur à la longueur d'onde d'excitation du donneur – Éq. (2.2.17). Cette équation est construite de la même manière que la relation définissant I_{AA} , en ajoutant la prise en compte du *quenching* du donneur par le facteur $(1-E)$.
- I_{DA} : le signal mesuré dans la fenêtre de détection de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur – Éq. (2.2.18). Le 1^{er} terme correspond au signal provenant effectivement du FRET. Le 2^{ème} renvoie à la contribution du débordement spectral des donneurs

- 18. Amenant avec elles de nombreux sigles spécifiques :
sFRET (*Spectral FRET*)
APB (*Acceptor Photo-Bleaching*)
lux-FRET (*Linear-Unmixing FRET*)
etc.

- 19. Causant alors une variabilité des valeurs d'efficacité FRET obtenues pour une même expérience.

- 20. smFRET (*Single-Molecule FRET*).

$$I_{AA} = n^A \cdot \frac{L_A}{h\nu_A} \cdot \sigma_{Aex}^A \cdot \phi_A \cdot \eta_{Adet}^{Aem} \quad (2.2.16)$$

$$I_{DD} = n^D \cdot \frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{Dex}^D \cdot (1-E) \cdot \phi_D \cdot \eta_{Ddet}^{Dem} \quad (2.2.17)$$

$$I_{DA} = n^D \cdot \frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{Dex}^D \cdot E \cdot \phi_A \cdot \eta_{Adet}^{Aem} + n^D \cdot \frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{Dex}^D \cdot (1-E) \cdot \phi_D \cdot \eta_{Ddet}^{Dem} + n^A \cdot \frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{Dex}^A \cdot \phi_A \cdot \eta_{Adet}^{Aem} \quad (2.2.18)$$

dans la fenêtre de détection de l'accepteur (*bleedthrough*, ou *BT*), et le 3^{ème} terme correspond à la contribution de l'excitation directe de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur (*direct excitation*, ou *DE*).

Revenir à ces définitions permet alors aux auteur·ice·s de définir formellement les facteurs de correction :

- α^{BT} : la proportion de *BT* des donneurs dans la fenêtre de détection de l'accepteur – Éq. (2.2.19).
- δ^{DE} : la proportion de *DE* des accepteurs à la longueur d'onde d'excitation du donneur – Éq. (2.2.20).
- γ^M : quantifiant la différence d'efficacité de détection entre les fenêtres de détection utilisées – Éq. (2.2.21).
- β^X : la différence d'efficacité d'excitation concernant les canaux d'excitation utilisés – Éq. (2.2.22).

En définissant le signal I_{DA}^{corr} obtenu après prise en compte des corrections de *diaphotie* entre les signaux (*crosstalk corrections*, ou bruits de fond) avec l'Éq. (2.2.23), ainsi que la stœchiométrie S des fluorophores présents dans chaque pixel d'une image de l'échantillon en Éq. (2.2.24), il devient possible d'obtenir *in fine* 2 équations maîtresses pour E et S – cf. Éq. (2.2.25) et (2.2.26). L'efficacité E est ici définie de manière *phénoménologique*, i.e. sans modèle physique sous-jacent du FRET : on peut, dans un second temps, remonter à des distances en choisissant la modélisation la plus appropriée par rapport à la situation expérimentale.

Si les facteurs de correction α^{BT} et δ^{DE} ne nécessitent respectivement que d'imager les situations de donneur seul et d'accepteur seul, il est généralement plus compliqué de déterminer les paramètres γ^M et β^X . En effet, le rendement quantique ϕ ainsi que la section efficace d'absorption σ dépendent fortement de l'environnement des émetteurs, d'autant plus si ces derniers sont au voisinage immédiat d'une interface. L'originalité du travail de Coullomb *et al.* réside dans la démonstration d'une méthode de calibration simple nécessitant uniquement un échantillon de stœchiométrie S connue et de distance entre donneur et accepteur fixée. Cette calibration peut être vérifiée en traçant un histogramme 2D de S en fonction de E ²¹. Après une "bonne" calibration, il est alors même possible d'imager la stœchiométrie S , de manière à interpréter plus finement les potentielles variations de l'efficacité du FRET lors d'une étude par imagerie.

Nous avons présenté le phénomène de FRET depuis ses formalisations théoriques jusqu'aux applications récentes, notamment en imagerie. La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à la présentation du dispositif d'imagerie utilisé dans ce projet doctoral.

$$\alpha^{BT} = \frac{\eta_{A_{det}}^{Dem}}{\eta_{D_{det}}^{Dem}} = \frac{I_{DA}^{[D \text{ isolé}]}}{I_{DD}^{[D \text{ isolé}]}} \quad (2.2.19)$$

$$\delta^{DE} = \frac{\frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{Ddex}^A}{\frac{L_A}{h\nu_A} \cdot \sigma_{Aex}^A} = \frac{I_{DA}^{[A \text{ isolé}]}}{I_{AA}^{[A \text{ isolé}]}} \quad (2.2.20)$$

$$\gamma^M = \frac{\phi_A \cdot \eta_{A_{det}}^{Aem}}{\phi_D \cdot \eta_{D_{det}}^{Dem}} \quad (2.2.21)$$

$$\beta^X = \frac{\frac{L_A}{h\nu_A} \cdot \sigma_{A_{dex}}^A}{\frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{D_{dex}}^D} \quad (2.2.22)$$

$$I_{DA}^{corr} = I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA} \quad (2.2.23)$$

$$S = \frac{n^D}{n^D + n^A} \quad (2.2.24)$$

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{\gamma^M I_{DD} + I_{DA}^{corr}} \quad (2.2.25)$$

$$S = \frac{\gamma^M I_{DD} + I_{DA}^{corr}}{\gamma^M I_{DD} + I_{DA}^{corr} + \frac{I_{AA}}{\beta^X}} \quad (2.2.26)$$

21. Les grandeurs E et S n'étant pas corrélées sur une échantillon où S est fixé, les nuages de points obtenus avec un tel histogramme 2D doivent être quasi parfaitement horizontaux. La présence d'une corrélation entre E et S indique au contraire une mauvaise détermination de γ^M et β^X .

2.3 IMAGERIE DE FLUORESCENCE GRAND-CHAMP

2.3.1 IMAGERIE EN ÉPIFLUORESCENCE

2.3.1.1 Généralités sur la microscopie

Un microscope a pour fonction essentielle de réaliser l'image agrandie d'un échantillon sur un photo-détecteur : le plus souvent, une caméra CCD, EMCCD, ou CMOS. La Figure 2.12 présente les éléments de base nécessaires pour enregistrer ce type d'images. L'objectif est un composant optique constitué d'un agencement de plusieurs lentilles qui sert à collecter le signal provenant de l'échantillon. Lorsque l'on fait la mise au point, on déplace l'objectif de manière à conjuguer le plan de l'échantillon avec celui du photo-détecteur. À la sortie de l'objectif, l'image de l'échantillon est projetée à l'infini. Pour produire une image dans le plan de la caméra, il faut donc utiliser une lentille convergente, appelée lentille de tube, de focale f_{LT} . En microscopie optique classique, l'échantillon est illuminé en transmission : on parle de *diascopie*. En microscopie de fluorescence, le chemin d'excitation passe par l'objectif, ce qui correspond à une configuration en *épiscopie* (épifluorescence). Cette approche en réflexion requiert l'introduction d'une lame réfléchissante ou d'un miroir dichroïque entre l'objectif et la lentille de tube, de manière à séparer l'illumination du signal de l'échantillon ²².

2.3.1.2 Paramètres instrumentaux et résolution

Le grandissement G , défini en Éq. (2.3.1), quantifie le rapport entre la taille de l'image $A'B'$ produite sur la caméra et celle de l'objet AB dans le plan de l'échantillon. L'ouverture numérique ON de l'objectif est définie en Éq. (2.3.2), où θ_{max} est l'angle maximum de collection de la lumière et n l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'échantillon. Ces grandeurs, ON et θ_{max} , sont utilisées pour déterminer la limite de résolution latérale Δr et axiale Δz de l'objectif – cf. Éq. (2.3.3) et Éq. (2.3.4), où λ_{em} est la longueur d'onde émise par l'échantillon. La résolution, ici donnée selon le critère de Rayleigh, définit la distance de séparation limite à partir de laquelle 2 objets ponctuels proches ne peuvent plus être distingués sur l'image en raison du phénomène de diffraction de la lumière. Lorsque l'on illumine un objet ponctuel dans un échantillon, son image est limitée par diffraction – Figure 2.13 (a). La distribution 3D d'une telle image est nommée fonction d'étalement du point, ou PSF ²³. La Figure 2.13 (b) illustre le phénomène de superposition des PSF lorsque la distance de séparation Δr entre 2 objets ponctuels devient trop faible pour les distinguer. Pour augmenter les capacités de résolution en microscopie de fluorescence, le moyen le plus évident consiste à augmenter le plus possible l'ouverture numérique ON . Pour cela, on utilise des objectifs à immersion à eau ou à huile, ce qui permet d'augmenter l'indice de réfraction n du milieu entre l'objectif et l'échantillon. On peut ainsi atteindre aisément $ON = 1,4$.

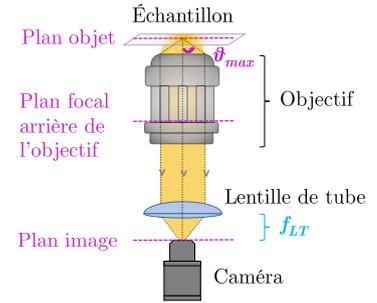


FIGURE 2.12 – Schéma général d'un microscope optique.

22. Notre dispositif optique, décrit en Figure 2.15 illustre ce type de montage.

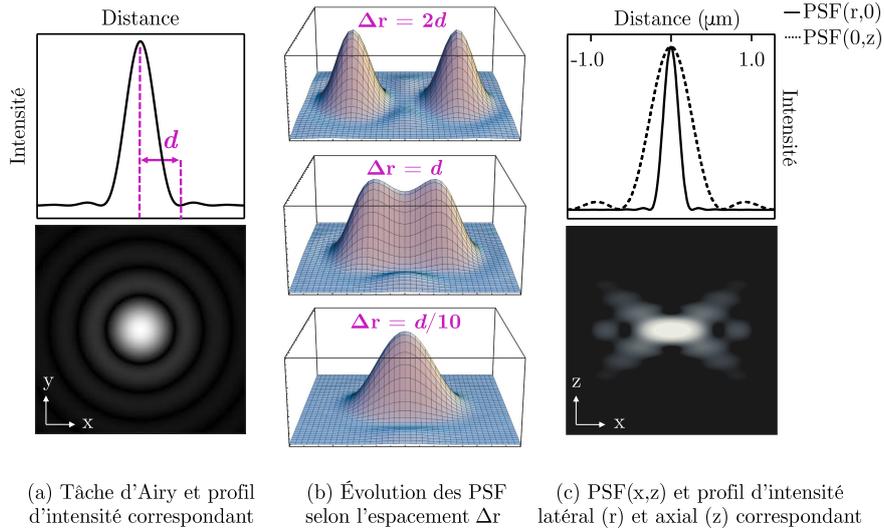
$$G = \frac{A'B'}{AB} \quad (2.3.1)$$

$$ON = n \cdot \sin\theta_{max} \quad (2.3.2)$$

$$\Delta r = 1,22 \frac{\lambda_{em}}{2ON} \quad (2.3.3)$$

$$\Delta z = \frac{\lambda_{em}}{n(1 - \cos\theta_{max})} \quad (2.3.4)$$

23. Point Spread Function.



(a) La distance d sur le profil d'intensité représente la distance entre le maximum de signal et le premier minimum. (b) Les représentations graphiques des PSF sont extraites de [109]. (c) PSF (x,z) de la figure de diffraction en échelle log, calculée pour un objectif d'ON = 1,2 sous illumination à $\lambda = 488$ nm dans l'eau.

La microscopie d'épifluorescence présente toutefois un inconvénient majeur lorsque l'on souhaite imager des phénomènes d'interface entre une cellule et son substrat, car l'ensemble de la cellule est illuminée. Aucune sélection axiale n'est réalisée : tout le corps cellulaire est donc irradié et la caméra collecte un signal hors focus important, qui induit un très mauvais rapport signal sur bruit.

2.3.2 PRINCIPES DE L'IMAGERIE TIRF

Une manière de minimiser le problème posé en fin de section précédente est de recourir à une illumination de l'échantillon par réflexion totale interne, comme introduit par Axelrod [71] en 1981. Le principe de cette méthode, qu'on nomme configuration TIRF²⁴, est illustré Figure 2.14. La différence d'indice de réfraction entre le verre et le milieu d'observation aqueux²⁵ induit l'existence d'un angle critique θ_c au-delà duquel il y a réflexion totale interne dans le verre. Si l'angle d'incidence θ_i est supérieur ou égal à l'angle critique θ_c , défini en Éq. (2.3.5), alors le faisceau est totalement réfléchi dans le milieu le plus réfringent – ici, le verre, cf. Figure 2.14 (a). Une onde électromagnétique évanescente existe alors dans le milieu de faible indice, Figure 2.14 (b). Son intensité est donnée par la relation en Éq. (2.3.6), où la grandeur κ représente la distance d'atténuation – parfois nommée profondeur de pénétration – de l'onde évanescente. Cette dernière, définie par l'Éq. (2.3.7) pour $\theta \geq \theta_c$, prend des valeurs typiques de l'ordre de 100-200 nm dans le visible. Ainsi, à l'aide des ondes évanescentes, l'illumination de l'échantillon devient quasiment négligeable au-delà de quelques centaines de nm au-dessus de l'interface. Comme l'illustrent les Figures 2.14 (c) et (d), cela a pour conséquence que seuls les fluorophores présents sur la partie ventrale d'une cellule seront excités, minimisant ainsi à la source le bruit issu de l'illumination de fluorophores hors focus²⁶.

FIGURE 2.13 – Limite de résolution latérale à partir du critère de Rayleigh. Inspiré de [20].

24. *Total Internal Reflection Fluorescence.*

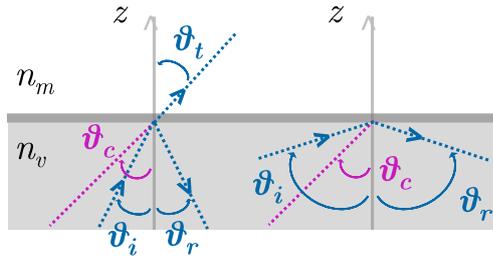
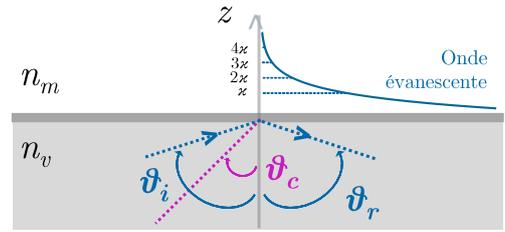
25. Dans notre cas, à 458 nm :
 $n_v \sim 1,533$
 $n_m \sim 1,338$

$$\theta_c = \arcsin \frac{n_m}{n_v} \quad (2.3.5)$$

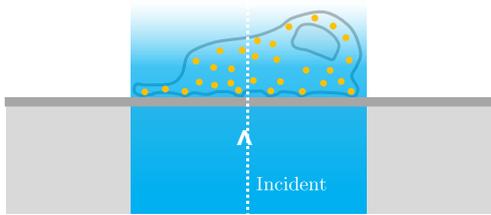
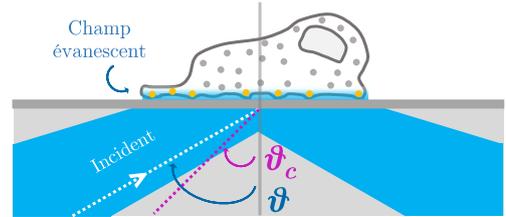
$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\frac{z}{\kappa}} \quad (2.3.6)$$

$$\kappa(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{n_v^2 \sin^2(\theta) - n_m^2}} \quad (2.3.7)$$

26. Ce qui optimise le contraste des images au niveau de l'interface, et augmente très significativement le rapport signal sur bruit.

(a) Réflexion totale interne lorsque $\theta_i \geq \theta_c$ 

(b) Onde évanescente

(c) Épifluorescence $\theta_i = 0$ (d) TIRF $\theta_i \geq \theta_c$

Nous avons présenté quelques contributions de l'imagerie TIRF à l'étude de l'adhésion cellulaire au chapitre précédent. En imagerie NEF, on utilise aussi ce type d'illumination, de manière à confiner l'excitation de l'échantillon au voisinage immédiat sur l'interface verre/eau, préservant ainsi le corps cellulaire de toute photo-dégradation.

FIGURE 2.14 – Comparaison des méthodes d'illumination Épifluorescence et TIRF. Les angles θ_c , θ_i , θ_r , θ_t désignent respectivement les angles critique, incident, réfléchi, transmis. Inspiré de [20].

2.4 MONTAGE EXPÉRIMENTAL

2.4.1 DESCRIPTION DU MONTAGE

Il existe différents montages optiques permettant de faire de l'imagerie TIRF, résumés dans la référence [20]. Dans le cadre de ce projet doctoral, j'ai mis en œuvre un montage optique qui intègre les impératifs suivants : adaptabilité aux dispositifs commerciaux existants ; prise en main rapide pour n'importe quelle personne utilisant un microscope de façon récurrente. C'est pourquoi la base de notre dispositif expérimental repose sur un microscope commercial²⁷ dont le bâti n'est modifié qu'à la marge, et complété par un montage extérieur sur table optique, employant les composants les plus simples possibles. Le schéma du montage final que nous avons développé est détaillé sur la Figure 2.15. On peut y distinguer 4 parties fonctionnelles, qui sont expliquées dans les sections suivantes.

2.4.1.1 Voies d'excitation et polarisation

Deux sources laser sont utilisées dans le montage, de longueur d'onde $\lambda = 458 \text{ nm}$ pour l'excitation des boîtes quantiques (donneuses FRET), et 633 nm pour l'excitation directe des molécules acceptrices²⁸. Afin de minimiser les fluctuations de pointé, les lasers fonctionnent toujours au maximum de leur puissance et l'on contrôle l'irradiance au niveau

27. Microscope inversé Zeiss Axio Observer D1.

28. Références respectives : Sapphire 458-50 CW CDRH 50 mW, Coherent et HNL150-EC, 35 mW, Thorlabs.

des échantillons par un jeu de filtres neutres absorbants – définis par leur densité optique DO – placé juste après les lasers sur le chemin optique.

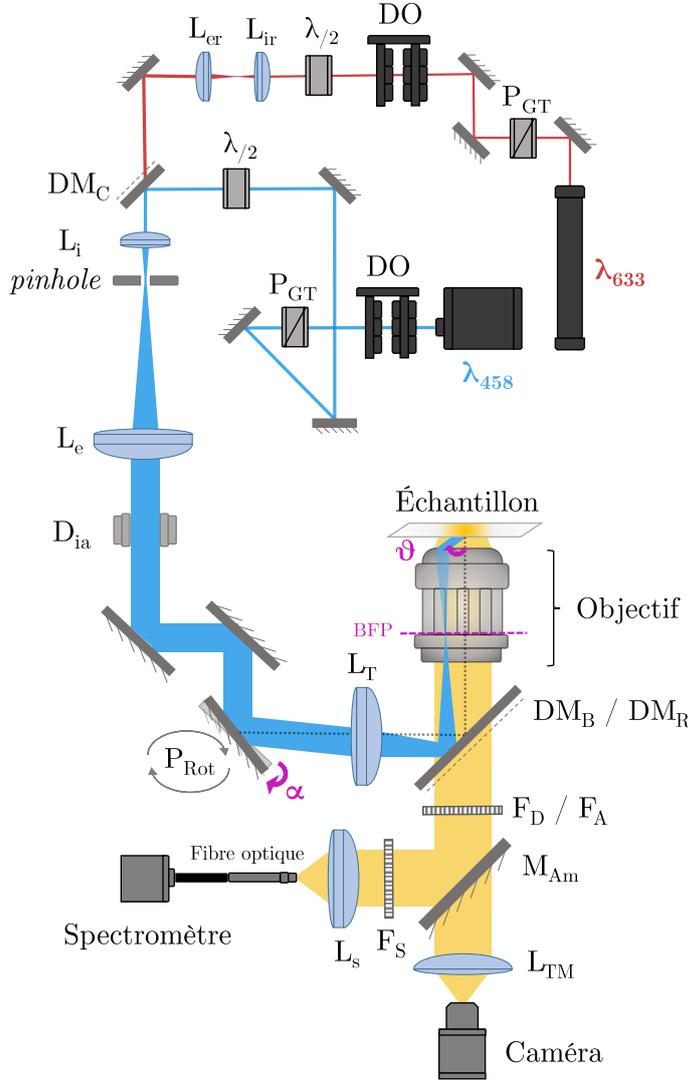


FIGURE 2.15 – Schéma général du montage optique. Seul le laser à 458 nm est représenté sur le chemin optique partagé par les 2 lasers (après le *pinhole*).

P_{GT} : Polarisateur de Glan-Taylor (Thorlabs)

DO : Jeu de densités optiques

$\lambda/2$: Lame demi-onde (Thorlabs)

L_{ir} et L_{er} : Lentilles convergentes de focales f_{ir} et $f_{er} = 19$ et 40 mm

DM_C : Dichroïque Di63-R488-t3

L_i et L_e : Lentilles convergentes de focales f_i et $f_e = 25$ et 300 mm

pinhole = $15 \mu\text{m}$

D_{ia} : Diaphragme réglable

P_{Rot} : Platine de rotation PRS-110, PI miCos, Résolution $2 \cdot 10^{-5}^\circ$

L_T : Lentille de tube, $f_T = 300$ mm

DM_B : Dichroïque Di03-R473-t3

DM_R : Dichroïque Di03-R635-t3

BFP : Plan focal arrière de l'objectif

Objectif : Zeiss α Plan-Apochromat

À huile; $x 63$; $ON = 1,46$

F_D et F_A : Jeux de filtres, voir 2.4.1.4

M_{Am} : Miroir amovible

L_{TM} : Lentille de tube du microscope de focale $f_{TM} = 164,5$ mm

F_S : Passe haut BLP01-488R-25

L_S : Lentille convergente

$f_T = 30$ mm

Chaque faisceau passe ensuite à travers un polariseur de Glan-Taylor noté P_{GT} , dont le principe est schématisé sur la Figure 2.16 (a). Constitué de 2 prismes triangulaires joints, ce composant sert à définir la polarisation des faisceaux laser le plus parfaitement possible. Une lame demi-onde, notée $\lambda/2$, permet d'ajuster la polarisation du faisceau afin de se placer en polarisation s sur l'échantillon, tel qu'explicité en Figure 2.16 (b). Il reste néanmoins une faible composante du faisceau non polarisée s car l'émission laser ne se réduit pas au mode fondamental TEM_{00} . L'élimination des modes résiduels – TEM_{01} , TEM_{10} , et TEM_{11} , etc. – nécessite la mise en place d'un filtrage spatial, qui permet également d'obtenir un profil gaussien d'illumination homogène.

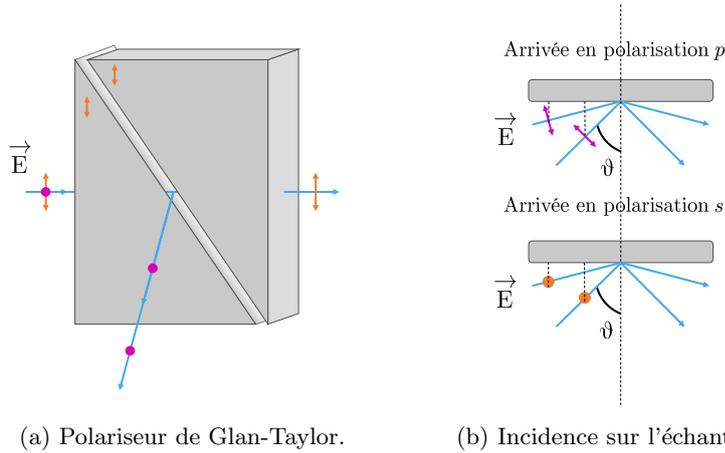


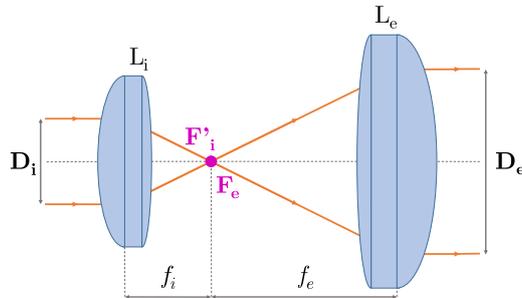
FIGURE 2.16 – Principe du polariseur de Glan-Taylor.

(a) Le gap d'air permet la réflexion de la lumière polarisée *s* et la transmission de la lumière polarisée *p* par rapport au plan du polariseur.

(b) Cette lumière arrive polarisée *s* par rapport au plan de l'échantillon et son orientation ne varie donc pas avec l'angle d'incidence, contrairement à la lumière qui arriverait polarisée *p* par rapport au plan de l'échantillon.

2.4.1.2 Largeur des faisceaux laser et filtrage spatial

Tout d'abord, notons que le champ d'observation final sur l'échantillon est directement lié à la largeur D du faisceau laser²⁹ : il sera d'autant plus grand que le faisceau est étendu. Pour cela, on utilise un jeu de 2 lentilles convergentes³⁰ montées dans un système afocal³¹. Elles sont disposées de manière à ce que la focale image F'_i de la première lentille L_i corresponde au point focal objet F_e de la seconde – Figure 2.17. Ainsi, le faisceau émergent est collimaté, et sa taille D_e est définie par le rapport de focale – Éq. (2.4.1). Le filtrage spatial est réalisé en introduisant un *pinhole* en F'_i . Au premier niveau, le choix du *pinhole* répond à un critère simple : sa taille doit être proche de celle d'un spot limité par diffraction produit à travers L_i .



29. Défini par l'ouverture du diaphragme D_{ia} Figure 2.15.

30. Communément appelé "Étendeur de faisceau" / *Beam Expander*.

31. Par définition, un système optique afocal conserve la parallélité des rayons lumineux.

$$D_e = \frac{f_e}{f_i} D_i \quad (2.4.1)$$

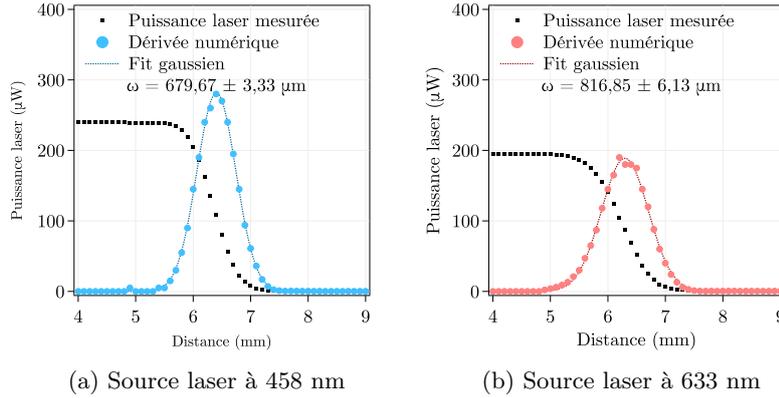
FIGURE 2.17 – Schéma de principe d'un étendeur de faisceau réalisé à partir de 2 lentilles convergentes.

La taille D_s d'un tel spot dépend de la longueur d'onde incidente λ_i , de la focale de la lentille L_i , et la taille du faisceau laser incident D_i – Éq. 2.4.2. Cette dernière est donnée par le *waist* ω . La détermination expérimentale de ω a été faite via la "méthode du couteau". Il s'agit de mesurer l'évolution de la puissance laser³² au fur et à mesure de l'obstruction du faisceau incident à l'aide d'une lame de rasoir placée dans le front d'onde. La lame est installée sur une platine de translation micrométrique pour contrôler finement sa position. En dérivant numériquement la courbe obtenue, on remonte au profil gaussien de l'intensité du faisceau, qu'il est possible de *fitter* à l'aide de l'Éq. (2.4.3) afin d'en extraire la valeur de ω . La Figure 2.18 donne les résultats de mes mesures.

$$D_s \approx 1,22 \frac{\lambda_i f_i}{D_i} \quad (2.4.2)$$

32. PM100A, Thorlabs, Sonde : S120VC, 200-1100 nm, 50 mW.

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{2(x-x_0)^2}{\omega^2}} \quad (2.4.3)$$

FIGURE 2.18 – Mesure du *waist* par la "méthode du couteau".

L'illumination à 458 nm étant notre mode d'excitation principal, ce laser sert de référence pour le choix du couple de lentilles et du *pinhole* afin de permettre un bon filtrage sans pour autant perdre trop de puissance. Après plusieurs essais, nous avons sélectionné une lentille L_i de distance focale $f_i = 25$ mm et un *pinhole* de 15 μm de diamètre. La valeur de ω déterminée pour cette lentille prédit $D_s(458 \text{ nm}) \approx 20 \mu\text{m}$ et $D_s(633 \text{ nm}) \approx 24 \mu\text{m}$. Empiriquement, on obtient un bon filtrage à 458 nm au prix d'une perte raisonnable de 12,8 % du signal. Dans ces conditions, la perte à 633 nm s'élève, elle, à 33 %, ce qui nous a conduit à installer un étendeur de faisceau³³ en amont de la lame dichroïque DM_C combinant les chemins optiques des 2 lasers. Cette extension conduit le faisceau à être plus focalisé par la lentille L_i et plus compatible avec le *pinhole* sélectionné. De fait, la perte de signal mesurée à 633 nm n'était plus que de 12,5 % après cet ajout. Enfin, à la suite de la lentille L_e collimatant les faisceaux, le diaphragme D_{ia} positionné juste après permet de finaliser le filtrage spatial, en ne laissant passer que le disque central du motif de diffraction – la partie centrale de la tâche d'Airy.

2.4.1.3 Inclinaison des faisceaux et conjugaison des plans

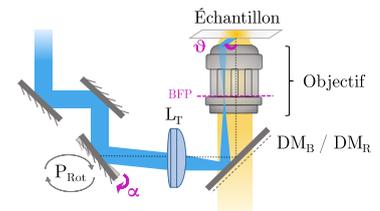
Une fois les faisceaux filtrés et collimatés, ils arrivent sur la partie critique du montage TIRF : le miroir d'inclinaison qui permet de contrôler l'angle θ du faisceau sur l'échantillon. Ce dernier est monté sur une platine de rotation motorisée, notée P_{Rot} sur la Figure 2.19, placée avant l'entrée du bâti du microscope. Le *tilt*, ou inclinaison du miroir, est noté α . Pour éviter toute distorsion du champ d'illumination lors de la variation de l'angle α et donc de θ , il faut que le plan pivot du miroir d'inclinaison soit parfaitement conjugué avec le plan de l'échantillon. Aussi l'ensemble des 3 grands miroirs permettant l'alignement précis du faisceau avec la lentille de tube L_T sont montés sur une plateforme équipée de platines de translation micrométriques pour chaque miroir, de manière à parfaire leur positionnement respectif. Il faut de plus noter que les lames dichroïques³⁴ DM_B et DM_R sont collées sur leur support dans la tourelle interne du

33. Jeu de lentilles sélectionné :

$$f(L_{ir}) = 19 \text{ mm}$$

$$f(L_{ir}) = 40 \text{ mm}$$

L'élargissement de 2,1 implique une nouvelle valeur prédite pour $D_s(633 \text{ nm}) \approx 12 \mu\text{m}$

FIGURE 2.19 – Arrivée des faisceaux d'excitation sur le microscope. La lentille de tube L_T focalise le faisceau incident sur le plan focal arrière de l'objectif (BFP). Elle est orientée de façon à pré-compenser les aberrations sphériques.

34. Via données Semrock :

$DM_B - B$ pour Bleu

Réflex. ≥ 94 % 457,9–478,0 nm

Transm. ≥ 93 % 486,6–1200 nm

$DM_R - R$ pour Rouge

Réflex. ≥ 94 % 632,8–641,7 nm

Transm. ≥ 93 % 658,8–1200 nm

microscope, afin d'éviter leur déformation – malgré le fait qu'il s'agisse de lames de 3 mm d'épaisseur. L'ajustement de la position des 3 miroirs d'entrée avant la lentille de tube L_T doit ainsi être optimisé afin de précisément ajuster la conjugaison entre le plan pivot du miroir et celui de l'échantillon. Après les différents aller-retours d'alignement et ajustement, le décalage angulaire résiduel constaté était de -0.28° , par rapport à un enchaînement parfait de miroirs à 45° les uns des autres jusqu'à l'échantillon.

2.4.1.4 Détection du signal

Le signal est collecté par le même objectif qu'utilisé pour générer les ondes évanescentes. Selon le positionnement du miroir M_{Am} , ce signal est transmis : soit (a) à un spectromètre UV-visible³⁵ installé sur la table optique; soit (b) à une caméra CMOS³⁶ à travers la lentille de tube L_{TM} du microscope. Dans le cas (a), le signal est filtré en F_S ³⁷ et les jeux de filtres F_D et F_A sont absents. La lentille L_S , par son choix de distance focale de 30 mm, permet de focaliser le signal sur une fibre optique³⁸ de 105 μm de cœur, ce qui correspond à une zone de détection de 11,5 μm de diamètre. Dans le cas (b) on souhaite pouvoir créer 2 fenêtres de détection³⁹ bien distinctes pour imager séparément le signal des QDs, donneuses FRET (I_{DD}), de celui des molécules acceptrices, qu'elles soient imagées *via* leur signal en FRET (I_{DA}) ou à leur longueur d'onde d'excitation "naturelle" (I_{AA}). Pour cela, on introduit 2 jeux de filtres bien choisis, que l'on note F_D pour la fenêtre de détection du donneur FRET, et F_A pour la fenêtre de détection de l'accepteur.

2.4.2 CARACTÉRISATION DU DISPOSITIF TIRF

2.4.2.1 Irradiance laser

Pour déterminer l'irradiance laser sur l'échantillon, il faut en premier lieu évaluer le *waist* des faisceaux à 458 et 633 nm sur l'échantillon. Pour caractériser le faisceau à 458 nm, nous avons utilisé une lamelle fonctionnalisée par une monocouche de QDs. En ce qui concerne le faisceau à 633 nm, il s'agit d'une lamelle recouverte par de l'Alexa Fluor 647. La Figure 2.21 synthétise les différents aspects de cette caractérisation. Les images acquises en épifluorescence et en TIRF, pour les 2 sources d'illumination, peuvent faire l'objet d'un *fit* avec une fonction gaussienne 2D – cf. Éq. (2.4.4) – ce qui donne accès à la valeur du *waist* latéral W de l'illumination. L'intensité laser est déterminée avec la même sonde que celle utilisée pour la méthode du couteau en section 2.4.1.2. Dans cette situation, la sonde est positionnée au-dessus de l'échantillon installé sur le microscope, et le jeu de filtres neutres absorbants permet de modifier l'intensité incidente. La Figure 2.22 synthétise donc l'évolution de l'irradiance laser à 458 nm et 633 nm en fonction des densités optiques installées sur le montage.

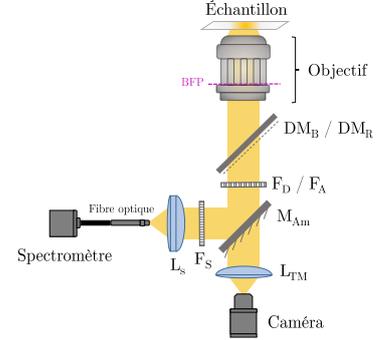


FIGURE 2.20 – Collection du signal

35. USB2000+, Ocean Optics

36. Orca Flash 4.0, C11440, Hamamastu

37. *Via données Semrock :*

Filtre spectromètre F_S

Passe haut pour éliminer le résidu d'excitation laser à 458 nm
BLP01-488R-25

Transm. $\geq 93\%$ 504,7–900 nm

38. AFS105/125Y, Thorlabs

$D_{cœur} = 105 \mu\text{m} \pm 2\%$

$D_{cladding} = 125 \mu\text{m} +1/-3 \mu\text{m}$

39. *Via données Semrock :*

Filtrage donneur F_D

Passe-haut pour éliminer le résidu d'excitation laser à 458 nm
LP02-473RS-25

Transm. $\geq 93\%$ 483,9–1066,9 nm

Passe-bande pour sélectionner l'émission des QDs. Deux choix possibles selon le pic d'émission :

FF01-590/20-25

Transm. $\geq 93\%$ 580–600 nm

FF01-600/14-25

Transm. $\geq 93\%$ 593–607 nm

Filtrage accepteur F_A

Passe-haut pour éliminer le résidu d'excitation laser à 633 nm
BLP01-635R-25

Transm. $\geq 93\%$ 660–1200 nm

Passe-bande pour sélectionner l'émission des molécules acceptrices
FF01-684/24-25

Transm. $\geq 93\%$ 672–696 nm

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{W^2}} \quad (2.4.4)$$

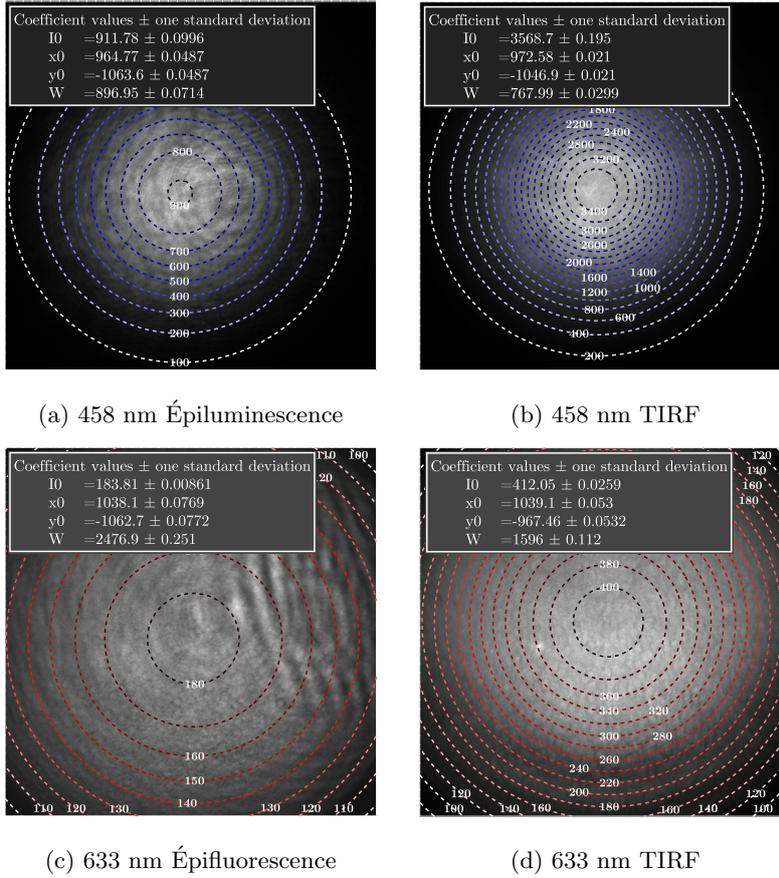


FIGURE 2.21 – Caractérisation du champ d'illumination à 458 et 633 nm.

On peut tout d'abord remarquer que le passage du mode épifluorescence au mode TIRF décale légèrement la position latérale du maximum d'intensité d'excitation, en particulier à 633 nm. De même, le *waist* du champ d'illumination diminue dans les 2 cas.

Pour déterminer l'irradiance laser, nous travaillons avec les valeurs de *waist* obtenues en TIRF, soit $767,99 \pm 0,03$ px (458 nm) et $1596 \pm 0,11$ px (633 nm).

Après mesure, la taille de nos pixels vaut $98,73 \pm 0,99$ nm.

Les valeurs de *waist* sont donc, en raison de la propagation des incertitudes : $75,8 \pm 0,8$ μm (458 nm) et $157,6 \pm 1,6$ μm (633 nm).

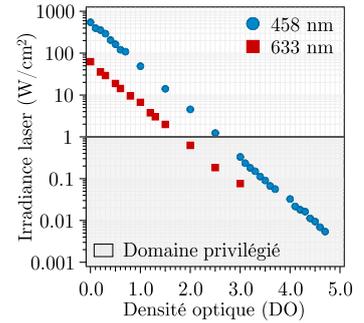


FIGURE 2.22 – Caractérisation de l'irradiance laser sur l'échantillon pour les 2 sources laser d'excitation.

2.4.2.2 Calibration de l'angle d'incidence en TIRF

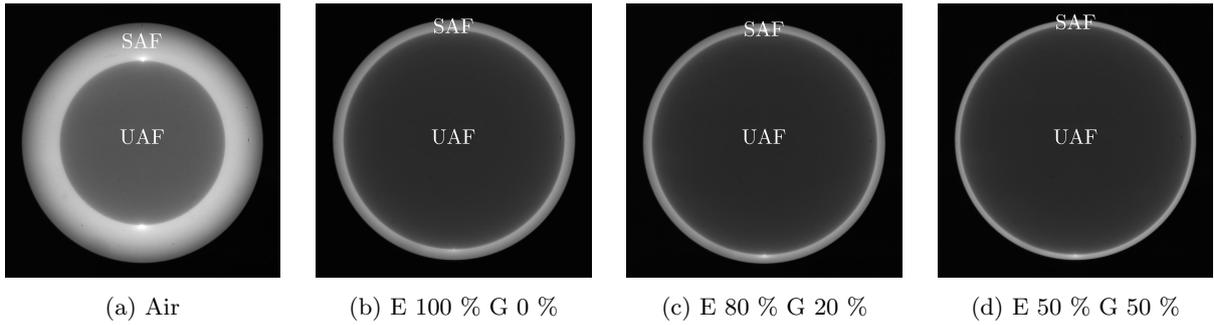
Pour déterminer de façon fiable la relation de grandissement entre l'angle α , que l'on contrôle avec la platine de rotation P_{Rot} , et l'angle θ sur l'échantillon, une méthode de calibration a été mise au point par l'équipe [144]. Elle est adaptée à tous les montages TIRF sans prisme. La procédure nécessite de modifier temporairement le montage en remplaçant le spectromètre, la fibre optique et la lentille L_S par une caméra⁴⁰ et une lentille de distance focale 150 mm, selon un montage "4f". Cela nous permet d'imager sur cette caméra le plan focal arrière de l'objectif noté BFP⁴¹. Comme on peut le constater sur la Figure 2.23, on peut y distinguer 2 régions : (a) l'émission sous-critique, notée UAF⁴², qui correspond au disque central ; et (b) l'émission super-critique (SAF)⁴³, l'anneau brillant périphérique. Son épaisseur définit le domaine de fonctionnement de l'imagerie TIRF, comprenant tous les angles compris entre θ_c et θ_{max} . Il dépend des indices de réfraction n_s du substrat et n_m du milieu d'observation, ainsi que de l'ouverture numérique ON de l'objectif. L'intensité et l'allure du signal SAF dépend aussi de la distance entre les émetteurs et la surface, ainsi que de leur diagramme de rayonnement, ce qui peut être exploité pour des mesures de distance cellule-substrat [145-147].

40. VS92-M-S, Artemis CCD Cameras.

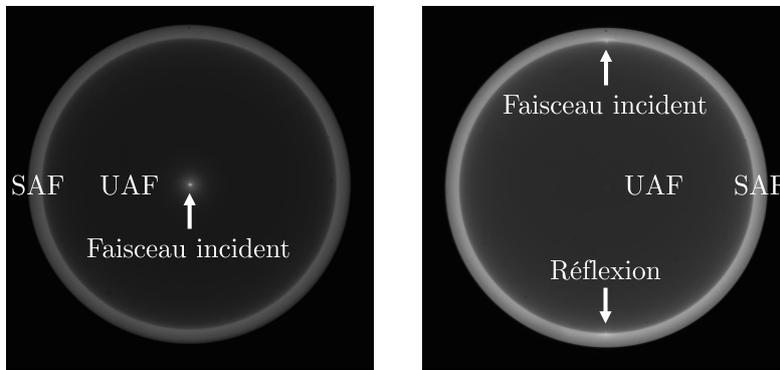
41. Back Focal Plane.

42. Under Critical Fluorescence

43. Super Critical Fluorescence



La frontière entre ces 2 zones étant caractéristique du passage à l'angle critique θ_c , il est possible de déterminer l'angle α_c correspondant (Figure 2.24) et lui associer une valeur théorique de θ_c à partir des lois de Snell-Descartes – Éq. (2.3.5).

(a) Image BFP pour $\alpha = 0$ (b) Image BFP pour $\alpha \geq \alpha_c$

En faisant varier n_m via des mélanges d'eau et de glycérol, on peut alors obtenir plusieurs mesures de α_c correspondant aux valeurs de θ_c théoriques, et ainsi remonter à la relation de grandissement entre α_c et θ_c par interpolation polynomiale, Figure 2.25 (a). L'indice n_m résultant des différents mélanges est précisément mesuré à l'aide d'un réflectomètre de Abbe⁴⁴. L'écart-type issu des 10 mesures faites pour chaque mélange est négligeable par rapport à l'incertitude sur α_c . Pour une interface verre/eau, notre domaine TIRF commence donc pour le couple $(\alpha_c; \theta_c)$ de valeurs $(0,3325; 60,83)^\circ$. Définir la fin du domaine de fonctionnement nécessite de déterminer l'angle θ_{max} . Il s'agit théoriquement de l'angle où le faisceau laser sort de l'objectif, défini par son ouverture numérique. En pratique, l'apparition d'aberrations optiques restreint le domaine de fonctionnement selon la taille du champ d'observation dont on a besoin. Dans notre cas, l'angle θ_{max} est déterminé par l'angle où se manifestent des aberrations gênantes lors de l'observation d'échantillons biologiques (cellules étalées sur un substrat). La Figure 2.25 (b) synthétise ces expériences, réalisées avec un marquage cellulaire par de la DiO et de la DiD, de manière à distinguer les spécificités des situations d'excitation à 458 et 633 nm. On observe une grande variation de α_{max} (θ_{max}) selon la taille des cellules observées et leur étalement dans le champ d'observation.

FIGURE 2.23 – Évolution de la zone SAF selon l'indice de réfraction du milieu déposé sur le verre (mélange Eau/Glycérol).

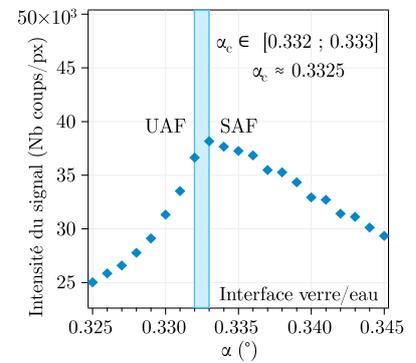
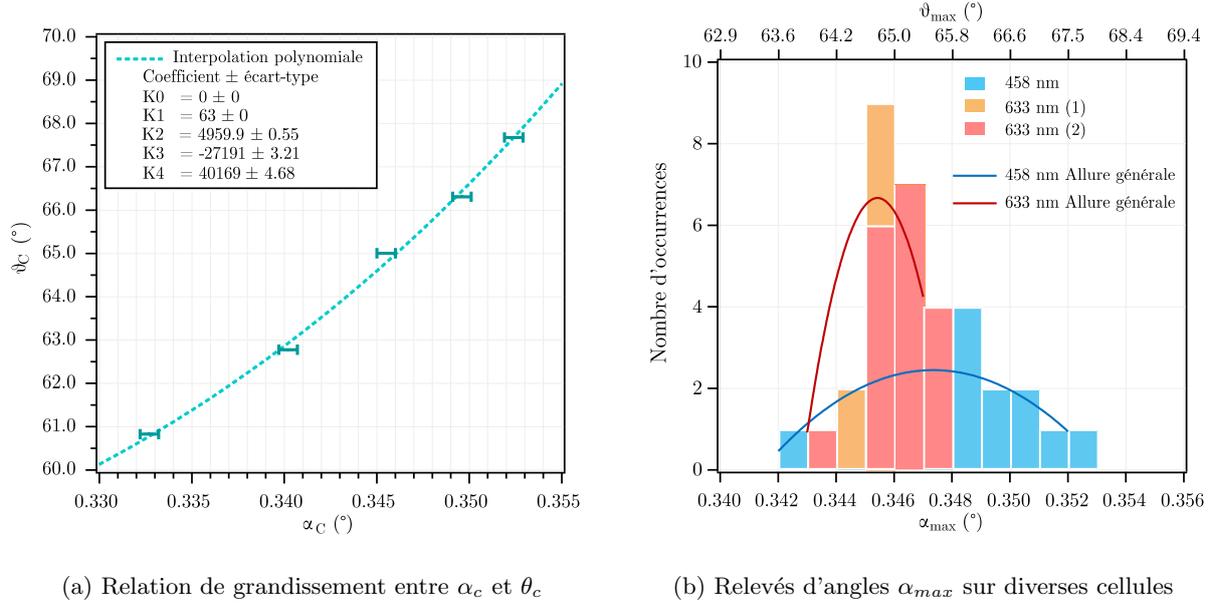
(c) Luminescence en fonction α

FIGURE 2.24 – Exemple de détermination de l'angle α_c , ici dans le cas de l'interface verre / eau.

44. Abbe 60/ED
Bellingham+Stanley, Xylem.



En particulier, un large étalement des cellules selon l'axe horizontal de la caméra conduit à l'apparition rapide d'aberrations gênant l'observation, ce qui se traduit par des valeurs de α_{max} comprises entre 0,342 et 0,352, soit θ_{max} entre 63,6 et 67,5°.

2.4.2.3 Longueur de pénétration de l'onde évanescente

À partir de cette calibration (α ; θ) et de la détermination du domaine de fonctionnement TIRF, il est possible de calculer l'évolution de la distance d'atténuation κ dans les différentes configurations qui nous sont accessibles d'après l'Éq. (2.3.7). La Figure 2.26 montre que nous pouvons approcher une valeur de κ d'environ 120 nm pour $\theta = 63,6^\circ$ à 458 nm. On constate que cette distance d'atténuation diminue rapidement avec l'augmentation de l'angle d'incidence. La valeur de κ est de plus sensible à l'indice de réfraction du milieu⁴⁵. Par exemple, nous représentons sur la Figure 2.26 le cas extrême d'un indice de réfraction de valeur 1,40. Pour limiter au maximum l'illumination en profondeur de nos échantillons, nous avons quoi qu'il arrive tout intérêt à fonctionner à l'angle d'incidence le plus élevé possible. L'onde évanescente est classiquement considérée négligeable⁴⁶ à partir de 3 à 4 κ – Figure 2.14. Dans notre configuration, la portée maximale de notre onde évanescente en fin du domaine de fonctionnement TIRF peut donc être considérée comme valant ~ 400 nm pour l'illumination à 458 nm.

2.4.2.4 Fenêtres spectrales de détection

La caractérisation des voies de détection en FRET est relativement simple à mettre en œuvre. On dépose de l'Alexa Fluor 647 sur une surface fonctionnalisée par des QDs⁴⁷ et l'on acquiert tout d'abord un spectre sous excitation à 458 nm en l'absence des jeux de filtres. On recommence l'opération en ajoutant alternativement F_D puis F_A .

FIGURE 2.25 – Caractérisation du domaine de fonctionnement TIRF.

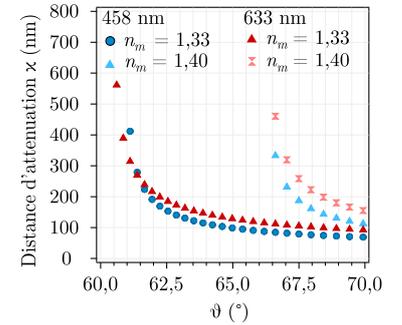


FIGURE 2.26 – Variation de la distance d'atténuation κ selon l'angle d'incidence θ

45. Ce phénomène est à la base de la méthode de cartographie des indices de réfraction effectifs de cellules individuelles par vaTIRF [72-74].

46. En effet :
 $I(3\kappa) \approx 0,050 \cdot I_0$
 $I(4\kappa) \approx 0,002 \cdot I_0$

47. Pour une présentation détaillée de ce type d'expérimentations, voir Chapitre 5 et tout particulièrement la partie 5.3.3.

Les différents spectres résultants sont normalisés et présentés sur la Figure 2.27, où la séparation spectrale est manifeste.

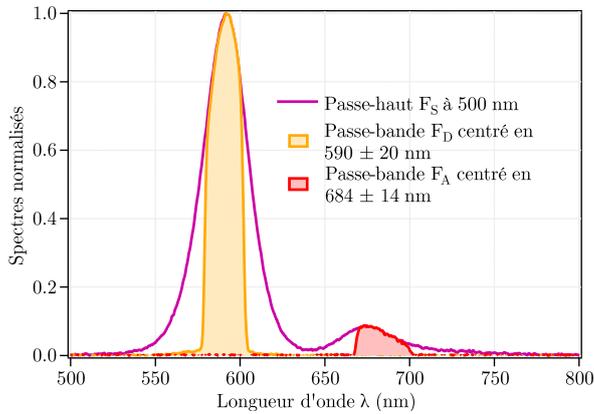


FIGURE 2.27 – Caractérisation spectrale des fenêtres de détection F_D et F_A

Nous avons vu en section 2.2.3 qu’une estimation précise des quantités – même minimales – associées au débordement spectral des QDs dans la fenêtre de détection F_A et de l’excitation directe du fluorophore accepteur à $\lambda = 458$ nm est nécessaire lorsque l’on souhaite faire de l’imagerie FRET quantitative. Selon le couple QDs / fluorophore accepteur FRET, les résultats varieront. Les quantifications détaillées seront donc précisées pour chaque cas de figure lors des présentations des différentes expériences FRET – chapitres 5 et 6.

2.5 CONCLUSIONS SUR LE DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL NEFI

Nous avons eu l’occasion de présenter le principe de l’imagerie grand-champ de luminescence / fluorescence, outil important dans les études de biophysique de l’adhésion cellulaire présentées en chapitre 1. À travers l’explication de la théorie du FRET, il a été possible de montrer l’intérêt de ce phénomène pour extraire des informations nanométriques d’une observation en champ lointain. La méthode d’imagerie NEF, développée par notre équipe, est ainsi adaptée à l’étude d’interactions ayant lieu à l’interface verre/eau. Elle repose sur l’usage d’un substrat ”optiquement actif” ajouté en complément d’un montage d’imagerie TIRF classique. J’ai donc présenté en détail le dispositif expérimental utilisé pour ce projet doctoral, ainsi que sa caractérisation. Le chapitre suivant va alors nous permettre de présenter le travail réalisé sur la synthèse des boîtes quantiques, nanocristaux de matériaux semi-conducteurs dont les caractéristiques en font de parfaits candidats pour jouer le rôle de donneurs en FRET.

Boites quantiques (QDs) : synthèse et caractérisations

3

Ce chapitre présente les propriétés générales des boites quantiques, leur synthèse ainsi que leur caractérisation photo-physique.

3.1 PROPRIÉTÉS FONDAMENTALES

3.1.1 STRUCTURE ET CONFINEMENT ÉLECTRONIQUE

3.1.1.1 Généralités

Les boites quantiques sont des nanocristaux de matériaux semi-conducteurs. Leur taille nanométrique dans les 3 dimensions de l'espace induit des propriétés électroniques et optiques particulières, proches des systèmes atomiques, bien qu'ils soient constitués de plusieurs dizaines de milliers d'atomes. À la différence des émetteurs organiques, les QDs se caractérisent par un large spectre d'absorption combiné à un spectre d'émission étroit, dont les positions sont majoritairement déterminées par leur taille. Le développement de ces objets a démarré dans les années 1980, avec les travaux de Ekimov & Onuschenko [148, 149] pour la synthèse dans une matrice de verre ; ainsi que Rossetti & Brus [150] et Alfassi *et al.* [151] pour la synthèse colloïdale en solution. Ce 2^{ème} procédé connut un saut important avec la contribution de Murray *et al.* [152] au début des années 1990, rendant possible l'obtention de solution colloïdales relativement mono-disperses. Enfin, Efros et Rosen [153-156] sont reconnus comme les précurseurs majeurs de la formalisation théorique des propriétés optiques de ces nanocristaux.

3.1.1.2 Éléments de théorie des bandes électroniques

Les propriétés optiques des semi-conducteurs sont décrites par la théorie des bandes. Dans un matériau *bulk* ou massif, un grand nombre d'atomes sont en interaction, conduisant à un "mélange" des niveaux d'énergie accessibles pour les différents électrons, comme le représente la Figure 3.1. La représentation en niveaux d'énergie discrets, caractéristique des atomes, s'efface au profit d'ensembles pouvant être assimilés à des bandes d'énergie continues – séparées par ce que l'on appelle une bande interdite. Dans les intervalles accessibles, les électrons "remplissent" les bandes selon la loi statistique de Fermi-Dirac, définissant un niveau d'énergie E_F du solide tel qu'à 0 K, tous les électrons ont une énergie $E \leq E_F$. La position de E_F permet de définir la bande de valence (BV), la bande énergétique qui précède E_F , et la bande de conduction (BC), bande immédiatement supérieure. L'énergie de gap E_g correspond au saut d'énergie entre BV et BC. Sachant que l'énergie

3.1 Propriétés fondamentales	51
Structure et confinement électronique	
Propriétés photophysiques des QDs	
3.2 Synthèses et caractérisations en solution	56
Banc de synthèse	
Synthèses réalisées	
Caractérisations photo-physiques	
3.3 Échanges de ligands de surface	70
Diversité des molécules et applications	
Protocoles d'échanges de ligands	
Caractérisations spectrales en solution et sur surfaces	
3.4 Conclusions sur les boites quantiques	79

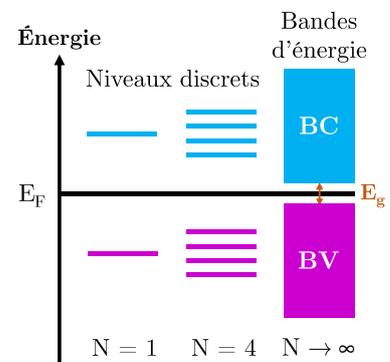


FIGURE 3.1 – Représentation schématique des conséquences du passage de l'atome au matériau massif sur la structure des niveaux d'énergie, en fonction du nombre N d'atomes. Adapté de [157].

de gap $E_g \approx 1$ eV pour un grand nombre de semi-conducteurs, l'absorption d'un photon dans l'UV ou le visible¹ permet la transition d'un électron e^- de BV à BC. Le processus fait apparaître une lacune électronique dans la BV, aussi appelée trou² et notée h^+ . Dans une nanoparticule, l'électron de la BC et le trou de la BV interagissent fortement : le modèle physique utilisé est alors celui des hydrogénoïdes, où le trou h^+ remplace le noyau. Cette paire électron-trou $e^- - h^+$ en interaction coulombienne est nommée *exciton*. La recombinaison de l'exciton peut être radiative (luminescence)³ ou non-radiative, selon la même logique qu'exposée au chapitre précédent – section 2.1.2. Pour une présentation plus détaillée de la détermination de la structure de bande du séléniure de cadmium (CdSe)⁴ massif, nous renvoyons à la thèse d'E. Cassette [158], qui synthétise clairement les travaux théoriques historiques. Par nécessité pour la suite, nous devons introduire la notion de rayon de Bohr, noté a_B , qui définit la distance caractéristique $e^- - h^+$ pour un matériau semi-conducteur donné – voir Éq. (3.1.1), où ε_r est la constante diélectrique du matériau semi-conducteur ; m_0 la masse de l'électron libre ; μ^* la masse effective réduite de l'exciton ; a_0 le rayon de Bohr de l'atome d'hydrogène. Dans le cas du CdSe, cette valeur vaut 5,6 nm.

3.1.1.3 Confinement spatial et excitons

La réduction de la taille des cristaux semi-conducteurs génère un confinement quantique des trous et des électrons⁵, modifiant les comportements possibles des excitons. Lorsque le rayon R d'un nano-cristal semi-conducteur est inférieur au rayon de Bohr du matériau, l'électron et le trou d'un exciton sont traités comme 2 particules indépendantes soumises à un potentiel sphérique V infini, tel que $V = 0$ pour $r < R$; et $V = \infty$ pour $r > R$. Les calculs montrent alors que le confinement quantique des e^- et h^+ évolue en $1/R^2$ tandis que l'attraction coulombienne évolue en $1/R$ [159] – cf. Éq. (3.1.2), où $\hbar = h/2\pi$ est la constante de Planck réduite (J/s) ; e la charge élémentaire de l'électron (C) ; et ε_0 la permittivité diélectrique du vide (F/m). Les niveaux d'énergie des e^- et h^+ sont discrétisés comme dans un système atomique, et l'énergie des transitions inter-bandes augmente avec la diminution de la taille du nano-cristal, comme cela est illustré en Figure 3.2 (a). Étant donné que la relaxation radiative a lieu entre les états de plus faible énergie uniquement⁶, il est ainsi possible d'obtenir une longueur d'onde de photoluminescence souhaitée simplement en ajustant la taille des nano-cristaux, sans changer leur composition⁷. Une autre conséquence du confinement spatial est que les effets de surface deviennent prédominants : en effet, plusieurs dizaines de pourcents du nombre total d'atomes peuvent se retrouver en surface du nanocristal, avec des liaisons dites "pendantes". En fournissant des états d'énergie intermédiaires entre la bande de valence et de conduction, ces liaisons pendantes peuvent agir comme des pièges pour les électrons délocalisés, induisant une relaxation non-radiative des excitons, ce qui diminue le rendement quantique du QD considéré.

1. $\lambda = 800$ nm $\rightarrow E = 1,6$ eV
 $\lambda = 400$ nm $\rightarrow E = 3,1$ eV

2. En anglais : *hole*.

3. La convention est d'employer le terme de luminescence plutôt que celui de fluorescence – même si l'on peut trouver nombre de travaux parlant de "fluorescence des QDs".

4. Matériau semi-conducteur de type II-VI historique des boites quantiques, et bien étudié. Dans le cadre de ce projet doctoral, les QDs synthétisés l'ont tous été sur base de CdSe, et les résultats théoriques ou empiriques cités relèvent quasi-systématiquement de ce matériau.

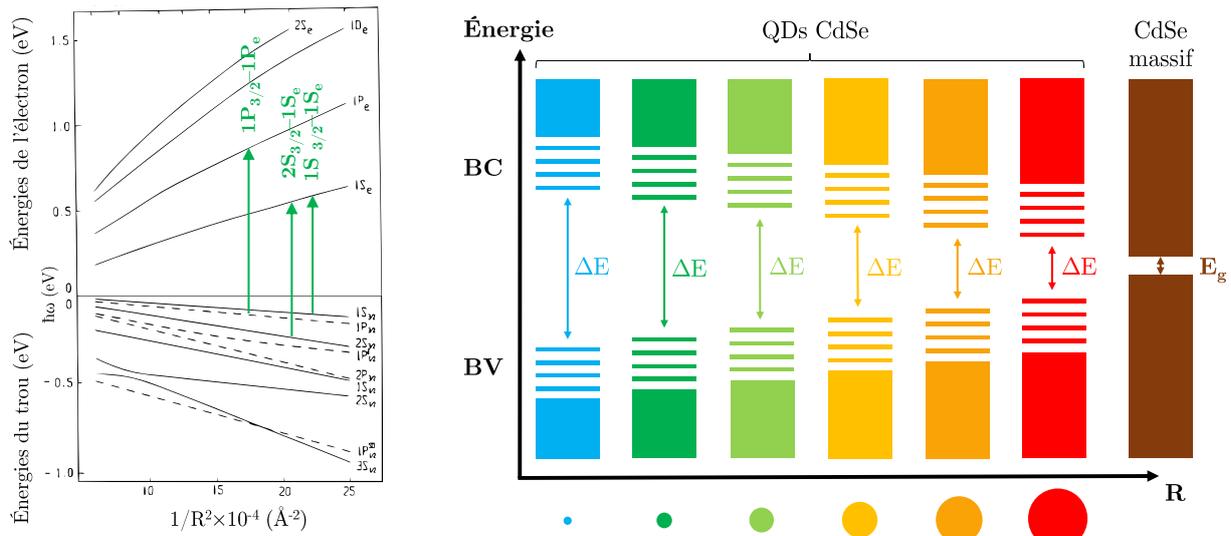
$$a_B = \varepsilon_r \frac{m_0}{\mu^*} a_0 \quad (3.1.1)$$

5. Typiquement pour des rayons de cristaux $R \leq 10$ nm.

$$\Delta E \approx E_g + \frac{(\hbar\pi)^2}{2\mu^* R^2} + \frac{1,8e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r R} \quad (3.1.2)$$

6. De manière analogue à ce qui a été décrit en section 2.1.2, une cascade de conversions internes non-radiatives rapides (10^{-12} s) relaxe e^- et h^+ aux niveaux les plus bas.

7. Dans le cas des nano-cristaux CdSe, les différentes tailles maîtrisées permettent d'accéder à l'ensemble du spectre visible – cf. Figure 3.2 (b).



(a) Dépendance théorique des niveaux des e^- et h^+ selon R

(b) Illustration schématique de l'émission selon la taille R des QDs

(a) est extraite de [156]. Les énergies des électrons sont tracées par rapport au niveau le plus faible de la BC ; les énergies des trous par rapport au niveau le plus haut de la BV. Les principales transitions optiques correspondant au spectre d'absorption Figure 3.4 (a) sont représentées en vert – inspiré de [158]. (b) est inspirée de [160].

Pour éviter cela, les boîtes quantiques couramment utilisées sont en réalité des hétéro-structures dites "cœurs/coquilles", dont il existe différents types : I (e^- et h^+ confinés dans le cœur) ; II (e^- et h^+ séparés spatialement) ; quasi-II (e^- ou h^+ est délocalisé). Par exemple, pour un cœur optiquement actif de CdSe, une coquille à base de sulfure de zinc (ZnS) sert souvent de couche de passivation des pièges de surface, depuis leur introduction par Hines & Guyot-Sionnest en 1996 [161]. L'usage de cette hétéro-structure de type-I est l'explication principale des hauts rendements quantiques mesurés pour ces QDs – souvent dans l'intervalle 0,7-1 en solution. En effet, comme l'illustre la Figure 3.3, cette coquille crée une barrière de potentiel augmentant ainsi la présence des porteurs de charge au niveau du cœur des QDs, et donc la probabilité de recombinaison radiative de la paire $e^- - h^+$.

3.1.2 PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DES QDS

3.1.2.1 Asymétrie des spectres d'absorption et d'émission

La Figure 3.4 (a) donne un exemple de spectres d'absorption et d'émission pour une solution colloïdale de nanocristaux CdSe. Ces spectres sont très différents de ceux des molécules fluorescentes organiques, dans le sens où ils ne présentent pas de symétrie. Cela s'explique tout d'abord par la présence de plusieurs transitions d'absorption excitoniques, dont la largeur dépend de la température ainsi que la dispersion en taille des QDs. Les transitions précisées sur la Figure 3.4 (a) correspondent à celles mises en avant Figure 3.2 (a). On observe ensuite une forte augmentation de l'absorbance due à l'absorption inter-

FIGURE 3.2 – Influence de la taille des boîtes quantiques sur leur structure électronique et leurs propriétés d'émission.

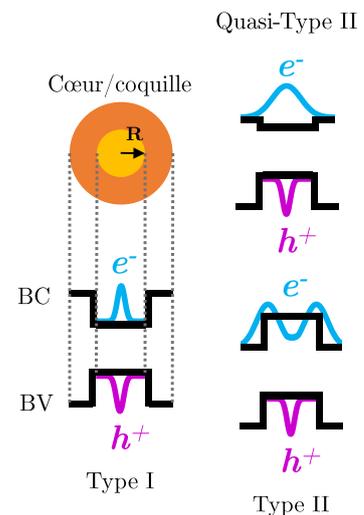


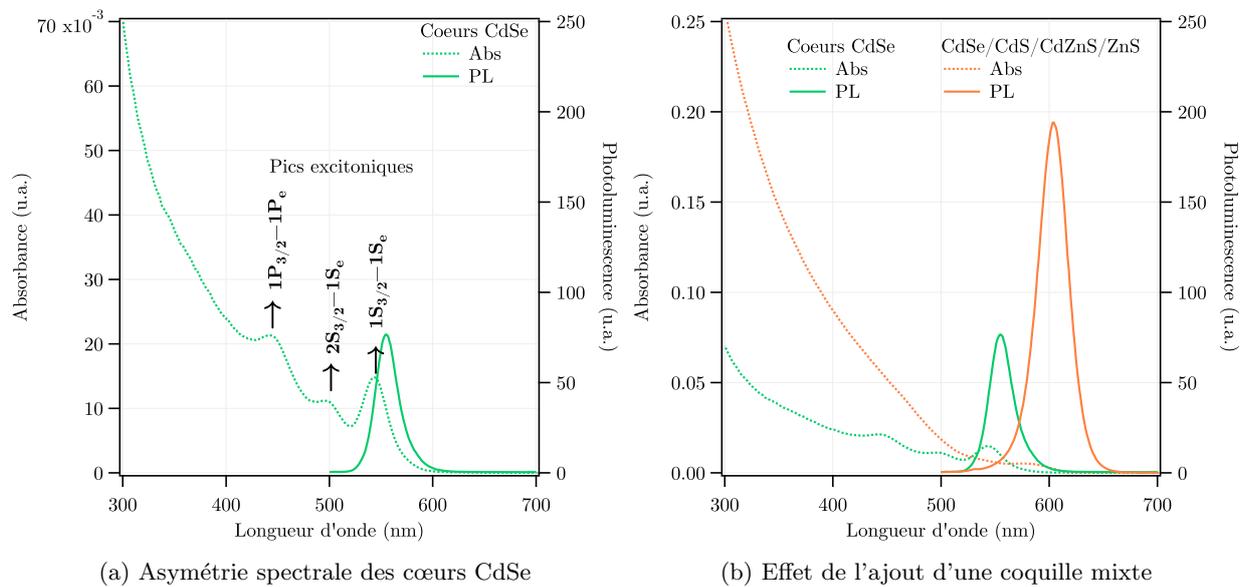
FIGURE 3.3 – Schéma des alignements de la BV et la BC pour les QDs à hétéro-structures, et des fonctions d'onde des e^- et h^+ résultantes. Adapté de [158].

bande caractéristique des semi-conducteurs⁸. L'émission de photoluminescence est issue de la relaxation fondamentale $1S_e \rightarrow 1S_{3/2}$. Elle présente quant à elle un profil spectral quasi-gaussien, dont la largeur est un moyen d'évaluer la variance de la distribution des tailles des nanocristaux. Le décalage de Stokes s'explique par la structure fine du premier niveau excitonique comportant 5 sous-états dont 2 optiquement inactifs [156, 158]. Cette structure fine dépend du rayon des boîtes quantiques⁹, de l'anisotropie de forme des QDs, et dans une moindre mesure [163] du champ cristallin¹⁰. Le peuplement des sous-états composant cette structure dépend de la température selon une statistique de Boltzmann, ce que l'on utilisera lors de l'estimation du rendement quantique des QDs.

8. Pour des énergies d'excitation élevées par rapport à ΔE , la section efficace d'absorption des QDs peut alors être approximée par le modèle des petites particules absorbantes, ce qui a permis l'élaboration d'une relation empirique entre la taille des QDs et leur section efficace d'absorption à 350 nm [162].

9. Déterminant l'intensité de l'interaction d'échange entre e^- et h^+ .

10. Selon que l'agencement des atomes soit wurtzite (WZ) / zinc-blende (ZB).



Ces spectres ont été réalisés en solution pour des concentrations de QDs identiques (~ 100 nM). (a) Les pics excitoniques correspondent aux transitions indiquées en Figure 3.2. (b) La structure des coquilles mixtes est CdS/CdZnS/ZnS.

La Figure 3.4 (b) montre que l'ajout d'une coquille ne modifie pas cette asymétrie spectrale, mais augmente la section efficace d'absorption et la photoluminescence émise. Le décalage de Stokes entre les cœurs et les hétéro-structures cœurs/coquilles est dû à l'emploi d'une coquille mixte pour minimiser les écarts de paramètre de maille et permettre l'encapsulation par une plus grande épaisseur de coquille¹¹.

3.1.2.2 Phénomènes de clignotement

Comme les fluorophores organiques, les boîtes quantiques manifestent une dynamique d'émission intermittente, mise en évidence en 1996 [164]. Ce phénomène de clignotement (*blinking*), illustré Figure 3.5, est lié à plusieurs processus de relaxation non-radiatifs. Il peut s'agir d'une relaxation Auger¹², ou bien de la combinaison d'un effet de solvatation dû au milieu et un effet tunnel au niveau de la coquille du QD [165]. Différents travaux sur les espèces excitoniques "exotiques" [166-168] comme les biexcitons et trions¹³, ou sur les conti-

FIGURE 3.4 – Spectres d'absorption et photoluminescence de QDs à température ambiante, pour des cœurs et hétéro-structures cœurs/coquilles.

11. L'écart des paramètres de maille entre CdSe et ZnS valant environ 12 %, les contraintes mécaniques en jeu ne permettent pas de faire croître une coquille sans défauts au-delà d'une épaisseur de 0,5 nm si le rayon des cœurs ≥ 4 nm [158]

12. Dans un cas de co-existence de plusieurs excitons, l'énergie de l'un peut être totalement cédée à l'autre sous l'effet des interactions d'échange. Cela conduit une éjection du e^- de l'exciton restant hors du QDs et à la ionisation de ce dernier.

13. Biexciton : couplage de 2 excitons.
Trion : couplage chargé d'un e^- ou h^+ avec un exciton existant.

nuums d'états émissifs, ont permis de mettre en évidence que les taux de recombinaisons non-radiatives k_{nr} sont très variables [169-171], ce qui a donné lieu à divers modèles dont certains reposent uniquement sur l'existence de pièges énergétiques internes, sans phénomène d'ionisation. Yuan *et al.* ont cependant montré en 2018 que les 2 phénomènes pouvaient se produire dans une même boîte quantique, et proposé un modèle synthétique [172] pour expliquer – et limiter – le clignotement des QDs.

3.1.2.3 Photo-blanchiment et photo-activation

Les coquilles sont également responsables de la relative résistance des boîtes quantiques au photo-blanchiment en comparaison avec les fluorophores organiques traditionnels, ce qui rend les QDs très intéressants pour l'imagerie sous illumination continue. Plus exotique encore, les boîtes quantiques se différencient des fluorophore organiques classiques par leur susceptibilité à se photo-activer – i.e. augmentation de leur émission sous illumination continue, cf. Figure 3.6. Initialement rapportée en 2000 par Cordero *et al* [173] sur de simples nanocristaux CdSe, ce phénomène a pu être constaté sur des hétéro-structures classiques CdSe/ZnS [174] ou à coquille mixte CdSe/CdS/ZnS [175], et sur des compositions variées de matériaux de QDs ou de ligands¹⁴ [176]. Malgré la similarité des résultats observés, il s'agit de processus physiques différents selon les situations, mais qui tendent aux mêmes effets : la passivation des pièges énergétiques et donc la fermeture des canaux de recombinaisons non-radiatives.

3.1.2.4 Intérêt des QDs pour l'imagerie NEF et précautions instrumentales

Dans le contexte de l'imagerie FRET, l'intérêt des QDs réside en premier lieu dans leurs caractéristiques spectrales. La possibilité de les exciter loin des fenêtres spectrales de détection permet de supprimer tout bruit issu du laser employé. Ensuite, leur grande section efficace d'absorption et leur haut rendement quantique minimisent l'irradiance laser à apporter pour obtenir un bon rapport signal sur bruit. L'importance du phénomène de clignotement pourrait être un grand désavantage des boîtes quantiques, en raison du décalage entre mesures sur QDs uniques et mesures d'ensemble. Heureusement, il a pu être montré que l'ajout de coquilles bien choisies¹⁵ permettait de fortement réduire – voire supprimer – le phénomène de clignotement [177-182]. La photo-activation des QDs induit une nécessité de précaution instrumentale pour l'imagerie NEF : il est nécessaire de caractériser l'évolution de la photoluminescence à différentes irradiances laser et veiller à garantir la stabilité de l'émission avant d'effectuer une étude FRET – en particulier si l'on emploie le calcul d'efficacité basé sur le *quenching* de photoluminescence des donneurs¹⁶.

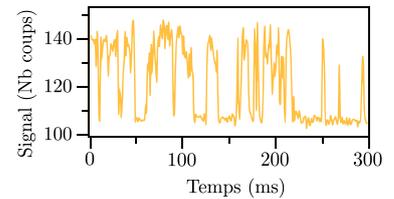


FIGURE 3.5 – Exemple du signal d'émission d'une boîte quantique unique.

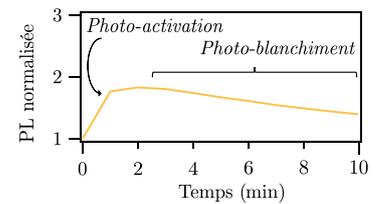


FIGURE 3.6 – Signal moyen normalisé à $t = 0$, mesuré pour une monocouche de QDs sur verre, sous une illumination continue à $4,5 \text{ W/cm}^2$.

14. Les ligands entourant les QDs ont été volontairement mis de côté jusqu'ici pour simplifier la présentation. Leur rôle est cependant important, et est détaillé dans la section 3.3.

15. Relativement épaisses, résultant de couches mixtes comme annoncé en section précédente.

16. Voir Éq. (2.2.11) du chapitre précédent.

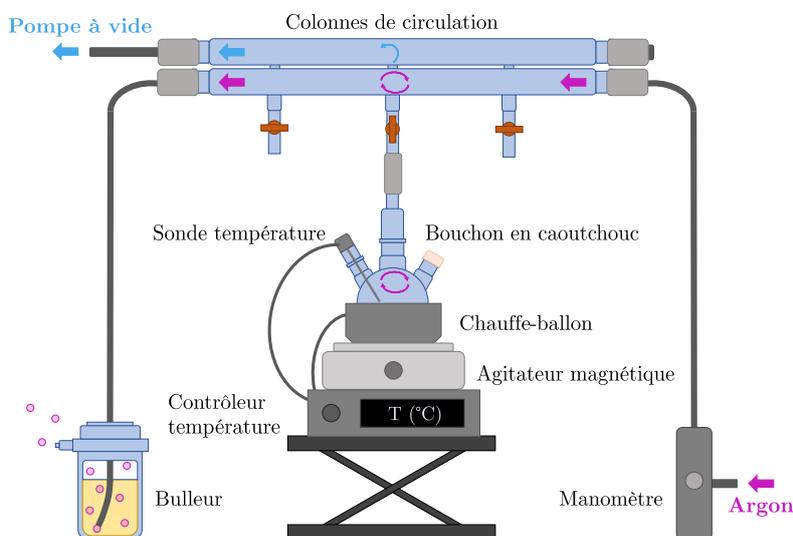
3.2 SYNTHÈSES ET CARACTÉRISATIONS EN SOLUTION

Depuis les premières synthèses dans les années 1980, de nombreuses méthodes ont été développées pour l'obtention de différents types de nanocristaux. En particulier, la transition de techniques empruntées à l'industrie des puces électroniques vers des synthèses en chimie humide a permis de simplifier l'obtention de ces nanoparticules, tout en réduisant les coûts de fabrication. Cependant, les hautes températures nécessaires – 200-350 °C – ont depuis longtemps joué contre l'industrialisation des procédés, en raison de la difficulté à maintenir ces températures de réaction stables sur des volumes importants. Ainsi, les premières boîtes quantiques commerciales datent de 2002, et c'est à partir des années 2010 que, poussée par la demande issue des domaines de l'optique et l'opto-électronique, la production de QDs a réellement pris un essor significatif [183]. Les boîtes quantiques sont donc devenues des objets utilisés couramment par un grand nombre de chercheurs, même si les prix d'achat restent élevés, et varient selon le type de ligands stabilisateurs utilisés. Le coût actuel est plutôt élevé, pour des concentrations et des temps de conservation relativement faibles ¹⁷.

Pour ces différentes raisons, il a donc été décidé de synthétiser nous-mêmes les boîtes quantiques que nous utiliserions dans le cadre de ce projet doctoral, avec l'aide de Thomas Pons du LPEM ¹⁸. En plus d'apporter son savoir-faire au laboratoire, ce choix nous a permis de bénéficier de l'expérience de spécialistes du domaine et d'adapter finement nos QDs à nos besoins, que ce soit sur le plan de leur luminescence que de leur fonctionnalisation.

3.2.1 BANC DE SYNTHÈSE

Le banc mis en place pour les besoins de la synthèse des boîtes quantiques est schématisé sur la Figure 3.7. La réaction est réalisée dans un ballon tricol.



17. À titre d'exemple, chez un fournisseur classique de composés chimiques comme Sigma-Aldrich, les QDs CdSe/ZnS sont actuellement vendus 340 € les 10 mg avec ligands octadécylamine; 140-145 € pour 1 mg avec ligands amine ou acide carboxylique fonctionnalisés

18. Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux, ESPCI Paris

FIGURE 3.7 – Schéma du banc de synthèse utilisé pour la synthèse des QDs.

Sur un pied réhausseur se superposent un contrôleur de température¹⁹ relié à une sonde de température et un chauffe-ballon²⁰. Ce dernier est posé sur un agitateur magnétique permettant une mise en mouvement continue de la solution contenant les réactifs. Le col principal du ballon est relié à des colonnes de circulation servant à, au choix : (a) dégazer le milieu avant le lancement des réactions chimiques via une pompe à vide; (b) alimenter le ballon en gaz neutre – ici, de l’argon – avec une légère sur-pression pour obtenir un milieu de réaction continuellement renouvelé. Cette sur-pression est contrôlée par un manomètre en début de circuit et un bulleur à sa fin. Le dernier col est quant à lui fermé par un bouchon en caoutchouc à jupe rabattable²¹ rendant l’ensemble étanche, tout en permettant des injections ou prélèvements au cours de la synthèse.

3.2.2 SYNTHÈSES RÉALISÉES

Dans la suite de ce document, les ligands de surface²² utilisés pour stabiliser les QDs en solution sont précisés entre crochets. Par exemple : QDs[OA] si l’acide oléique joue le rôle de ligand. Le protocole de synthèse nous a été fourni par T. Pons, et est essentiellement structuré en 2 parties distinctes : la synthèse des cœurs; puis la croissance des coquilles autour de ceux-ci. J’ai réalisé un peu plus d’une trentaine de synthèses au cours du projet doctoral.

3.2.2.1 Synthèse des cœurs CdSe – aussi notés QDs_{cœurs}

(a) Préparation des précurseurs pour les cœurs de QDs

Les cœurs des QDs, de structure zinc-blende (ZB) sont synthétisés via une adaptation de la procédure ”Cao” [184]. La nouveauté apportée par Yang *et al.* en 2005 tient à ce qu’il n’est pas nécessaire de réaliser d’injection de précurseurs au cours de la réaction. Il faut néanmoins réaliser la synthèse *ex situ* d’un des deux réactifs : le myristate de cadmium Cd(Myristate)₂. Pour ce faire, on commence par dissoudre 3,13 g de myristate de sodium NaMyr²³ dans 250 mL de méthanol²⁴, sous agitation à température ambiante pendant 1 h. En parallèle, 1,23 g de nitrate de cadmium tétrahydraté (Cd(NO₃)₂ + 4 H₂O)²⁵ est dissout dans 40 mL de méthanol. Après 1 h, on ajoute lentement à la pipette le Cd(NO₃)₂ dans la solution de NaMyr en maintenant l’agitation. Se forme alors un précipité blanc que l’on va filtrer via l’utilisation d’une fiole à vide²⁶, un entonnoir Büchner²⁷, et un filtre en cellulose²⁸. Le résultat est séché sous vide pendant une nuit dans un tube à centrifuger²⁹ de 50 mL dont le bouchon est percé. La poudre finalement obtenue est stable pendant plusieurs mois à température ambiante et peut donc être utilisée pour de nombreuses synthèses de QDs. À titre d’exemple : je n’ai réalisé que 3 synthèses de myristate de cadmium Cd(Myristate)₂ sur l’ensemble du projet doctoral.

19. Gemini-230, J-KEM Scientific.

20. Le chauffe-ballon utilisé dépend du volume du ballon nécessaire à l’expérimentation : 100 ou 250 mL, Duran.

21. 407015-20, Ø 14,9 mm, Saint-Gobain Performance Plastics.

22. Voir section 3.3 pour une présentation détaillée.

23. M0483, ≥ 98 %, TCI.

24. 34860-2-2.5L-R, ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich.

25. 642045-100G, ≥ 98 %, Aldrich Chemistry.

26. 500 mL, Simax.

27. 127C-0a, Haldenwanger.

28. Rotilabo Rundfilter 113A, Ø 47 mm, Carl Roth GmbH+Co.

29. Falcon, 734-0448, VWR

(b) Synthèse des $QDs_{cœurs}$

Concernant la synthèse des cœurs, on pèse 174 mg de $Cd(Myristic)_2$ directement dans le ballon tricol de 100 mL. La quantité stœchiométrique de sélénium en poudre – soit de 12 mg – est pesée dans un pilulier ; dissoute dans 16 mL d’octadécène³⁰ via l’aide d’un bain à ultrasons³¹, puis ajoutée dans le ballon. Une fois le tout mis en place sur le banc décrit en Figure 3.7, on commence par dégazer la solution à température ambiante environ 15 min, sous agitation, jusqu’à ce que les bulles à la surface du mélange disparaissent. On remplace ensuite le vide créé par de l’argon en légère sur-pression, pour garantir sa circulation, et l’on chauffe³² jusqu’à atteindre le plus vite possible une température entre 220 et 240 °C selon la taille de QDs que l’on souhaite atteindre – voir section 3.2.2.3. Quand on atteint la température souhaitée, on la maintient durant quelques minutes puis on refroidit rapidement le mélange avec un pistolet à air comprimé, en ajoutant 500 μ L d’acide oléique OA³³ vers 200°C pour stopper la réaction. La solution obtenue est lavée par centrifugation : après séparation dans 2 tubes de 50 mL, on ajoute dans chacun 5-10 mL d’OA, complétés par de l’éthanol³⁴. L’ensemble est centrifugé 10 min à 6000 RPM. Si tout n’a pas bien précipité, on rajoute 5 mL d’OA et l’on re-centrifuge. Ajouter au moins 7,5 mL d’OA dès le départ permet généralement d’éviter cette seconde centrifugation. Le surnageant contenant les restes de réactifs est jeté, et le précipité de $QDs_{cœurs}[OA]$ est repris dans un total de 10 mL d’héxane³⁵. Une telle solution de cœurs de boîtes quantiques est stable quelques jours uniquement si l’on ne réalise pas la croissance des coquilles. Une petite quantité (10 μ L) est prélevée et diluée dans 3 mL d’héxane pour caractériser le résultat en absorbance, photo-luminescence, et durée de vie de l’émission.

3.2.2.2 Croissance des coquilles mixtes CdS/CdZnS/ZnS

(a) Caractérisation de la solution de $QDs_{cœurs}$

Cette seconde étape de la synthèse est basée sur la méthode SILAR³⁶, utilisée pour la fabrication de couches minces sur substrats. Son usage pour les synthèses colloïdales de nanocristaux a été introduite par Li *et al.* en 2003 [186]. Les coquilles sont ainsi générées par l’injection séquentielle de quantités de précurseurs correspondant à la formation d’une seule mono-couche par nanoparticule. Son intérêt principal est de permettre un contrôle fin de la composition des différentes couches des coquilles. Cette méthode passe par le traitement du spectre d’absorption des $QDs_{cœurs}[OA]$, dont un exemple est donné Figure 3.8. La position du premier pic excitonique permet d’estimer la taille moyenne des cœurs suivant la relation empirique de Peng [187] donnée en Éq. (3.2.1). Même si cette relation a originellement été dérivée pour des cœurs de QDs CdSe de structure wurtzite (WZ), elle est suffisamment juste au regard de nos injections faites avec une précision de l’ordre de quelques dizaines de μ L. Pour des concentrations faibles, l’absorbance $A(\lambda)$

30. O806-1L, 90 %, Sigma-Aldrich.

31. Elmasonic S 10, Elma.

32. Une représentation simplifiée de la synthèse de nanocristaux, comme la théorie LaMer-Dinegar [185], découpe 3 étapes principales. 1) La nucléation correspondant à l’apparition des premières unités périodiques stable, se produisant lorsque la température approche le niveau nécessaire à la réaction de synthèse. 2) La croissance homogène des nanocristaux à partir des *nucléis* : les réactifs encore présents sont consommés préférentiellement par les plus petites particules, conduisant à une homogénéisation des tailles de cristaux. 3) Le mûrissement d’Ostwald, c’est-à-dire la consommation des petites particules pour nourrir la croissance des plus grandes, qui tend à se produire lorsque la concentration en réactifs devient faible. Pour obtenir une solution de QDs homogènes, on a donc intérêt à combiner une montée en température rapide et un temps de réaction court.33. 364525-1L, ≥ 90 %, Sigma-Aldrich

34. E/0600DF/21, 99 %, VWR.

35. 34859-2.5L-M ≥ 97 %, Sigma-Aldrich.36. *Successive Ion Layer Adsorption and Reaction*, ou adsorption et réaction séquentielle de mono-couche ionique

$$r_{Peng} = \frac{1}{2}(1,612210^{-9}\lambda^4 - 2,657510^{-6}\lambda^3 + 1,624210^{-3}\lambda^2 - 0,4277\lambda + 41,57) \quad (3.2.1)$$

d'une solution, mesurée via une cuve standard de largeur $l = 1$ cm est directement reliée à la concentration C de l'espèce chimique d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$, selon la loi de Beer-Lambert – cf. Éq. (3.2.2).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)Cl \quad (3.2.2)$$

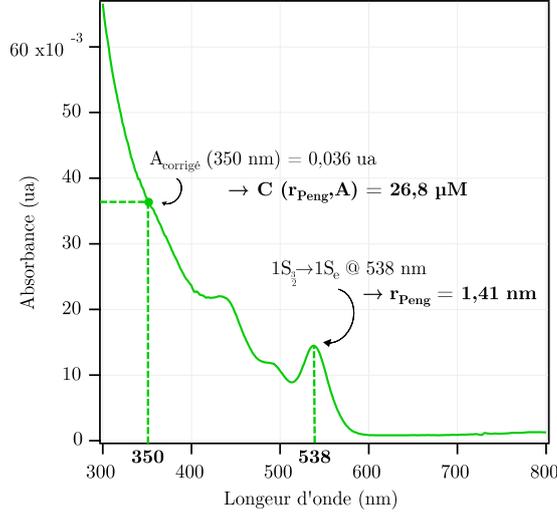


FIGURE 3.8 – Exemple de détermination du rayon des nanocristaux et de la concentration de la solution colloïdale de cœurs de QDs à partir d'un spectre d'absorption.

Dilution de 10 μ L de QDs_{cœurs} dans un volume final de 3 mL d'héxane.

La valeur de $A(350 \text{ nm})$ est corrigée par $A(700 \text{ nm})$ où les QDs n'absorbent pas.

Dans le cas des nanocristaux CdSe dans l'héxane, à 350 nm³⁷, il existe un excellent accord entre les mesures de section efficace d'absorption σ et les calculs théoriques, tout comme une relative absence d'effet des ligands stabilisateurs, ce qui fait de cette longueur d'onde une référence de choix pour estimer la concentration – Éq. (3.2.4) à (3.2.6).

À partir de ces valeurs, il est alors possible de calculer les quantités nécessaires à chaque injection de précurseur pour la croissance des coquilles. Comme dans le cas de la synthèse des cœurs, ces derniers sont fabriqués *ex situ*.

(b) Préparation des précurseurs pour coquilles CdS/CdZnS/ZnS

Pour l'oléate de cadmium Cd(OA)₂, on souhaite obtenir une solution à 0,5 M. Ce niveau de concentration entraîne une solidification à température ambiante mais est très stable. On pèse pour cela 6,42 g d'oxyde de cadmium CdO³⁸ dans un ballon de 250 mL. On y ajoute 100 mL d'OA, le tout chauffé à 160°C sous agitation en atmosphère argon jusqu'à ce que la solution soit incolore. On redescend alors la température à 120°C en refroidissant avec de l'air comprimé. La température est stabilisée à 100°C et l'on dégaze pour évacuer l'eau. L'oléate de zinc – Zn(OA)₂ – est préparé pour une même concentration finale : 4,07 g d'oxyde de zinc ZnO³⁹ sont pesés dans le ballon auquel est ajouté 100 mL d'acide oléique. Le reste de la dissolution suit les mêmes étapes que précédemment, si ce n'est que la température est élevée jusqu'à 280°C pendant 1h. Enfin, nous avons besoin d'une solution de Soufre-ODE à 0,1 M : 100 mL d'ODE sont tout d'abord dégazés à 60°C. On ajoute ensuite 0,32 g de soufre⁴⁰ pesés dans un tube Eppendorf et l'on augmente la température à 120°C. Une fois

37. D'après Leatherdale *et al.* [162], avec σ en cm^2 et r en cm :

$$\sigma_{350} = 5,501 \cdot 10^5 \cdot r^3 \quad (3.2.3)$$

$$C = \frac{A_{350}}{\varepsilon_{350}l} \quad (3.2.4)$$

$$\sigma_{350} = \frac{\varepsilon_{350}1000\ln(10)}{N_A} \quad (3.2.5)$$

Donc

$$C = \frac{A_{350}1000\ln(10)}{N_A\sigma_{350}l} \quad (3.2.6)$$

38. 244783-100G, $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich.

39. 255750-100G, 99,99 %, Sigma-Aldrich

40. 213292-50G, 99,99 %, Aldrich Chemistry.

la dissolution terminée, la solution est stockée dans une bouteille en verre. L'ensemble de ces précurseurs est stable sur une longue durée et préparé dans des quantités suffisantes pour plusieurs synthèses : les oléates de cadmium ou de zinc n'ont eu à être préparé qu'une fois durant toute la thèse, et 3 fois pour la solution de S-ODE.

(c) *Croissance des coquilles sur QDs_{coeurs}*

Le tableau 3.1 récapitule l'ensemble des injections nécessaires à la formation des coquilles, à partir d'un exemple concret. Les quantités à injecter sont déterminées à l'aide d'une feuille de calcul reprenant la méthode SILAR, dont les entrées sont le rayon des cœurs, le volume et la concentration de leur solution. La solution de 10 mL de QDs_{coeurs}[OA] est mélangée à 10 mL d'ODE auxquels on ajoute 2 mL d'oleylamine⁴¹ pour dissoudre les ligands OA qui, sinon, entraveraient la croissance des coquilles sur les cœurs. Pendant que l'on dégaze l'ensemble dans un tricol de 250 mL à 30°C, on chauffe un aliquot de Cd(OA)₂ et de Zn(OA)₂, respectivement à 200 et 300°C, afin de retourner à l'état liquide et prélever le volume nécessaire à diluer pour obtenir les solutions de précurseurs à 0,1 M qui vont être injectées. Le Zn(OA)₂ à 0,1 M peut être conservé liquide à condition d'être maintenu à 60°C dans une étuve. Lorsque le dégazage de l'héxane est terminé, on remplace le vide créé par une atmosphère d'argon en légère sur-pression.

Couche	Injection (mL)	T (°C)	Timing
CdS	Cd = 0,29 S = 0,29	30	t ₀ t ₀
CdS	Cd = 0,45 S = 0,45	230	Arrivée à T + 10 min
CdS	Cd = 0,63 S = 0,63	230	+ 10 min + 10 min
CdZnS	CdZn = 0,93 S = 0,93	250	Arrivée à T + 10 min
CdZnS	CdZn = 1,20 S = 1,20	250	Arrivée à T + 10 min
CdZnS	Zn = 1,65 S = 1,65	250	+ 10 min + 10 min
Zn	Zn = 2,00	250	+ 10 min

Une fois toutes les injections faites, on attend 10 min avant de refroidir à 100°C avec le pistolet à air comprimé. La solution est séparée dans 4 tubes à centrifuger de 50 mL auxquels on ajoute 5-10 mL d'OA, complétés par de l'éthanol. Le mélange est centrifugé à 6000 RPM durant 5 min. Comme pour les cœurs, le surnageant est jeté et le précipité de QDs_{coeurs/coquilles}[OA] est repris dans un total de 10 mL d'héxane.

41. 129540010, ≥ 80-90 %, Acros Organics.

TABLE 3.1 – Récapitulation des injections nécessaires à la croissance des coquilles de QDs. Exemple correspondant aux cœurs CdSe présentés en Figure 3.8.

On réalise les 2 premières injections à 30°C *via* des seringues de 1 mL graduée à 0,01 mL adjointe d'une aiguille verte 21G. La température est ensuite augmentée au plus vite jusqu'à 230°C. On injecte le volume de Cd(OA)₂ requis puis, 10 min après, un volume identique de S-ODE, et l'on ré-attend 10 min avant de procéder à l'étape suivante. Chaque mono-couche CdS décale le spectre de photo-luminescence d'environ 10 nm vers le rouge. Après cela, on monte la température à 250°C et l'on procède aux injections suivantes selon le même rythme. À noter que les injections "CdZn" sont obtenues à partir d'un mélange 50/50 de Cd(OA)₂ et Zn(OA)₂.

De nouveau, 10 μL sont prélevés et dilués dans un volume final de 3 mL pour caractériser le résultat en absorbance, photo-luminescence, et durée de vie de photo-luminescence. En supposant négligeables les pertes de matière entre la solution de cœurs CdSe et la solution de CdSe/CdS/CdZnS/ZnS après croissance des coquilles, on peut calculer le coefficient d'extinction molaire de la solution obtenue en cette toute fin de synthèse, *via* le ratio entre l'absorbance à 350 nm des $\text{QDs}_{\text{coeurs/coquilles}}[\text{OA}]$ et des $\text{QDs}_{\text{coeurs}}[\text{OA}]$. Une telle solution est, pour le coup, stable plusieurs mois à température ambiante⁴².

42. Avec une concentration typique de 25-30 μM .

3.2.2.3 Influence des paramètres de la synthèse

(a) Température et temps de réaction de la synthèse des cœurs

Dans la publication originale de la méthode de synthèse "Cao" [184], la température de synthèse était fixée à 240°C. L'étude du temps de réaction, comme on peut le voir sur la Figure 3.9, montrait qu'il s'agissait d'un paramètre permettant de contrôler simplement les caractéristiques principales de la synthèse⁴³. L'augmentation de la taille des cœurs est associée, comme attendu, à un décalage du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde / faibles niveaux d'énergie. De façon plus surprenante, cela conduit aussi à resserrer la distribution en taille des nanocristaux, comme le montre les pics d'absorption et les spectres de photo-luminescence plus étroits.

43. Prolonger le temps de réaction permet d'augmenter la taille des cœurs de boîtes quantiques obtenus mais diminue la concentration de la solution de produits réactionnels.

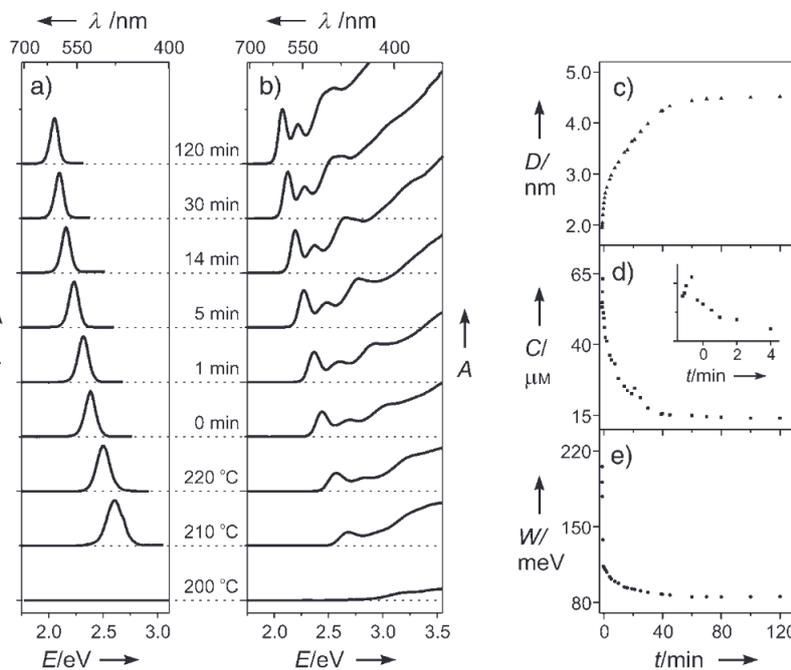
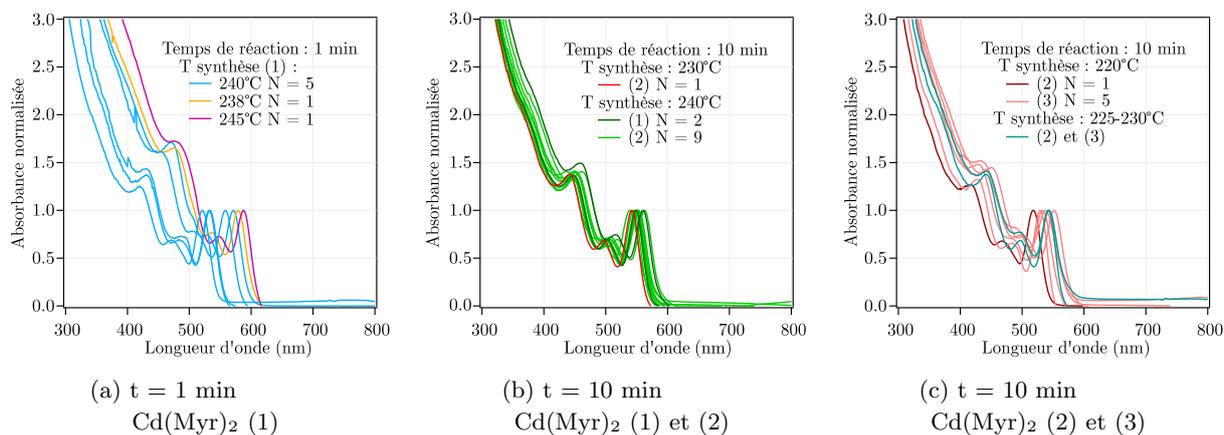


FIGURE 3.9 – Évolution temporelle, au cours de la synthèse, du a) spectre de photo-luminescence, noté (f) pour "fluorescence"; b) du spectre d'absorption; c) du diamètre (D) des nanocristaux; d) de la concentration (C) des nanocristaux; e) la largeur à mi-hauteur (W) du spectre de photo-luminescence. Extrait de [184].

Autrement dit, dans cette situation, le phénomène de mûrissement d'Ostwald⁴⁴ ne semble pas se produire. Nous avons reproduit cette expérience de variation temporelle, à 1 et 10 min de temps de réaction, pour deux groupes de synthèses. La Figure 3.10 (a) présente les spectres d'absorption des cœurs de boîtes quantiques pour 1 min, et la Fi-

44. Voir section 3.2.2.1 (b).

gure 3.10 (b) pour 10 min. Nous obtenons des cœurs de rayon moyen proche dans les 2 cas, mais avec une dispersion bien plus importante pour 1 min par rapport à 10 min de temps de réaction : $1,48 \pm 0,20$ et $1,52 \pm 0,07$ nm. On peut aussi remarquer que nous n'obtenons pas de concentration plus élevée pour le temps de réaction le plus court, comme attendu : $20,98 \pm 7,14$ μM (1 min) contre $28,95 \pm 4,13$ μM (10 min).



Les 3 synthèses de précurseur $\text{Cd}(\text{Myr})_2$ sont notées (1), (2), et (3). N correspond au nombre de synthèses réalisées.

Ce phénomène peut avoir plusieurs origines, comme une montée en température pas assez bien maîtrisée pour ces premières synthèses, et/ou une stœchiométrie des réactifs non parfaitement respectée⁴⁵. Comme le montre d'ailleurs divers spectres répartis sur l'ensemble des tracés, la synthèse de précurseur⁴⁶ $\text{Cd}(\text{Myr})_2$ s'est révélée être un paramètre important : le niveau de rinçage des restes de réactifs en fin de synthèse de ce dernier peut effectivement affecter le respect de la stœchiométrie des réactifs et donc le résultat produit pour une pesée donnée. Pour certaines synthèses, le rayon des cœurs obtenus était systématiquement trop important : proche de 1,60 nm, ce qui après croissance des coquilles donnait des spectres de photo-luminescence centrés sur des valeurs ≥ 610 nm. T. Pons nous ayant indiqué qu'il était possible de faire varier la température de synthèse pour stopper la croissance des cœurs⁴⁷, nous avons repris notre protocole pour les synthèses de $\text{Cd}(\text{Myr})_2$ (2) et (3) de manière à explorer l'intervalle de températures 220-230°C, pour 10 min de temps de réaction. Les Figures 3.10 (b) et (c), attestent que cela permet effectivement de retrouver nos valeurs cibles de rayon moyen des cœurs ($1,41 \pm 0,09$ nm), voire légèrement inférieur, ce qui est cette fois-ci associé comme attendu à une augmentation de la concentration moyenne de la solution obtenue ($32,69 \pm 9,03$ μM), à nuancer par la dispersion de la distribution des concentrations pour les solutions concernées. Les courbes correspondant aux synthèses à 225 et 230°C tracées sur les Figures 3.10 (b) et (c) montrent que la variation de température de réaction semble bien être moins important que le $\text{Cd}(\text{Myr})_2$ employé, confirmant la synthèse de ce précurseur comme facteur crucial. Il a donc été nécessaire de déterminer, pour chaque synthèse de $\text{Cd}(\text{Myr})_2$,

FIGURE 3.10 – Spectres d'absorption des cœurs CdSe .

45. Mais suffisamment proches pour que cela ne se traduise pas par l'apparition de 2 populations de cœurs

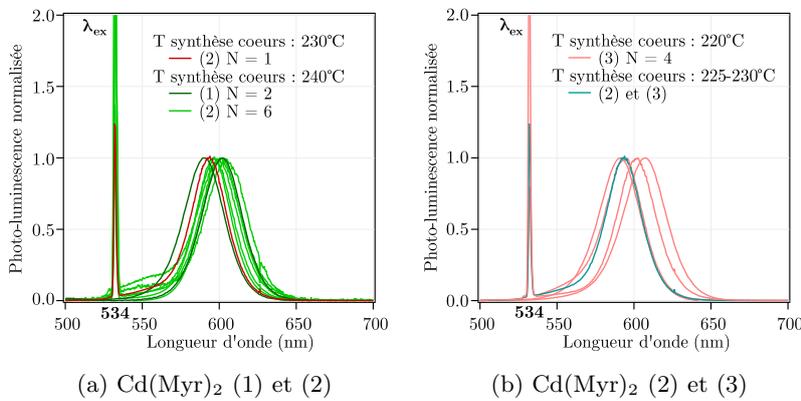
46. Que l'on a détaillée en partie 3.2.2.1 (a).

47. Nous n'avons pas trouvé de publication spécifique reprenant la méthode "Cao" pour étudier l'effet du paramètre température de synthèse, comme son potentiel croisement avec le paramètre du temps de réaction.

quelle était la température de réaction la plus appropriée pour obtenir, de manière reproductible, les QDs_{coeurs/coquilles} finaux correspondant à nos besoins⁴⁸.

(b) *Injections et architecture des coquilles*

Pour différentes synthèses de cœurs, les spectres normalisés de photoluminescence après croissance des coquilles sont récapitulés sur la Figure 3.11. Certains spectres ont été obtenus via une excitation à 350 nm, d'autres à 458 nm, ou même 534 nm – cela n'impacte pas le profil du spectre d'émission des QDs. Si on peut constater une reproductibilité importante, avec des pics d'émission plutôt bien centrés à $\lambda \approx 600$ nm – Figure 3.11 –, les quelques exceptions permettent d'aborder les paramètres déterminants de cette réaction.



48. Pour décaler l'émission des QDs finaux loin vers le rouge, outre la température de réaction, il est aussi possible de procéder à une ré-injection des précurseurs au cours de la création des cœurs. Cette méthode nous a permis d'obtenir un spectre d'émission plus étroit et une solution plus concentrée qu'avec une température de réaction augmentée à 250°C. Dans un cas comme dans l'autre, nous n'avons pas eu besoin de ces protocoles pour la suite de la thèse, aussi nous ne détaillerons pas plus ces éléments.

FIGURE 3.11 – Spectres normalisés de photo-luminescence des différentes solutions de QDs après croissance des coquilles.

Les 3 synthèses de précurseur Cd(My₂)₂ différentes sont notées (1), (2), et (3). N : nombre de synthèses réalisées. Les couleurs reprennent l'agencement défini en Figure 3.10. Le pic à 534 nm correspond au laser d'excitation utilisé pour certains spectres, sur un montage sans filtre passe-haut.

Tout d'abord, les volumes injectés à chaque étape de croissance doivent être le plus proche possible des quantités calculées pour correspondre à la formation de mono-couches, en particulier sur les injections correspondant aux couches CdS⁴⁹, au risque de décaler l'émission vers le rouge de façon trop importante. De plus, le temps laissé entre chaque injection doit lui aussi être respecté le plus scrupuleusement possible. Les 2 spectres dont le pic d'émission se situe au-delà de 600 nm, en Figure 3.11 (b), relèvent typiquement d'une croissance de coquille où ces éléments ont trop dérivé. Enfin, la répartition des spectres de photoluminescence, selon la température de synthèse des cœurs de boîtes quantiques et les différents précurseurs Cd(My₂)₂, est quasiment identique à ce qui était observé sur la Figure 3.10 concernant les spectres d'absorption avant croissance des coquilles. Cela corrobore le fait que la première étape de croissance des cœurs influence majoritairement le positionnement des spectres de photoluminescence, et que les déviations au protocole de croissance des coquilles induisent seulement des décalages minimes. Ces différentes données nous ont permis de peaufiner notre démarche de synthèse de boîtes quantiques de manière à pouvoir, au pied levé, obtenir des QDs dont l'émission pouvait être centrée à environ 590 nm ou 600 nm, selon nos besoins.

49. Il est aussi possible de jouer sur l'architecture des coquilles : par exemple, remplacer une couche CdS par une couche CdZnS, permet de limiter le décalage spectral et, dans une certaine mesure, de minimiser la largeur à mi-hauteur du spectre de photoluminescence.

3.2.2.4 Reproductibilité des synthèses

J'ai évalué la qualité des synthèses de plusieurs manières. En ce qui concerne les cœurs, les éléments quantitatifs appropriés⁵⁰ ont été présentés dans la partie précédente. Dans le cadre de l'imagerie NEF, les caractéristiques les plus importantes de nos QDs_{cœurs/coquilles} sont la position du pic d'émission et sa largeur à mi-hauteur du spectre. Le tableau 3.2 ci-dessous récapitule mes résultats⁵¹, où sont exclues du calcul les synthèses où un problème quelconque de manipulation – au niveau de la montée en température, de l'injection des couches, etc. – a pu être explicitement constaté. Lorsque ces précautions sont prises, on peut effectivement constater un faible écart-type pour les différentes grandeurs contrôlées⁵², ce qui accrédite l'idée d'une bonne reproductibilité du protocole de synthèse.

Synthèse cœurs	240°C 10 min	220°C 10 min
Rayon des cœurs (nm)	1,52 ± 0,07	1,4 ± 0,1
Concentration (μM)	29 ± 4	33 ± 9
Pic d'émission cœurs/coquilles (nm)	599,9 ± 0,2	591,93 ± 0,04
LMH émission cœurs/coquilles (nm)	31,4 ± 0,1	30,4 ± 0,1

50. Rayon des cœurs et concentration de la solution colloïdale.

51. Obtenus pour chaque spectre *via* l'outil *Multipeak Fitting 2* du logiciel Igor Pro, puis moyennés.

52. Excepté la concentration, dans le cas de la synthèse ciblant une émission finale de 590 nm.

TABLE 3.2 – Compilation des éléments de reproductibilité de nos synthèses de QDs.

3.2.3 CARACTÉRISATIONS PHOTO-PHYSIQUES

3.2.3.1 Méthodes empiriques de détermination du rendement quantique

Pour pouvoir faire de l'imagerie FRET quantitative, il est nécessaire d'estimer le rendement quantique⁵³ de l'espèce donneuse, i.e. les QDs dans le cas de l'imagerie NEF, afin d'estimer au mieux le rayon de Förster R_0 . L'estimation rigoureuse de ce paramètre est souvent plus compliquée qu'il n'y paraît à première vue.

(a) Méthodes usuelles

La comparaison avec un fluorophore "connu" est la méthode la plus utilisée en raison de son apparente simplicité. Comme le montrent Grabolle *et al.* [188], cette méthode présente pourtant de nombreuses sources d'incertitudes pouvant se croiser, et généralement non quantifiées : la pertinence du fluorophore choisi comme référence⁵⁴; les paramètres précis d'instrumentation⁵⁵; ou encore la prise en compte de variabilités photo-physiques⁵⁶. Lorsque ces différents éléments sont pris en compte au mieux, il est possible de déterminer des valeurs de ϕ précises à quelques % près. L'utilisation d'une sphère d'intégration, comme introduit par Porrès *et al.* [189] pour les solutions, est une autre manière classique d'accéder à une valeur de ϕ , et qui permet normalement d'en mesurer directement une valeur absolue. En plus de ne pas reposer sur une référence potentiellement discutable, ses intérêts expérimentaux principaux sont de s'affranchir des problèmes

53. Qu'on note ϕ pour référer à la notion de rendement quantique en général.

54. Même longueur d'onde d'excitation que pour l'application prévue; pureté du fluorophore; rendement quantique relativement consistant à travers la littérature.

55. Largeur de la fente de détection des spectromètres et fluorimètres utilisés; prise en compte de l'irradiance effective de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation.

56. Différences de diagramme de rayonnement entre le standard utilisé et les QDs; dépendance de ϕ à la concentration, à l'équilibre d'adsorption / désorption des ligands, au solvant utilisé, à l'irradiance d'excitation.

issus de potentielles anisotropies d'émission, puisque l'ensemble de la lumière émise est – supposément – collectée; et de pouvoir tester rigoureusement la dépendance de ϕ à la longueur d'onde et l'irradiance d'excitation sur une large gamme. À condition de disposer d'une telle sphère d'intégration, et de pouvoir garantir sa parfaite étanchéité et réflectivité, il est ainsi possible d'atteindre, "simplement", une précision sur ϕ également de l'ordre de quelques %.

(b) *Méthodes particulières*

Il existe par ailleurs diverses méthodes alternatives, nécessitant souvent des dispositifs expérimentaux spécifiques, et permettant une estimation plus ou moins précise de ϕ . Les travaux de thèse de X. Brokmann [190] ont permis de montrer qu'il était possible d'estimer, avec une précision de l'ordre de 10 à 15 %, le rendement quantique de nanocristaux CdSe individuels *via* une altération de leur environnement immédiat⁵⁷, à travers l'obtention du diagramme de rayonnement et des taux de recombinaison radiatives et non-radiatives dans les deux situations [191, 192]. Par la suite, cette idée générale se retrouve chez Chizhik *et al.* [193], qui ont montré la possibilité de mesurer le rendement quantique de multiples émetteurs présents dans un mélange, via l'utilisation de nano-cavités Fabry-Pérot de taille variable et plusieurs fenêtres de détection spécifiques sur un montage confocal – incertitude de 5 %. Il existe aussi plusieurs propositions méthodologiques reposant globalement sur la thermo-optique. Que ce soit par TSL⁵⁸ [194] ou PTQYm⁵⁹ [195], le principe repose sur l'analyse de la perte de chaleur vers l'environnement.

(c) *Méthode choisie*

Enfin, il existe une méthode basée sur la relation de Strickler-Berg [196] ou sa version étendue par Briks-Dyson [197]. Dérivées directement à partir des coefficients d'Einstein, elles servent à produire une estimation du taux de recombinaisons radiatives k_r à partir des mesures expérimentales des spectres d'absorption et de photo-luminescence. Complété par une mesure expérimentale de la durée de vie de fluorescence τ , cela permet de remonter à une valeur de ϕ . Étant donné que l'acquisition de ces spectres était une procédure routinière de contrôle de nos synthèses de QDs, et que nous disposions d'un montage de mesure de durée de vie de fluorescence durant une partie de ce projet doctoral, nous avons employé cette méthode, dont je présente les résultats dans la section suivante. Les Éq. (3.2.7) à (3.2.9) rappellent la définition générale du rendement quantique ϕ par rapport aux taux de recombinaisons radiatives k_r et non radiatives k_{nr} (s^{-1}), ainsi que de la durée de vie de l'émission τ (s) – qu'il s'agisse de luminescence ou fluorescence.

57. En l'occurrence, des QDs individuels sont emprisonnés dans une couche de polyméthacrylate de méthyle acrylique (PMMA) de 45 nm d'épaisseur; l'altération de l'environnement se fait par l'ajout d'une couche de polydiméthylsiloxane (PDMS) de 200 μm d'épaisseur.

58. *Thermal Lens Spectrometry.*

59. *Photo Thermal Quantum Yield measurement.*

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3.2.7)$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3.2.8)$$

Donc

$$\phi = k_r \cdot \tau \quad (3.2.9)$$

3.2.3.2 Détermination du taux de recombinaisons radiatives

(a) Développement historique du formalisme

À partir de la relation, établie par Einstein, entre les probabilités d'absorption et d'émission spontanée d'un photon pour une molécule donnée, plusieurs tentatives de définition du taux de relaxations radiatives k_r , par rapport au spectre d'extinction ont été proposées durant la première partie du XX^e siècle – dont une par Förster [198]. L'équation établie par Strickler et Berg, Éq. (3.2.10) et (3.2.11), est le premier formalisme rigoureux d'une telle relation [196]. Elle est exprimée en fonction du nombre d'onde $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) et d'un coefficient numérique résultant de plusieurs constantes. La grandeur n représente l'indice de réfraction du milieu; F l'intensité de fluorescence relative; et $\epsilon(\tilde{\nu})$ le coefficient d'extinction molaire (L·mol⁻¹·cm⁻¹), dont l'intégrale est définie sur la bande d'absorption correspondant aux transitions concernées. La dégénérescence des niveaux électroniques est prise en compte par le facteur g_l/g_u ⁶⁰. Pour une fluorescence issue de transitions entre états singulets, $g_l/g_u = 1$. Les travaux de Birks et Dyson [197] ont conduit à formaliser une version étendue de cette définition du taux de recombinaisons radiatives k_r , Éq. (3.2.12), qui prend en compte la potentielle dispersion optique du solvant des molécules considérées, avec n_a et n_f les indices de réfraction des milieux d'absorption et d'émission. À partir des années 2010, les travaux de Gong *et al.* [199, 200] ont entrepris de montrer la pertinence d'une telle approche pour les QDs, en proposant une adaptation de ces relations – cf. Éq. (3.2.13) et (3.2.14). Le coefficient C_{fs} – où k_B représente la constante de Boltzmann – remplace le rapport de dégénérescence des niveaux d'énergie, et sert à prendre en compte la population [201, 202] et les forces d'oscillateur relatives des différentes transitions excitoniques. Comme expliqué en section 3.1.2.1, la structure électronique fine des nanocristaux CdSe implique que certains niveaux d'énergie excitoniques thermiquement accessibles seront émetteurs et d'autres non. La prise en compte de tous ces niveaux est donc impérative dans le calcul. Pour calculer C_{fs} , il est alors nécessaire de connaître, pour un niveau d'énergie E_i donné, la fraction de force d'oscillateur correspondante f_i .

(b) Calculs du taux k_r de recombinaisons radiatives des cœurs CdSe

La section qui suit ne concerne que le calcul de k_r pour le cas des cœurs de QDs. Dans chaque cas étudié, les intégrales spectrales sont obtenues à partir de l'outil *Multipeak Fitting 2* du logiciel Igor Pro. Les spectres ont été réalisés dans une solution d'héxane $n = 1,375$. L'obtention de C_{fs} est plus complexe⁶¹, car elle nécessite d'utiliser divers détails des travaux de Efros & Rosen [154, 156]. Dans notre approximation, nous considérons la transition fondamentale 1S_{3/2}-1S_e uniquement⁶². L'évaluation des différentes énergies relatives E_i des sous-états i de la structure fine nécessite essentiellement de déterminer la contribution de l'interaction d'échange, notée 4η , et qui suit la loi

$$k_r = 2,88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle^{-1} \frac{g_l}{g_u} \int \frac{\epsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (3.2.10)$$

$$\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle^{-1} = \frac{\int F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int F(\tilde{\nu}) \cdot \tilde{\nu}^{-3} d\tilde{\nu}} \quad (3.2.11)$$

60. Le niveau l (*lower*) correspondant à l'état fondamental, et le niveau u (*upper*) à l'état excité, g_l et g_u représentent respectivement les multiplicités des états l et u .

$$k_r = 2,88 \cdot 10^{-9} \frac{n_f^3}{n_a} \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle^{-1} \frac{g_l}{g_u} \int \frac{\epsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (3.2.12)$$

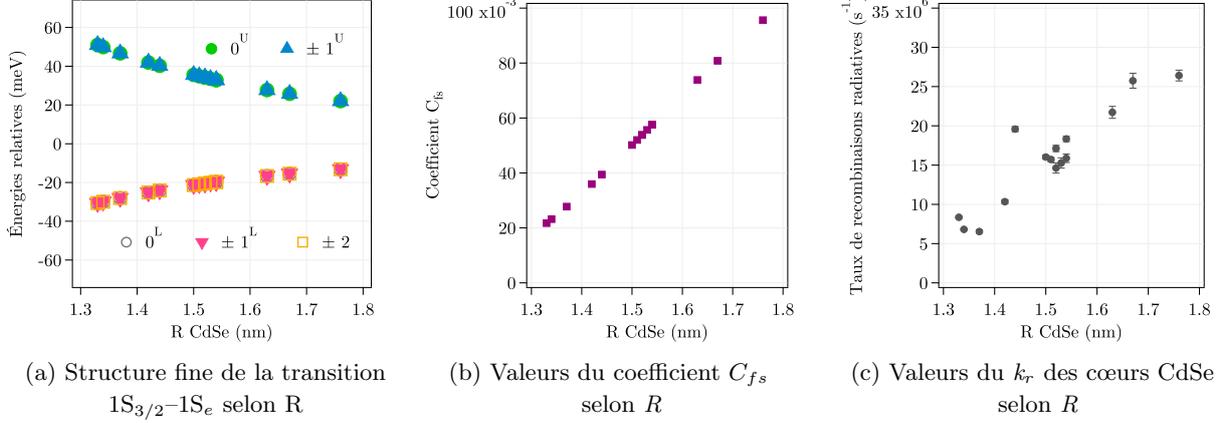
$$k_r \approx 2,88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle C_{fs} \int \frac{\epsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (3.2.13)$$

$$C_{fs} = \frac{\sum_i f_i \cdot e^{-\frac{E_i}{k_B T}}}{\sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}}} \quad (3.2.14)$$

61. On rappelle à ce titre qu'un déroulement pas-à-pas en langue française est proposé en [158].

62. Gong *et al.* [199, 200] recommandent de prendre en compte les populations d'excitons 1P_{3/2}-1S_e, thermiquement accessibles, si l'on souhaite les résultats les plus fins possibles.

$4\eta(R) = 48/R^3$ dans le cas d'un cœur sphérique ZB de CdSe – R étant le rayon moyen des nanocristaux. Dans ces conditions, l'effet du champ cristallin et de l'anisotropie de forme peuvent être considérées comme nulles.



La séparation des différents niveaux d'énergie obtenue est représentée en Figure 3.12 (a), où les sous-états notés $\pm 1^U$ et 0^U sont les états émetteurs, de forces d'oscillateurs respectives valant 2 et 1 ; et les sous-états notés $\pm 1^L$ sont les 2 états sombres, de force d'oscillateur nulle⁶³. Ces éléments nous permettent de calculer C_{fs} – Figure 3.12 (b) – et donc d'aboutir à une estimation des k_r de nos cœurs de boîtes quantiques, donnés en Figure 3.12 (c). Par exemple, pour un rayon de cœur de 1,52 nm, $k_r \approx 16 \times 10^6$ s $^{-1}$.

3.2.3.3 Durée de vie de la photoluminescence

Le second élément nécessaire pour l'estimation du rendement quantique est la durée de vie de la photoluminescence. Les mesures de cette grandeur ont été réalisées sur un montage dédié, à l'aide d'un laser à impulsion picoseconde⁶⁴, émettant à 532 nm. L'histogramme des temps d'arrivée des photons a été enregistré en mode comptage de photons⁶⁵ à l'aide d'une carte appropriée⁶⁶. La Figure 3.13 présente un exemple typique de déclin de photoluminescence obtenue par cette méthode. Ce type de caractérisation ayant été faite de manière routinière après nos synthèses, à la suite de nos spectres d'absorption et de photoluminescence, la concentration des solutions étudiée était de l'ordre de 100 nM. Pour un signal d'environ 10 000 coups/s, nous avons effectué des acquisitions de 2 min pour construire des courbes de déclin de qualité suffisante. Ces dernières ont ensuite été *fitées* par une fonction multi-exponentielle à l'aide du logiciel SymPhoTime, en prenant en compte la réponse impulsionnelle du solvant – cf. Éq. (3.2.15), où A est l'amplitude totale et a_i le poids de chaque déclin τ_i , avec $\sum_i a_i = 1$. La convergence du *fit* pouvant varier selon les bornes choisies, 5 à 10 *fits* ont été réalisés par courbe de déclin en faisant varier ces bornes.

FIGURE 3.12 – Détermination de k_r d'après la structure fine de la 1^{ère} transition excitonique.

63. Lorsque l'on normalise par les valeurs des niveaux d'énergie non-émissifs, on retrouve l'allure des courbes produites dans la littérature [163].

64. NdYAG doublé, taux de répétition 20 MHz, Time-Bandwidth.

65. *Time-correlated single photon counting* (TCSPC).

66. PicoHarp 300, PicoQuant. Réponse instrumentale $\sim 0,1$ ns.

$$F(t) = A \cdot \sum_i a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3.2.15)$$

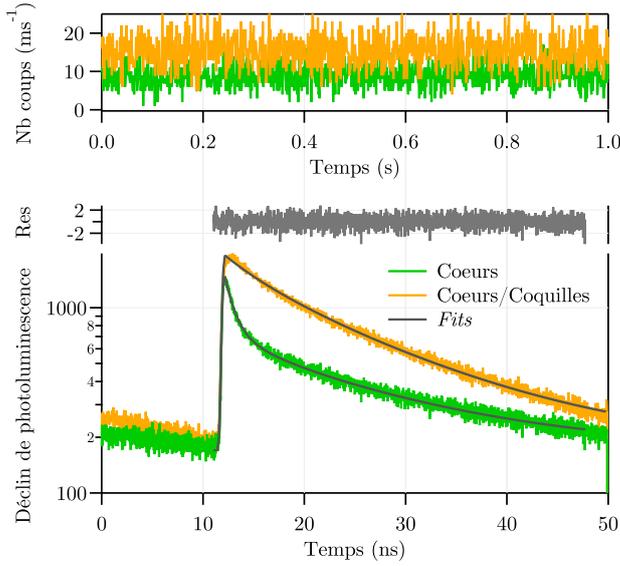


FIGURE 3.13 – Exemple de mesure de déclin de la photoluminescence de cœurs CdSe et cœurs/coquilles CdSe/CdS/CdZnS/ZnS.

La prise en compte de la réponse impulsionnelle du solvant aide à la détermination des composantes au temps court. La qualité du *fit* est évaluée par la méthode des moindres carrés, où le résidu *Res* doit rester au plus proche de zéro.

La Table 3.3 donne les résultats numériques moyens concernant le *fit* illustré en Figure 3.13. Dans le cas des QDs, le déclin de photoluminescence n'est en effet pas mono-exponentiel. Dans ce cas, il est préférable d'estimer le rendement quantique à partir de la détermination de la durée de vie moyenne τ_m , définie par l'Éq. (3.2.16). Or le nombre de déclins physiquement envisageables est un choix *a priori* sur le modèle utilisé pour la régression, qui influence plus ou moins la valeur finale attribuée au temps de durée de vie moyen τ_m .

$$\tau_m = \frac{\int_0^\infty F(t) \cdot t \cdot dt}{\int_0^\infty F(t) \cdot dt} = \frac{\sum_i a_i \cdot \tau_i^2}{\sum_i a_i \cdot \tau_i} \quad (3.2.16)$$

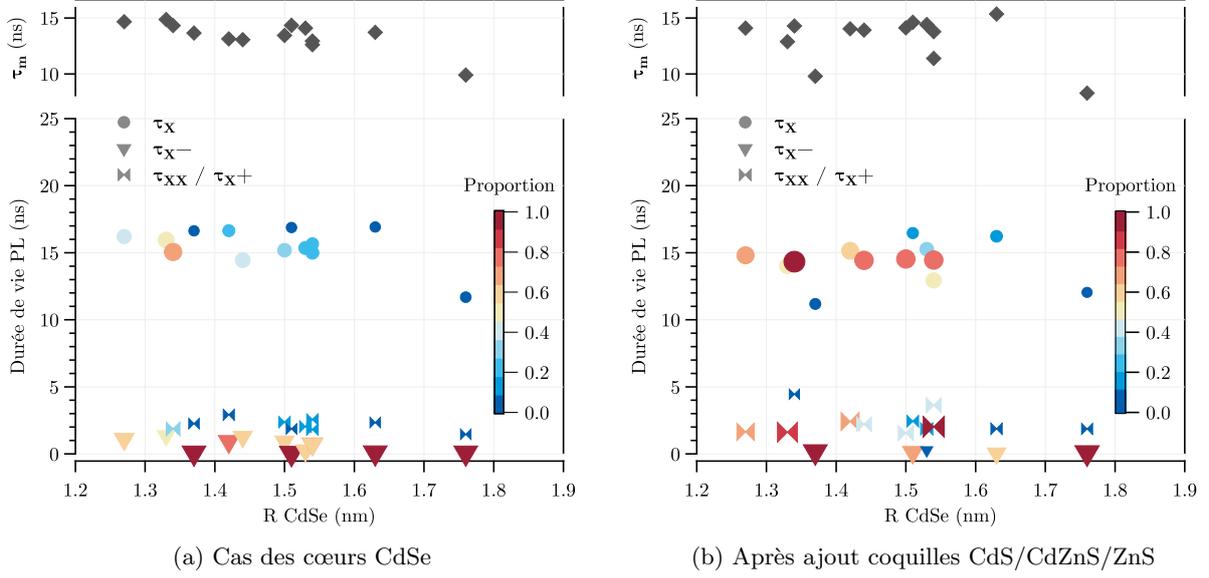
a_1	τ_1	a_2	τ_2	a_3	τ_3
0,32±0,01	15,2±0,6	0,58±0,05	0,9±0,1	0,102±0,006	2,4±0,1
A	τ_m	χ^2			
1573,2±3,8	13,4±1,1	1,0			

TABLE 3.3 – Résultats moyens des 10 *fits* tri-exponentiels réalisés pour le déclin de cœurs CdSe donné en Figure 3.13.

τ_i (ns).

La Figure 3.14 récapitule les valeurs de durée de vie moyenne τ_m mesurées pour les différentes synthèses, ainsi que les valeurs des différents déclins τ_i , accompagnées de leur poids relatif. Nous avons constaté qu'avec une régression bi-exponentielle, la valeur moyenne de l'estimateur de la qualité de la régression χ^2 est, sauf exception, systématiquement plus grand que 1, compris dans l'intervalle 1,06-4,42, et surtout plus dispersée à travers les échantillons. Dans le cas où l'on utilise un modèle tri-exponentiel : les valeurs moyennes de χ^2 sont dans l'intervalle 0,95-1,17, ce qui est plus acceptable. Les *fits* à 3 exponentielles permettent de distinguer nettement 3 déclins. Les 2 premiers, présents dans le modèle à 2 exponentielles, sont de durées de vie respectives $\tau_1 = 12-17$ ns et $\tau_2 \leq 1$ ns. Ce 2^{ème} déclin est nettement majoritaire, avec un poids $a_2 = 0,49-0,96$, alors que les valeurs de a_1 se situent sauf exception dans l'intervalle 0,02-0,43. Les valeurs de durée de vie τ_3 du 3^e déclin se situent dans l'intervalle 1,45-3 ns, avec un poids $a_3 = 0,01-0,32$ équivalent à a_1 . Divers travaux dans la littérature [167-170, 203, 204] permettent d'interpréter ces différents déclins : la composante longue τ_1 est à associer aux excitons simples (X) ; la composante τ_2

est associée aux trions négatifs (X^-); et la composante rapide τ_3 à un mélange ici indiscernable de biexcitons et trions positifs (XX/X^+): d'où leur notation respective $\tau_1 = \tau_X$; $\tau_2 = \tau_{X^-}$; $\tau_3 = \tau_{XX}/\tau_{X^+}$ sur la Figure 3.14 ci-dessous.



Le poids relatif des déclin est exprimé à la fois par la taille des marqueurs et par une échelle de couleur : par exemple, la couleur la plus bleue indique un poids entre 0 et 0,1; la plus rouge entre 0,9 et 1. Les valeurs de durée de vie moyenne τ_m sont également données pour chaque mesure. (a) Le cas des cœurs CdSe nécessite 3 déclin exponentiels pour être correctement *fités*. (b) Les QDs après croissance des coquilles sont généralement bien *fités* avec un modèle bi-exponentiel.

La Figure 3.14 montre également que l'ajout des coquilles ne modifie pas tellement la durée de vie moyenne τ_m , mais tend à faire disparaître les trions négatifs X^- au profit des excitons X . Au niveau des *fits*, cela se manifeste par des valeurs de τ_m strictement identiques que le modèle utilisé soit bi ou tri-exponentiel.

FIGURE 3.14 – Résultats des mesures de durées de vie sur 12 synthèses de QDs.

3.2.3.4 Estimation du rendement quantique en solution

Les calculs de taux de recombinaisons radiatives k_r , n'étant valables que pour les cœurs CdSe, nous avons dû estimer le rendement quantique des QDs_{cœurs/coquilles} par comparaison. Connaissant le rendement quantique des cœurs de QDs ϕ_c , que l'on a calculé à partir de la relation Éq. (3.2.9), il est en effet possible de remonter expérimentalement au rendement quantique des hétéro-structures cœurs/coquilles ϕ_{cc} grâce au ratio de ces 2 grandeurs, qu'on peut rapporter au rapport de leurs signaux I_i (s^{-1}) normalisé par le rapport de leurs extinctions molaires $\varepsilon_i^{\lambda_e}$ ($L/mol/cm$) corrigé de la différence de puissance d'excitation $L_i^{\lambda_e}$ (W/cm^2) – cf. Éq. (3.2.17). Cette relation se retrouve à partir des définitions données en Éq. (3.2.18) à (3.2.20), où η_d est l'efficacité de détection; k_{λ_e} le taux d'excitation à une longueur d'onde donnée (s^{-1}); $\sigma_{abs}^{\lambda_e}$ la section efficace d'absorption (m^2); $h\nu_e$ l'énergie des photons d'excitation (J); et N_A le nombre d'Avogadro. Les valeurs des différents ratios sont directement déterminables *via* les spectres d'absorption et de photoluminescence réalisés après les synthèses – le mon-

$$\frac{\phi_{cc}}{\phi_c} = \frac{\frac{I_{cc}}{I_c}}{\frac{\varepsilon_{cc}^{\lambda_e}}{\varepsilon_c^{\lambda_e}} \cdot \frac{L_{cc}^{\lambda_e}}{L_c^{\lambda_e}}} \quad (3.2.17)$$

$$I = \eta_d \cdot \phi \cdot k_{\lambda_e} \quad (3.2.18)$$

$$k_{\lambda_e} = \sigma_{abs}^{\lambda_e} \frac{L^{\lambda_e}}{h\nu_e} \quad (3.2.19)$$

$$\varepsilon^{\lambda_e} = \sigma_{abs}^{\lambda_e} \frac{N_A}{10^3 \ln(10)} \quad (3.2.20)$$

tage utilisé pour la réalisation des spectres de photoluminescence permet en particulier d'obtenir la puissance d'excitation. La Figure 3.15 synthétise alors les valeurs de rendement quantique ϕ_c obtenus pour les cœurs CdSe et ϕ_{cc} pour les QDs CdSe/CdS/CdZnS/ZnS.

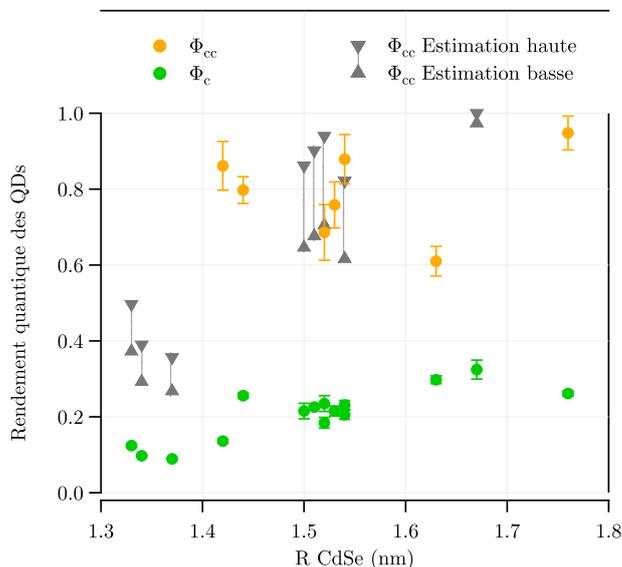


FIGURE 3.15 – Valeurs de rendement quantique ϕ déterminées pour nos QDs dans l'héxane. ϕ_c pour les QDs_{cœurs} ϕ_{cc} pour les QDs_{cœurs/coquilles}

La photoluminescence de mes premières synthèses de QDs ayant été caractérisées à l'aide d'un spectromètre commercial dont la fiabilité a plus tard été constatée comme défailante⁶⁷, certaines de nos valeurs de rendement quantique ϕ_c n'ont pas pu donner lieu à une estimation fiable de ϕ_{cc} . Le coefficient multiplicateur⁶⁸ à appliquer est cela dit systématiquement dans l'intervalle 3 à 4, ce qui m'a permis de proposer des valeurs approximées de ϕ_{cc} pour ces cas. Pour la grande majorité des QDs utilisés par la suite, dont le rayon $R = 1,4-1,6$ nm, on peut retenir qu'en moyenne, $\phi_c = 0,21 \pm 0,03$ et $\phi_{cc} = 0,79 \pm 0,07$.

3.3 ÉCHANGES DE LIGANDS DE SURFACE

3.3.1 DIVERSITÉ DES MOLÉCULES ET APPLICATIONS

Le champ disciplinaire de la physico-chimie des surfaces a établi que la présence d'espèces chimiques tensioactives ou adsorbées⁶⁹ sur des surfaces cristallines peut altérer leur réactivité ainsi que leurs propriétés électroniques. Plusieurs mécanismes peuvent alors intervenir, comme un couplage entre les orbitales des atomes de la surface et celles des espèces chimiques adsorbées⁷⁰. Les molécules tensioactives interagissent avec les atomes présents en surface d'une manière analogue à des molécules formant un complexe de coordination avec un ion métallique. C'est la raison pour laquelle le terme ligand est souvent employé dans la littérature dans le cas des boîtes quantiques pour désigner les molécules stabilisant les solutions colloïdales de QDs – et/ou les fonctionnaliser⁷¹.

67. Variation de la puissance d'excitation non contrôlable.

68. Issu des différents rapports ϕ_{cc}/ϕ_c déterminés de façon fiable.

69. Respectivement connues sous les noms *Surfactants* et *Adsorbates*, dans la littérature.

70. Ces effets sont importants dans le cas des nanocristaux, et notamment des boîtes quantiques.

71. La revue de Boles *et al.* [205], qui sert de support principal à cette section, propose ainsi de nommer ces molécules *ligands de surface*, pour souligner cette dualité tensioactif-ligand – j'utiliserai néanmoins le terme "ligand" régulièrement par la suite, pour simplifier.

Les ligands de surface permettent en premier lieu de contrôler la dispersion et l'agrégation des boîtes quantiques en solution, en jouant sur l'encombrement stérique et/ou les interactions électrostatiques. Ces 2 mécanismes emploient des ligands différents, comme l'illustre la Figure 3.16. La nature des ligands de surface utilisés détermine ainsi la solubilité générale des QDs : les chaînes carbonées permettent une solubilisation stable en milieu apolaire (héxane, toluène, etc.), tandis que les espèces ioniques sont utilisées pour les milieux polaires (eau, éthanol, etc.). Les ligands de surface passent aussi les défauts de surface des QDs, en particulier pour des cœurs simples. Ces défauts de surfaces rendent possibles des états d'énergie intermédiaires entre les niveaux $1S_{3/2}$ et $1S_e$, capables de piéger les trous ou les électrons, et donc de limiter la luminescence des boîtes quantiques ou de modifier leurs caractéristiques spectrales. En couplant leurs propres niveaux d'énergie avec ces niveaux intermédiaires, les ligands de surface peuvent "écarter" ces pièges et ainsi limiter ces problèmes. Enfin, les ligands de surface permettent de fonctionnaliser les boîtes quantiques pour des applications spécifiques, par exemple en opto-électronique ou en biologie [206]. Toutes ces fonctions peuvent être combinées *via* un design modulaire des ligands de surfaces, comme le montre la Figure 3.17, avec en ligne de mire les applications en biologie.

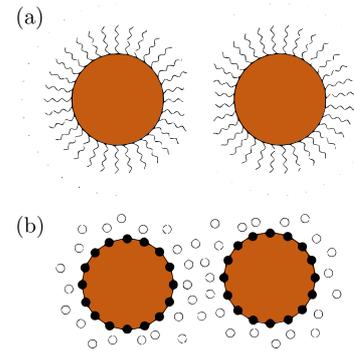
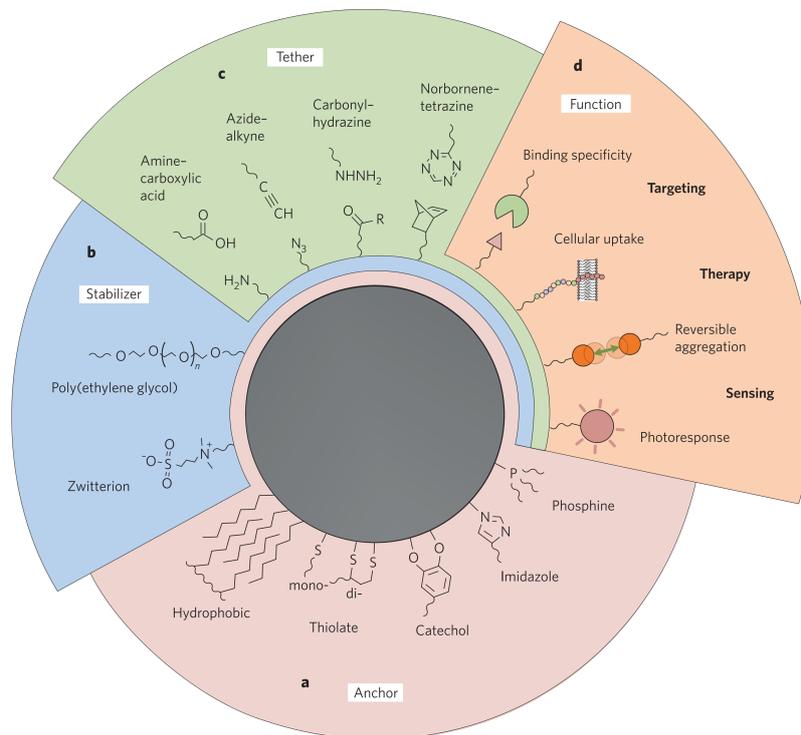


FIGURE 3.16 – Schéma, adapté de [205], de l'interaction entre 2 QDs stabilisées soit par :

- (a) encombrement stérique *via* des ligands à longues chaînes hydrocarbonées.
- (b) répulsion électrostatique avec des ligands ioniques, où ● représentent les ions et ○ les contre-ions.



(a) Les ancrs (*anchors*) relient les molécules recouvrant les QDs par des interactions variables avec les ligands natifs ou par des liaisons atomiques se liant directement à la surface du nanocristal ; (b) Des ligands stabilisateurs comme le polyéthylène glycol (PEG) ou des chaînes zwitterioniques donnent un caractère hydrophile et empêchent l'adsorption non spécifique. (c) Les ligands de surface peuvent aussi comporter des groupes réactifs servant d'adaptateur/coupleur (*tether*) pour la conjugaison covalente avec des molécules biofonctionnelles après échange de ligands. (d) Des unités biofonctionnelles peuvent offrir des capacités de ciblage, de thérapie ou de détection.

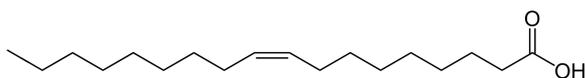
FIGURE 3.17 – Design modulaire des ligands de surface utilisés pour l'obtention de nanocristaux biocompatibles [205].

Le développement et la caractérisation de ces ligands constitue un champ scientifique à part entière, nécessitant l'utilisation de méthodes variées et complémentaires, récapitulées dans la Figure 3.18 en fonction de leur domaine d'intérêt :

- Étudier les liaisons chimiques entre un nanocrystal et ses ligands de surface se fait par simulations numériques à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ; spectroscopie photo-électronique X (XPS) ; et, dans certains cas, à l'aide de la microscopie électronique à transmission (TEM).
- Les techniques comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (NMR) permettent d'élucider la composition et la structure des molécules de ligands.
- Déterminer les propriétés effectives de l'ensemble, telles que l'épaisseur de la couche, le potentiel zêta (V_ζ), ou la densité et la constante diélectrique. Pour cela on utilisera la microscopie à force atomique (AFM), ou encore les spectroscopies de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

Sachant que les ligands de surface s'adsorbent sur les QDs *via* des interactions moins énergétiques que les liaisons covalentes, ils présentent différents degrés de labilité. Cette notion désigne le fait qu'un ligand peut être plus ou moins facilement échangé par un autre [207]. À l'issue d'une synthèse, les boîtes quantiques sont souvent en milieu apolaire, recouvertes de ligands de surface à base de chaînes carbonées, car ce sont à l'heure actuelle les espèces chimiques les plus appropriées pour un contrôle fin de la taille et forme des QDs. Passer les boîtes quantiques dans un solvant polaire nécessite alors de changer les ligands de surface. L'adsorption de ligands sur les surfaces de QDs est généralement modélisé par une courbe de Langmuir classique [208-211] ou adaptée [212]. Il en découle que les échanges de ligands consistent, dans leur version la plus simplifiée, à diluer une solution de QDs avec leurs ligands natifs dans une solution de ligands souhaités, de manière à créer une situation de compétition favorable à l'échange⁷². Les parties suivantes vont nous permettre de présenter les différents ligands de surface que j'ai utilisés durant ma thèse, ainsi que les protocoles d'échange associés.

3.3.1.1 Acide oléique (OA)



L'acide oléique est un acide gras répandu dans la nature, présent dans les huiles végétales et le corps humain – sous une forme triglycéride. Contenu dans les savons ou les produits cosmétiques, il est

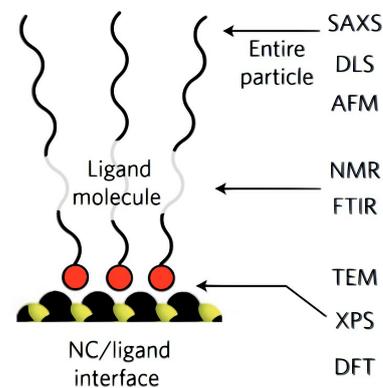


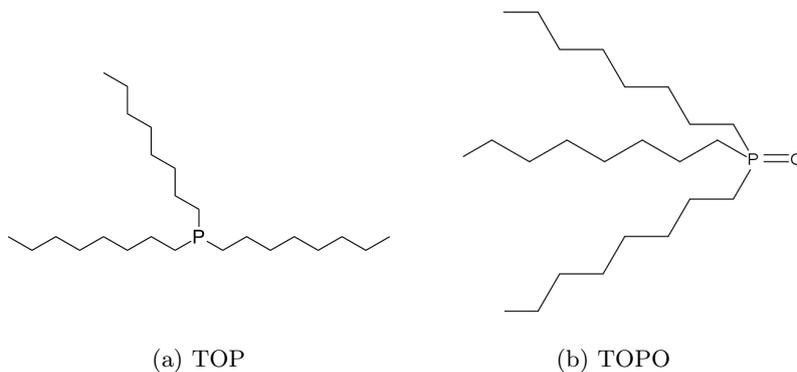
FIGURE 3.18 – Résumé des techniques utilisées pour l'analyse de l'interface QD/ligand, regroupées par domaine. Extrait de [205].

72. Il est parfois nécessaire de fournir un apport d'énergie sous la forme d'agitation ou de chaleur, notamment lorsque l'échange de ligands vise à transférer les QDs dans un environnement aqueux dans lequel la solubilité n'est pas possible au départ.

FIGURE 3.19 – Structure de la molécule acide oléique (OA).

couramment utilisé dans les synthèses de nanoparticules pour influencer la cinétique de réaction et ainsi contrôler la taille comme la la morphologie des produits de la synthèse – voir [213] par exemple. Dans le cas des boites quantiques, plusieurs travaux ont eu pour objectif de remplacer la voie purement "organo-métallique", utilisée dans les années 90 [152], par des approches plus écologiques, plus simples, et nécessitant des éléments moins toxiques⁷³. Cela a de plus permis une progression des connaissances sur la croissance des nanocristaux en général et les moyens de la contrôler. L'acide oléique s'est ainsi imposé dès le début des années 2000 comme un ligand de surface de choix, que ce soit comme environnement de synthèse et/ou comme stabilisateur colloïdal de QDs en milieux organiques [184, 186, 216-222]. C'est le ligand de surface de nos boites quantiques après synthèse, incompatible avec notre processus de fonctionnalisation final⁷⁴ et qui nécessite donc d'être remplacé pour la suite des expériences.

3.3.1.2 Trioctylphosphine et son oxide (TOP/TOPO)



73. Par exemple, le remplacement du diméthylcadmium $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ par l'oxyde de cadmium CdO , le séléniure de trioctylphosphine Se-TOP par du Se élémentaire, etc. [214-216]

74. Voir chapitre 4.

FIGURE 3.20 – Structure des molécules trioctylphosphine (TOP) et oxide de trioctylphosphine (TOPO).

Sous l'inspiration des travaux de Stuczynski *et al.* [223], le TOP ou les mixtures TOP/TOPO ont d'abord été introduits comme solvant pour la synthèse de QDs CdSe par Murray *et al.* [152], sur la base de la stabilité et facilité de préparation des composés TOP-Se. Ils ont progressivement été mis de côté pour cet usage au profit de solvants non-coordonnants⁷⁵ comme l'octadécène [217, 220-222]. Cela permet notamment un plus grand contrôle de la nucléation et croissance des QDs en jouant sur l'ajout de ligands de surface en cours de synthèse. Le TOP ou les mélanges TOP/TOPO restent néanmoins couramment utilisés comme ligand de surface en milieu organique, car cela permet une stabilisation colloïdale relativement efficace mais plus labile que ce qui est obtenu avec l'OA⁷⁶. Ce sont typiquement ces ligands que nous avons donc utilisés pour nos préparations de surfaces de QDs en milieu organique.

75. Ne formant pas de complexe de coordination avec les ions métalliques en solution.

76. En raison de la taille inférieure des chaînes carbonées et d'une moindre rigidité en l'absence de double liaison, ce qui facilite les processus de fonctionnalisation.

3.3.1.3 Acide dihydrolipoïque-sulfobétaïne (DHHLA-SB)

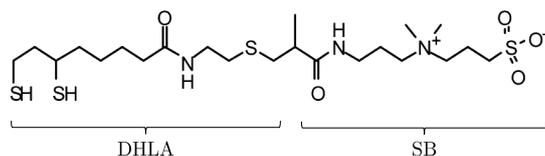


FIGURE 3.21 – Structure de la molécule acide dihydrolipoïque-sulfobétaïne (DHHLA-SB).

Le DHHLA-SB a été introduit comme ligand de surface en milieu aqueux en 2010, par l'équipe de T. Pons et en particulier dans les travaux de E. Muro [224-226]. Il s'agissait d'une réponse aux limitations de 2 ligands classiques à ce moment : le DHHLA et le PEG, parfois utilisés de manière couplée. Les *thiols* (terminaisons SH) sont notamment connues pour former des liaisons stables avec l'or, et ainsi à la base de nombreuses applications en nanosciences [227]. Dans le cas de QDs présentant du soufre sur leur couche externe, les thiols peuvent former des ponts disulfures. Les QDs stabilisées par des ligands de surface DHHLA permettaient d'obtenir des nanoparticules stables et compactes, mais propices aux interactions non-désirées en raison de leur charge négative. L'utilisation de PEG permettait de limiter ces soucis contre une moindre stabilité dans les milieux salés et une taille de nanoparticules plus importante, pouvant empêcher leur utilisation comme sonde dans certains environnements biologiques. L'utilisation d'une terminaison SB zwitterionique permet de répondre à ces différents impératifs sans compromis⁷⁷. Pour rendre nos QDs compatibles avec une fonctionnalisation en milieu aqueux, ce fut notre premier choix.

77. Les zwitterions sont des espèces chimiques disposant de charges locales opposées sur des atomes non-adjacents, dont le signe effectif dépend du pH, ce qui leur confère des propriétés très intéressantes pour la biocompatibilité et la passivation de surface [228-230].

3.3.1.4 Acide mercaptopropionique (MPA)

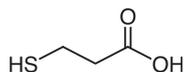


FIGURE 3.22 – Structure de la molécule acide mercaptopropionique (MPA).

Le MPA est un ligand de surface basé sur une accroche monothiol⁷⁸, très labile en raison de (a) sa petite taille ; (b) la sensibilité de l'accroche à la photo-oxydation ; et (c) la facilité de formation de ponts disulfures entre ligands MPA, qui ne peuvent alors plus se lier aux QDs [231-233]. À notre connaissance, sa première utilisation comme stabilisateur colloïdal de boîtes quantiques provient des travaux de Mitchell *et al.* [234]. Il faut noter que les QDs[MPA], solubles dans le N,N-diméthylformamide (DMF), ne deviennent compatibles avec les solvants aqueux qu'à la condition de d'abord déprotoner les ligands

78. Contrairement aux ligands basés sur le DHHLA, dont l'accroche est qualifiée de bi ou di-thiol.

MPA par réaction avec un composé basique, puis maintenir l'environnement à un $\text{pH} \geq 8$. Dans ces conditions, les QDs[MPA] obtenus sont stables, et surtout monodisperses, à l'échelle d'une journée. Nous nous sommes repliés sur ces ligands de surface après nos difficultés à utiliser les QDs[DHLA-SB] pour la réalisation de surfaces fonctionnalisées ou pour les expériences de FRET⁷⁹.

79. Voir chapitres 4 et 5.

3.3.2 PROTOCOLES D'ÉCHANGES DE LIGANDS

3.3.2.1 QDs[TOP] dans le toluène

Pour obtenir des QDs[TOP], on introduit, dans un tricol 250 mL, un quart d'une synthèse de QDs[OA] (2,5 mL) avec 10 g de TOPO⁸⁰ et 5 mL de TOP⁸¹. L'ensemble est chauffé sous agitation jusqu'à atteindre 70°C, ce qui fait fondre le TOPO. On dégaze alors le contenu du tricol pour évacuer l'héxane et l'oxygène, avant de passer sous atmosphère argon. On laisse le mélange sous argon et avec agitation durant 1 h à 70°C, puis l'on récupère la solution résultante dans des tubes Falcon⁸² de 50 mL que l'on complète avec de l'éthanol. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 5 min, on peut jeter le surnageant et resolubiliser les QDs[TOP] dans de l'héxane ou du toluène⁸³, au choix.

80. 223301-100G, 99%, Sigma-Aldrich.

81. 718165-100ML, 97%, Sigma-Aldrich.

82. 734-0448, VWR.

83. 179418-2.5L, 99,5%, Sigma-Aldrich.

3.3.2.2 QDs[DHLA-SB] dans un tampon Hepes

Cet échange de ligands nécessite 2 grandes étapes : (a) l'échange de ligand et (b) l'ultrafiltration des QDs[DHLA-SB] obtenus⁸⁴. Avant toute chose, on dissout 100 mg d'acide lipoïque-sulfobétaïne LA-SB⁸⁵ avec 2 mL d'eau distillée ultra-pure, dans une fiole de 25 mL. Sous agitation, on ajoute 20 mg de borohydrure de sodium⁸⁶ NaBH_4 , ce qui va permettre d'ouvrir le cercle aromatique à 2 soufres, qui vont être protonés, nous permettant alors d'obtenir une solution aqueuse de DHLA-SB sous 30-45 min. En parallèle, il faut rincer les QDs[OA] pour éliminer le maximum d'OA présent. Une quantité de 4 nmol de QDs[OA], généralement entre 100 et 150 μL , est mélangée à au moins 1,5 mL d'éthanol dans un tube à centrifuger 2 mL pour rinçage. Après 5 min à 13 300 g⁸⁷, on remplace le surnageant résultant par de l'éthanol. L'ensemble est mis aux ultrasons pour redispersion, et l'on centrifuge une nouvelle fois. Les QDs rincés et précipités sont ensuite repris dans 2 mL de chloroforme⁸⁸, puis mélangés à la solution de DHLA-SB. La fiole de 25 mL utilisée permet d'étaler les solutions non miscibles et ainsi maximiser la surface d'échange. Après avoir laissé l'ensemble sous agitation durant 1 h, la plupart des QDs sont passés en phase aqueuse. La fiole avec bouchon non vissé est laissée dans une étuve à 60°C, sans agitation pendant une nuit, pour évaporer le chloroforme à travers la phase aqueuse et compléter l'échange de ligands. On obtient alors une solution de QDs[DHLA-SB] limpide, d'environ 1,5-2 mL avec parfois un reste de chloroforme⁸⁹. L'ultrafiltration de la solution obtenue nécessite l'utilisation de tubes à centrifugation Vivaspin 500 μL ⁹⁰, disposant de membranes de filtration en PES et d'un

84. Ce protocole est adapté de Muro *et al.* [224].

85. Fourni par T. Pons.

86. 4051.1, 97%, Roth.

87. Sauf précision contraire, ces mêmes paramètres seront conservés pour chaque occurrence du mot "centrifugation" dans cette partie et la suivante.

88. 1.02445.2500, 99-99,4 %, Supelco.

89. Pour résoudre cela, il est possible de centrifuger l'ensemble à 9000 g durant 5 min pour obtenir une nette séparation des phases, ce qui facilite l'extraction de la phase aqueuse surnageante

90. VS0132, Sartorius Stedim Biotech. 10459512, Fisher Scientific.

réservoir. On effectue tout d'abord une centrifugation de rinçage avec 4 tubes remplis d'eau distillée ultra-pure, ce qui permet de nettoyer les membranes de filtration de potentielles traces de glycérine et azide de sodium, minimisant ainsi tout risque de pollution. La solution de QDs[DHLA-SB] est ensuite répartie dans les 4 tubes, puis l'on centrifuge à 13 300 g durant 30 min, ce qui concentre en 25 μL environ les 500 μL présents au départ dans chaque tube⁹¹. On complète alors les tubes avec une solution de tampon Hepes à 0,1 M dans laquelle on ajoute du 200 mM de NaCl, et dont le pH est ajusté à 8 *via* l'ajout de soude NaOH à 10 M. Cette préparation est centrifugée 10 min pour rincer les QDs. Après avoir répété cette opération de rinçage, on récupère des QDs[DHLA-SB] concentrés dans l'Hepes, pour une concentration proche de 30-40 μM sans dilution⁹².

3.3.2.3 QDs[MPA] dans un tampon NaHCO_3

De même que pour l'échange de ligands de surface précédent, nous procédons en 2 grandes étapes : ici il s'agit (a) de l'échange de ligands proprement dit et (b) le transfert vers un solvant aqueux⁹³. La procédure de rinçage des QDs[OA] est la même que décrite dans la partie précédente, toujours pour une quantité de 4 nmol. Les QDs rincés et précipités sont ensuite repris dans un volume de 400 μL de MPA⁹⁴ et dispersés par ultrasons. La solution est laissée dans une étuve à 60°C pendant une nuit sans besoin d'agitation, pour compléter l'échange de ligands. Après quoi on ajoute 1 mL de chloroforme et l'on centrifuge pour faire précipiter les QDs[MPA], qu'il est ensuite possible de reprendre dans 0,5-1 mL de N,N-diméthylformamide (DMF)⁹⁵. Pour pouvoir transférer ces QDs[MPA] dans l'eau, il faut alors ajouter 20-40 mg de *tert*-butoxide de potassium⁹⁶ t-BuOK puis soumettre l'ensemble aux ultrasons pour disperser le tout et déprotoner les ligands MPA. Ce mélange est centrifugé, et le surnageant évacué. Après une redispersion pour rinçage dans l'éthanol, suivi d'une centrifugation, on peut évacuer le surnageant pour alors solubiliser les QDs[MPA] dans 400 μL de tampon bicarbonate de soude NaHCO_3 à 0,1 M, dont le pH est ajusté à 9 avec de la soude NaOH à 10 M. Après avoir effectué un spectre d'absorption, on peut vérifier que la concentration de la solution obtenue se situe bien aux alentours de 10 μM , comme il est prévu au regard des 4 nmol initialement prélevés⁹⁷.

3.3.3 CARACTÉRISATIONS SPECTRALES EN SOLUTION ET SUR SURFACES

Comme nous l'avons présenté en partie 3.3.1, les propriétés photophysiques des QDs peuvent être affectées par les ligands de surface, en particulier dans le cas de cœurs sans coquilles. Avec coquilles, cet effet est normalement marginal, cependant, nos mesures spectrales ont montré qu'il était bien possible d'observer des modifications en fonction des ligands de surface. La Figure 3.23 (a) montre que, lorsque caractérisés en solution⁹⁸, tous les échanges de ligands ne produisent pas les mêmes effets. L'échange OA(Héxane) \rightarrow TOP(Toluène) ne modifie

91. Le solvant en trop est évacué dans un réservoir que l'on vide après la centrifugation.

92. Dilution qui peut néanmoins avoir son intérêt dans le but de minimiser les pertes lors de la récupération, tant qu'elle reste raisonnable : ces QDs sont stables en solution au moins 1 mois, lorsque stockés dans un réfrigérateur, à condition de rester au-dessus de 8 μM .

93. Ce protocole est repris de Mat-toussi *et al.* [235].

94. 63768-25ML, 99%, Sigma.

95. 270547-1L, 99,9%, Aldrich.

96. 156671-25G, $\geq 98\%$, Aldrich.

97. Le MPA ayant tendance à s'oxyder et former des ponts disulfures qui ne se lient plus aux QDs, ce type de solution doit être utilisée relativement rapidement, si possible dans la journée, et sans avoir effectué de rinçage trop important des ligands en excès.

98. Dans toute cette section, la concentration des solutions vaut environ 100 nM.

par le spectre de photoluminescence, les spectres sont donc confondus. À l'inverse, l'échange OA(Héxane) \rightarrow DHLA-SB(Hepes/Eau distillée) produit un léger resserrement du profil d'émission et un décalage vers le rouge, ce qui est particulièrement notable lorsque l'on se focalise sur le pic d'émission en Figure 3.23 (b).

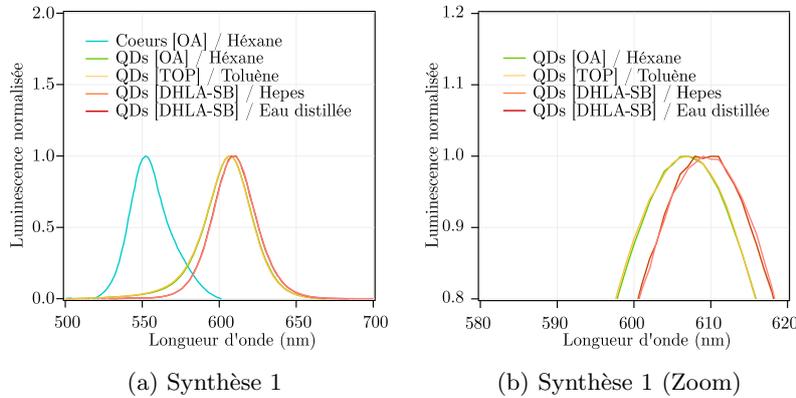


FIGURE 3.23 – Spectres normalisés de photoluminescence pour différents ligands de surfaces et solvants – première synthèse étudiée.

Maximums d'émission des QDs :

[OA]/[TOP] : 607 nm

[DHLA-SB] : 609 nm

LMH des spectres :

[OA]/[TOP] : $35,2 \pm 0,2$ nm

[DHLA-SB] : $33,1 \pm 0,1$ nm

Les Figures 3.24 (a) et (b) montrent, d'une part, que ce phénomène est reproductible sur une autre synthèse de boîtes quantiques et, d'autre part, que l'échange OA(Héxane) \rightarrow MPA(NaHCO_3) produit lui aussi resserrement du profil et un décalage du pic d'émission, de façon moins prononcée. Les spectres de photoluminescence des coeurs de QDs sont donnés pour référence, et permettent de remarquer que l'opération de croissance des coquilles peut permettre de "rattraper" une mauvaise synthèse de coeurs, en réduisant la dispersion en taille des nanocristaux.

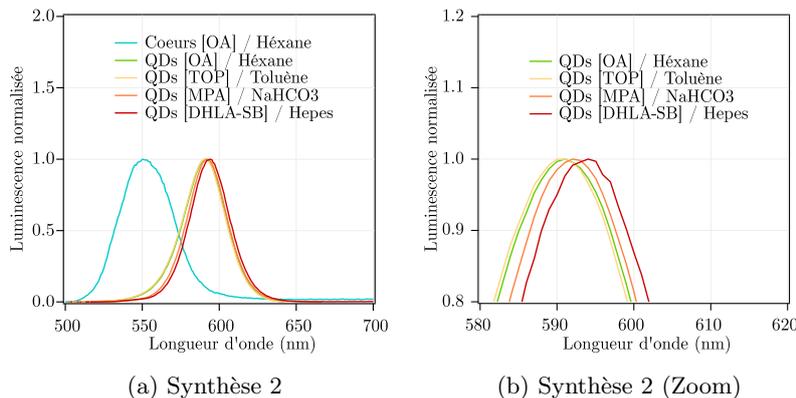


FIGURE 3.24 – Spectres normalisés de photoluminescence pour différents ligands de surfaces et solvants – seconde synthèse étudiée.

Maximums d'émission des QDs :

[OA]/[TOP] : 590-591 nm

[MPA] : 592 nm

[DHLA-SB] : 594 nm

LMH des spectres :

[OA]/[TOP] : $33,5 \pm 0,2$ nm

[MPA] : $31,3 \pm 0,1$ nm

[DHLA-SB] : $31,1 \pm 0,1$ nm

Il est intéressant de noter qu'un phénomène semblable peut se produire au moment de la fonctionnalisation des boîtes quantiques sur substrat⁹⁹. La Figure 3.25 nous montre en effet que, pour des QDs[TOP], le passage de la solution colloïdale à la monocouche sur verre montre là encore un décalage vers le rouge de quelques nanomètres. L'influence du milieu semble pour le coup jouer un rôle plus minime : le fait d'ajouter de l'eau sur la monocouche de QDs[TOP] ne modifie qu'à la marge

99. Méthode décrite en chapitre 4.

la position du maximum du spectre par rapport à celui de la même monocouche, laissée à l'air libre. En ce qui concerne le resserrement spectral, il est présent dans le cas d'une interface verre-eau, mais la monocouche en interface verre-air présente plutôt un léger élargissement.

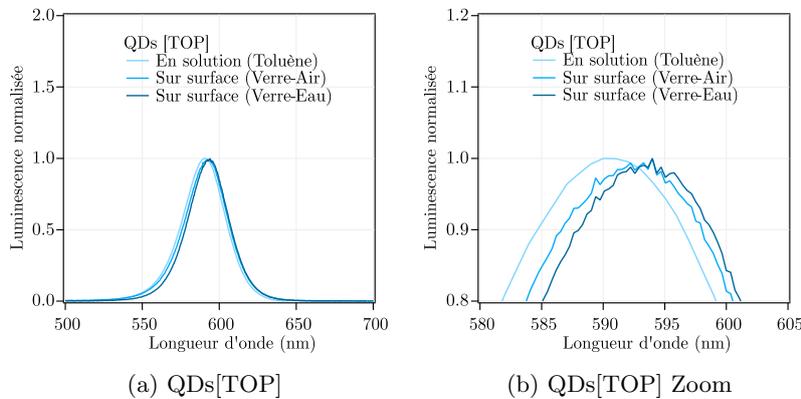


FIGURE 3.25 – Spectres normalisés de photoluminescence des QDs[**TOP**] dans différentes situations, en solution ou en monocouche.

Maximums d'émission QDs[**TOP**] :

En solution : 590-591 nm

Verre-Air : 593 nm

Verre-Eau : 594 nm

LMH des spectres :

En solution : $33,5 \pm 0,2$ nm

Verre-Air : $33,80 \pm 0,06$ nm

Verre-Eau : $32,20 \pm 0,04$ nm

Ce phénomène est moins marqué pour les QDs[**MPA**], comme le montre la Figure 3.26, où les tracés des spectres de photoluminescence de QDs sur surface sont remarquablement bien superposés. Plusieurs éléments peuvent entrer en jeu et contribuer de manière complexe à ce phénomène : la qualité des coquilles ; la différence de passivation des surfaces de QDs selon les ligands ; l'influence du couplage avec la surface [192] ; ainsi qu'un phénomène de FRET entre QDs compatibles par leur légère différence de taille¹⁰⁰. Le fait que l'on ne constate pas de différence spectrale entre les QDs[**OA**] dans l'héxane et les QDs[**TOP**] dans le toluène, comme nous l'avons illustré en Figures 3.23 et 3.24, semble *a priori* mettre la qualité des coquilles hors de cause. À l'inverse, on constate un décalage spectral en solution alors qu'il ne peut y avoir, dans cette situation, de FRET entre les QDs.

100. Lunz *et al.* [236] ont étudié l'occurrence de FRET entre QDs de ce type lorsque déposées en monocouches et séparées de 5 nm ou moins. Les caractérisations MEB de nos surfaces dans le chapitre suivant montrent que nous nous situons bien dans cette configuration.

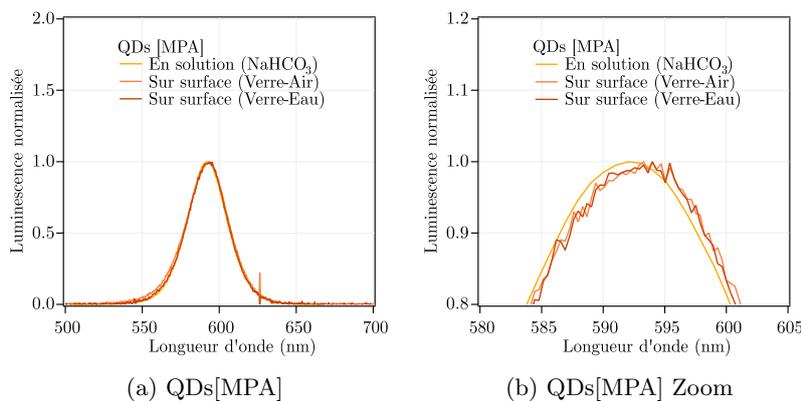


FIGURE 3.26 – Spectres normalisés de photoluminescence des QDs[**MPA**] dans différentes situations.

Maximums d'émission QDs[**MPA**] :

En solution : 592 nm

Verre-Air : 593 nm

Verre-Eau : 593 nm

LMH des spectres :

En solution : $31,3 \pm 0,1$ nm

Verre-Air : $33,72 \pm 0,07$ nm

Verre-Eau : $32,12 \pm 0,06$ nm

Pour tenter de déterminer les contributions respectives de l'échange de ligands et la fonctionnalisation sur surface, la Figure 3.27 retrace les différents spectres des 2 Figures précédentes, séparés par situation, en se focalisant sur les pics d'émissions : en solution, à l'interface verre-

air, et verre-eau. Il apparaît alors que le décalage spectral de 2 nm constaté en solution entre QDs[TOP] et QDs[MPA] disparaît après dépôt en monocouche, quel que soit le milieu – air ou eau.

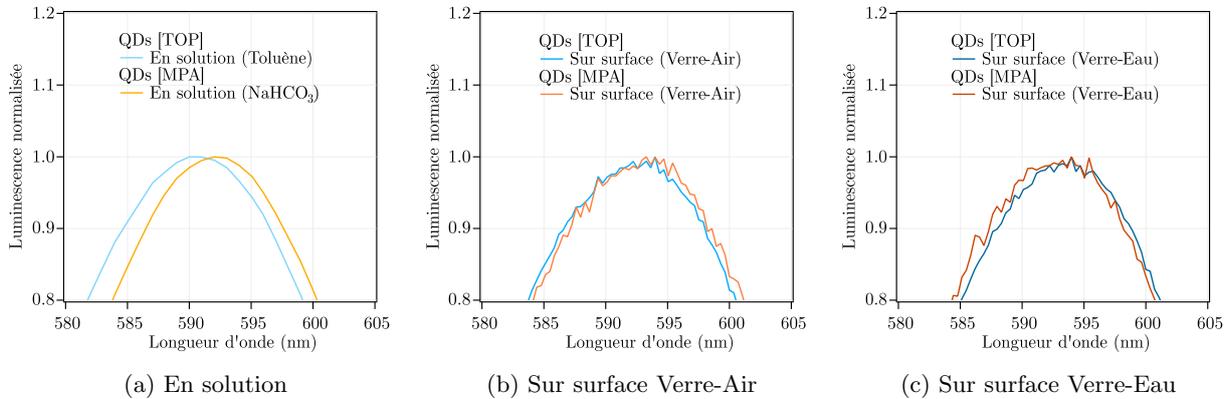


FIGURE 3.27 – Comparaison des spectres normalisés de photoluminescence des QDs[TOP] et QDs[MPA] dans chaque situation.

Nous proposons d’interpréter ces résultats de la manière suivante : en solution, la différence de structure, taille et liaison de nos ligands MPA induit une moins bonne passivation de la surface des coquilles que les QDs[TOP]. Après fonctionnalisation, les monocouches de QDs obtenues sont peu recouvertes de ligands dans les 2 cas, de telle manière que, quelque soit le ligand, l’éventuelle passivation est alors moindre. À défaut de pouvoir réaliser une étude détaillée parfaitement concluante, ces caractérisations spectrales nous permettent néanmoins de fixer un aspect instrumental important : pour optimiser la position du spectre d’émission de notre monocouche donneuse FRET, il est nécessaire d’anticiper le décalage spectral se manifestant après fonctionnalisation. Il faut donc synthétiser des boîtes quantiques d’émission centrée vers 590 nm plutôt que 600 nm, pour minimiser voire supprimer le signal de débordement spectral du donneur FRET dans la fenêtre de détection de l’accepteur ¹⁰¹.

3.4 CONCLUSIONS SUR LES BOITES QUANTIQUES

En présentant les propriétés fondamentales des boîtes quantiques, nous avons confirmé leur intérêt comme donneuses FRET. La démonstration de la maîtrise de leur synthèse et des échanges de ligands nécessaires à la suite de nos travaux a été faite. J’ai également donné une estimation du rendement quantique de nos QDs. La caractérisation de leur spectre d’émission, tant en solution que sur surfaces, dans différentes conditions, nous a quant à elle permis de montrer que le ligand de surface des boîtes quantiques en solution n’a pas d’influence sur l’émission après leur fonctionnalisation ¹⁰². Nous avons aussi pu fixer un pic d’émission cible à 590 nm pour les synthèses devant nous fournir des boîtes quantiques adaptées à leur rôle de donneuses FRET pour le dispositif expérimental TIRF détaillé au chapitre 2. Le chapitre suivant va donc être l’occasion de nous focaliser sur le travail réalisé concernant la fonctionnalisation et microstructuration des QDs sur surfaces en verre.

101. Nous avons défini le débordement spectral du donneur en section 2.2.3.2 et présenté notre dispositif de sélection spectrale pour l’imagerie en 2.4.2.4. On montrera en chapitre 5, partie 5.3.3.3, que malgré notre anticipation, le débordement spectral du donneur, aussi faible soit-il, reste un signal polluant du FRET équivalent à l’excitation directe dans notre cas.

102. Dans la suite de ce document, on ne spécifiera donc les ligands utilisés que lorsque nous détaillerons les différences de protocole et résultats dans le processus de fonctionnalisation et microstructuration.

Microstructuration des surfaces

4

Ce chapitre présente le développement ainsi que la caractérisation de la fonctionnalisation et la microstructuration de surfaces de verre, à l'aide de nos QDs, pour l'imagerie NEF.

4.1 FONCTIONNALISATION À GRANDE ÉCHELLE DE LAMELLES DE VERRE

4.1.1 MÉTHODES DE FONCTIONNALISATION EXISTANTES

Dans la littérature, les expressions "fonctionnalisation de surface" ou "adsorption sur surface", dans le contexte des "boîtes quantiques", renvoient majoritairement vers des publications concernant la modification de surface des QDs en suspension colloïdale, assimilables aux démarches d'échanges de ligands que nous avons exposées au chapitre précédent – section 3.3.1 – ou aux procédures d'enrobage *via* une couche de silice par exemple. Ces nombreux travaux de recherche traduisent l'engouement actuel pour ces nanoparticules, autant en biophysique qu'en nanophotonique. Les QDs biofonctionnalisées sont utilisées comme marqueurs pour l'imagerie ou comme agents sensibilisants en thérapie photo-dynamique [237]. Elles sont également employées dans la fabrication de dispositifs opto-électroniques à faible coût, par des méthodes comme l'impression par injection (*inkjet printing*) [238].

Les travaux concernant l'utilisation de boîtes quantiques déposées sur des surfaces sont en comparaison moins nombreux, mais néanmoins variés. La méthode historique consistait généralement en un dépôt par *spin coating* de solutions colloïdales de QDs diluées dans une solution de polymère (PMMA, PEDOT, etc.), ce qui permet d'obtenir une couche mince de densité surfacique contrôlable selon la dilution [192]. Cependant, ce n'est pas la méthode la plus reproductible pour obtenir une parfaite monocouche, si bien que diverses alternatives ont été proposées à partir des années 2000 : épitaxie par jet moléculaire [239]; évaporation [240]; dépôt par couches atomiques [241] ou couches de poly-électrolytes alternés [242]; par contrôle de flux électro-osmotique [243] ou électrophorétique [244]; recuit de fusion [245]; méthode "Sol-Gel" [246]; déposition par laser pulsé [247]; ou encore écriture laser directe par faible absorption de photon unique [248].

Si ces méthodes permettent l'obtention, au choix, de monocouches denses de QDs comme de nanocristaux isolés¹, les boîtes quantiques sont ici généralement piégées dans une matrice. Il est donc impossible par la suite de les biofonctionnaliser². Ainsi, les immobilisations de QDs sur surfaces visant une application en biologie tendent à privilégier des

4.1	Fonctionnalisation à grande échelle de lamelles de verre	81
	Méthodes de fonctionnalisation existantes	
	Nettoyage et activation des surfaces	
	Silanisation de lamelles de verre	
	Adsorption des QDs	
4.2	Microstructuration des QDs	95
	Choix du procédé	
	Photo-lithographie UV avec PRIMO	
	Développement du protocole de microstructuration	
	Résolution et homogénéité des micro-motifs 2D de QDs	
4.3	Conclusions sur la microstructuration des QDs	106

1. Contribuant ainsi à des études approfondies sur des QDs uniques ou à diverses applications électro-optiques.
2. Une alternative étant de préparer des boîtes quantiques piégées dans un matériau hybride adapté [249, 250].

voies de fonctionnalisation reposant sur une simple couche d'accrochage intermédiaire, sur laquelle s'adsorbent les QDs – ce qui les laisse ensuite disponibles à diverses possibilités de bioconjugaison. Cette couche intermédiaire est généralement basée sur des protéines [251, 252] ou bien des espèces chimiques [253] auto-assemblées³, dont les composés de type *silanes* [254-258] sont parmi les plus répandus. Les applications concernées relèvent principalement du domaine des capteurs, et les surfaces ainsi fonctionnalisées ne sont pas nécessairement planes [259]. On notera que ces travaux ne s'attachent généralement pas à produire une caractérisation poussée du processus de fonctionnalisation lui-même, contrairement à ce qui peut être fait dans d'autres champs [260, 261].

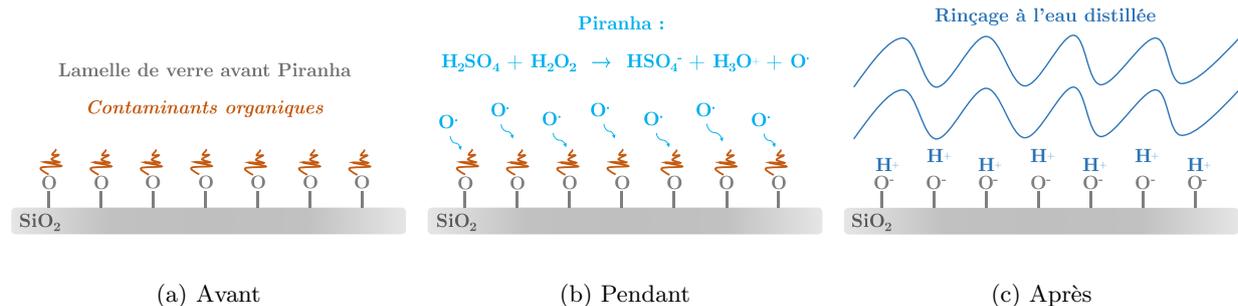
Dans la première partie de ce chapitre, je présenterai la méthode de fonctionnalisation que nous avons retenue, et la caractérisation des surfaces résultantes. L'enjeu de la microstructuration sera abordé dans la seconde partie.

4.1.2 NETTOYAGE ET ACTIVATION DES SURFACES

Les surfaces de verre fonctionnalisées sont des lamelles de verre⁴ de 24×24 mm de côté, et $0,17 \pm 0,01$ mm d'épaisseur. Avant toute autre chose, ces lamelles doivent être nettoyées et activées. Deux procédures ont été retenues dans ce cadre.

4.1.2.1 Mélange Piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$)

Le mélange dit "Piranha" est un moyen classique de nettoyage et d'activation des surfaces, constitué d'un mélange 50-50 d'acide sulfurique⁵ pur et d'eau oxygénée⁶ à 30 %. Ces deux composés réagissent ensemble de manière très exothermique pour former, notamment, des radicaux libres qui vont éliminer les contaminants organiques des surfaces de verre – Éq. (4.1.1) – comme cela est illustré en Figure 4.1. La surface présente (après 30 min à 1 h de traitement) des terminaisons SiOH, la rendant extrêmement hydrophile, au point qu'il n'est pas vraiment possible de mesurer un angle de contact lorsque l'on y dépose une goutte d'eau. Dans de précédents travaux de l'équipe, la rugosité d'une telle surface avait été caractérisée par AFM pour un résultat ≤ 1 nm [72].



3. SAM dans la littérature, pour *Self-Assembled Monlayers*.

4. 41014521, Hecht Assistent.

5. X945.1, Roth.

6. 9683.1, Roth.

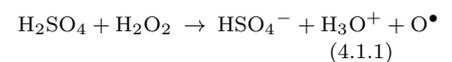


FIGURE 4.1 – Traitement de lamelles de verre au Piranha.

4.1.2.2 Ultrasons dans Éthanol 70 % + Plasma-Air

Une autre méthode permettant d'atteindre des résultats semblables consiste à nettoyer les lamelles de verre dans un bain à ultrason ⁷, pendant 5 min, dans une solution d'éthanol à 70 % pour éliminer les traces de contaminants. Après séchage à l'air comprimé, les lamelles sont ensuite exposées à un plasma-air ⁸ durant 2 min, généralement suffisant pour obtenir une surface très hydrophile – i.e. sans angle de contact mesurable. L'intérêt principal de ce type de méthode réside dans le fait que, par rapport au Piranha, elle présente des avantages tant du point de vue écologique que de la sécurité des personnes réalisant la manipulation.

7. Elmasonic S 10, Elma.

8. PDC-002, Harrick Plasma.

4.1.3 SILANISATION DE LAMELLES DE VERRE

Les silanes sont des monomères basés sur la présence d'un "cœur" de silicium Si, appartenant à la même colonne d'éléments que le carbone C mais d'électronégativité plus faible, donnant ainsi accès à des réactions typiques inaccessibles *via* des composés organiques classiques. Comme présenté dans l'ouvrage de synthèse de G. T. Hermanson [262], la grande réactivité de cette famille d'espèces chimiques et leur capacité à former des liaisons covalentes fait qu'elles sont couramment utilisées pour la réalisation de monocouches auto-organisées solidement liées à des surfaces de verre, de silicium, ou de PDMS ⁹. La structure générale des composés organosilanes est présentée sur la Figure 4.2. Elle comprend un groupe fonctionnel ou réactif, noté R, à l'extrémité d'une chaîne alkyle. À l'autre extrémité de cet espaceur organique, on retrouve des sites de liaison de l'atome de silicium central, auquel sont également attachés jusqu'à trois groupes hydrolysables, notés X. L'intérêt de ce type de dérivés est de favoriser la liaison des QDs à une surface de verre, *via* d'une part, une réaction de couplage des groupes hydrolysables X avec la surface de verre et, d'autre part, l'accroche des QDs au groupe fonctionnel R.

9. Polydiméthylsiloxane.

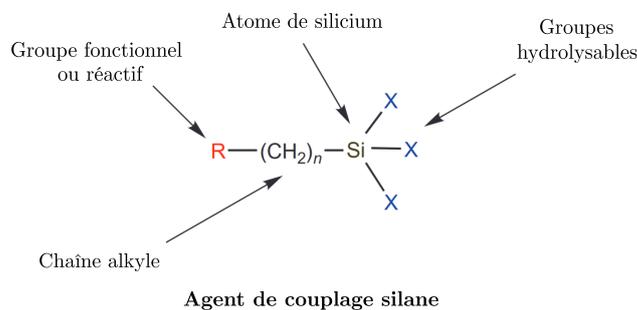


FIGURE 4.2 – Structure générale d'un agent de couplage silane. Adapté de [262].

4.1.3.1 Couplage des groupes hydrolysables des organosilanes

Les silanes les plus courants sont des alcoxysilanes, dont les groupes hydrolysables sont des chaînes carbonées courtes proches de l'éther méthyle ou éthyle ¹⁰ et doivent ainsi subir une hydrolyse préalable

10. Les silanes concernés étant alors respectivement nommés "méthoxysilanes" et "éthoxysilanes".

pour former un intermédiaire réactif appelé silanol, qui se couple ensuite au substrat. Comme décrit par la Figure 4.3, la formation de silanols est suivie d'une condensation à proximité de la surface de verre, qui permet d'assembler les silanes ensemble en une matrice polymère liée par des liaisons $-Si-O-Si-$; puis d'une interaction avec la surface de verre, avec apparition d'un réseau de liaisons hydrogène entre les terminaisons $-OH$ des silanols et les groupements $-OH$ de la surface.

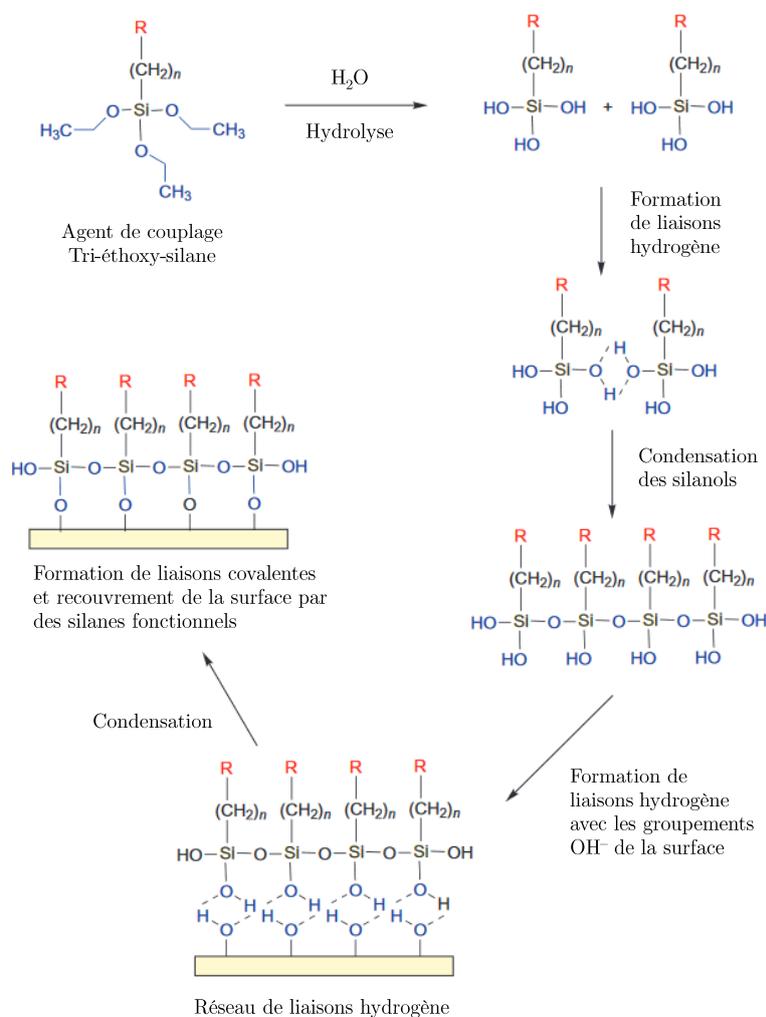


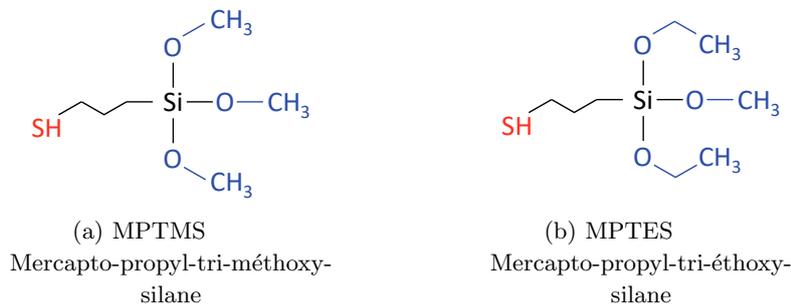
FIGURE 4.3 – Schéma des différentes réactions impliquées dans le couplage d'un organosilane à une surface inorganrique contenant des groupes $-OH$ disponibles, ici avec l'exemple d'un triéthoxysilane. Adapté de [262].

À terme, une seconde réaction de condensation se produit¹¹ et génère un polymère d'organosilane lié à la surface de manière covalente, avec des liaisons siloxane stables. Dans le cadre de la thèse, nous avons essentiellement travaillé avec des méthoxysilanes et éthoxysilanes. Ces derniers sont typiquement non-réactifs sans hydrolyse, tandis que les méthoxysilanes sont plutôt utilisés dans un solvant organique anhydre et forment spontanément des monocouches attachées à la surface de verre par liens siloxanes [262].

11. Il peut être nécessaire de chauffer ou pomper pour éliminer l'eau.

4.1.3.2 Choix de la terminaison fonctionnelle

S'il existe des travaux poussés témoignant de la possibilité de fonctionnaliser une monocouche de QDs avec coquille ZnS relativement dense sur une surface, en utilisant des silanes terminés par un groupe amine¹² [260], notre équipe a choisi dès les travaux de L. Riachy [263] d'utiliser des silanes terminés par un thiol SH : MPTMS et MP TES¹³, dont la structure est présentée en Figure 4.4. Comme cela a déjà été mentionné en partie 3.3.1.3, les thiols forment des ponts disulfure avec le soufre de la couche externe des boîtes quantiques, ce qui permet d'obtenir *in fine* des couches de QDs immobilisées intégralement par des liaisons covalentes.



12. APTMS :
Amino-Propyl-Tri-Méthoxy-Silane
13. Respectivement :
175617-25G, Sigma-Aldrich.
AB 111218, abcr.

FIGURE 4.4 – Structure des silanes MPTMS et MP TES utilisés. Le code couleur reprend celui des Figures 4.2 et 4.3..

Le MPTMS est ainsi utilisé comme couche d'accrochage depuis au moins les années 1990 et encore de nos jours [264-266], pour sa grande réactivité facilitant l'obtention finale de monocouches de nanoparticules (NPs) denses et résistantes, et n'impactant peu ou pas les différentes propriétés électro-optiques des NPs considérées [267, 268].

4.1.3.3 Protocoles de silanisation et caractérisation

Nous avons repris le protocole de silanisation en solution présenté dans l'ouvrage *Bioconjugate Techniques* [262], et testé divers ajustements pour sélectionner le processus le plus simple permettant d'arriver au résultat désiré¹⁴. Après activation au piranha ou au plasma-air des lamelles de verre, ces dernières sont placées en atmosphère neutre¹⁵ et incubées une nuit dans une solution de MPTMS diluée à une concentration entre 2 et 5 % dans du toluène anhydre¹⁶. On rince ensuite les échantillons dans un bain de toluène anhydre soumis aux ultrasons pendant 10 à 20 s, de manière à éliminer les silanes non liés de façon covalente à la surface.

Dans le cas des MP TES, l'incubation et le rinçage se fait dans les mêmes gammes de concentration. Le solvant utilisé est un mélange éthanol + eau distillée à 95 + 5 %, dont le pH est ajusté entre 4,5 et 5,5 avec de l'acide acétique. Il est recommandé de laisser se produire l'hydrolyse des MP TES durant au moins 5 min avant d'incuber les lamelles à fonctionnaliser. Hormis ces 2 variations, les étapes du protocole sont conservées à l'identique. Avant caractérisation par angle de contact, les surfaces silanisées obtenues sont ensuite soumises à un séchage dans une pompe à vide, ou dans une étuve – 30 min à 110°C.

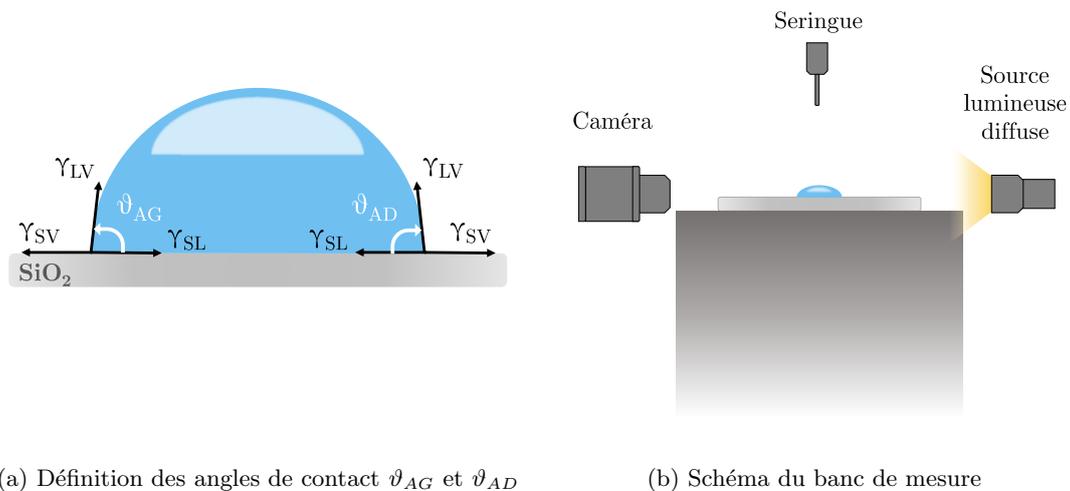
14. Une monocouche dense de QDs sur une surface de verre.
15. *Via* une boîte à gants sous argon, disposant de pièges à eau et oxygène.
16. 244511-2L, Sigma-Aldrich.

(a) Caractérisation par mesure d'angle de contact

Le principe de cette caractérisation est schématisé en Figure 4.5. L'étalement d'une goutte sur une surface dépend des 3 tensions d'interfaces : γ_{SV} , γ_{SL} , et γ_{LV} – notations qui représentent respectivement les tensions de surface pour les interfaces solide-vapeur, solide-liquide, et liquide-vapeur. L'angle de contact ϑ_A à l'équilibre représenté sur la Figure 4.5 (a) est donné par la relation de Young – Éq. (4.1.2) – et permet alors d'évaluer la *mouillabilité* de la surface. Une surface hydrophile ou hydrophobe se caractérise ainsi par un petit ou grand angle de contact¹⁷. Après rinçage et séchage, elles sont amenées sur un banc de caractérisation permettant d'observer le profil des gouttes – Figure 4.5 (b). À l'aide d'une seringue, montée sur un pousse-seringue, on dépose une goutte d'eau distillée de 1 μL sur la lamelle. Une source de lumière diffuse permet d'acquérir, à l'aide d'une caméra à l'opposé du banc, une image contrastée du profil de la goutte à partir de laquelle on peut estimer les valeurs d'angle de contact. La silanisation rendant la surface hydrophobe¹⁸, cette méthode est une façon rapide d'évaluer l'efficacité du dépôt, par comparaison avec une surface nettoyée et activée par piranha ou plasma-air.

$$\cos \vartheta_A = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (4.1.2)$$

17. Entre 0 et 180°, on a :
 0-30° : très hydrophile à modérément hydrophile.
 30-90° : modérément hydrophobe à hydrophobe.
 90-150° : hydrophobe à très hydrophobe
 150-180° : super-hydrophobe
18. Comme indiqué en partie 4.1.2.1, les lamelles après nettoyage / activation sont extrêmement hydrophiles : $\vartheta_{A0} \approx 0^\circ$ sert alors de référence.



L'opération est répétée à plusieurs endroits de la lamelle pour évaluer l'homogénéité de la silanisation. Les résultats sont représentés *via* un graphe dit "boîte à moustaches" (*boxplot*), dont le principe est illustré sur la Figure 4.6. Cela permet de fournir une représentation rapide de la distribution des données. La largeur de la boîte n'a aucune signification et est simplement fonction de l'espacement choisi pour les points représentant des données de valeurs identiques. Sur les lamelles de verre utilisées pour ces caractérisations, il a été possible de déposer jusqu'à 26 gouttes sur une même lamelle. Certains résultats présentés dans les sections suivantes sont composés de distributions de plus de 26 points : ils sont obtenus par l'agrégation des données de plusieurs lamelles.

FIGURE 4.5 – Principe de la caractérisation par mesure d'angles de contact.

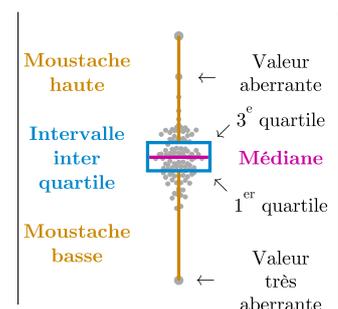


FIGURE 4.6 – Aide pour l'interprétation d'une figure type "boîte à moustaches".

(b) *Reproductibilité*

Cette compilation de données ne vaut que si l'on peut montrer que le protocole est reproductible. Les résultats de notre expérience de vérification de cette reproductibilité sont présentés sur la Figure 4.7. Dans cette expérience, les lamelles de verre ont toutes été silanisées *via* une solution MPTMS diluée à 5 %. On constate qu'il peut y avoir une légère baisse de la qualité de la silanisation au cours du temps, traduite par une diminution de l'angle de contact moyen et une hausse de l'écart-type : $71,7 \pm 2,0^\circ$ en agrégeant les 2 premières caractérisations et $65,4 \pm 3,8^\circ$ pour les 2 suivantes. On reste malgré tout sur des valeurs bien supérieures à la référence avant silanisation de $\vartheta_{A0} \approx 0$.

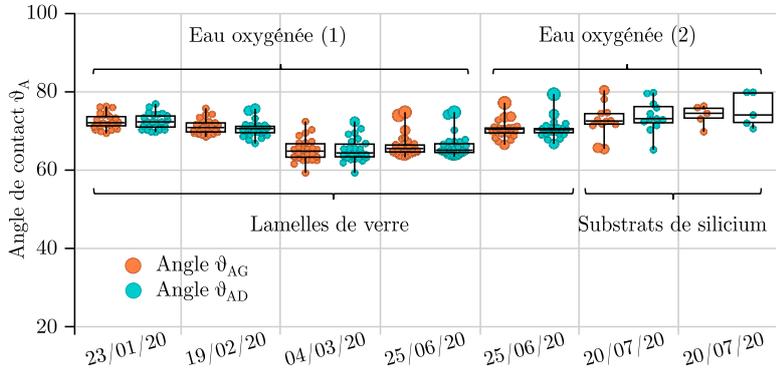


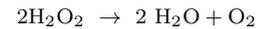
FIGURE 4.7 – Reproductibilité de la silanisation des surfaces. Les angles ϑ_{AG} et ϑ_{AD} désignent respectivement l'angle de contact mesuré à gauche du profil de la goutte et l'angle de contact mesuré à droite.

Cette modification au cours du temps s'explique tout simplement par la baisse d'efficacité de l'étape de nettoyage et activation, causée par le vieillissement¹⁹ de l'eau oxygénée (1) utilisée pour le mélange piranha. Ainsi, l'utilisation d'une nouvelle bouteille (2), permet de retrouver des distributions de mesures semblables aux caractérisations initiales, avec un angle de contact agrégé de $70,5 \pm 2,4^\circ$. On confirme de plus que notre méthode fonctionne aussi bien pour des lamelles de verre borosilicate que des substrats de silicium pur²⁰. Il faut toutefois remarquer qu'en raison de la taille bien plus réduite des échantillons Si, le nombre de mesures est limité à 5 ou 6 points par échantillon.

(c) *Comparaison des méthodes de séchage*

Comme le montre la Figure 4.8, notre méthode de caractérisation n'a pas permis de mettre en évidence une variation significative de la valeur moyenne des angles de contact entre les surfaces traitées par pompe à vide ou à l'étuve²¹. Cependant l'homogénéité est meilleure lorsque l'on pompe sous ultra-vide : les valeurs d'angle de contact agrégé valent respectivement $73,8 \pm 3,9^\circ$ après dégazage à la pompe, et $74,8 \pm 5,3^\circ$ après séchage à l'étuve. Cela peut s'expliquer par le fait que l'étuve utilisée est commune au laboratoire, et que son utilisation a plus de probabilité d'entraîner des contaminations – même si cela reste peu prononcé.

19. Une fois la bouteille ouverte, la concentration de l'eau oxygénée diminue car cette dernière se dismute, selon l'équation :



20. Que nous avons utilisées pour nos premiers tests d'images MEB des surfaces de QDs, l'imagerie MEB sur lamelles de verre n'étant pas aisée.

21. Les lamelles de verre ont toutes été nettoyées par le même mélange piranha, et silanisées *via* la même solution MPTMS, de nouveau à 5 %.

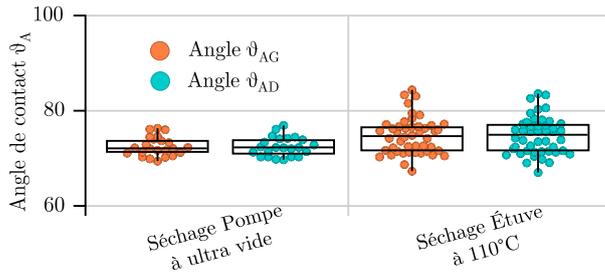
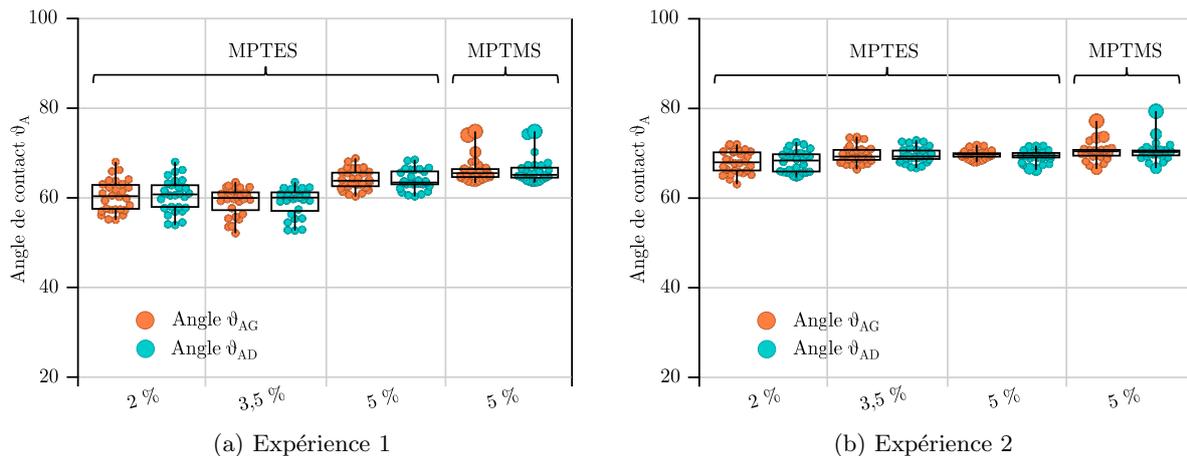


FIGURE 4.8 – Comparaison entre les méthodes de séchage *via* pompe ou étuve. Les angles ϑ_{AG} et ϑ_{AD} désignent respectivement l'angle de contact mesuré à gauche du profil de la goutte et l'angle de contact mesuré à droite.

(d) *Comparaison MPTMS / MPTES*

Enfin, nous avons comparé les angles de contact obtenus entre les silanisations MPTMS et MPTES. Conformément aux stratégies de silanisation exposées en [262], nous avons caractérisé l'utilisation de MPTES à différentes concentrations comprises dans l'intervalle 2-5 %, avec comme référence notre silanisation MPTMS par incubation à 5 %. Les résultats de l'expérience 1, rapportés en Figure 4.9 (a), semblent suggérer que les surfaces MPTES sont moins hydrophobes que leurs homologues MPTMS pour les incubations à concentration faible²², l'angle de contact moyen du MPTES à 2 % valant $59,2 \pm 3,1^\circ$, contre $66,2 \pm 2,9^\circ$ pour le MPTMS à 5 %. Cela est cependant réfuté lors d'une 2^e expérience – cf. Figure 4.9 (b) – où des résultats très similaires ont été obtenus : $68,1 \pm 2,5^\circ$ contre $70,5 \pm 2,3^\circ$. Dans l'expérience n°2, les lamelles MPTES ont cette fois-ci été caractérisées en premier. Le banc de mesure d'angles de contact étant situé hors des salles blanches où sont réalisées les étapes de fonctionnalisation, on peut supposer que la silanisation MPTES, sur l'ensemble de l'intervalle 2-5 %, est en réalité autant efficace que la silanisation MPTMS à 5 %, mais qu'elle se dégrade plus rapidement.

22. Ce qui traduirait une moindre densité de la fonctionnalisation.



Nous avons donc vérifié l'efficacité et la fiabilité de notre étape de silanisation, pour 2 types de silanes différents. Au cours de la suite du projet doctoral, nous avons finalement privilégié les MPTMS pour leur compatibilité avec notre protocole de microstructuration – voir section 4.2.3.3. L'expression "lamelles silanisées" désignera ainsi par la

FIGURE 4.9 – Comparaison entre les silanes sur leurs domaines respectifs de concentrations d'incubation.

suite "lamelles fonctionnalisées avec des MPTMS". Nous avons aussi baissé la concentration d'incubation des MPTMS à 2 % sans que cela n'influence les surfaces de QDs résultantes, mais nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion de contrôler cela par mesure d'angles de contact en raison de l'indisponibilité du banc de mesure, en réparation.

4.1.4 ADSORPTION DES QDS

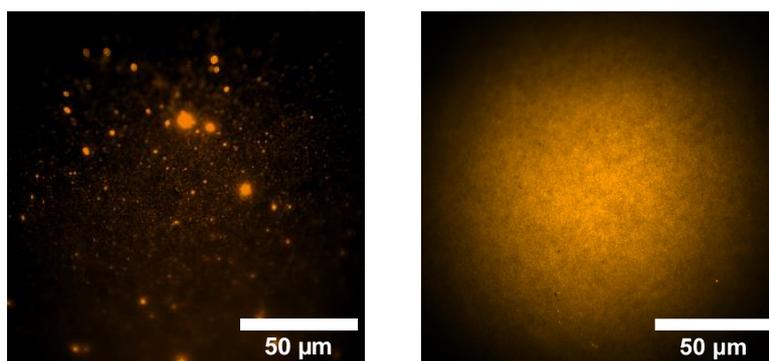
Pour adsorber les boîtes quantiques sur les lamelles silanisées, ces dernières ne sont pas séchées mais directement ré-incubées après le rinçage dans une solution de toluène anhydre accompagné d'ultrasons. La concentration de la solution de QDs utilisée pour cette nouvelle incubation vaut environ 1 μM , ce qui permet d'affaiblir l'effet de stabilisation des ligands de surface, sans pour autant produire une agrégation rapide de la solution colloïdale. Dans le cas des QDs[*TOP*], la solution diluée est filtrée avant incubation à l'aide d'un filtre en PTFE²³ dont la porosité vaut 20 nm, afin d'éliminer tout agrégat éventuel. L'incubation doit durer environ 24 h, puis est rincée au toluène anhydre. Pour les QDs[*MPA*], 15 à 20 min d'incubation suffisent, et le rinçage se fait à l'eau distillée. Cependant, le meilleur filtre compatible avec des solutions aqueuses²⁴ à notre disposition permettait de filtrer jusqu'à 200 nm seulement. Il était donc inutile de l'utiliser.

23. Anotop 10 Plus, Whatman.
GE Healthcare Life Sciences.
WHA68093002, Sigma-Aldrich.

24. À base de polyfluorure de vinylidène (PVDF).

4.1.4.1 Nécessité du changement de ligands

Obtenir une adsorption efficace nécessite que les boîtes quantiques colloïdales utilisées disposent de ligands de surface adaptés. Comme cela a été exposé en partie 3.3, les QDs après synthèse sont stabilisées *via* de l'acide oléique OA. Les longues chaînes carbonées de ce genre ne permettent pas le dépôt d'une monocouche homogène de nanocristaux sur les silanes, comme le montre la Figure 4.10 (a).



(a) Ligands OA

(b) Ligands TOP ou MPA

FIGURE 4.10 – Images TIRF des surfaces obtenues, avec QDs[OA] et après échange de ligands avec des QDs[*TOP*] ou QDs[*MPA*]. Couleurs artificielles.

En milieu organique, il convient donc de préalablement réaliser l'échange de ligands OA(Héxane) \rightarrow TOP(Toluène)²⁵, ce qui permet d'obtenir des surfaces présentant une monocouche dense et homogène, comme l'illustre la Figure 4.10 (b). Dans le cas de solutions colloïdales aqueuses, le ligand DHLA-SB²⁶ stabilisait tellement bien

25. Voir parties 3.3.1.2 et 3.3.2.1

26. Voir présentation en 3.3.1.3

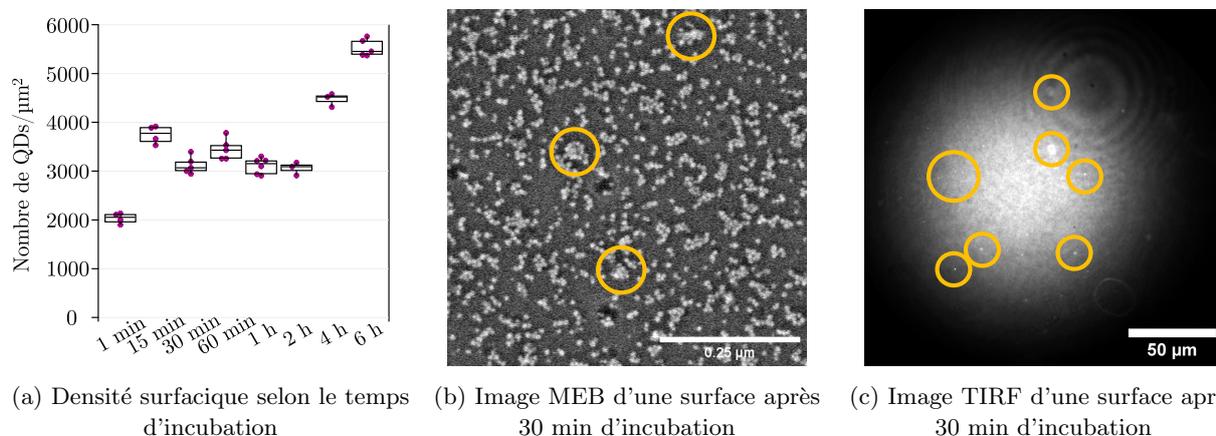
les QDs qu'il ne nous était pas possible de fixer les boites quantiques sur la surface de verre, ainsi avons nous privilégié l'échange de ligands OA(Héxane) \rightarrow MPA(Eau+NaHCO₃)²⁷. Nous allons maintenant pouvoir discuter des caractéristiques des surfaces ainsi obtenues, en comparant les résultats obtenus avec les QDs[TOP] et QDs[MPA].

4.1.4.2 Caractérisation des lamelles homogènes QDs[TOP] / QDs[MPA]

(a) Densité surfacique de QDs et homogénéité

L'évaluation de la densité surfacique des boites quantiques sur nos surfaces est faite à partir d'images MEB²⁸. Je remercie à ce titre Jérémie Béal pour le temps passé avec moi à réaliser ces images. Les valeurs présentées sont obtenues à partir d'un décompte manuel des QDs sur 3 à 5 images différentes²⁹, enregistrées sur une même lamelle. Nous avons en effet réalisé cette caractérisation conjointement avec une caractérisation TIRF, ce qui imposait d'utiliser des lamelles de verre, sur lesquelles le contraste n'était généralement pas suffisant pour que les décomptes issus d'algorithmes de traitement d'images soient fiables.

Les QDs[TOP] présentent une dynamique d'adsorption très lente : il faut au moins 24 h pour atteindre une densité surfacique de l'ordre de 3000 QDs/ μm^2 . À l'inverse, les QDs[MPA] atteignent une densité surfacique de 2000 QDs/ μm^2 en 1 min seulement, qui peut monter jusqu'à plus de 5000 QDs/ μm^2 au bout de 6 h d'incubation³⁰ – cf. Figure 4.11 (a). Cependant, nous avons pu constater, en imagerie TIRF comme au MEB, une organisation préférentielle des QDs sous la forme d'oligomères³¹, favorisant la formation de complexes 3D dans le cas d'une incubation de QDs[MPA] au-delà de 30 min. Cela crée une rupture dans l'homogénéité de nos surfaces, comme cela est illustré en Figure 4.11 (b) et (c). Nous avons donc dû nous limiter à des temps d'incubation de 15 à 20 min, ce qui correspond au début d'un plateau de densités surfaciques entre 3000 et 4000 QDs/ μm^2 sur l'intervalle de temps d'incubation 15 min à 2 h.



Les cercles jaunes mettent en évidence les complexes 3D de QDs qui apparaissent à partir de 30 min d'incubation.

27. Voir parties 3.3.1.4 et 3.3.2.3

28. MEB à effet de champ. SU 8030 FEG-SEM, Hitachi.

29. Pour des grandissement différents.

30. La taille de nos QDs synthétisés valant 10 nm environ, les différentes densités surfaciques mentionnées correspondent respectivement à des taux de remplissage d'environ 30 ; 20 ; et 50 %.

31. Constat valable aussi bien pour les QDs[TOP] que les QDs[MPA].

FIGURE 4.11 – Influence du temps d'incubation sur la densité surfacique des QDs[MPA].

Concernant la caractérisation de l'homogénéité des surfaces, la méthode employée est la suivante : sur chaque image TIRF, on extrait les valeurs des pixels issus de la zone centrale, sur un carré de grande envergure pouvant aller jusqu'à 30×30 ou $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. À partir de ces données, il est possible de calculer la valeur moyenne $\langle I \rangle$ et l'écart-type σ_I du signal de photoluminescence enregistré. L'écart-type σ_I peut être normalisé par rapport à la valeur moyenne, et exprimé en pourcentages – Éq. (4.1.3). Cette grandeur, notée σ_N , permet ainsi d'évaluer l'homogénéité du signal de photoluminescence sur une image. Enfin, pour caractériser l'homogénéité des surfaces à l'échelle d'une lamelle entière, on enregistre 10 images à différents points de la lamelle. Cela permet de calculer la grandeur σ_{NL} – Éq. (4.1.4) – à partir de la moyenne $M_{\langle I \rangle}$ des valeurs de $\langle I \rangle$, et de l'écart-type $\sigma_{\langle I \rangle}$. La Figure 4.12 illustre, pour une lamelle, les acquisitions d'images nécessaires à l'obtention de ces différentes grandeurs.

$$\sigma_N = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} \quad (4.1.3)$$

$$\sigma_{NL} = \frac{\sigma_{\langle I \rangle}}{M_{\langle I \rangle}} \quad (4.1.4)$$

J'ai tout d'abord quantifié l'éventuel effet de la taille de la surface d'analyse. À partir de 10 images sélectionnées aléatoirement, la Figure 4.13 (a) permet d'estimer que ce biais issu d'aires d'extraction différentes se situe dans un intervalle de 1 à 2 % pour une variation de $10 \mu\text{m}$ de côté de la surface d'analyse. La caractérisation de l'irradiance laser du montage – section 2.4.2.1 – nous permet d'attribuer cette légère variation au profil gaussien de l'illumination. Pour réaliser une évaluation comparative des surfaces que l'on peut obtenir *via* des QDs[TOP] ou QDs[MPA], on agrège les valeurs de σ_N extraites de 60 à 70 images, réalisées sur un peu moins d'une dizaine de lamelles pour chaque configuration. Les distributions résultantes sont récapitulées en Figure 4.13 (b). On peut constater que les lamelles obtenues à partir de QDs[MPA] tendent à être légèrement plus homogènes, i.e. de valeurs σ_N plus faibles, et ce malgré le biais de surestimation lié à l'aire d'extraction de pixels plus grande. Les valeurs aberrantes sont associées à la présence d'un complexe 3D de QDs sur l'image concernée. Dans les 2 situations, nous obtenons des surfaces dont le signal présente une variabilité locale majoritairement comprise dans l'intervalle 6-12 %.

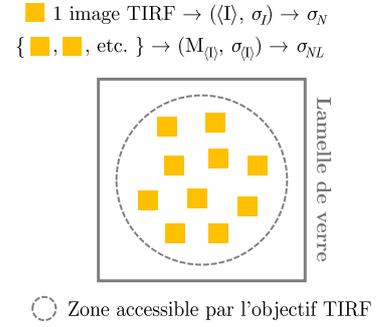


FIGURE 4.12 – Schéma du processus d'obtention des grandeurs σ_N et σ_{NL} .

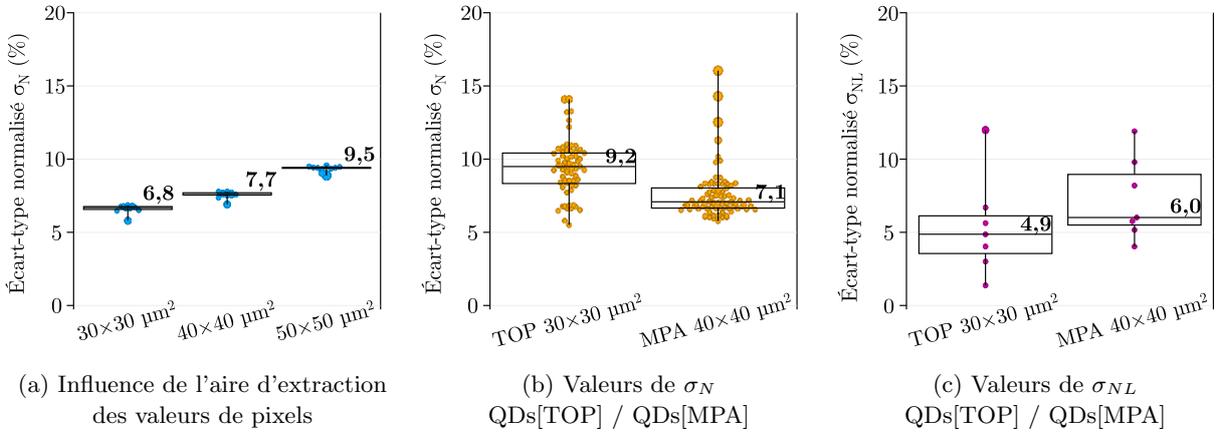


FIGURE 4.13 – Caractérisation de l'homogénéité des surfaces de QDs par imagerie TIRF.

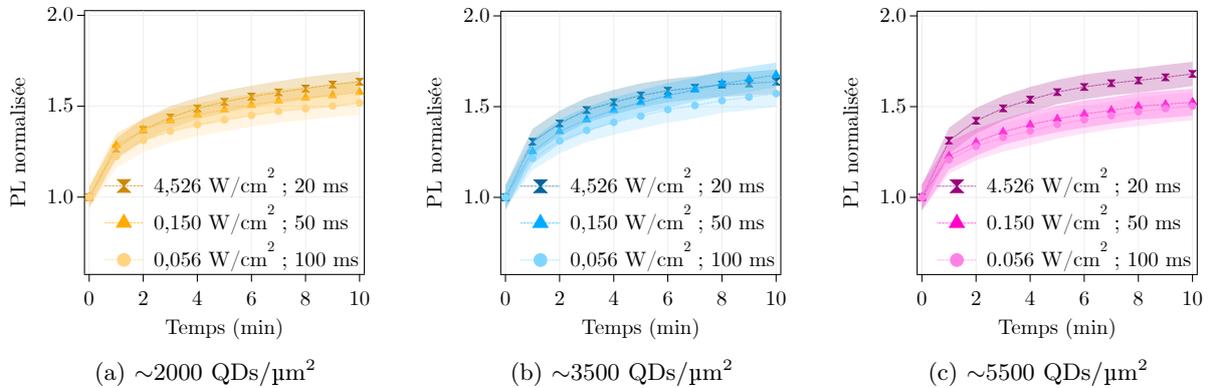
La Figure 4.13 (c) propose une comparaison des valeurs moyennes de σ_{NL} obtenues pour les lamelles de QDs[TOP] et QDs[MPA] étudiées. La grandeur σ_{NL} est très synthétique, ce qui limite le nombre de points. On peut néanmoins constater que l'on a, à l'échelle de lamelles entières, une variation entre 4 à 9 %. L'ensemble de ces données permet donc de démontrer une bonne homogénéité du signal de photoluminescence, que ce soit à l'échelle locale d'une aire d'acquisition qu'à l'échelle globale d'une surface millimétrique. Ces résultats montrent aussi une bonne homogénéité entre des lamelles différentes. Tout cela démontre la robustesse de notre méthode de fonctionnalisation.

(b) *Dynamique temporelle de la photoluminescence des surfaces*

Une propriété photo-physique étonnante des boîtes quantiques consiste en leur photo-activation progressive, comme présenté au début du chapitre précédent³². Ce phénomène est très marqué sur nos surfaces de QDs, et nous avons donc pris soin de le caractériser *via* des images TIRF acquises périodiquement, toutes les minutes, sous une illumination continue durant 10 min, et cela à divers niveaux d'irradiance. La Figure 4.14 récapitule les dynamiques de photoluminescence des lamelles QDs[MPA] étudiées précédemment, dans le cas d'une interface verre/air. Le niveau de photoluminescence³³ est normalisé par l'image acquise à $t = 0$. On peut constater que ni la densité surfacique ni l'irradiance laser ne semblent influencer l'évolution de la photo-activation.

32. Voir section 3.1.2.3.

33. Les points représentent les valeurs moyennes $\langle I \rangle$ du signal sur l'aire extraite d'une image TIRF, et l'enveloppe à l'écart-type σ_I correspondant.



Différentes densités surfaciques de QDs, à une interface verre-air, pour plusieurs niveaux d'irradiance laser à 458 nm.

Si l'on choisit cette fois de faire varier la nature du milieu qui recouvre la surface et/ou la nature des ligands des QDs, on peut alors observer des dynamiques très variées. La Figure 4.15 montre l'effet du changement de milieu pour différentes irradiances d'illuminations. Chaque courbe est construite de la même manière que précédemment. L'ajout d'eau distillée par rapport au cas verre/air produit un photo-blanchiment précoce après une courte période de photo-activation, d'autant plus prononcé que l'irradiance laser est importante. Remplacer l'eau distillée par une solution de tampon Hepes à pH basique³⁴ permet d'atténuer légèrement cette photo-dégradation, sans pour autant modifier significativement la dynamique observée.

FIGURE 4.14 – Évolution temporelle de la photoluminescence des surfaces de QDs[MPA] sous illumination continue.

34. Hepes 10 mM, NaCl 200 mM, pH = 8 ajusté *via* l'ajout de NaOH.

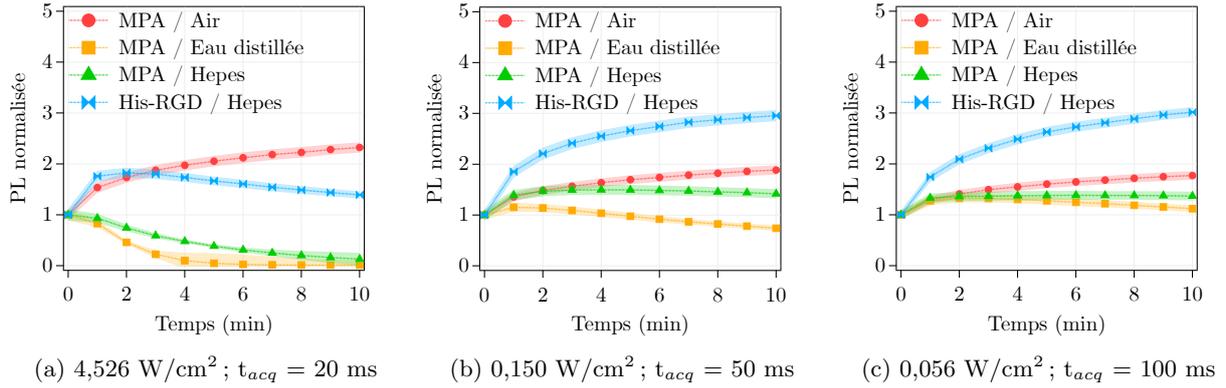
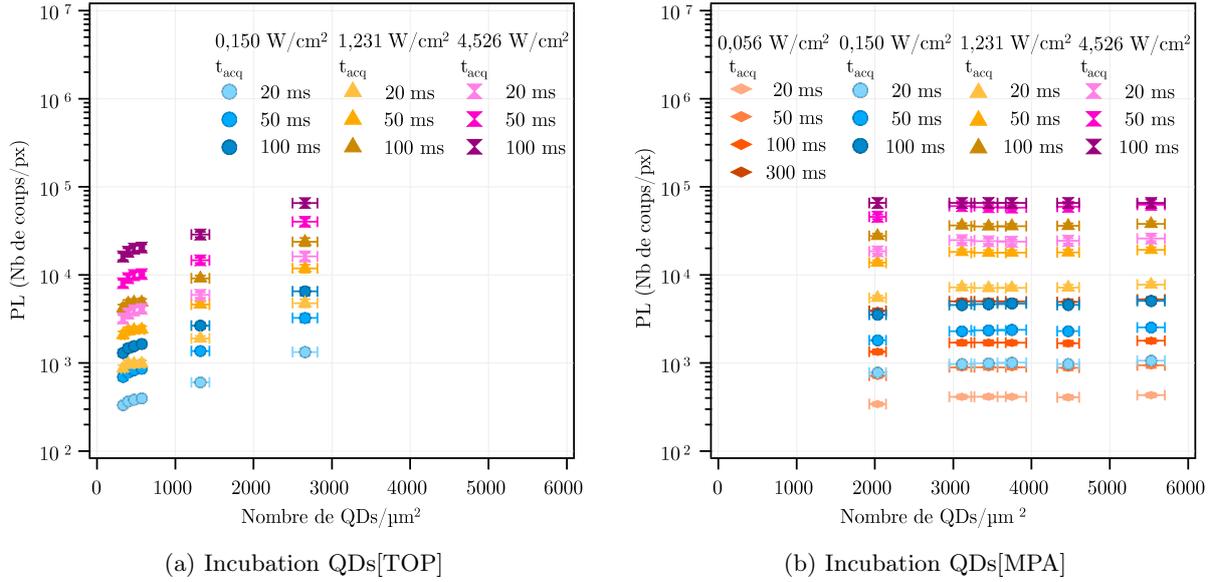


FIGURE 4.15 – Évolution temporelle de la photoluminescence des surfaces de QDs sous illumination continue, pour différents milieux, ligands et irradiances.

Pour une irradiance supérieure à 1 W/cm², on observe une photo-dégradation notable de la photoluminescence. Il est possible de restabiliser les boîtes quantiques avec des ligands de surface plus adaptés. En l'occurrence, nous avons utilisé le ligand de biofonctionnalisation His-RGD que nous présentons avec son protocole d'utilisation dans le chapitre 5, section 5.1.2.1. Lorsque les QDs sont stabilisées par ce ligand, on constate une nette amélioration de la photo-stabilité et même une amplification de la photoluminescence. Le photo-blanchiment est quant à lui réduit au domaine des fortes irradiances d'illumination (> 1 W/cm²) et absent en-dessous.

(c) Relation entre luminescence et densité surfacique

Dans le cadre des études FRET, il est souvent utile d'estimer la stœchiométrie donneur-accepteur. Pour notre méthode d'imagerie NEF, il faut donc pouvoir évaluer la densité surfacique de boîtes quantiques pour chaque échantillon. Passer systématiquement par de l'imagerie MEB n'est ici pas envisageable pour des raisons de temps. Ainsi, nous avons réalisé une calibration, par comparaison entre la luminescence obtenue en TIRF – pour l'interface verre/air, avant toute biofonctionnalisation ou passivation de surface – et la densité surfacique mesurée à partir d'images MEB. La Figure 4.16 présente les résultats ainsi obtenus avec les incubations à base de QDs[*TOP*] et QDs[*MPA*], qui permettent de couvrir des intervalles de densité surfacique différents. Les valeurs de photo-luminescence représentent le signal moyen extrait de l'aire centrale 50×50 μm² des images TIRF obtenues à différentes irradiances laser et temps d'acquisition. La barre d'erreur correspondante représente l'écart-type de la distribution de valeurs de pixels pour l'aire considérée. De manière à limiter le biais lié à la photo-activation présenté dans la partie précédente, l'acquisition des images associées à une lamelle est précédée de 10 min d'illumination continue. Les valeurs de densité surfacique sont issues d'images MEB réalisées après caractérisation TIRF. La Figure 4.16 montre qu'il semble possible d'utiliser la photo-luminescence des surfaces pour discriminer relativement finement la densité surfacique des QDs, lorsque cette dernière est plutôt faible, i.e. < 3000 QDs/μm².



Cette méthode se révèle moins fiable pour les densités surfaciques élevées avec lesquelles nous travaillons, i.e. > 3000 QDs/ μm^2 . Il est d'ailleurs possible de mettre en évidence un phénomène de saturation de la photoluminescence en fonction de la concentration de boîtes quantiques en agrégeant et interpolant les données issues des incubations QDs[TOP] et QDs[MPA], comme cela est fait en Figure 4.17. Cette saturation est liée à la présence de plus en plus importante d'oligomères, voire d'agrégats de QDs sur la surface – Figure 4.11 (b). Au sein de ces structures, le *self-quenching* augmente avec le nombre de QDs, limitant ainsi l'augmentation de la photoluminescence générée lors de l'adsorption de QDs supplémentaires. Autrement dit, au-delà d'un certain seuil de concentration, le nombre de QDs "actifs"³⁵ à l'intérieur d'un *spot* limité par diffraction (de diamètre $\sim 0,25 \mu\text{m}^2$) est limité, et vaut ~ 150 QDs, ce qui est équivalent à ~ 30 QDs/px.

FIGURE 4.16 – Niveaux de photo-luminescence en fonction de la densité surfacique pour les QDs[TOP] et QDs[MPA].

35. Susceptibles d'émettre simultanément des photons de luminescence.

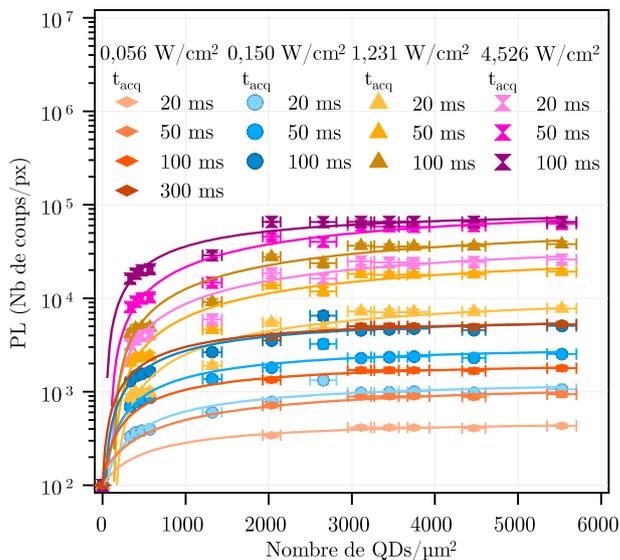


FIGURE 4.17 – Agrégation des données des Figures 4.16 (a) et (b). Ajustement par une fonction de saturation type Éq. (4.1.6); où y_0 , a , et x_s sont 3 paramètres ajustables.

$$y = y_0 + a \frac{x}{1 + \frac{x}{x_s}} \quad (4.1.6)$$

La Figure 4.17 montre également que l'on peut ajuster l'irradiance laser et le temps d'acquisition de manière à optimiser finement la configuration d'imagerie selon les priorités d'une expérience donnée : suivi au temps long à irradiance la plus faible possible, ou au contraire grande vitesse d'acquisition pour enregistrer un grand nombre d'images successives³⁶. L'exemple le plus parlant, à cet égard, est la proximité des courbes obtenues pour les réglages (0,056 W/cm², 300 ms), (0,150 W/cm², 100 ms), et (1,231 W/cm², 20 ms), qui permettent tout trois d'atteindre un signal moyen ≥ 3000 coups/pixel, soit déjà 30 fois la valeur du bruit d'obscurité de la caméra.

36. Ce qui est nécessaire pour de l'imagerie super-résolue, comme on le verra au chapitre 6, section 6.3.2.

4.2 MICROSTRUCTURATION DES QDs

La pertinence des différentes voies de fonctionnalisation actée, la seconde partie de ce chapitre vise à montrer leur compatibilité avec l'exigence de microstructuration, que l'on a présentée dans notre premier chapitre.

4.2.1 CHOIX DU PROCÉDÉ

4.2.1.1 Méthodes de microstructuration existantes

Le champ des nanosciences a conduit, ces 20 dernières années, à la mise au point de diverses techniques de fabrication et structuration des substrats. Concernant la microstructuration des boîtes quantiques, cette diversité a largement été mise à profit, principalement poussée par les activités de recherche et développement des QLEDs³⁷. Les méthodes dominantes sont l'impression par injection [238, 269-273]; l'impression par transfert, par contact [274-278]; la photolithographie "directe" [279-283] où les QDs sont employées au sein d'un mélange photosensible; ou la photolithographie "indirecte", en au moins 2 étapes [284-287], où les QDs sont utilisées de façon indépendante. Il existe aussi des techniques plus exotiques, comme l'utilisation de chambres de microfluidique croisées [251]; le moulage/démoulage à partir d'un substrat préalablement structuré [288]; le brossage direct au pinceau à commande numérique [289]; ou la photostructuration assistée par FRET [290]. Lorsqu'une précision sub-micronique est nécessaire, la lithographie à faisceau d'électron (EBL) est une méthode éprouvée et donc souvent mise à profit [291-297]. Il existe toute une combinaison de ces méthodes de microstructuration avec les méthodes de fonctionnalisation décrites en section 4.1.1. Sauf exceptions³⁸, il ne s'agit généralement pas de micro-structurer des monocouches; et, même dans ces exemples, les boîtes quantiques ne sont pas nécessairement disponibles pour une bioconjugaison.

37. LEDs à base de QDs. LEDs : *light emitting diodes*, soit diodes électroluminescentes.

38. Représentées par les travaux présentés dans les références [276, 284, 286, 296].

4.2.1.2 Méthode envisagée

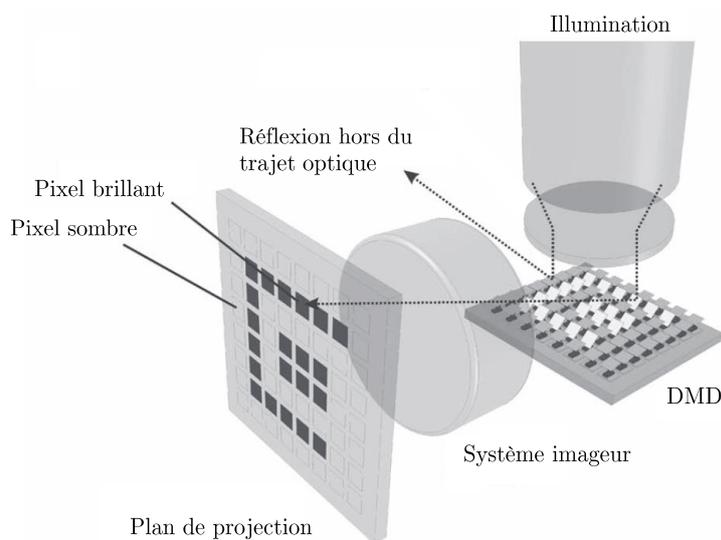
Sur la base de la fonctionnalisation présentée dans la thèse de L. Riachy [263] m'ayant précédé, et de nos propres résultats caractérisés en détail dans la première partie de ce chapitre, nous avons donc privilégié

la méthode de photolithographie "indirecte", *via* une microstructuration *top-down* avant fonctionnalisation, à l'aide d'une résine photosensible. L'avantage de cette méthode est qu'après microstructuration, les zones où la résine est éliminée permet de réaliser notre fonctionnalisation à grande échelle. À ce titre, le travail de Na *et al.* [285] en 2008 est à reconnaître comme précurseur. Cependant, l'absence d'optimisation de chacune des étapes de réalisation avait logiquement conduit à des résultats relativement décevants³⁹. Outre la mise à profit d'une méthode de fonctionnalisation optimisée, permise par notre maîtrise de bout en bout des étapes de fabrication, l'apport de ce travail, exposé dans les sections suivantes, réside aussi dans son originalité : la réalisation de la photolithographie à l'aide d'un dispositif numérique à micro-miroirs (DMD)⁴⁰.

4.2.2 PHOTO-LITHOGRAPHIE UV AVEC PRIMO

4.2.2.1 Principe des dispositifs numériques à micro-miroirs

Les objets appelés "dispositifs numériques à micro-miroirs"⁴¹, communément utilisés dans les vidéo-projecteurs, reposent sur l'agencement matriciel de plusieurs centaines de milliers de miroirs déformables de taille micrométrique et individuellement contrôlables. Par exemple, ces derniers peuvent permettre de projeter sur un plan n'importe quelle image numérique, en commutant les différents miroirs en position *on* ou *off* de manière à inclure ou exclure du chemin optique telle ou telle partie du faisceau d'illumination – Figure 4.18. Faire alterner, à haute vitesse, les miroirs entre leur position *on/off* permet de plus d'obtenir différents niveaux d'intensité lumineuse.



39. Il est même difficile de parler de "micro-motifs" pour les qualifier.

40. *Digital Micromirror Device*.

41. Ou, parfois, "matrices à micro-miroirs".

FIGURE 4.18 – Schéma du principe d'un dispositif optique utilisant un DMD pour projeter une image sur un plan. Adapté de [298].

Les DMD sont donc des systèmes intéressants pour la lithographie : plus besoin de masques en chrome coûteux, au profit d'un *design* rapide du motif à l'aide d'un logiciel de dessin⁴². L'introduction de ces

42. Comme Inkscape, logiciel libre et *open source*.

dispositifs dans le champ de la photo-lithographie semble dater de la fin des années 2000. À la suite de quelques travaux précurseurs, Zhao *et al.* [299] en 2009 et Kattipparambil Rajan *et al.* [300] en 2010 démontraient la possibilité de créer à la volée des motifs sur résines photo-sensibles, avec une précision de 10 à 20 μm , à partir de montages rudimentaires maison, mis au point à partir de DMD commerciaux de l'époque. Parallèlement, Chen *et al.* relevaient en 2009 la pertinence d'employer un DMD pour microstructurer des protéines⁴³ sur une surface en activant des fonctions thiols par irradiation UV [301]; pertinence qui sera confirmée en 2012 par Waldbaur *et al.* [298] sur un montage optimisé permettant d'atteindre une résolution de 2,5 μm . Dans un contexte d'engouement pour les méthodes de *micropatterning* cellulaire [7], ces avancées ont généré une demande de mise au point d'un outil "clé-en main"⁴⁴ dont le dispositif PRIMO est un représentant-type.

4.2.2.2 Système optique PRIMO

Commercialisé par la société française Alvéole, le système PRIMO a fait l'objet d'une publication de démonstration par Strale *et al.* [302] fin 2015. Le principe d'illumination de ce système est présenté Figure 4.19. L'émission cohérente du laser UV passe à travers un diffuseur rotatif RD, de manière à minimiser le phénomène de *speckle*. Le faisceau collimaté arrive ensuite sur le dispositif numérique à micro-miroirs DMD. Les images sont projetées à l'aide d'un système imageur dont le dernier élément est un objectif de microscope $\times 10$ ou $\times 20$. L'ensemble est piloté grâce au logiciel dédié "Leonardo" d'Alvéole, qui prend en entrée des images de dimension 1824×1140 px codées en 8 bits, soit 256 niveaux de gris.

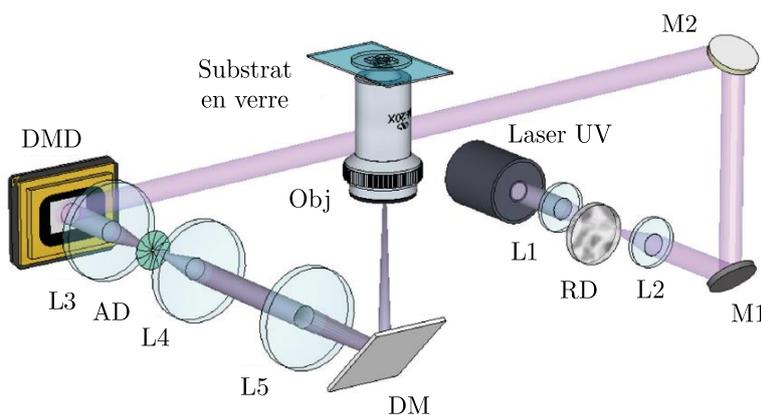


FIGURE 4.19 – Schéma du montage optique du système PRIMO d'Alvéole. Adapté de [302].

UV laser : Diode laser à $\lambda = 375$ nm.
 Li : diverses lentilles convergentes.
 AD : Diaphragme d'ouverture.
 Mi : Miroirs diélectriques UV montés sur une monture cinématique.
 RD : Diffuseur rotatif.
 DMD : Dispositif numérique à micro-miroirs.
 DM : Miroir dichroïque placé dans la tourelle de filtre du microscope.
 Obj : Objectif du microscope.

Lorsque l'on suit le protocole d'utilisation constructeur, basé sur le dépôt d'une couche de PLL-PEG que l'on va localement détruire *via*

43. Avec, là encore, une précision de l'ordre de la dizaine de μm^2 au maximum.

44. Aussi nommés avec malice : outils "presse-bouton".

l'ajout d'un photo-initiateur, la résolution annoncée des microstructures en utilisant un objectif $\times 20$ est de $1,2 \mu\text{m}$. Dans le cas où l'on utilise un objectif $\times 10$, cette résolution se situe vers $2 \mu\text{m}$ environ. La dose UV d'illumination en mJ/mm^2 est réglable et la puissance laser est modulable.

4.2.2.3 Utilisation de PRIMO dans la littérature

Le système PRIMO est, en toute logique, utilisé majoritairement dans le champ de la biophysique et biologie cellulaire⁴⁵. Depuis 2016, on compte au moment de la rédaction de ce document presque 70 articles scientifiques⁴⁶ utilisant cet outil [303]. Il ne s'agit évidemment pas ici de toutes les présenter en détail. Cependant, il est intéressant de relever que les publications portent autant sur le *micropatterning* cellulaire que la fabrication de chambres de microfluidique ou la structuration d'hydrogels : la versatilité d'un outil comme PRIMO est déjà reconnue en biophysique. Pourtant, malgré l'intérêt du champ de la photo-lithographie pour les DMD, le système PRIMO ne semble pas, jusqu'ici, avoir été "détourné" pour de la microstructuration de surface au-delà du domaine de la recherche en biologie et ses applications, et ce malgré sa pertinence évidente au regard de ses caractéristiques détaillées en section précédente. C'est donc dans cet esprit que nous avons choisi de nous reposer sur le système PRIMO disponible au laboratoire pour microstructurer de façon *top-down* nos surfaces ; surfaces dont nous avons par ailleurs présenté, dans la première partie de ce chapitre, la possibilité de fonctionnalisation *bottom-up*.

45. Cet outil est d'ailleurs couramment utilisé dans l'équipe pour réaliser du *patterning* de cellules de manière à contrôler la contractilité cellulaire, par la maîtrise de l'organisation du cytosquelette.

46. Ce nombre correspond aux publications recensées par la société Alvéole sur leur site web.

4.2.3 DÉVELOPPEMENT DU PROTOCOLE DE MICROSTRUCTURATION

Dans cette section du chapitre, nous allons présenter la résine photosensible sélectionnée pour notre processus de microstructuration, la caractérisation des paramètres de ce processus, ainsi que l'ajustement du protocole de fonctionnalisation nécessaire.

4.2.3.1 Propriétés générales et protocole d'utilisation de la résine S1813 G2

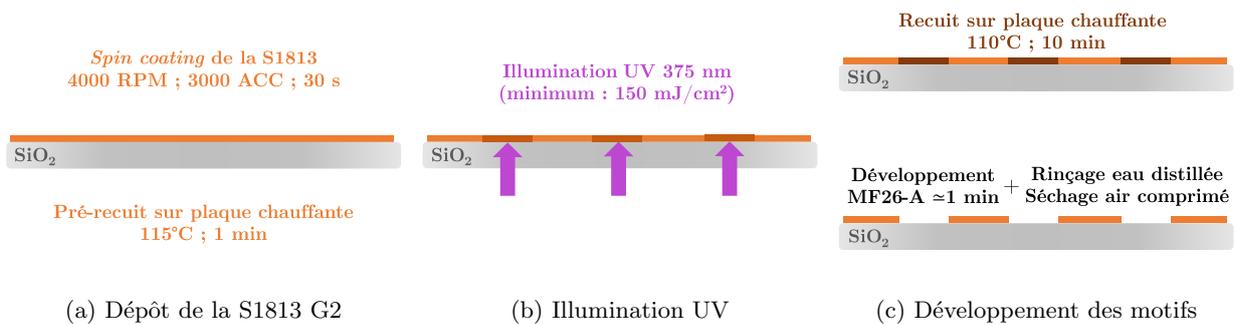
La série Microposit S1800 regroupe un ensemble de résines photosensibles très utilisées depuis plus de 20 ans en micro-électronique en raison de leur facilité d'utilisation⁴⁷ ainsi que de la qualité des couches obtenues⁴⁸. La S1813 G2 est la deuxième version développée de la résine S1813, qui se distingue par une résolution de motifs pouvant aller jusqu'à $0,48 \mu\text{m}$, et la possibilité d'obtenir des épaisseurs de couche déposée entre $1-1,9 \mu\text{m}$ selon la vitesse de rotation sélectionnée lors du *spin coating*. Elle est particulièrement adaptée à notre procédé de fonctionnalisation, en raison de : (a) sa sensibilité à la longueur d'onde 375 nm , avec une valeur d'énergie à apporter relativement faible de $150 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, ce qui permet des temps d'expositions courts ; et (b) ses différentes propriétés de solubilité. La S1813 G2 est plutôt insoluble dans le toluène et l'eau – solvants de base pour nos étapes de fonctionnalisation MPTMS et QDs – mais très soluble dans l'éthanol

47. Qui regroupe les qualités : d'adhésion à divers substrats, en particulier semi-conducteurs ; et déposition simple, par exemple par *spin coating*.

48. Uniformité des dépôts et résolution.

ou l'acétone, substances dans lesquelles les MPTMS et QDs sont eux-mêmes insolubles, ce qui permet une étape de *lift-off* n'endommageant pas, ou à la marge, la fonctionnalisation réalisée. Dans le cadre de mes travaux, j'ai utilisé des dépôts de résine de 1,3 μm d'épaisseur, ce qui permet d'une part, à la couche de résister à plusieurs dizaines d'heures d'incubation dans du toluène ou de l'eau; et d'autre part, obtenir – après développement de la résine – des puits de profondeur suffisamment faible pour ne pas entraver l'accès des molécules de fonctionnalisation (silanes comme QDs) aux surfaces de verre découvertes.

Le protocole d'obtention de ces couches est synthétisé en Figure 4.20. Après nettoyage et activation des lamelles de verre, on dépose la couche de résine S1813 G2⁴⁹ par *spin coating* avec les paramètres suivants : 4000 RPM⁵⁰; 3000 ACC⁵¹; 30 s. Après un pré-recuit (*softbake*) à 115°C durant 1 min sur plaque chauffante⁵², qui stabilise le dépôt, on passe à la phase d'illumination avec PRIMO. Une fois cette étape réalisée, un recuit à 110°C durant 10 min solidifie la couche non insolée de manière à ce qu'elle résiste au développement. Ce dernier peut être réalisé à l'aide de 2 solutions : MF-319 ou MF-26A⁵³.



- 49. Megaposit S1813 G2, Dupont.
- 50. Rotations par minute.
- 51. Accélération, en RPM².
- 52. EchoTerm, Torrey Pines Scientific.
- 53. Dans les 2 cas : Megaposit, Dupont.

La résine S1813 G2 est annoncée comme étant optimisée en résolution pour le développeur MF-319, mais cela concerne essentiellement les applications comme les puits de profondeur intermédiaire. Dans notre cas, nous souhaitions pouvoir enlever toute la résine, et c'est avec le MF-26A que nous avons constaté les meilleurs résultats⁵⁴. Après divers essais, le développement optimal afin d'obtenir le meilleur rendu des motifs nécessite une incubation d'1 min des lamelles dans le MF-26A, sous agitation manuelle légère, suivie d'un rinçage à l'eau distillée. Les lamelles sont ensuite séchées à l'air comprimé.

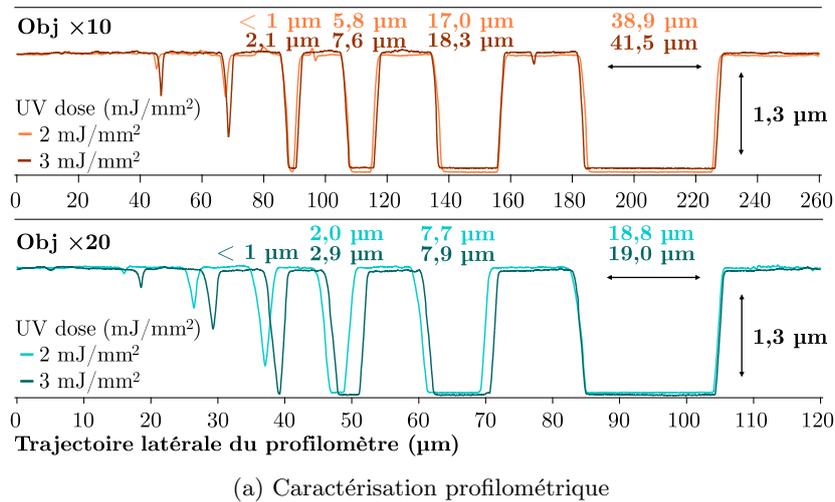
4.2.3.2 Influence de l'objectif de microscope utilisé

Ayant à notre disposition un objectif $\times 10$ et $\times 20$, nous avons souhaité vérifier la différence de résolution réalisable avec la résine S1813 G2. Le logiciel "Léonardo" permettant le pilotage de PRIMO n'accepte en entrée que des valeurs de dose d'illumination en mJ/mm^2 , et uniquement des entiers naturels. La valeur fabricant de $150 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ pour la S1813 G2 équivalant à $1,5 \text{ mJ}/\text{mm}^2$, cela nous oblige à envoyer une dose de $2 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ au minimum.

FIGURE 4.20 – Protocole de microstructuration de la résine photo-sensible S1813 G2.

54. Chaque test était contrôlé par microscopie optique classique, à divers niveaux de grandissement, pour une évaluation qualitative des motifs obtenus.

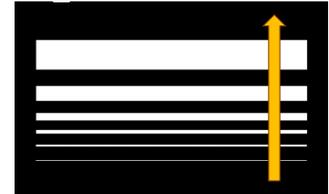
La Figure 4.21 donne le profil topographique obtenu par profilométrie de micro-motifs réalisés avec des doses d'illumination de 2 et 3 mJ/mm² avec les objectifs $\times 10$ et $\times 20$. On constate tout d'abord que l'épaisseur de la couche déposée correspond bien à 1,3 μm , ce qui suggère que l'étape de développement permet d'enlever efficacement toute la résine jusqu'à laisser apparent la surface de verre.



Profilomètre utilisé : DektakXT, Bruker. L'échelle verticale en (a) est ajustée de manière à faciliter la lisibilité.

La S1813 G2 étant fluorescente sous excitation à 458 nm, il a été possible de confirmer cela en imagerie TIRF sur notre montage optique, comme illustré en Figure 4.22. Cependant, la meilleure résolution reproductible est obtenue, contre toute attente, avec l'objectif $\times 10$. L'utilisation d'un objectif $\times 20$ implique, dans notre situation, une plus grande difficulté à obtenir une bonne mise au point. En effet, la seule manière de faire la mise au point consiste à illuminer une lamelle recouverte d'une couche fluorescente⁵⁵, puis de remplacer cette lamelle de mise au point par la lamelle recouverte de S1813 G2 pour procéder à l'illumination finale⁵⁶. Cette étape cause nécessairement, malgré toute notre application dans la réalisation de cette échange de lamelles, un léger décalage de la mise au point, qui se révèle manifestement suffisant pour annuler le bénéfice attendu d'un grandissement 2 fois plus élevé. Notons qu'une partie de ce défaut de focalisation est lié aux potentielles variations de planéité entre les lamelles de verre. Pour l'objectif $\times 10$, la taille latérale du plus petit motif bien distinguable vaut environ 2 μm , et a été obtenu pour une dose d'illumination de 3 mJ/mm²; et ce sans que cette valeur de dose ne produise une moins bonne définition des motifs de taille plus grande.

Ces premières expériences de prise en main de la microstructuration *top-down* ayant été faites, nous avons alors adapté notre procédure de fonctionnalisation afin de vérifier la possibilité de réaliser des micro-motifs de QDs; pour, ensuite, caractériser par imagerie TIRF les microstructures 2D obtenues.



(b) Motif projeté et sens du balayage du profilomètre

FIGURE 4.21 – Caractérisation des micro-motifs de S1813 G2 selon l'objectif utilisé, pour 2 doses d'illumination UV.

55. Appliquée avec un feutre Stabilo.

56. Une méthode alternative évidente serait d'illuminer la lamelle S1813 G2 avec la source de lumière blanche classique du microscope, qu'on filtrerait par un passe-haut adapté. La mise au point pourrait alors se faire *via* les poussières à l'interface verre / résine photo-sensible. Malheureusement, l'étape de nettoyage et activation des lamelles avant dépôt de la S1813 G2 rend de telles poussières parfaitement introuvables.

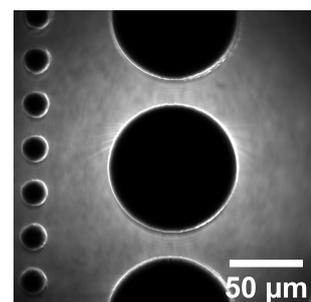


FIGURE 4.22 – Image TIRF de la résine S1813 G2 après développement au MF26-A.

4.2.3.3 Ajustement du protocole de fonctionnalisation

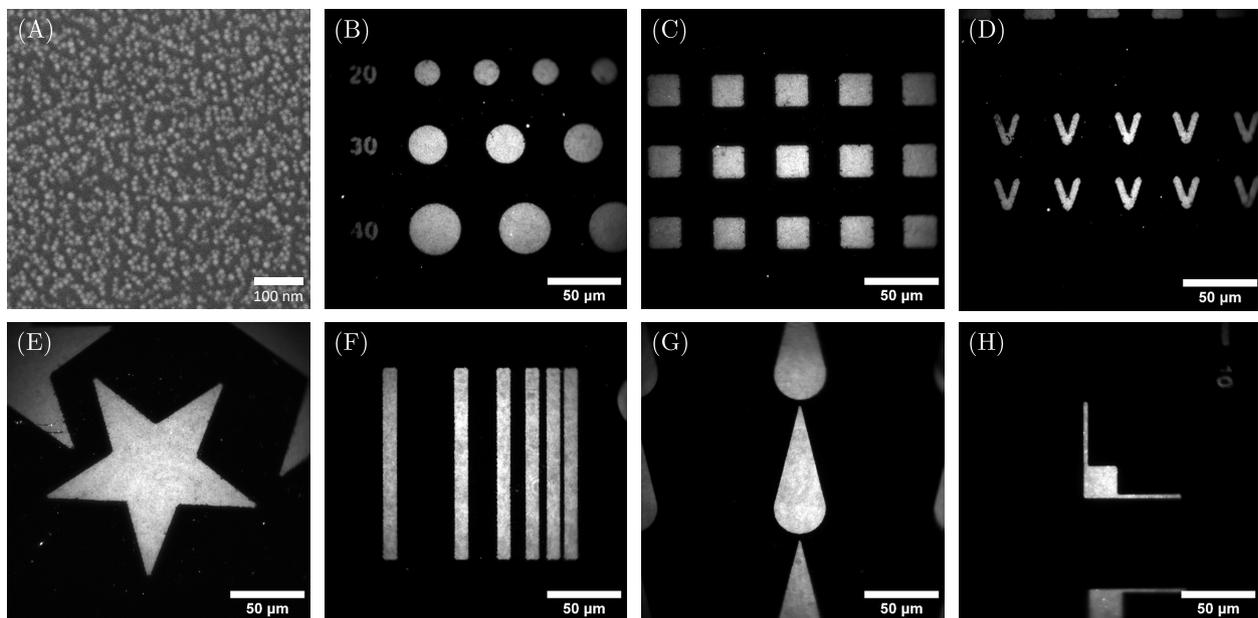
L'étape de microstructuration s'insère nécessairement entre l'étape (a) de nettoyage/activation⁵⁷ et l'étape (b) de silanisation par les MPTMS⁵⁸. Elle ne peut pas être réalisée en amont de l'étape (a) car le Piranha comme le bain ultrasons dans l'éthanol à 70% dissolvent la S1813 G2. De plus, elle ne peut être réalisée après l'étape (b) au risque de dégrader la couche de silanes. Le temps nécessaire à la réalisation des micro-motifs dans la résine photo-sensible, et le dépôt de la résine elle-même, affectent cependant le niveau d'activation des surfaces de verre. C'est pourquoi nous avons rajouté une étape de "ré-activation" des surfaces, qui s'insère entre l'étape de microstructuration de la S1813 G2 et la silanisation par les MPTMS. Elle consiste en un simple passage de 2 min au Plasma-Air⁵⁹. Pour cette durée, nous n'avons pas observé de dégradation significative de la bordure des micro-motifs réalisés dans la résine. Les étapes de silanisation et d'incubation des QDs – avec ligands de surface MPA ou TOP/TOPO – restent inchangées. Les boîtes quantiques étant liées à la surface de verre par l'intermédiaire des MPTMS, cette fonctionnalisation covalente résiste sans problème à l'étape finale de *lift-off* de la S1813 G2, qui consiste en un bain sous ultrasons de 5 min dans l'acétone⁶⁰. Les lamelles sont ensuite rincées délicatement à l'air comprimé. La Figure 4.23 témoigne de la grande liberté de formes que cette microstructuration *top-down* permet, tout en conservant les qualités de densité et d'homogénéité de notre méthode de fonctionnalisation *bottom-up*.

57. Voir section 4.1.2.

58. Voir section 4.1.3.

59. Empiriquement, et comme mentionné en partie 4.1.2.2, une exposition de 2 min est suffisante pour rendre hydrophile une surface de verre.

60. 24201-5L, Honeywell.



Une fois cette preuve de concept réalisée, nous avons pu entreprendre de caractériser plus finement le protocole dans son ensemble et, en particulier, étudier l'impact des paramètres d'illumination de la résine photo-sensible sur les micro-motifs fins de QDs obtenus.

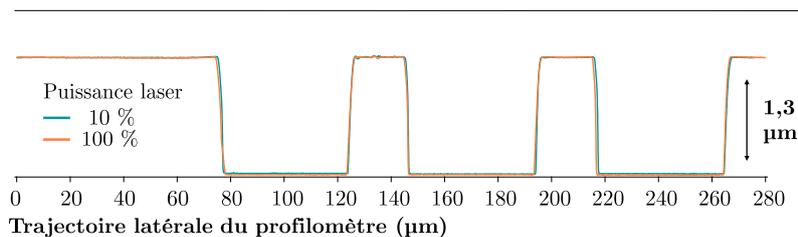
FIGURE 4.23 – Démonstration de la variété des micro-motifs 2D de QDs réalisables. Exemple avec des QDs[TOP]. (A) Image MEB de l'intérieur d'un micro-motif. (B-H) Images TIRF de diverses microstructures.

4.2.3.4 Influence des paramètres d'illumination UV

Il y a 2 paramètres contrôlables lors de l'étape d'illumination. La puissance laser⁶¹ à 375 nm permet de contrôler la rapidité de l'impression des motifs pour une dose donnée. L'irradiance totale, ou dose⁶², définit la quantité d'énergie envoyée sur la résine photo-sensible. C'est donc l'influence de ces 2 grandeurs que nous allons détailler dans les paragraphes suivants.

(a) Vérification de l'absence d'effet de la puissance laser

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un quelconque effet de la puissance laser utilisée sur les micro-motifs fins. À titre d'exemple, la Figure 4.24 montre la superposition des courbes obtenues par profilomètre de motifs issus d'illumination UV de 10 et 100%. Ces résultats sont représentatifs de l'étude paramétrique que nous avons menée, en croisant les variations de puissance laser avec les variations d'irradiance UV totale dans le but d'identifier de potentielles configurations faisant office d'exception⁶³. En l'absence d'effet, nous avons alors tout intérêt à utiliser en permanence la puissance laser la plus élevée possible, de manière à minimiser le temps d'exposition.



61. Exprimée en pourcentages de la valeur maximum, ~ 5 mW en sortie d'objectif.

62. Exprimée en mJ/mm^2 dans le logiciel Leonardo

63. Les résultats ont essentiellement été évalués qualitativement par microscopie classique.

FIGURE 4.24 – Mesure au profilomètre des micro-motifs de S1813 G2 selon la puissance laser d'illumination UV.

Ainsi, le temps d'illumination nécessaire pour un motif, dans le cas d'une irradiance de 2 ou 3 mJ/mm^2 , est de l'ordre de la seconde. Le champ d'illumination correspondant au DMD avec l'objectif $\times 10$, $924 \times 574 \mu\text{m}^2$, permet alors de réaliser, de façon automatisée et sans défaut de mise au point, un ensemble de 5×3 projections d'images sur une lamelle en moins d'une minute. Soit une taille totale de $4,6 \times 1,72 \text{ mm}^2$.

(b) Effet de la variation de la dose

En ce qui concerne la dose d'irradiation, deux aspects nécessitent d'être étudiés : l'influence de ce paramètre sur la *fidélité* des micro-motifs vis-à-vis de l'image numérique projetée ; et sur la qualité de la photo-activation de la résine. Concernant ce deuxième point, les éléments donnés en section 4.2.3.3 corroboraient plutôt solidement l'idée que l'étape de développement enlève l'intégralité de la S1813 G2 dès l'apport d'une dose UV d'au moins $2 \text{ mJ}/\text{mm}^2$. La Figure 4.25 présente la comparaison des signaux de photoluminescence de micro-motifs de QDs, où l'on a fait croître la dose d'irradiation UV.

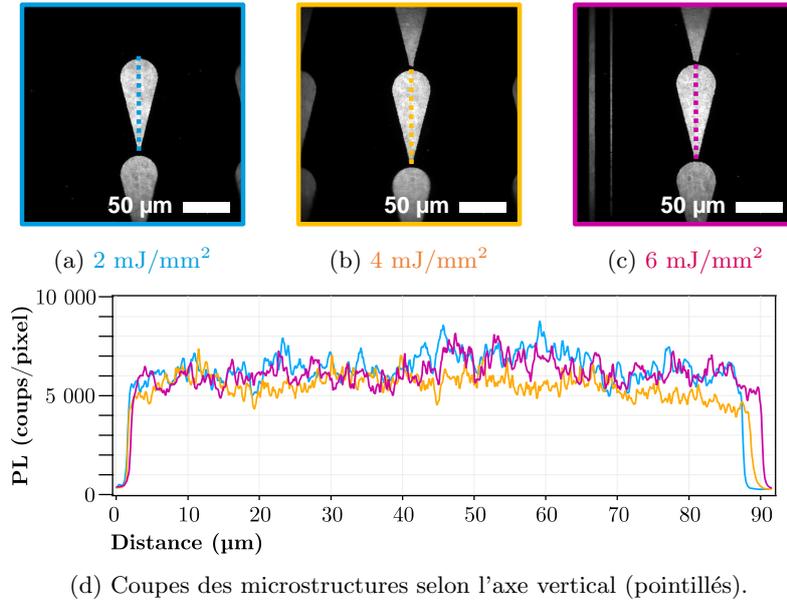


FIGURE 4.25 – Influence de la dose UV reçue par la résine S1813 G2 sur le signal de photoluminescence des micro-motifs de QDs.

Moyenne et écart-type du signal obtenu pour l'axe vertical central des différents motifs :

$$S_2 = 6483 \pm 674 \text{ coups/px}$$

$$S_4 = 5526 \pm 536 \text{ coups/px}$$

$$S_6 = 6184 \pm 620 \text{ coups/px}$$

De fait, on ne constate pas de modification du niveau de signal corrélée à la dose totale d'irradiance UV utilisée. Les signaux apparaissent même comme quasi-strictement équivalents à partir des valeurs de coups/pixel moyennes enregistrées – cf. Figure 4.25 (d). Par contre, la fidélité des motifs de QDs est bien affectée par l'augmentation de la dose UV d'illumination, comme cela est mis en évidence en Figure 4.26. À l'aide d'un *design* de motif bien choisi, on peut effectivement mettre en évidence un phénomène de "bavure", présent dès 4 mJ/mm² qui peut aller jusqu'à une fusion des motifs les plus proches, normalement séparés de 5 μm. Ainsi, l'ensemble des éléments développés dans cette section plaide donc en faveur d'une dose UV la plus faible possible, ici 2 mJ/mm².

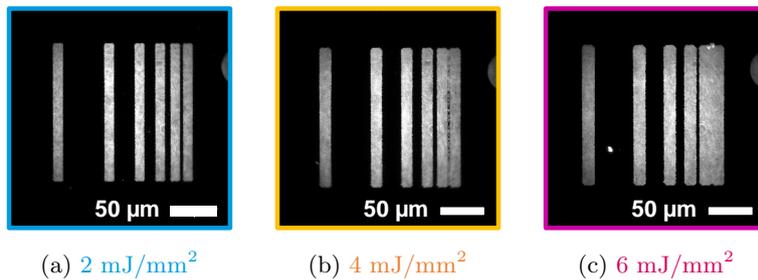


FIGURE 4.26 – Influence de la dose UV reçue par la résine S1813 G2 sur la fidélité des micro-motifs de QDs.

En revanche, nos résultats préliminaires au profilomètre semblaient indiquer que les micro-motifs les plus petits étaient plus susceptibles d'être obtenus *via* une dose UV de 3 mJ/mm². La section suivante permettra donc de clarifier ce point et montrer ce que l'on peut atteindre à l'aide de notre méthode de microstructuration.

4.2.4 RÉSOLUTION ET HOMOGENÉITÉ DES MICRO-MOTIFS 2D DE QDs

4.2.4.1 Résolution limite des motifs

Nous avons réalisé plusieurs essais comparés de micro-motifs de QDs pour des doses UV valant 2 ou 3 mJ/mm². L'image projetée sur la résine photo-sensible pour cette étude est donnée Figure 4.27. Chaque ligne verticale est associée à un nombre exprimant la largeur de la ligne en pixels – avec l'objectif $\times 10$, 1 px = 0,5 μm . La ligne de QDs la plus fine visible par imagerie TIRF nous donne accès à la limite de résolution de notre protocole. La Figure 4.28 présente un exemple de détermination de la résolution maximale atteinte : on constate sans grande surprise que la limite de taille de nos micro-motifs ($\sim 2 \mu\text{m}$) correspond à la limite en résolution du dispositif PRIMO.

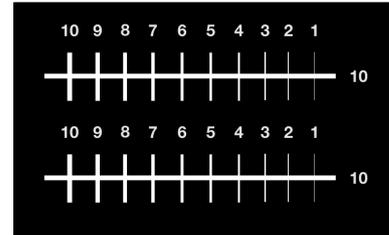


FIGURE 4.27 – Image numérique projetée sur la résine S1813 G2 pour l'étude de la résolution optimale des micro-motifs de QDs.

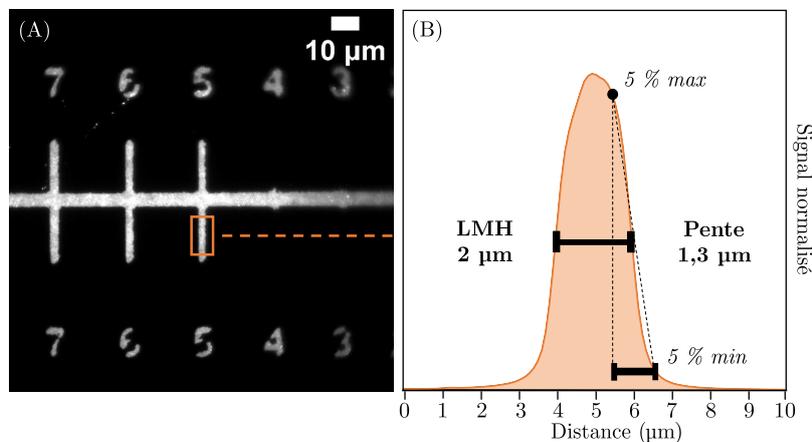


FIGURE 4.28 – Motif le plus petit réalisable par microstructuration des surfaces avec des QDs.

(A) Image TIRF des plus petits micro-motifs de QDs.

(B) Profil moyen de la ligne de 5 px de large, soit en théorie 2,5 μm . La largeur à mi-hauteur (LMH) mesurée sur les images TIRF est de 2 μm .

De manière générale, nous n'avons observé aucune différence significative entre les doses UV de 2 et 3 mJ/mm², que ce soit sur le plan de la fidélité comme de la résolution optimale atteignable. Cependant, la mise au point⁶⁴ a de nouveau été identifiée comme un facteur critique de ce procédé. Sans pouvoir produire d'étude statistique probante, notre expérience semble indiquer que l'irradiance UV à 3 mJ/mm² permet plus souvent de compenser un éventuel défaut de mise au point lors de l'étape d'illumination UV de la résine photo-sensible, ce qui est particulièrement critique lorsque l'on souhaite réaliser un motif à la limite de résolution du système PRIMO. C'est donc cette dose UV que nous avons choisie pour notre protocole de référence.

4.2.4.2 Homogénéité des motifs

La photolithographie employée élimine simplement des zones accessibles au processus de fonctionnalisation. Il était attendu que le niveau d'homogénéité de répartition des QDs sur les surfaces microstructurées soit la même que ce que nous avons déjà observé sans microstructuration. C'est ce que l'on peut constater lorsque l'on emploie les QDs[*TOP*], comme cela est montré sur les Figures 4.29 (a) et (b), où les micro-motifs obtenus sont bien délimités et leur constitution interne

64. Dont les enjeux ont été donnés en partie 4.2.3.2.

est homogène. Ce résultat change lorsque l'on utilise les QDs[MPA] : nous avons pu observer l'apparition très régulière d'agrégats, toujours situés au bord des micro-motifs – Figures 4.29 (c) et (d).

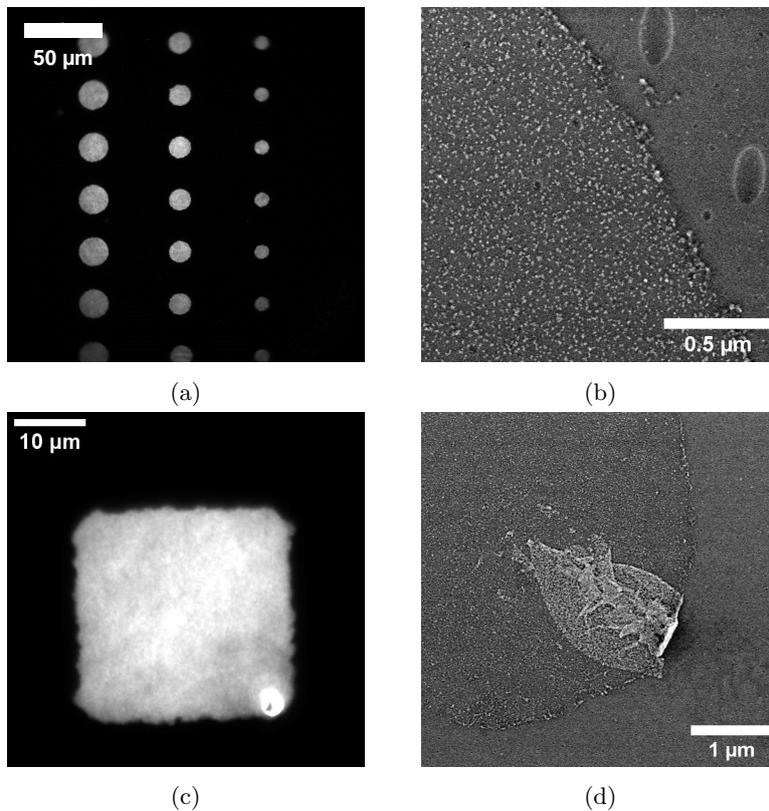


FIGURE 4.29 – Micro-motifs obtenus avec des QDs[TOP] et QDs[MPA].

(a) Image TIRF de micro-motifs obtenus avec des QDs[TOP].

(b) Image MEB au bord d'un micro-motif de l'image (a).

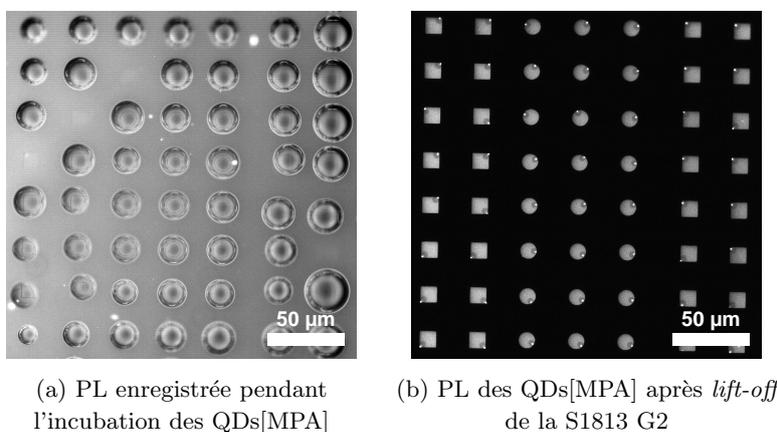
(c) Image TIRF d'un micro-motif obtenu avec des QDs[MPA].

(d) Image MEB au bord du micro-motif de l'image (c).

En étudiant par imagerie d'épifluorescence⁶⁵ l'étape d'incubation de la solution de QDs[MPA] elle-même, nous avons pu mettre en évidence – voir Figure 4.30 – la présence de micro-bulles formées sur les *patterns* de S1813 G2. Ce phénomène, cause probable de la formation des agrégats, résulte de l'hydrophobicité du verre silanisé et de la résine S1813 G2 – les QDs[MPA] sont solubilisées dans un tampon NaHCO_3 . Nous avons tenté d'éviter la formation de ces micro-bulles de diverses manières⁶⁶, mais sans réussir à les faire disparaître.

65. IX73, Olympus; objectif $\times 10$; illumination à 490 nm; pE-4000 Cool-LED.

66. Immersion verticale des lamelles; ultrasons pendant incubation.



(a) PL enregistrée pendant l'incubation des QDs[MPA]

(b) PL des QDs[MPA] après *lift-off* de la S1813 G2

FIGURE 4.30 – Mise en évidence de micro-bulles sur les motifs lors de l'incubation de QDs[MPA]. Excitation à 490 nm.

4.3 CONCLUSIONS SUR LA MICROSTRUCTURATION DES QDs

Au cours de ce chapitre, j'ai présenté notre protocole de fonctionnalisation de lamelles de verre déjà initié dans la thèse de L. Riachy [263]. Ce protocole a été enrichi en mettant à profit le savoir-faire, en termes d'échanges de ligands, que nous avons exposé au chapitre précédent, et j'ai réalisé une caractérisation approfondie des surfaces obtenues. Les monocouches de boites quantiques obtenues peuvent atteindre des densités surfaciques très élevées⁶⁷ – plus de $3000 \text{ QDs}/\mu\text{m}^2$ – ce qui est indispensable pour adapter l'irradiance laser ou le temps d'acquisition dans le contexte de l'imagerie NEF. Les boites quantiques étant liées de manière covalente à la surface en verre par l'intermédiaire de silanes, la fonctionnalisation se révèle très résistante, ce qui nous a permis de montrer la pertinence de combiner cette approche *bottom-up* avec une pré-microstructuration *top-down* par photolithographie UV avec la résine photo-sensible S1813 G2. Les micro-motifs de QDs ainsi obtenus ont eux-aussi été caractérisés, et la résolution maximum a été établie comme $\sim 2 \mu\text{m}$. Le protocole complet issu de cette étude est résumé Figure 4.31. Dans le chapitre suivant, on s'attachera alors à présenter nos travaux de biofonctionnalisation de ces microstructures 2D, et démontrer la possibilité d'obtenir un signal FRET dans une situation modèle.

67. Pour obtenir des densités faibles, on peut jouer sur : les ligands de surface, en privilégiant les TOP/TOPO ; le temps d'incubation ; ou encore la concentration de la solution de QDs utilisée pour l'incubation – ce qui en fait une technique adaptable à de nombreux besoins. Des travaux annexes avec des collègues du L2n, A. Broussier et C. Couteau, ont par exemple permis de montrer la possibilité de descendre à une densité surfacique de $1 \text{ QD}/\mu\text{m}^2$, avec une solution de 10 nM incubée durant 30 s . Il a pu être démontré que ces QDs étaient émetteurs de photons uniques et qu'ils pouvaient être couplés avec des guides d'ondes, permettant l'obtention de photons uniques en sortie d'une fibre optique.

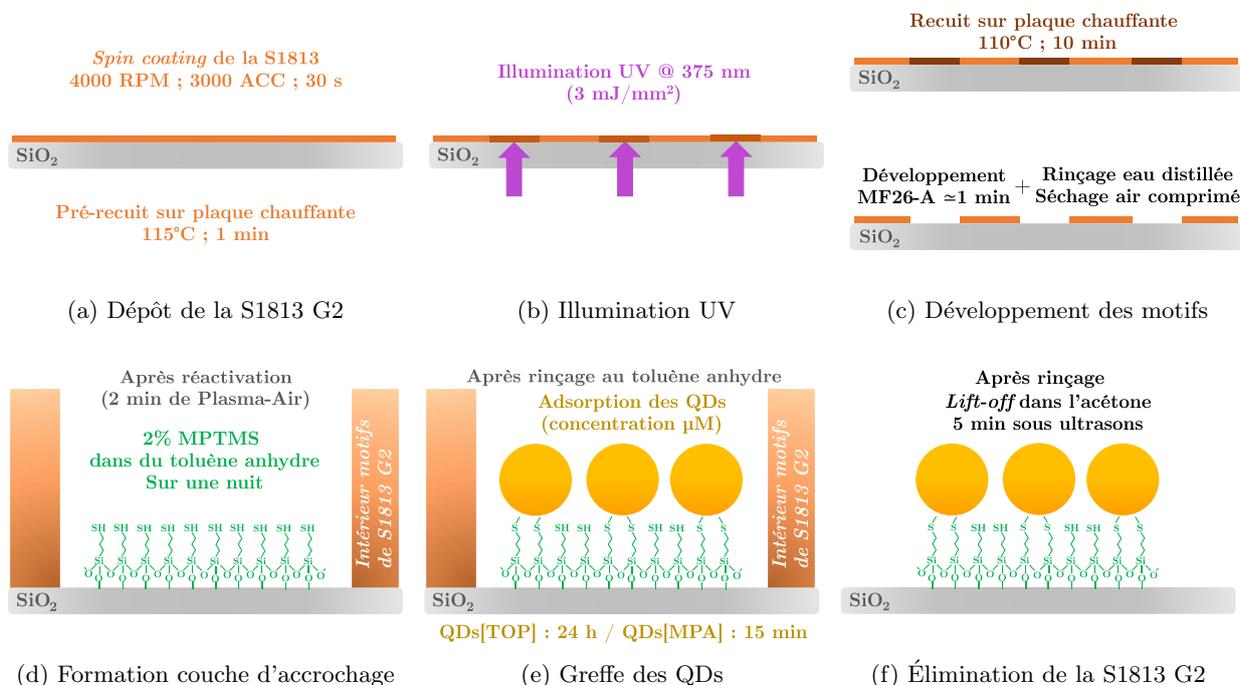


FIGURE 4.31 – Résumé du processus de microstructuration 2D de boites quantiques.

Surfaces actives pour l'imagerie NEF

5

Le but de ce chapitre est de démontrer la possibilité de biofonctionnaliser des surfaces microstructurées pour l'imagerie NEF. Nous y présentons la nécessité de passiver le verre autour des micro-motifs, ainsi qu'une analyse quantitative de FRET dans une situation modèle.

5.1 PRINCIPE

Comme on a pu le voir en section 3.3, il existe de nombreuses manières de fonctionnaliser des boîtes quantiques en jouant sur le *design* modulaire de leurs ligands de surface. Le protocole de fonctionnalisation présenté au chapitre précédent facilite vraisemblablement le remplacement des ligands présents sur les QDs par d'autres, biocompatibles, dont la fonctionnalisation peut être adaptée. Après avoir exposé la stratégie de conception des ligands utilisés dans cette étude, je présenterai les résultats expérimentaux ouvrant la voie à l'étude de l'adhésion cellulaire par imagerie NEF sur des surfaces microstructurées.

5.1.1 CHÉLATION ET COMPLEXES DE COORDINATION

5.1.1.1 Éléments généraux sur la chélation

La très grande majorité des composés dits métalliques sont, de fait, des complexes de coordination, où un atome métallique central est entouré d'un certain nombre de ligands. Dans le cas général, on parle indifféremment de coordination ou complexion. Le terme de chélation¹ est employé lorsque l'ion métallique complexé² est lié au ligand de coordination³ par au moins 2 liaisons de coordinations. La formation de tels complexes, outre son omniprésence dans la nature, est un phénomène reconnu comme d'importance vitale chez la plupart des organismes vivants multicellulaires⁴.

Cependant, pour certains ions métalliques vitaux comme le cuivre, le fer, et le zinc, une régulation homéostatique défectueuse dans l'organisme peut conduire à l'apparition de pathologies. De nombreuses études suggèrent par exemple un lien entre ces problèmes de régulation et l'apparition des maladies d'Alzheimer ou Parkinson, ainsi que de certains cancers. Les stratégies thérapeutiques intègrent donc l'utilisation de molécules capables de chélater ces métaux pour promouvoir leur excrétion, de manière à soulager l'organisme dans sa tâche de régulation homéostatique [304]. Outre ces applications strictement médicales, les agents chélatants sont aussi utilisés dans des domaines aussi divers que la purification de protéines, des procédés industriels

5.1 Principe	107
Chélation et complexes de coordination	
Ligands à ancrage Imidazole	
5.2 FRET en solution aqueuse	110
Méthodologie	
Absence de FRET avec les QDs[DHLA-SB]	
FRET avec les QDs[MPA]	
5.3 FRET sur surfaces microstructurées	115
Signal d'excitation directe l'accepteur à 458 nm	
Compétition entre chélation et adsorption résiduelle	
Mise en évidence du FRET sur les microstructures	
5.4 Conclusions sur les surfaces actives pour NEFI	130

1. Dérivé du mot grec $\chi\eta\lambda\acute{\eta}$, "khêlê", qui renvoie aux pinces du homard mais aussi d'autres crustacés.

2. Le chélaté.

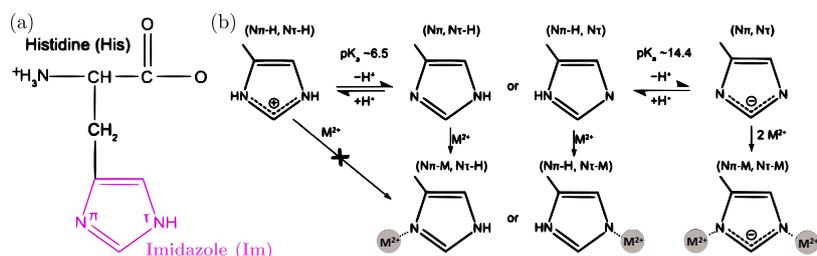
3. Le chélatant, ou chélateur.

4. Les ions métalliques dans les systèmes biologiques sont généralement répartis entre quatre états différents *in vivo*. Il y a d'abord les formes inertes du complexe métallique, qui peuvent être présentes dans une matrice solide, comme le calcium dans les os et les dents, soit être complexées dans une protéine non réactive. Il existe ensuite trois états d'espèces labiles. Les protéines métalliques liées de manière réversible à des ions métalliques sont connues sous le nom d'espèces de masse moléculaire élevée. Celles-ci sont en équilibre avec les complexes dits de faible masse moléculaire. Enfin, il doit y avoir des ions métalliques directement complexés avec l'eau, bien que cela soit hautement improbable à un pH = 7,4 en raison du phénomène d'hydrolyse [207].

très variés⁵ et des produits de consommation courante⁶, ou encore pour contrôler la chimie des métaux ; mais également comme agents d'adoucissement de l'eau dure, comme conservateurs alimentaires ou composants d'engrais microélémentaires. Ils jouent aussi un rôle essentiel dans les processus métallurgiques avec des applications à chaque étape du traitement du minerai⁷ [305].

5.1.1.2 Terminaison de ligands pour adsorption sur les QDs

Concernant la fonction d'ancrage des ligands à la surface des QDs, notre choix s'est donc porté sur les cycles imidazole⁸. Ces groupes fonctionnels sont notamment présents dans l'histidine, un acide aminé capable de complexer une grande variété d'ions métalliques de transition bivalents (Zn, Ni, Cu, Fe, Co, Mn)⁹. Cette propriété émerge de la présence de 2 atomes d'azote¹⁰ qui peuvent être protonés/déprotonés dans les conditions adéquates [306]. La Figure 5.1 représente les configurations possibles de l'histidine. Ayant un premier $pK_a \approx 6,5$, la chaîne latérale est entièrement protonée et chargée positivement dans des conditions acides. Dans des conditions physiologiques, l'un des atomes d'azote¹¹ est déprotoné et la chaîne latérale n'est alors pas chargée, ce qui permet la liaison avec un atome métallique.



Le choix de l'imidazole comme fonction d'ancrage, *via* l'utilisation d'histidines ou plus directement de cycles imidazole, permet donc une accroche spécifique et stable sur le zinc à la surface des boîtes quantiques *via* la formation d'un complexe de coordination. Cette approche a d'ailleurs déjà été employée pour des QDs en solution colloïdale [307-310] et même pour l'immobilisation de boîtes quantiques et nanoparticules d'or sur des surfaces [311]. Cette méthode présente également l'avantage d'ouvrir la voie à un nettoyage simple des lamelles de QDs après expérience, par un rinçage dans une solution d'imidazole pur, ce qui permettrait la réutilisation des surfaces préparées.

5.1.2 LIGANDS À ANCRAGE IMIDAZOLE

Durant ma thèse, j'ai utilisé 2 ligands à ancrage imidazole différents. Ils se distinguent essentiellement par leur autre terminaison, et donc leur usage – Figure 5.2. Le premier dispose à son extrémité du peptide RGD pour permettre l'adhésion cellulaire ; le second d'un fluorophore : l'Alexa Fluor 647. Ce 2^e ligand a été utilisé pour mettre en évidence l'adsorption sur les QDs, et pour des expériences de FRET.

5. Pâte et papier, traitement photographique, ainsi que l'industrie nucléaire.
6. Détergents ménagers, nettoyants pour surfaces dures, dégraissants, agents de lavage des voitures, détartrants marins, fixateurs de colorants, etc.
7. De la flottation à l'obtention d'un métal en passant par la lixiviation, l'enrichissement et la séparation.

8. Voir Figure 3.17.

9. L'histidine est par ailleurs le chélatant le plus commun de Zn dans le vivant, suivi par la cystéine *via* un atome de soufre et l'aspartate/glutamate *via* un atome d'oxygène [304].

10. Ici notés $N\pi$ et $N\tau$, en accord avec la référence mobilisée.

11. Généralement $N\pi$.

FIGURE 5.1 – Chimie de l'histidine et fixation des métaux. Adapté de de [306].

(a) Structure chimique de l'acide aminé histidine (His) dans des conditions physiologiques ($pH \approx 7,5$).

(b) En fonction du pH, la chaîne latérale imidazole de l'histidine peut exister sous plusieurs formes. La liaison du métal M^{2+} ne peut se produire que lorsqu'un proton est perdu par au moins un atome d'azote.

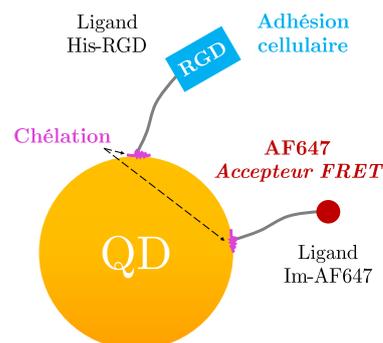
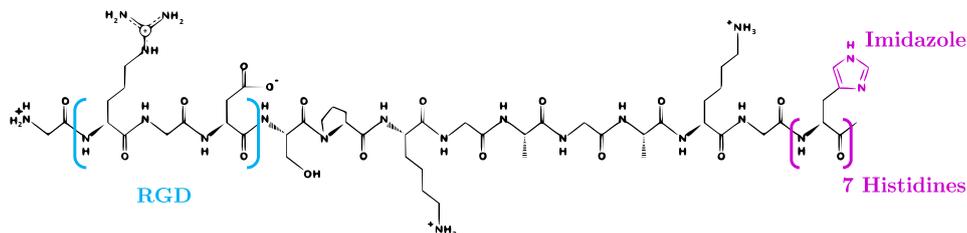


FIGURE 5.2 – Schéma des deux ligands utilisés et leur fonction.

5.1.2.1 Ligand terminé RGD : His-RGD



Le premier ligand est représenté sur la Figure 5.3. Il correspond à la séquence peptidique **GRGDSPKGAGAKG-HHHHHHH**, de masse molaire égale à 2117 g/mol. Le bloc de 7 histidines permet une accroche stable à la surface des QDs par leurs cycles d'imidazole : certaines liaisons peuvent se défaire temporairement, mais il est relativement improbable que les 7 cycles imidazole se délient des QDs en même temps. À l'autre extrémité, le tri-peptide RGD permet l'adhésion cellulaire *via* sa reconnaissance par les intégrines des cellules – voir présentation en chapitre 1. L'effet de la fonctionnalisation des surfaces de QDs par ce ligand His-RGD ont été décrites en section 4.1.4.2, et plus particulièrement avec la Figure 4.15. Pour obtenir ces résultats, une incubation des lamelles avec une solution de His-RGD à 1 μM dans un tampon Hepes¹² permet un recouvrement quasiment instantané des boîtes quantiques. En pratique, la phase d'incubation est généralement laissée entre 5 et 10 min, avant un rinçage avec la solution tampon Hepes. Le ligand His-RGD a été synthétisé sur la plateforme de synthèse peptidique de l'Institut de Biologie Paris-Seine. À ce titre, nous remercions tout particulièrement Christophe Piesse.

FIGURE 5.3 – Structure chimique de His-RGD. Produite à partir de PepDraw et vectorisée *via* InkScape.

5.1.2.2 Ligand terminé Alexa Fluor 647 : Im-AF647

Le second ligand est composé d'un premier bloc d'environ **8 cycles imidazole** jouant le même rôle que les histidines du His-RGD, puis un second bloc d'environ **26 molécules de sulfobetaine**¹³ pour promouvoir la solubilité dans l'eau et minimiser les phénomènes d'adsorption non-spécifique [228-230] – cf. Figure 5.4. Après un lien tri-éthylène-glycol, le ligand est terminé par un groupement aminé N_3 conjugué au colorant AF647-DBCO. La masse molaire de l'ensemble vaut 8300 g/mol, et la taille du Im-AF647 lorsque complètement déplié vaut 4 à 5 nm, ce qui permet de placer l'accepteur à une distance idéale de la surface des QDs pour le FRET. La concentration de la solution mère est d'environ 3 mM dans un tampon Hepes à 0,1 M, qui contient 150 mM de NaCl, à $\text{pH} = 7$. Au cours des expérimentations de ce chapitre, la dilution a systématiquement été faite dans la même solution tampon Hepes que décrite au paragraphe précédent. Nous remercions ici Thomas Pons pour nous avoir fourni ce ligand.

12. Comme en partie 3.3.2.2 : Hepes à 0,1 M avec 200 mM de NaCl, et dont le pH est ajusté à 8 *via* de la soude à 10 M.

13. On reconnaîtra la même espèce chimique zwitterionique utilisée par l'équipe de T. Pons pour concevoir le ligand DHLA-SB, décrit en partie 3.3.1.3.

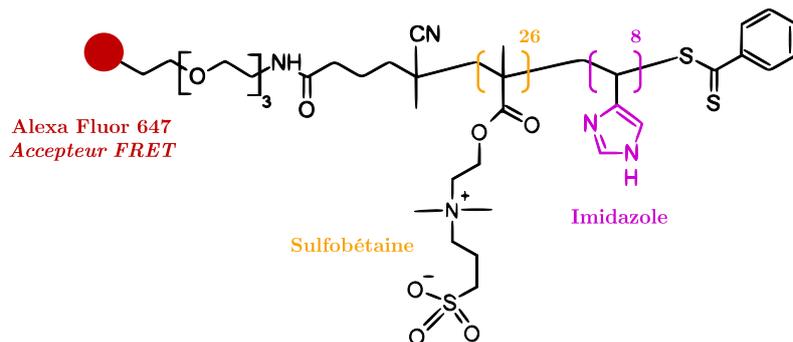


FIGURE 5.4 – Structure chimique de Im-AF647, fournie par T. Pons.

5.2 FRET EN SOLUTION AQUEUSE

Dans le but de vérifier la conjugaison entre nos QDs et le ligand Im-AF647, nous avons tout d'abord réalisé une série d'expériences en solution. Cette conjugaison permet de coupler les donneurs (QDs) et les accepteurs (AF647) de façon à initier le transfert d'énergie non-radiatif (FRET) entre les 2 espèces chimiques. Pour cela, nous avons utilisé nos QDs rendus solubles en milieu aqueux, que ce soit *via* des ligands DHLA-SB ou MPA¹⁴.

5.2.1 MÉTHODOLOGIE

L'ensemble des spectres de photoluminescence présentés dans cette section ont été obtenus sur le même spectrophotomètre UV-visible Cary Eclipse¹⁵. La vitesse de scan était de 120 nm/min avec un intervalle de 1 nm entre chaque point de mesure, pour un temps d'acquisition par point de 0,5 s. Ce dispositif commercial présente certaines limitations notables. L'illumination fournie par ce spectrophotomètre UV-visible utilise un ensemble de lampes dont l'allumage précis va varier à chaque mise en route. Autrement dit, l'irradiance effective de l'échantillon étudié peut varier selon les jours – ou même au sein d'une même journée si la machine est malencontreusement éteinte par des collègues. Ce dispositif ne permettant pas de contrôler la valeur absolue de l'illumination, il n'est en pratique pas possible de comparer quantitativement des courbes issues de journées d'expérimentation différentes¹⁶. D'autres biais peuvent également apparaître dans le cadre de ce type de mesures en solution. Par exemple, à faible concentration¹⁷, il est crucial d'utiliser la même micropipette équipée du même cône si l'on veut minimiser les incertitudes de dilutions des différentes espèces.

5.2.2 ABSENCE DE FRET AVEC LES QDs[DHLA-SB]

L'utilisation des QDs[DHLA-SB] permet une expérience de contrôle, avec une situation dans laquelle il n'est pas possible d'échanger le ligand des QDs par celui qui intègre l'accepteur AF647¹⁸. Dans cette expérience, nous partons de 2 solutions initiales à 100 nM : une de QDs[DHLA-SB], une autre de ligand Im-AF647. Après une mesure de

14. Cf. parties 3.3.1.3 et 3.3.1.4 pour leur description, et parties 3.3.2.2 et 3.3.2.3 pour les protocoles d'échange de ligands depuis les QDs[OA] obtenus après synthèse.

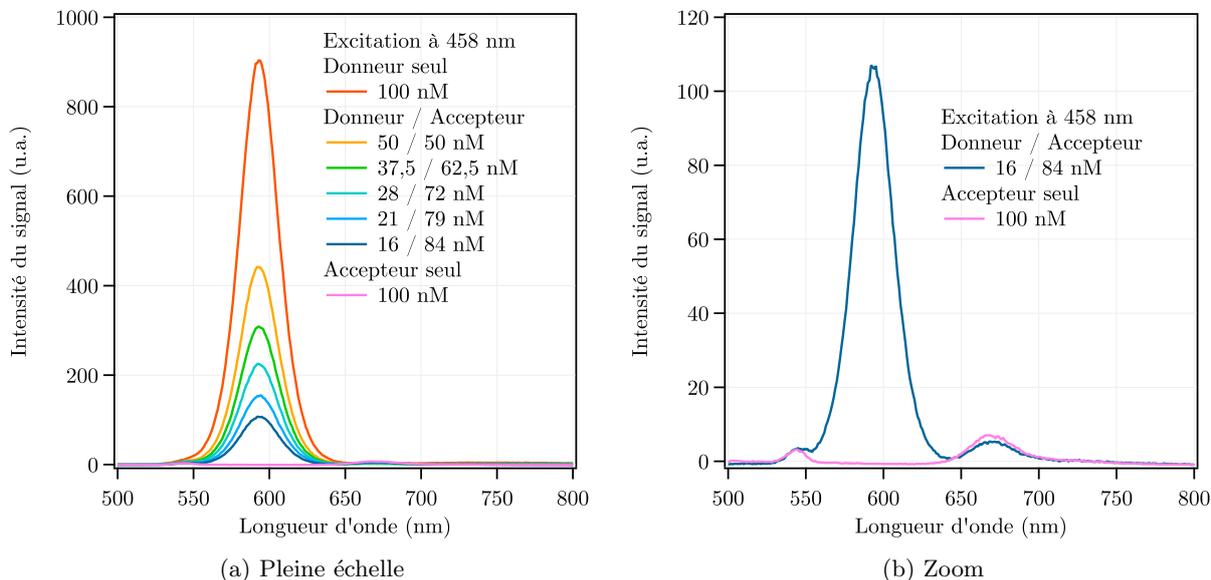
15. FL1102M006, Agilent

16. En revanche, à l'échelle d'une demi-journée, l'illumination reste suffisamment stable pour que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de variation du signal obtenu pour une même solution.

17. Typiquement $\leq 0,5 \mu\text{M}$.

18. Comme nous l'avons mentionné dans la section 4.1.4.1, la stabilisation par les ligands de surface DHLA-SB est très efficace, au point qu'ils ne permettent pas la fonctionnalisation des QDs sur verre dans le cadre de notre protocole.

chaque solution, les 2 espèces chimiques sont mélangées dans la cuvette de spectroscopie, de façon à travailler à volume constant. J'ai fait varier la proportion de donneur et accepteur de 1:1 à environ 1:5. Les spectres mesurés à chacune de ces étapes sont donnés en Figure 5.5.



Le très léger signal sur l'intervalle spectral 640-700 nm ne dépasse pas ce qui est observé pour le Im-AF647 seul à 458 nm, comme on peut le vérifier sur la Figure 5.5 (b). Il s'agit donc uniquement de l'excitation directe de l'accepteur à cette longueur d'onde. Cette expérience semble ainsi confirmer la trop grande passivation causée par les ligands DHLA-SB, que nous avons déjà constaté sous une autre forme – section 4.1.4.1. Dans cette situation, il n'y a aucun signal de FRET car le ligand Im-AF647 ne s'adsorbe pas à la surface des QDs.

5.2.3 FRET AVEC LES QDs[MPA]

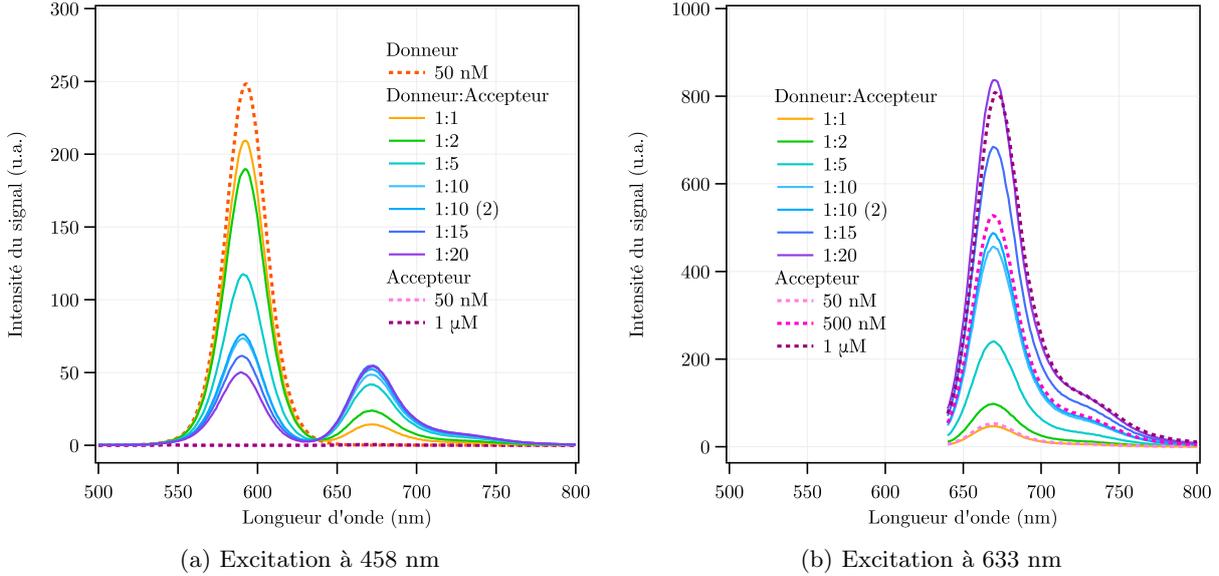
5.2.3.1 Démonstration spectrale du FRET

Pour cette seconde expérience, une série de mélanges de QDs[MPA] et Im-AF647 sont préparés séparément de manière à obtenir des solutions de ratio donneur : accepteur les plus précises possible¹⁹, tout en conservant une concentration du donneur à 50 nM dans chaque cas. La Figure 5.6 récapitule l'ensemble des spectres mesurés pour cette expérience. Les paramètres du spectrophotomètre, sont ajustés de manière à ce que le signal d'excitation directe de l'accepteur (Im-AF647) soit nul. Cela permet ainsi de considérer – Figure 5.6 (a) – l'ensemble de l'éventuel signal observé sur l'intervalle 640-800 nm comme étant généré par du FRET²⁰. On constate alors que ce dernier se manifeste sans ambiguïté dès un ratio donneur : accepteur de 1:1. Augmenter la fraction de l'accepteur Im-AF647 par rapport aux QDs[MPA] se caractérise par une augmentation progressive du *quenching* de la photoluminescence des boîtes quantiques, corrélée à l'augmentation du signal issu du FRET.

FIGURE 5.5 – Spectres de photoluminescence des différentes solutions de QDs[DHLA-SB] (Donneur) et Im-AF647 (Accepteur).

19. Les ratios donneur : accepteur effectifs de l'expérience précédente peuvent être biaisés si les dynamiques d'adsorption des QDs[DHLA-SB] et Im-AF647 sur les parois des cuvettes en quartz sont trop différentes. Nous minimisons cette possibilité en réalisant à chaque fois une nouvelle solution de mélange à partir des mêmes solutions mères, qu'on caractérise immédiatement.

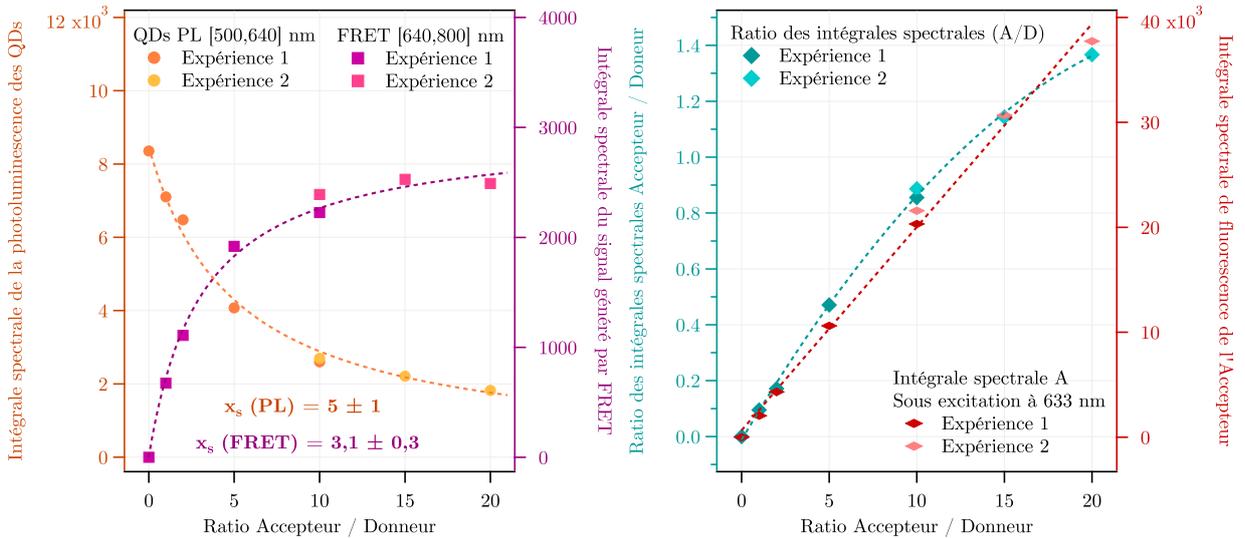
20. Avec une contribution marginale du débordement spectral des QDs.



Les spectres des ratios donneur : accepteur 1 : 15 et 1 : 20 ont été réalisés à partir d’une solution de Im-AF647 différente des spectres allant de 1 : 1 à 1 : 10. L’agrégation de ces courbes est néanmoins justifiée par la précision suffisante des réalisations de solutions, comme montré par le spectre 1 : 10 (2) qui nous sert de contrôle. La Figure 5.6 (b) permet de contrôler la présence de l’accepteur *via* l’acquisition du spectre de fluorescence sous une excitation à 633 nm.

Il est également possible de calculer l’intégrale de ces différents spectres, de manière à mieux visualiser l’évolution des signaux en fonction du ratio accepteur/donneur – cf. Figure 5.7. Le *quenching* de photoluminescence des boites quantiques décroît avec l’augmentation de la proportion d’accepteur Im-AF647. À l’inverse, le signal issu du FRET augmente jusqu’à un plateau.

FIGURE 5.6 – Spectres de photoluminescence des différentes solutions de QDs[MPA] (donneur) et Im-AF647 (accepteur).



(a) Évolution du *quenching* de photoluminescence des QDs et du signal de FRET (b) Évolutions comparées du signal de FRET normalisé et de la quantité d’accepteur

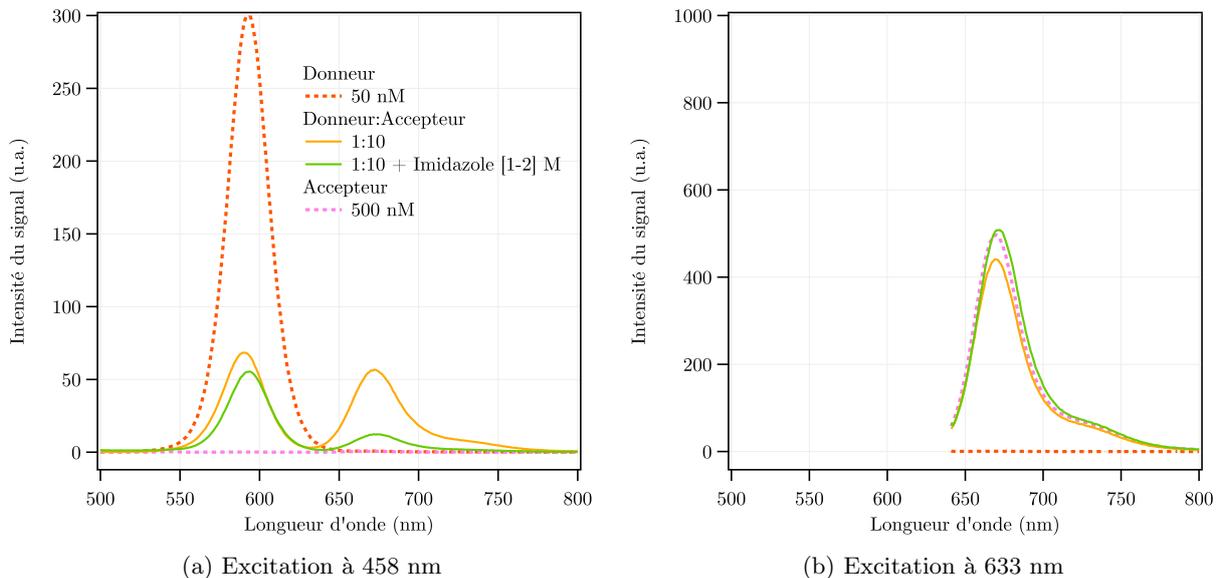
(a) Le signal de FRET de l’accepteur est ajusté par la fonction de saturation donnée par l’Éq. (5.2.1). La PL des QDs est ajustée par une fonction de même type, mais décroissante – Éq. (5.2.2). La grandeur x_s correspond au seuil de saturation, donné en ratio accepteur/donneur. (b) L’intégrale spectrale A est ajustée par une fonction linéaire, l’intégrale spectrale A/D par un polynôme du second degré.

FIGURE 5.7 – Intégrales spectrales des signaux des différentes solutions de QDs[MPA] (Donneur) et Im-AF647 (Accepteur).

Réaliser un *fit* du signal de FRET et de la photoluminescence des QDs – Figure 5.7 (a) – à l'aide de fonctions de saturation de type Langmuir – Éq. (5.2.1) et (5.2.2) – permet d'obtenir des valeurs de seuil de saturation, données en ratio accepteur/donneur, de $x_s(\text{PL}) = 5 \pm 1$ et $x_s(\text{FRET}) = 3,1 \pm 0,3$. La différence de valeur n'est pas surprenante. En effet, le ligand Im-AF647 stabilise la photoluminescence des QDs de la même façon que le ligand His-RGD – cf. section 4.1.4.2. La valeur $x_s(\text{PL})$ tirée de l'évolution du *quenching* est donc nécessairement sur-estimée. À partir de $x_s(\text{FRET})$, on peut évaluer la constante de dissociation $K_d = C_A \cdot x_s \approx 155 \text{ nM} \approx 1,55 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. La constante d'association²¹ vaut donc $K_a = 1/K_d \approx 6,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Le plateau de signal semble débiter avec l'équilibre entre émission des donneurs et émission générée par FRET des accepteurs, i.e. pour un ratio donneur : accepteur entre 1:12 et 1:13 – Figure 5.7 (b). Au-delà, le *quenching* de photoluminescence des QDs se poursuit sur un rythme moins soutenu, et le signal issu du FRET reste relativement constant. Cette expérience met donc clairement en évidence le FRET entre nos boîtes quantiques et l'Alexa Fluor 647. Elle semble également montrer qu'il n'est pas possible de *quencher* complètement la photoluminescence des QDs avec le ligand Im-AF647.

5.2.3.2 Démonstration de la spécificité de liaison entre donneur et accepteur

Il est possible de montrer, même dans le contexte d'études en solution, que l'apparition du signal de FRET est bien lié à la formation d'assemblages entre donneurs et accepteurs sur la base d'une liaison spécifique – ici, la chélation. Pour ce faire, nous créons une situation de compétition entre les ligands terminés AF647 et de l'imidazole pure, afin d'entraver la formation du complexe QDs–Im-AF647. Le protocole général d'expérimentation reste le même que précédemment. La Figure 5.8 donne les résultats pour l'ajout d'imidazole à 2 M, premier niveau de concentration où l'on peut observer un effet tangible.



21. Ces valeurs peuvent être comparées aux grandeurs correspondant aux constantes d'association et de dissociation des complexes Im-Zn²⁺ dans la littérature, respectivement :

$$K_a \approx 10^{9,2} \text{ M}^{-1}$$

$$K_d \approx 6,3 \cdot 10^{-10} \text{ M}$$

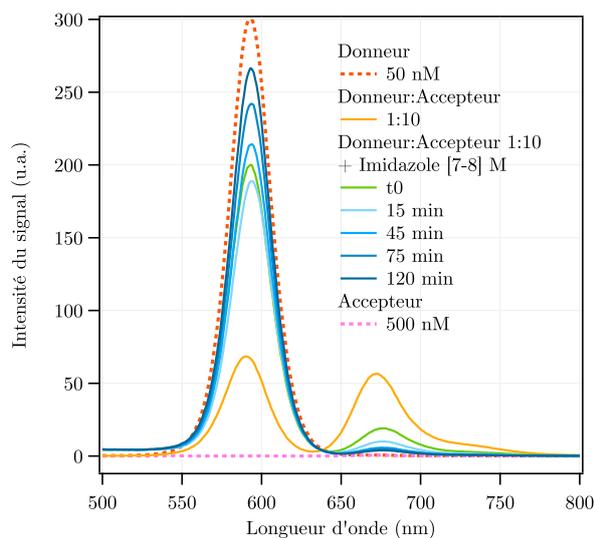
On pourrait interpréter cette différence comme signifiant que dans notre configuration expérimentale, l'adsorption de notre ligand sur les QDs est moins forte que prévue. La littérature sur le sujet est cependant difficile d'accès et les valeurs incertaines [312, 313].

La comparaison avec une constante de dissociation bien connue, celle de la liaison biotine–avidine (10^{-15} M) [314] indique néanmoins que la liaison QDs–Im-AF647 est bien moins stable que cette liaison de référence.

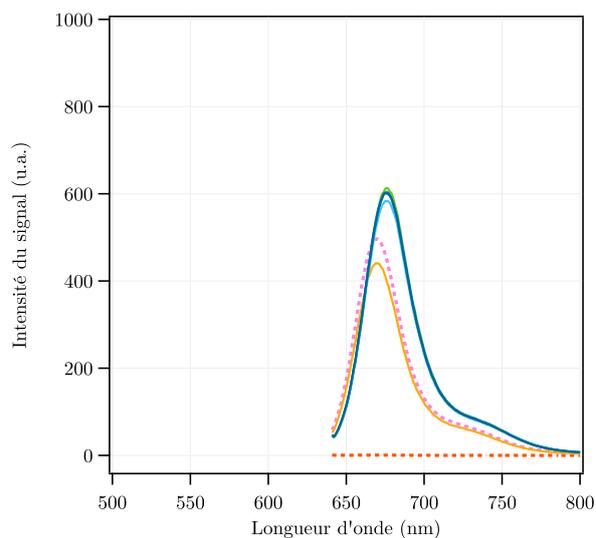
FIGURE 5.8 – Effet de l'ajout d'imidazole à 2 M en compétition avec le Im-AF647.

En intégrant les spectres sur l'intervalle 640-800 nm, le contrôle à 633 nm en Figure 5.8 (b) montre que, malgré une quantité d'accepteur légèrement supérieure à la situation où l'accepteur est seul (+16%), on constate une forte diminution (-78%) du signal généré par FRET – Figure 5.8 (a) ²². Pris ensemble, ces éléments confirment l'hypothèse que le FRET observé dans les sections précédentes résulte de la formation spécifique d'assemblages QDs—Im-AF647. De façon surprenante, la baisse importante du signal de FRET ne s'accompagne cependant pas d'une augmentation de la photoluminescence des boîtes quantiques ²³.

J'ai réalisé la même expérience en augmentant la concentration d'imidazole à 8 M. Les résultats sont alors plus proches de ce qui est attendu, comme le montre la Figure 5.9. Une nouvelle fois, le contrôle à 633 nm garantit la présence du ligand Im-AF647 à une concentration proche de 500 nM, et l'on observe bien une diminution du signal de FRET corrélée à une augmentation de la photoluminescence des QDs, qui se rapproche de la photoluminescence observée pour la solution de boîtes quantiques seules à 50 nM.



(a) Excitation à 458 nm



(b) Excitation à 633 nm

La Figure 5.9 montre aussi une accentuation progressive de cette dynamique avec le temps – et une légère agitation de la solution en cuvette avant chaque nouvelle acquisition de spectre. Ces résultats confirment donc définitivement le lien entre le FRET observé dans la configuration QDs + Im-AF647, et la formation de complexes de coordination entre les 2 espèces chimiques. Cette validation faite, j'ai étudié le signal FRET sur surfaces microstructurées, de manière à prouver la possibilité d'études NEFI dans ce type de configuration, mais aussi déterminer le meilleur processus de dépôt spécifique du ligand His-RGD sur les boîtes quantiques, en vue des expériences d'étude de l'adhésion cellulaire. Le détail de ces différents éléments constitue le reste de ce chapitre.

22. Et ce alors que le ratio donneur : accepteur théorique cible étant 1 : 10, on devrait observer un ratio des intégrales spectrales A/D entre 0,85 et 0,89 d'après la Figure 5.7 (b). Ici, dans le cas de référence sans imidazole, on se situe à 1,06 – indiquant un ratio donneur : accepteur empirique proche de 1:13.

23. Cet effet n'est pas le résultat d'un problème de manipulation : il est reproductible en solution, et on peut aussi le constater sur les surfaces de QDs, où le nombre de boîtes quantiques est fixe.

FIGURE 5.9 – Effet de l'ajout d'imidazole à 8 M en fonction du temps.

5.3 FRET SUR SURFACES MICROSTRUCTURÉES

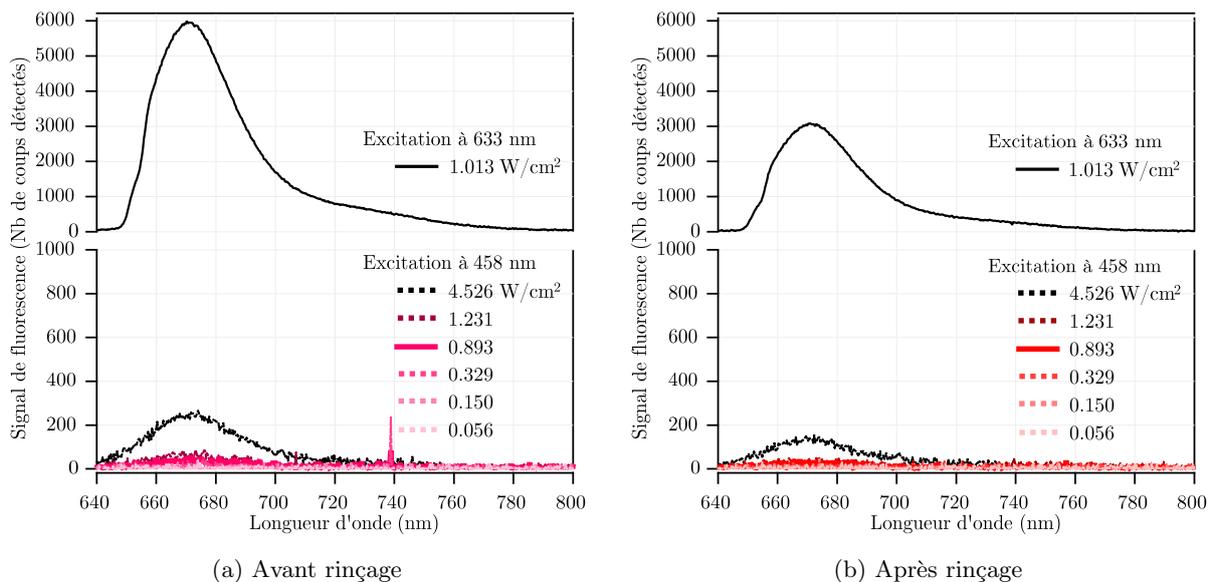
Dans cette partie, nous établirons premièrement le domaine d'irradiance laser adapté à nos expérimentations. Après avoir montré comment mettre en œuvre le ligand Im-AF647 lorsque les boîtes quantiques sont déposées sur une surface en verre²⁴, nous présenterons nos observations FRET en imagerie TIRF sur nos microstructures.

5.3.1 SIGNAL D'EXCITATION DIRECTE L'ACCEPTEUR À 458 NM

Pour correctement analyser le signal enregistré à travers la fenêtre de détection dédiée au FRET dans notre dispositif TIRF²⁵, il faut déterminer au mieux le bruit de fond provenant de l'excitation directe de l'accepteur à 458 nm – cf. section 2.2.3. Pour cela, on dépose le ligand Im-AF647 à 100 μM sur une surface de verre nettoyée par Piranha. Un puits de PDMS est utilisé pour pouvoir conserver la solution sur la surface de façon stable lorsque la lamelle de verre est étudiée sur le microscope. Ce puit permet également de réaliser le rinçage sans démonter l'échantillon de son support – cf. Figure 5.10.

5.3.1.1 Caractérisation spectrale

Le signal de référence permettant de contrôler la présence du Im-AF647 est produit par une excitation à 633 nm, et détecté à l'aide du spectrophotomètre de notre montage optique – section 2.4.1.4. Un filtre passe-haut sélectionnant les longueurs d'ondes $\lambda \geq 500$ nm est placé sur le chemin optique. Les spectres résultant de cette expérience sont tracés sur la Figure 5.11.



L'irradiance d'illumination de contrôle à $\lambda = 633$ nm est d'environ 1 W/cm^2 , pour un temps d'acquisition $t_{acq} = 1$ s. Les spectres tracés sont le résultat d'une moyenne de 25 spectres. Pour une excitation à 458 nm, on enregistre des spectres du même type mais cette fois pour des valeurs d'irradiance entre 0,05 et $4,5 \text{ W/cm}^2$. Le rinçage est réalisé par la solution de tampon Hepes déjà décrite en section 5.1.2.2.

24. Et par conséquent, comment mettre en œuvre le ligand His-RGD.

25. Présenté en section 2.4. La fenêtre de détection du FRET F_A sélectionne la gamme spectrale $\lambda = 672\text{-}696$ nm.



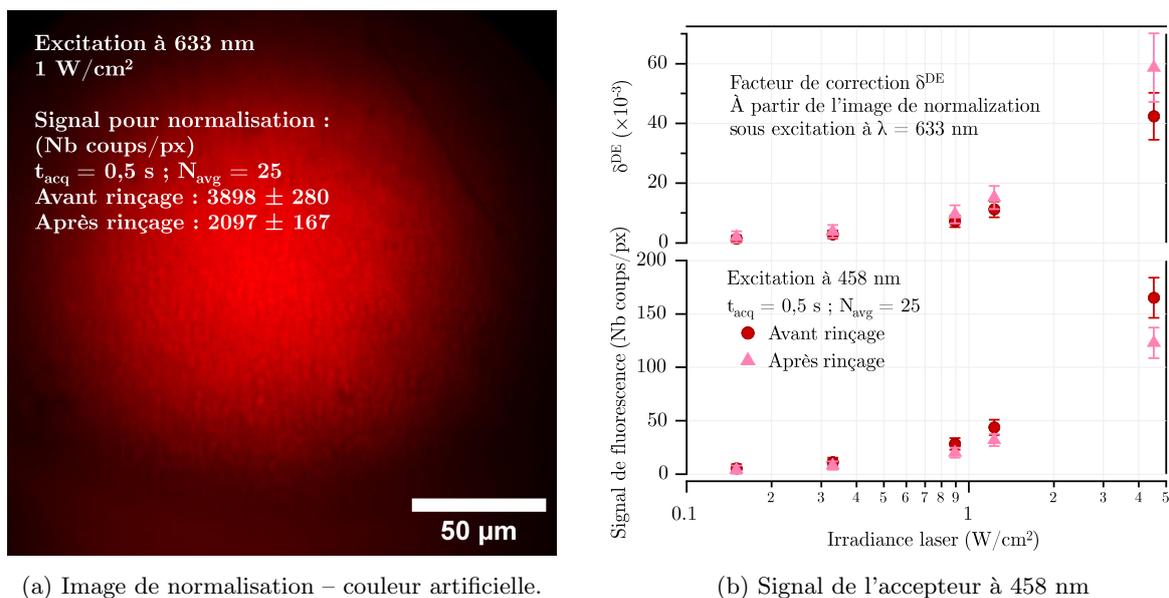
FIGURE 5.10 – Schéma du dépôt de Im-AF647 sur lamelle de verre avec puits de PDMS.

FIGURE 5.11 – Caractérisation spectrale du signal de l'accepteur Im-AF647 déposé à $100 \mu\text{M}$ sur du verre.

Le domaine d'irradiance propice aux mesures FRET correspond alors au cas où l'on ne détecte pas de signal issu de l'excitation directe de l'accepteur, que ce soit avant ou après rinçage de la solution de Im-AF647. Une irradiance d'environ 1 W/cm^2 à 458 nm semble définir cette limite.

5.3.1.2 Caractérisation sur la caméra

Sur le plan de l'imagerie TIRF, on réalise le même type de mesures, si ce n'est que le temps d'acquisition des images vaut $0,5 \text{ s}$, et que le signal est enregistré à travers la fenêtre de détection centrée à $684 \pm 14 \text{ nm}$. La Figure 5.12 synthétise les résultats de cette expérience.



(a) Image de normalisation – couleur artificielle.

(b) Signal de l'accepteur à 458 nm

Les valeurs présentées sont préalablement corrigées par le bruit d'obscurité de la caméra (*dark count*) qui, dans cette situation, s'élève à 109 ± 2 coups/px. À $\lambda = 458 \text{ nm}$, pour une irradiance de $0,9 \text{ W/cm}^2$, on enregistre 28 ± 6 coups/px avant rinçage et 20 ± 5 coups/px après. Le facteur de correction δ^{DE} est défini par l'Éq. (2.2.20).

On constate un nombre de coups/px dépassant le bruit d'obscurité de la caméra relativement faible à toutes les irradiances à 458 nm . Atteindre une parfaite absence de signal d'excitation directe est cependant difficile, sauf pour une irradiance d'environ $0,06 \text{ W/cm}^2$. Comme on l'a présenté en section 2.2.3.2, réaliser de l'imagerie NEF quantitative à partir de l'émission de l'accepteur nécessite de disposer d'un facteur de correction permettant de relier le signal émis sous excitation à 633 nm au signal d'excitation directe (DE) obtenu à 458 nm dans la fenêtre de détection du FRET. Le résultat du calcul²⁶ de ce facteur δ^{DE} est donné dans la partie supérieure de la Figure 5.12 (b).

FIGURE 5.12 – Caractérisation du signal d'excitation directe à 458 nm de l'accepteur Im-AF647 sur la caméra, déposé à $100 \mu\text{M}$ sur du verre.

26. Défini dans le cadre méthodologique QuantI-FRET – section 2.2.3.2.

5.3.2 COMPÉTITION ENTRE CHÉLATION ET ADSORPTION RÉSIDUELLE

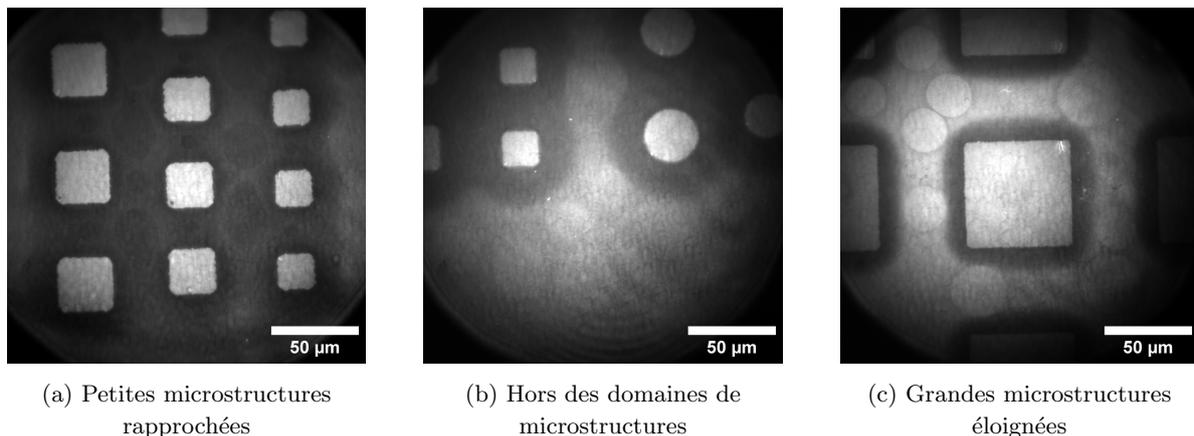
Le deuxième élément que nous souhaitons étudier est la manière dont le ligand Im-AF647 se dépose sur nos surfaces microstructurées. Différents essais successifs ont permis d'identifier l'intervalle de concentrations $1\text{-}100 \mu\text{M}$ comme particulièrement pertinent. Sur une surface

donnée de boîtes quantiques, un recouvrement homogène de la surface est quasiment instantané même à 1 μM . De plus, pour une concentration donnée, le dépôt ne semble pas vraiment évoluer en fonction du temps d'incubation. C'est donc le paramètre de la concentration qu'il faut ajuster.

5.3.2.1 Adsorption résiduelle autour des microstructures

Comme le montre la Figure 5.13, le bloc fonctionnel de 26 sulfobétaines présent dans la structure du ligand Im-AF647 ne parvient pas à minimiser l'adsorption résiduelle sur le verre comme nous l'avions espéré. La Figure 5.13 (a) illustre un cas typique pour des microstructures rapprochées, de taille entre 20 et 30 μm . Sous excitation à $\lambda = 633 \text{ nm}$, le signal détectable en dehors des microstructures de boîtes quantiques²⁷ vaut typiquement la moitié de celui émis au sein les micro-motifs de QDs. Ce résultat ne dépend ni de la densité en QDs des microstructures, ni de la concentration de la solution de Im-AF647 incubée.

27. Sur verre seul, donc.



Les images sont obtenues après incubation de 15 min du Im-AF647 puis rinçage au tampon Hepes. Des formes circulaires sont identifiables au niveau de la zone de dépôt du Im-AF647 sur le verre en (c). Il s'agit vraisemblablement de traces de séchage apparaissant lorsque trop de solvant est soustrait d'un coup lors de l'étape de rinçage.

Les images des Figures 5.13 (b) et (c) montrent de plus un phénomène inattendu : différents niveaux de dépôt sont observables autour des microstructures. En s'éloignant des micro-motifs, la densité du dépôt de Im-AF647 devient proche de ce qui peut être observé sur les microstructures elles-mêmes. Dans le cas des micro-motifs de grande taille, la zone déplétée suit la forme des microstructures, ce qui suggère l'existence d'une compétition entre l'attraction sur les QDs et sur le verre. Quel que soit le détail des interactions mises en jeu, l'objectif de mon travail était de trouver le moyen de passer la surface de verre, de façon à minimiser – voire empêcher complètement – l'adsorption autour des microstructures, sans pour autant entraver la fonctionnalisation des boîtes quantiques elle-même²⁸.

FIGURE 5.13 – Démonstration de l'adsorption résiduelle autour des microstructures de QDs par imagerie TIRF à 633 nm.

28. Le but étant de pouvoir déposer le His-RGD le plus spécifiquement possible sur les boîtes quantiques pour réaliser du *micropatterning* cellulaire.

5.3.2.2 Échec de la passivation avec la BSA

Nous avons en premier lieu testé l'albumine de sérum bovin (BSA). Il s'agit d'une protéine très utilisée en biologie. Ses propriétés de passivation de surfaces sont couramment utilisées pour les tests ELISA [317], *Western Blot* [318], ou PCR [319]. La période récente a aussi vu émerger son usage pour des biocapteurs en microfluidique [320], ainsi que pour la stabilisation et passivation de nanoparticules, essentiellement pour des applications médicales [321, 322].

Pour cette expérience, une lamelle contenant des micro-motifs de QDs est d'abord incubée 1 h avec une solution de BSA²⁹ diluée à 1% dans une solution tampon de PBS³⁰, puis rincée à l'eau distillée. On réalise ensuite une incubation de 10 min avec une solution de ligand Im-AF647 à 1 μ M. Après rinçage au tampon Hepes, les images obtenues sont données Figure 5.15. On peut constater l'obtention d'un résultat contraire à ce qui est souhaité : il semble n'y avoir aucun dépôt de Im-AF647 sur les boîtes quantiques, tout est adsorbé sur le verre. Cela peut s'expliquer par la capacité de la BSA à former des complexes de coordination avec le cuivre ou le zinc, comme en témoignent les travaux de Lee *et al.* [323].

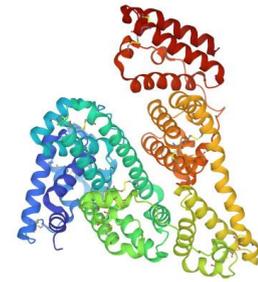
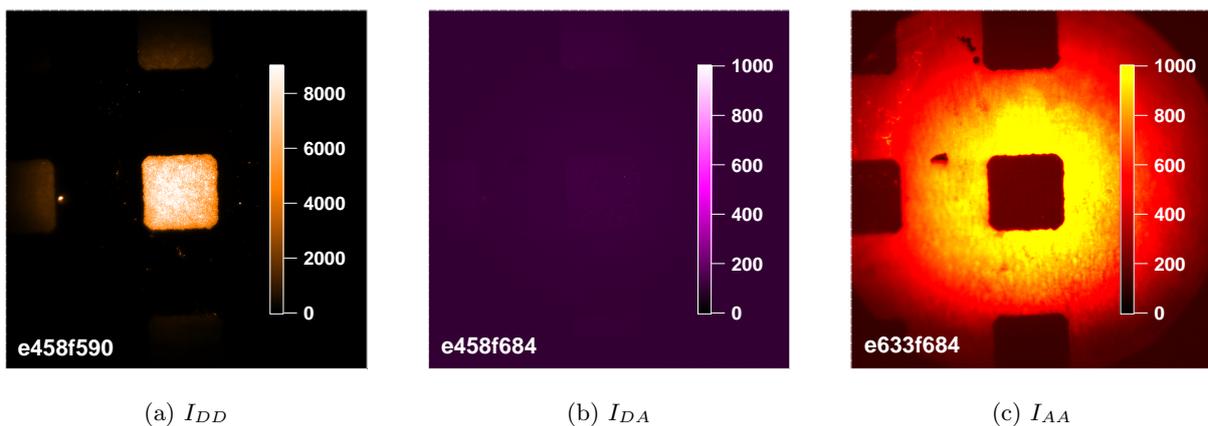


FIGURE 5.14 – Structure de la BSA, déterminée par diffraction aux rayons X. Extrait de [315] citant [316].

29. A3803-10G, Sigma.

30. *Phosphate-buffered saline* : 20010-019, Gibco.



Les images (couleurs artificielles) sont issues d'une moyenne de 25 acquisitions de 100 ms, où l'irradiance à 458 et 633 nm – indiquées par e458 et e633 – valent respectivement 4,5 et 3,8 W/cm². La lettre f indique la longueur d'onde sur laquelle la fenêtre de détection est centrée. Les signaux I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} sont été définis chapitre 2, section 2.2.3.2.

Si cette expérience n'a pas permis de montrer l'utilité de la BSA pour passiver nos surfaces de manière à promouvoir exclusivement l'adsorption sur les microstructures de QDs, elle corrobore l'affirmation que le ligand Im-AF647 – lorsque c'est possible – se lie avec les boîtes quantiques de manière spécifique par chélation. Ici, la BSA chélate les atomes de zinc en surface des boîtes quantiques, ce qui "interdit" la présence de Im-AF647 sur les QDs. On peut cependant noter que la passivation des boîtes quantiques par la BSA n'est pas totale : il existe bien un faible signal I_{AA} , autour de 200 coups/px, au niveau de la zone correspondant au micro-motif de QDs. À cela correspond un très léger signal I_{DA} , autour de 130 coups/px, sur la fenêtre de détection du FRET.

FIGURE 5.15 – Signal détecté à 458 et 633 nm, dans les différentes conditions d'intérêt d'une étude NEFI. Motifs de 40 μ m de côté.

5.3.2.3 Passivation des surfaces à l'aide de PEG

Pour passiver nos surfaces et éviter l'adsorption du ligand Im-AF647, nous avons finalement utilisé des molécules de PLL-g-PEG. Cette espèce chimique est un copolymère avec un squelette de poly-L-lysine (PLL) et des chaînes périphériques de poly-éthylène-glycol (PEG) connectées aux lysines – typiquement 1 lysine sur 3 ou 4. Le squelette de PLL, chargé positivement, se dépile par attraction électrostatique avec le verre chargé négativement³¹, tandis que les PEG s'étendent verticalement depuis la surface pour former une brosse polymère avec une haute densité – Figure 5.16. Le PLL-g-PEG est très utilisé en sciences de la vie depuis le début des années 90 [325], notamment pour bloquer l'adsorption non spécifique de protéines ou empêcher l'adhésion cellulaire. Il peut aussi être fonctionnalisé par un fluorophore ou une molécule d'intérêt impliquée dans des phénomènes biologiques [324]. Dans mon travail, j'ai utilisé le PLL-g-PEG³² dilué en solution à 0,15 ou 0,3 mg/mL – pas de différence observée – dans un solvant Hepes à 10 mM, avec du NaCl à 150 mM et à un pH $\sim 7,4$.

Pour mettre en évidence l'effet de cette molécule, j'ai comparé 2 surfaces microstructurées de QDs issues d'un même lot de lamelles fonctionnalisées. Un puit de PDMS est ajouté pour réaliser les différentes étapes d'incubation et de rinçage³³. La passivation ciblée du verre obtenue par le PLL-g-PEG est testée en incubant une des lamelles pendant 1 h, que l'on rince ensuite à l'eau distillée. On ajoute alors une solution de Im-AF647 à 10 μM sur les 2 lamelles, pour une incubation de 30 min, puis un rinçage au tampon Hepes, qui sert ensuite de milieu pour les observations sur le montage expérimental TIRF. Notre hypothèse de travail est que le PLL-g-PEG se dépose essentiellement sur le verre, autour et entre les boîtes quantiques, de telle manière à ce que les brosses PEG repoussent les ligands Im-AF647 sauf au niveau des QDs elles-mêmes, comme l'illustre schématiquement la Figure 5.17.

La comparaison expérimentale entre la surface passivée avec le PLL-g-PEG et la surface témoin est présentée en Figure 5.18. Sans PLL-g-PEG, on observe ce que l'on a constaté précédemment, i.e. une forte adsorption du ligand Im-AF647 sur et autour des microstructures de QDs, avec la présence d'une zone intermédiaire déplétée – cf. Figure 5.18 (a). Refaire un cycle d'incubation d'une solution de Im-AF647 (ici à 50 μM) et un rinçage ne modifie pas cette répartition spatiale, comme le montre la Figure 5.18 (b). L'adsorption supplémentaire obtenue est uniforme, comme le traduit l'augmentation du signal sous illumination à 633 nm, qui est multiplié par 1,5 en moyenne.

Par contre, l'incubation de PLL-g-PEG – Figures 5.18 (c) et (d) – joue bien le rôle attendu : l'adsorption non spécifique du ligand autour des QDs est largement supprimé. Ce phénomène se caractérise par une quasi-disparition du signal du ligand autour des micro-motifs et une diminution du signal à l'intérieur de ces derniers, liée au fait que les QDs n'occupent pas l'entièreté de l'espace disponible³⁴. Le signal hors des micro-motifs vaut typiquement 15 à 20 % du signal capté au niveau des microstructures³⁵, d'après la Figure 5.18 (d). Reproduire sur

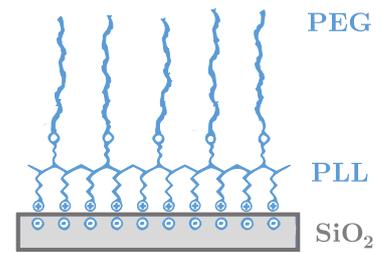


FIGURE 5.16 – Schéma de l'adsorption de PLL-g-PEG sur lamelle de verre. Adapté de [324].

31. Par exemple : le verre activé par nettoyage Piranha ou Plasma-Air présente des groupements silanol SiOH.

32. PLL(20)-g(3.5)-PEG(2), SuSoS.

33. Suivant le modèle présenté en section précédente *via* la Figure 5.10.

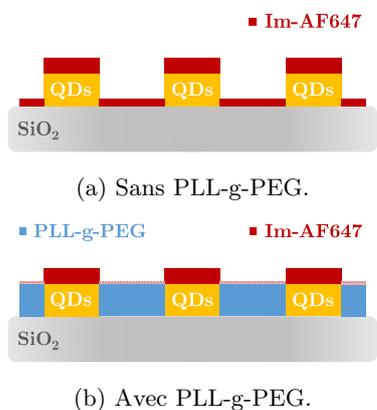
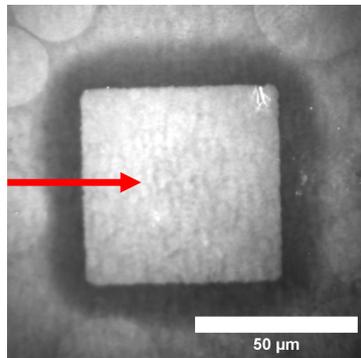


FIGURE 5.17 – Schéma de la passivation du substrat avec du PLL-g-PEG.

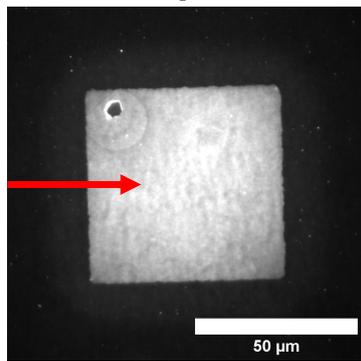
34. Comme nous l'avons caractérisé au chapitre précédent, on peut estimer la compacité de notre monocouche à environ 30 %.

35. Contre 50 à 100 % sans PLL-g-PEG, selon la distance par rapport au micro-motif.

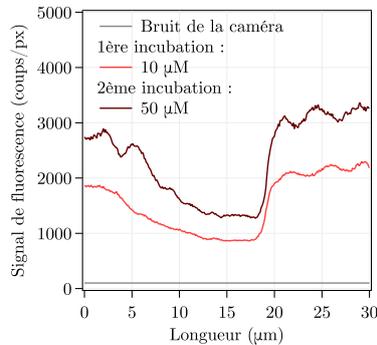
cette surface passivée le test d'une seconde incubation de Im-AF647³⁶ permet de constater une augmentation non-uniforme de l'adsorption spécifique et non-spécifique : le signal du ligand Im-AF647 est multiplié par 1,25-1,40 sur les microstructures, contre une augmentation de 1,60-1,80 sur le verre, ce qui suggère une limite à la robustesse de la passivation.



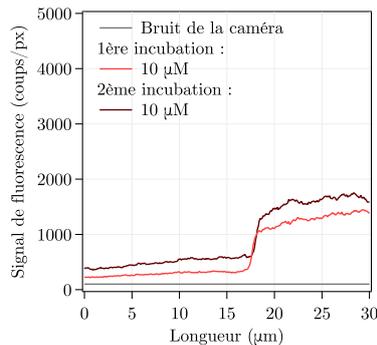
(a) Im-AF647 sur surface sans PLL-g-PEG



(c) Im-AF647 sur surface avec PLL-g-PEG



(b) Profil horizontal sans PLL-g-PEG



(d) Profil horizontal avec PLL-g-PEG

La passivation fournie par l'incubation des surfaces avec la molécule de PLL-g-PEG permet cependant d'obtenir des images bien contrastées, comme l'atteste la Figure 5.18 (c). La vérification que ce niveau de passivation est suffisant pour permettre le *micropatterning* cellulaire sur les microstructures de QDs sera présentée dans le chapitre suivant.

5.3.3 MISE EN ÉVIDENCE DU FRET SUR LES MICROSTRUCTURES

Nous devons introduire ici différentes notations permettant de qualifier précisément les conditions d'observation dans les expériences qui suivent :

- [D] : Les QDs, jouant le rôle de donneur FRET, sont seules.
- [DA] : Les donneurs FRET sont mis en présence d'accepteurs FRET (dans ce chapitre, le ligand Im-AF647).
- [DAI] : Les surfaces [DA] ont subi un rinçage à l'aide d'une solution d'imidazole à 2 M.

36. Ici de nouveau à 10 μM , plutôt que 50.

FIGURE 5.18 – Passivation des surfaces à l'aide du PLL-g-PEG.

(a) et (c) Images TIRF obtenues à partir de la moyenne de 25 acquisitions dans les conditions suivantes :
Excitation à 633 nm
Irradiance = 2 W/cm²
 $t_{acq} = 500$ ms

La flèche en (a) et (c) indique la position du profil réalisé permettant de respectivement obtenir (b) et (d). La ligne grise en (b) et (d) correspond au bruit d'obscurité de la caméra.

L'ajout la lettre **R** à la fin des sigles précédents signifie que la surface a été rincée avec le tampon Hepes, 5 fois de suite. Pour chacune des conditions, j'ai imagé les surfaces dans 3 configurations différentes :

- **e458f590** : l'excitation est à 458 nm et le signal est enregistré à travers la fenêtre de détection F_D centrée à 590 ± 20 nm, ce qui correspond au signal I_{DD} ciblant l'excitation des QDs et leur émission.
- **e458f684** : l'excitation est à 458 nm et le signal est enregistré à travers la fenêtre de détection F_A centrée à 684 ± 14 nm, ce qui correspond au signal I_{DA} associé au FRET.
- **e633f684** : l'excitation est à 633 nm et le signal est enregistré à travers la fenêtre de détection F_A centrée en 684 ± 14 nm, ce qui correspond au signal I_{AA} résultant de l'excitation et l'émission de l'accepteur.

5.3.3.1 Méthode expérimentale

Plusieurs méthodes ont été explorées avant de fixer celle qui est présentée dans cette section. Les premiers tests nous ont permis de mettre en évidence l'importance des ligands His-RGD et Im-AF647. Au chapitre précédent³⁷, j'ai montré qu'ils modifient favorablement le comportement de photo-émission des monocouches de QDs obtenues à partir des QDs[**TOP**] et QDs[**MPA**], en promouvant la photo-activation des QDs en milieu aqueux. Ainsi, lors des acquisitions en situation [D], il est nécessaire d'avoir déjà réalisé l'échange de ligands [TOP/MPA] \rightarrow [His-RGD], de manière à ne pas fausser la comparaison avec les situations [DA] et [DAI] lorsque celles-ci étaient étudiées successivement sur le même groupe de micro-motifs. Considérant la stabilisation de la photoluminescence des QDs permise par le ligand His-RGD ; la possibilité d'effectuer l'échange de ligands His-RGD \rightarrow Im-AF647 par simple incubation à haute concentration de ce dernier ; ainsi que la robustesse de notre protocole de microstructuration donnant lieu à des micro-motifs de densité homogène sur une même lamelle, nous avons finalement mis en œuvre la méthode suivante :

- Une unique lamelle à micro-motifs de QDs est étudiée³⁸. L'ajout d'un puit de PDMS autour des microstructures permet de les étudier successivement³⁹ dans les différentes conditions suivantes.
- Les microstructures de QDs sont incubées 1 h avec le PLL-g-PEG à 0,3 mg/mL, rincées à l'eau distillée, puis incubées 10 min avec une solution de His-RGD à 1 μ M, rincée au tampon Hepes. La situation [D] est ensuite caractérisée spectralement et par imagerie en milieu Hepes.
- Afin de garantir l'échange de ligands His-RGD \rightarrow Im-AF647, le tampon Hepes est remplacé par une solution hautement concentrée de Im-AF647 à 100 μ M. Cette situation [DA] est caractérisée, puis l'on rince avec le tampon Hepes pour aboutir à la situation [DAR] qui fait l'objet de la même caractérisation que précédemment.

37. cf. Figure 4.15

38. Pour éliminer la contribution d'inhomogénéité de la densité surfacique de QDs entre lamelles, évaluée à 5-10 % en partie 4.1.4.2.

39. Sans démonter l'échantillon de son support.

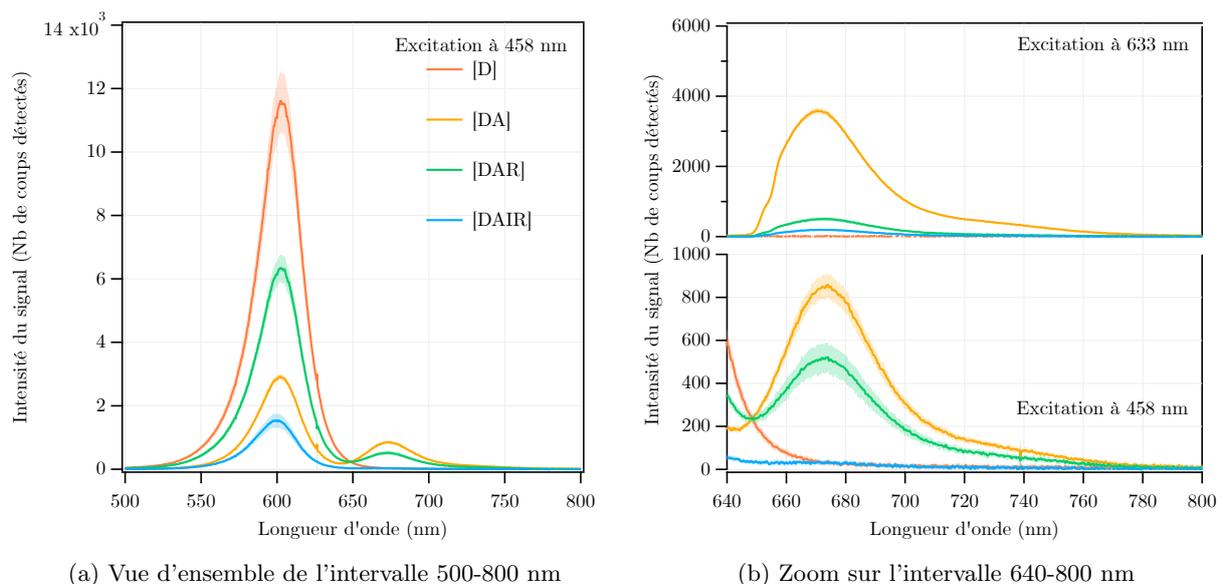
— La dernière situation à étudier, [DAIR], est obtenue en effectuant un lavage par de l'imidazole à 2 M (5 fois), puis un rinçage au tampon Hepes, avant d'incuber de nouveau les microstructures de QDs avec une solution de His-RGD à 1 μ M, rincée au tampon Hepes : l'idée étant de se rapprocher au maximum des conditions initiales en [D].

Dans chacune de ces conditions, la caractérisation spectrale est issue de l'étude de 10 microstructures de QDs sélectionnées aléatoirement sur l'échantillon, et dont les spectres sont moyennés de manière à pouvoir comparer quantitativement les différents cas. La caractérisation par imagerie sert d'expérience complémentaire, et est à chaque fois réalisée sur un micro-motif choisi au hasard⁴⁰. Avant chaque acquisition spectrale ou par imagerie, on illumine 1 min à 458 nm avec une irradiance de 4,5 W/cm², de manière à atteindre le plateau de photo-activation des QDs – Figure 4.15 – sans pour autant photo-dégrader les donneurs et/ou accepteurs.

40. Le caractère comparable de ces différents micro-motifs est établi *via* l'étude spectrale détaillée dans la section suivante.

5.3.3.2 Démonstration spectrale

Cette partie de l'expérience est issue d'une moyenne de 10 spectres par condition d'illumination (458 ou 633 nm), pour chaque situation [D], [DA], [DAR], et [DAIR]. Chaque spectre associé à une microstructure est le résultat d'une moyenne de 25 mesures successives d'une seconde. Les 10 spectres de micro-motifs de QDs associés à une situation et configuration d'excitation donnée sont ensuite moyennés pour aboutir aux différents résultats, présentés sur la Figure 5.19. Le signal observé entre 640 et 800 nm, après ajout du Im-AF647 puis rinçage de la solution d'incubation (situations [DA] et [DAR]) est ainsi attribuable sans ambiguïté au phénomène de FRET.



L'irradiance après l'étape de photo-activation est de 0,9 W/cm² à 458 nm et 1 W/cm² à 633 nm. Le spectre d'une microstructure est issu de la moyenne de 25 acquisitions de 1 s. Les spectres des 10 microstructures pour chaque condition sont moyennés (ligne pleine) et présentés avec l'écart-type (enveloppe).

FIGURE 5.19 – Démonstration spectrale du FRET sur microstructures de QDs.

L'expérience contrôle présentée en section 5.3.1.1 nous permet même de quantifier précisément la part du FRET dans le signal obtenu. En reprenant la notation QuanTI-FRET [143] présentée en section 2.2.3.2 :

- Pour la situation [DA] : on utilise le ratio des intégrales spectrales à 458 et 633 nm obtenues dans la situation contrôle de l'accepteur isolé [A] pour calculer le facteur $\delta^{DE} = 0,0079 \pm 0,0002$. On prédit donc un signal intégré d'excitation directe à 458 nm : 1156 ± 36 coups. On obtient le facteur $\alpha^{BT} = 0,013 \pm 0,003$ grâce à la situation [D], *via* le ratio du signal intégré sur l'intervalle 640-800 nm par rapport à l'intervalle 500-640 nm. On calcule ainsi un débordement spectral des donneurs sur l'intervalle 640-800 nm : 1539 ± 439 coups. L'intégrale spectrale du signal mesuré sous excitation à 458 nm, sur l'intervalle 640-800 nm, en situation [DA] vaut : 40421 ± 3464 coups. Si l'on corrige cette valeur par les contributions des bruits de fond estimées, on obtient que le FRET représente 93 ± 3 % du signal enregistré sur cet intervalle de longueurs d'onde.

$$\delta^{DE} \int_{640}^{800} I_{633nm}^{[DA]} d\lambda = 1156 \pm 36 \text{ coups}$$

$$\alpha^{BT} \int_{500}^{640} I_{458nm}^{[DA]} d\lambda = 1539 \pm 439 \text{ coups}$$

$$\int_{640}^{800} I_{458nm}^{[DA]} d\lambda = 40421 \pm 3464 \text{ coups}$$

- Pour la situation [DAR] : la variation de présence de l'accepteur demande de re-calculer le facteur de correction de l'excitation directe à 458 nm. Ici, $\delta_R^{DE} = 0,0086 \pm 0,0014$. Le fait que les valeurs δ^{DE} et δ_R^{DE} calculées soient si proches confirme que notre choix d'irradiance laser à 458 nm est pertinent. La contribution de l'excitation directe de l'accepteur est donc : 184 ± 29 coups. La valeur de α^{BT} ne dépend pas de la présence de l'accepteur, le débordement spectral des QDs vaut alors : 3348 ± 1064 coups. L'intégrale spectrale du signal mesuré sous excitation à 458 nm, sur l'intervalle 640-800 nm, en situation [DAR] vaut : 26581 ± 4008 coups. Le même processus de calcul que précédemment nous donne alors un signal FRET représentant 87 ± 10 % du signal enregistré sur cet intervalle de longueurs d'ondes.

$$\delta_R^{DE} \int_{640}^{800} I_{633nm}^{[DAR]} d\lambda = 184 \pm 29 \text{ coups}$$

$$\alpha^{BT} \int_{500}^{640} I_{458nm}^{[DAR]} d\lambda = 3348 \pm 1064 \text{ coups}$$

$$\int_{640}^{800} I_{458nm}^{[DAR]} d\lambda = 26581 \pm 4008 \text{ coups}$$

L'augmentation de l'incertitude provient de (a) la diminution et dispersion plus importante du signal sur l'intervalle 640-800 nm, et (b) la diminution du *quenching* de la photoluminescence des QDs, ce qui cause une multiplication par 2 du débordement spectral sur ce même intervalle. Le fait que l'on constate plus de *quenching* des boîtes quantiques et plus de FRET dans la situation [DA] que dans la situation [DAR] est attendu : dans la situation [DA] avant rinçage, il y a un réservoir important d'accepteurs sur la surface des QDs du fait de la haute concentration (100 μ M) utilisée. Le rinçage avec la solution tampon change l'équilibre thermodynamique et un nombre significatif de ligands Im-AF647 se désorbe de la surface des boîtes quantiques. On peut alors tenter d'estimer le nombre de ces derniers aux différentes étapes de cette expérience, de 2 manières : par comparaison avec les spectres obtenus en solution, ou en utilisant un modèle physique du FRET, comme celui des multiples accepteurs⁴¹.

On a tracé en Figure 5.7 (b) le ratio du signal accepteur/donneur en fonction du ratio accepteur/donneur. Les signaux utilisés correspondent aux intégrales spectrales de l'accepteur sur l'intervalle 640-800 nm et du donneur sur l'intervalle 500-640 nm, en solution. Les

41. Présenté dans le chapitre 2, section 2.2.1.3.

concentrations des mélanges en solution étant connues, on peut se servir de la courbe obtenue comme moyen de calibration pour cette expérience sur surfaces microstructurées. Dans la situation [DA], ce ratio vaut $0,36 \pm 0,05$, et $0,10 \pm 0,02$ pour la situation [DAR]. À l'aide du *fit* polynomial réalisé, on obtient, respectivement, les valeurs $n_{[DA]}^{A/D} = 3,3 \pm 0,4$ et $n_{[DAR]}^{A/D} = 1,0 \pm 0,2$. Autrement dit : au regard des spectres mesurés pour nos expériences sur surfaces, tout se passe comme si l'on avait entre 3 et 4 ligands Im-AF647 par QD lors de l'incubation à 100 μM , et seulement 1 ligand Im-AF647 encore accroché après rinçage.

Le modèle FRET à multiples accepteurs de Clapp *et al.* [114], dont la forme a été donnée par l'Éq. (2.2.12), peut être ré-arrangé sous la forme de l'Éq. (5.3.1), où $\chi = r/R_0$. Le rapport $n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D}$ donne l'Éq. (5.3.2) où χ n'apparaît plus. Dans notre situation expérimentale, l'efficacité moyenne du FRET peut être calculée à partir du *quenching* de la photoluminescence des QDs, cf. Éq. (2.2.11). Pour les situations [DA] et [DAR], ce calcul donne respectivement $75 \pm 9\%$ et $45 \pm 7\%$. On obtient alors $n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D} = 3,7 \pm 1$. Si cette méthode permet uniquement d'obtenir des proportions relatives d'accepteurs, on constate que la valeur donnée correspond bien à ce que l'on a estimé à partir du ratio A/D des intégrales spectrales.

Cela étant dit, ces résultats témoignent aussi de la solidité de l'accroche des ligands Im-AF647 aux QDs : comme dans les expériences en solution, il faut en effet nettoyer les surfaces avec de l'imidazole à 2 M pour constater la disparition du signal FRET – situation [DAIR]⁴². On constate de nouveau cet effet étonnant de l'inhibition des boîtes quantiques par l'imidazole, que l'on aurait pu attribuer à une perte de QDs causée par les rinçages successifs, si on ne l'avait pas aussi constaté durant nos expériences en solution – cf. Figure 5.8. Il semble donc clair qu'à un certain niveau, la présence d'imidazole pur à la surface des boîtes quantiques modifie leur photo-émission de façon délétère.

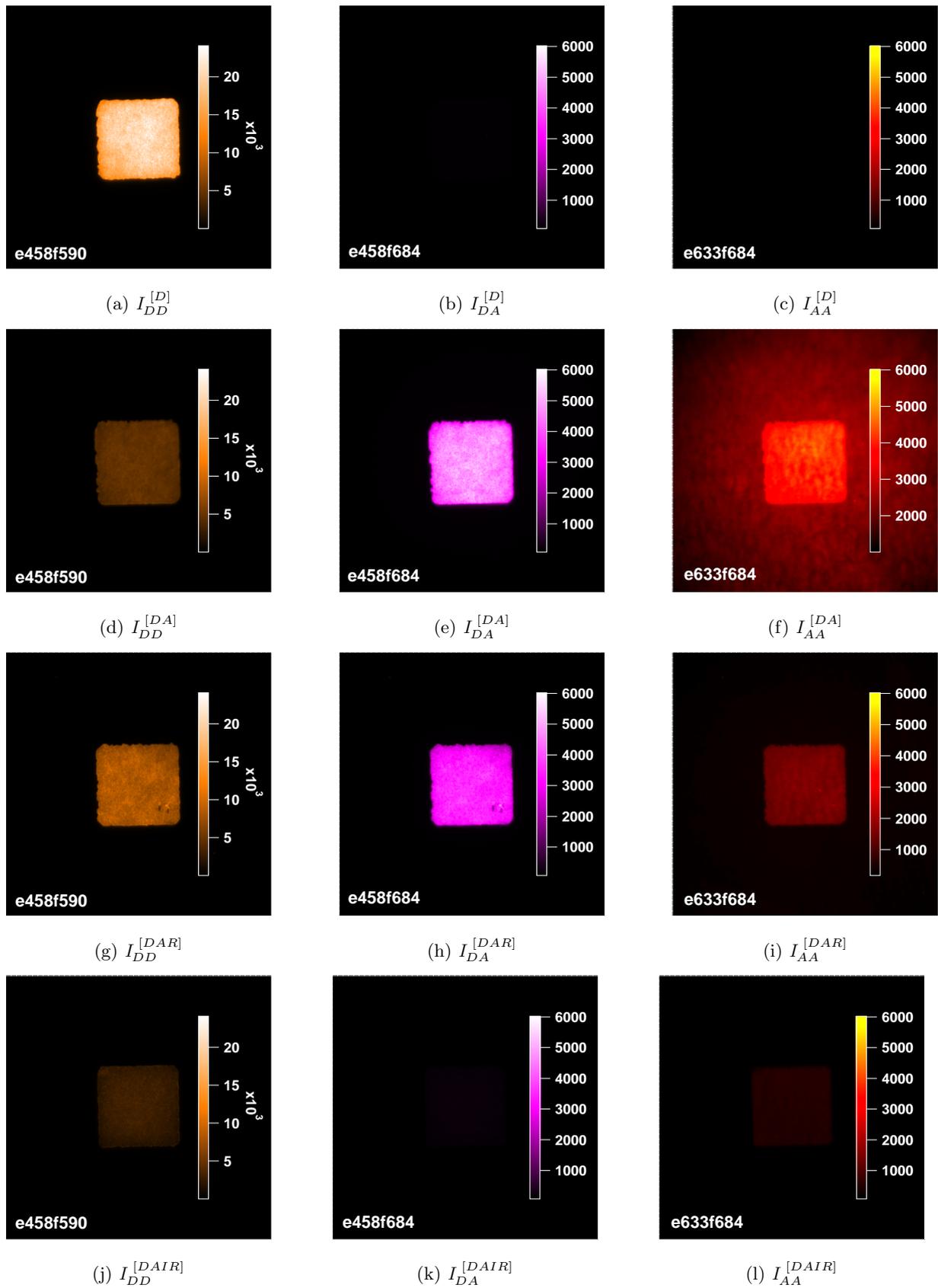
5.3.3.3 Démonstration par imagerie du FRET sur microstructures

Par imagerie, on utilise systématiquement des filtres passe-bande permettant de bien sélectionner les signaux du donneur et de l'accepteur. Les images obtenues sont issues de la moyenne de 25 acquisitions de 0,5 s. Les conditions d'illumination et de photo-activation restent inchangées. La Figure 5.20 récapitule les différentes images obtenues. Les résultats exposés dans la section précédente restent valables et ne nécessitent pas d'être répétés, à la différence que les filtres passe-bande permettent de considérablement augmenter le rapport signal sur bruit de la détection du FRET, comme je vais le montrer. On peut cependant relever que l'imagerie permet ici de confirmer l'apport du PLL-g-PEG pour la passivation des surfaces : après rinçage de la solution de Im-AF647 – situation [DAR] – le signal émis hors des micro-motifs de QDs sous excitation à 633 nm est indétectable à l'œil – Figure 5.20 (i) – alors même que la forte concentration de 100 μM avait induit une très forte présence du ligand, détectable en situation [DA] – Figure 5.20 (f).

$$E_{MA} = \frac{1}{1 + \frac{\chi^6}{n^{A/D}}} \quad (5.3.1)$$

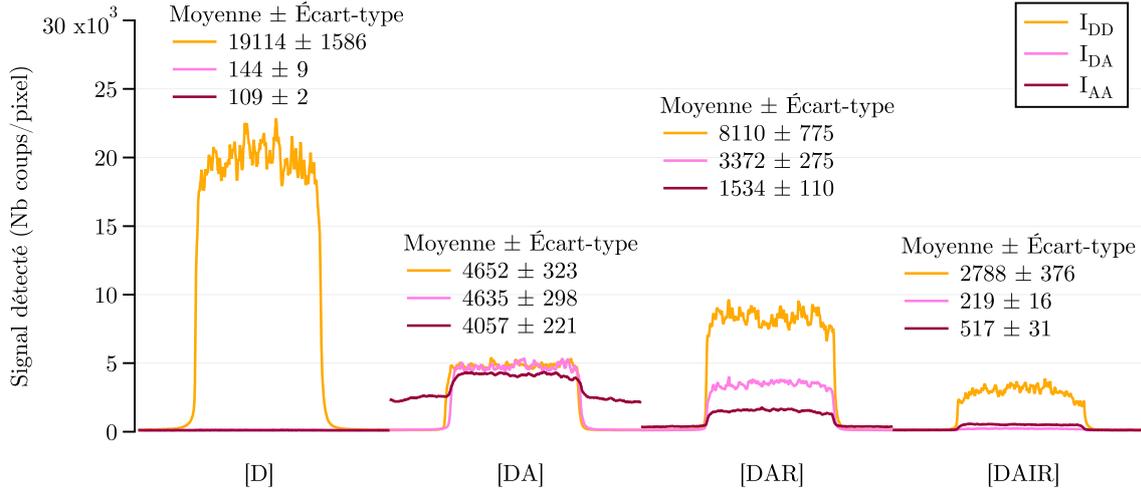
$$\frac{n_{[DA]}^{A/D}}{n_{[DAR]}^{A/D}} = \frac{\frac{1}{E_{MA}^{[DAR]} - 1}}{\frac{1}{E_{MA}^{[DA]} - 1}} \quad (5.3.2)$$

42. Plusieurs itérations de cette expérience ont été réalisées jusqu'à ce que nous nous décidions à monter la concentration. Nos solutions d'imidazole initiales étaient de concentration d'environ 450 mM, mais cela n'avait essentiellement d'effet que sur les ligands Im-AF647 adsorbés sur le verre ou le PLL-g-PEG.



(a-c) Donneur seul [D]; (d-f) Donneur+Accepteur 100 μM [DA]; (g-i) Donneur+Accepteur après rinçage [DAR]; (j-l) Après rinçage à l'imidazole [DAIR]. Les couleurs sont artificielles.

FIGURE 5.20 – Images TIRF de motifs de 30 μm de côté, pour les différentes configurations d'observation et conditions de préparation.



Les valeurs moyennes et écarts-types sont obtenus à partir d'un ROI (*region of interest*) sur l'entièreté des micro-motifs en excluant les bords. $N \approx 7 \times 10^4$ pixels par motif. Les courbes tracées à partir de profils des images servent à illustrer les variations des signaux.

Pour pousser plus loin l'analyse, et préciser l'intérêt du dispositif d'imagerie par rapport à l'étude spectrale, il est nécessaire de procéder à une analyse quantitative en extrayant, à partir des images originales, les valeurs des pixels associés aux microstructures pour chaque configuration d'acquisition, dans les différentes situations de [D] à [DAIR]. Ces données sont compilées Figure 5.21, avec les profils de micro-motifs correspondants à titre d'illustration. Après correction du bruit propre de la caméra⁴³, on peut se placer dans le cadre QuantI-FRET pour déterminer la proportion de FRET attribuable au signal I_{DA} . La situation [D] permet⁴⁴ d'établir la valeur du facteur de correction $\alpha^{BT} = 0,0018 \pm 0,0006$. Pour chaque situation [DA], [DAR], et [DAIR], on trouve alors les valeurs effectives $\alpha^{BT} I_{DD}^{[i]}$ correspondant au débordement spectral des QDs enregistré dans la fenêtre de détection du FRET. Ces valeurs, qu'on doit retrancher au signal I_{DA} , sont rassemblées dans la Table 5.1 ci-dessous. Parallèlement, on peut utiliser l'expérience contrôle présentée en section 5.3.1.2 pour construire une prédiction du signal d'excitation directe de l'accepteur à 458 nm, pour une irradiance de $0,9 \text{ W/cm}^2$. Les facteurs de correction δ^{DE} pour les situations avant et après rinçage de la solution d'incubation, présentés en Figure 5.12 (b), valent respectivement $0,007 \pm 0,002$ et $0,010 \pm 0,0030$. Les signaux $\delta^{DE} I_{AA}^{[i]}$, à retrancher au signal I_{DA} , sont eux aussi compilés dans la Table 5.1.

$\alpha^{BT} I_{DD}^{[i]}$ moyen ± écart-type	DA	DAR	DAIR
En Nb coups/px	8 ± 3	15 ± 6	5 ± 2
En (%) du signal I_{DA}	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$
$\delta^{DE} I_{AA}^{[i]}$ moyen ± écart-type	DA	DAR	DAIR
En Nb coups/px	29 ± 9	14 ± 5	4 ± 2
En (%) du signal I_{DA}	$0,6 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$3,5 \pm 1,2$

FIGURE 5.21 – Quantification des signaux enregistrés sur les micro-motifs de QDs présentés Figure 5.20

43. De valeur 109 ± 2 coups/px

44. Via les signaux :

$$I_{DD}^{[D]} = 19276 \pm 1427 \text{ coups/px}$$

$$I_{DA}^{[D]} = 36 \pm 9 \text{ coups/px}$$

TABLE 5.1 – Valeurs des signaux de débordement spectral des QDs dans la fenêtre de détection de l'accepteur FRET et des signaux d'excitation directe de l'accepteur Im-AF647.

Nous pouvons donc corriger les signaux bruts I_{DA} de manière adéquate, c'est-à-dire de façon à quantifier la proportion de signal FRET I_{DA}^{corr} pour les différentes étapes expérimentales. Ces résultats sont présentés dans la Table 5.2, et permettent de démontrer la pertinence de nos choix de paramètres d'illumination, d'acquisition, comme de la sélection spectrale réalisée par nos fenêtres de détection : le signal enregistré provient ici quasi-exclusivement du FRET.

Signal moyen \pm Écart-type	DA	DAR	DAIR
En Nb coups/px	4506 ± 296	3247 ± 280	103 ± 19
En (%) du signal I_{DA}	$99,2 \pm 0,3$	$99,1 \pm 0,4$	$92,1 \pm 4,5$

Comme dans la section précédente, il est possible de déterminer une valeur d'efficacité du FRET, tout d'abord une nouvelle fois à partir du signal des QDs. Par cette méthode, on obtient $E = 76 \pm 11$ % en situation [DA] et $E = 58 \pm 10$ % en situation [DAR], ce qui est proche des résultats issus de l'analyse spectrale. Il faut aussi noter qu'ici, l'écart-type sur les valeurs d'efficacité du FRET rend compte de la variation locale pour chaque pixel de l'image d'un motif de QDs de surface $\sim 30 \times 30 \mu\text{m}^2$, tandis que les calculs à partir des données spectrales concernent une surface d'acquisition environ 3 fois inférieure, mais intègrent une variabilité inter-motifs. Le calcul de $n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D}$ à partir de l'Éq. (5.3.2) donne une valeur de $2,3 \pm 0,7$. La robustesse de la méthode de calcul de l'efficacité du FRET par le *quenching* des donneurs peut varier selon les contextes expérimentaux [135]. La concordance empirique globale ici observée peut s'expliquer par la conjonction de plusieurs facteurs favorables⁴⁵ – en plus de l'absence de facteurs de confusion pouvant mener à un *quenching* parasite des donneurs.

5.3.3.4 Comparaison avec l'approche QuanTI-FRET

Cela étant dit, j'ai également souhaité utiliser le formalisme QuanTI-FRET pour comparer ces résultats à une approche basée sur l'émission de l'accepteur. Idéalement, ce formalisme nécessite de réaliser une calibration à l'aide d'échantillons de stoechiométrie S connue et pour plusieurs distances D–A fixées [143], de manière à déterminer les facteurs de correction β^X et γ^M . N'ayant pas de tels échantillons de calibrations – qui doivent être basés sur le même couple FRET – j'ai plutôt tenté d'estimer directement ces facteurs de correction à partir des données instrumentales et photo-physiques, que nous pouvions mesurer. En effet, si l'on se réfère aux équations (2.2.21) et (2.2.22)⁴⁶, γ^M dépend des rendements quantiques de l'accepteur (Im-AF647) et du donneur (les QDs utilisés), ainsi que de l'efficacité de détection des différents canaux. Le facteur β^X est construit à partir des intensités d'excitation aux différentes longueurs d'onde, et des sections efficaces d'absorption. Toutes ces grandeurs nous sont accessibles avec plus ou moins de précision, et peuvent faire l'objet d'une estimation préalable.

TABLE 5.2 – Valeurs corrigées des signaux I_{DA}^{corr} correspondant au FRET.

45. On a en effet montré :
 (a) que la distribution spectrale suggérait une configuration donneur : accepteur telle que l'on se situe dans l'intervalle entre 10 : 1 et 1 : 10, ce qui est requis pour faire du FRET quantitatif [135];
 (b) que les données spectrales comme d'imagerie témoignent d'une répartition homogène des donneurs comme de l'accepteur sur l'ensemble des micro-motifs d'une lamelle;
 (c) que notre dispositif expérimental et les paramètres d'illumination choisis permettent une bonne spécificité dans l'imagerie des QDs et du Im-AF647, comme en témoigne la Table 5.2.

46. Voir section 2.2.3.2.

À partir de la courbe de rendement quantique de notre caméra, que l'on intègre sur les bandes spectrales de nos fenêtres de détection, on peut estimer le rapport des efficacités de détection⁴⁷. Il est connu que la présence d'une interface diélectrique influence fortement le rendement quantique de nos émetteurs, mais les facteurs de correction à appliquer peuvent être postulés très proches pour le donneur et l'accepteur. Sachant que c'est le ratio des rendements quantiques qui intervient dans la définition de γ^M , et à défaut de pouvoir mesurer précisément le rendement quantique *in situ*, nous prenons les valeurs de ϕ en solution pour ce calcul. Pour les QDs, la moyenne déterminée au chapitre 3, section 3.2.3.4, est de 79 %. Concernant l'Alexa Fluor 647, nous prenons la valeur de référence (33 %), en l'absence d'autres éléments. On obtient alors $\gamma^M \approx 0,464$.

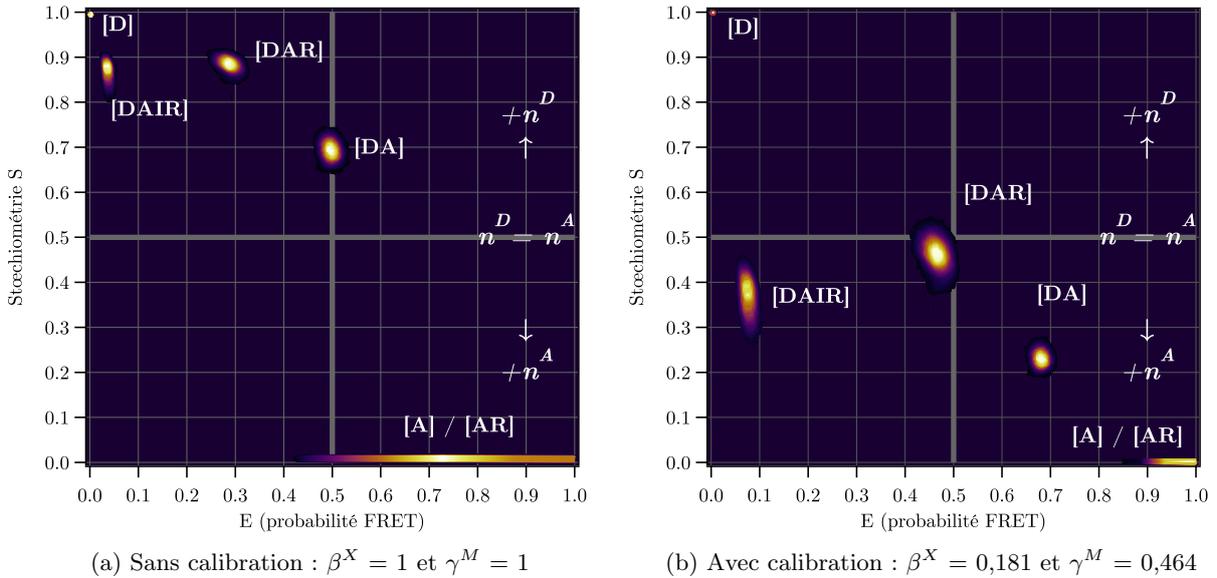
Les valeurs d'irradiance laser sont connues – chapitre 2, section 2.4.2.1. Le rapport des sections efficaces d'absorption peut être estimé à partir du rapports des valeurs d'extinction molaires aux longueurs d'onde d'excitation du montage optique. Ces valeurs ont été mesurées à partir de spectres d'absorption réalisés avec des solutions de concentration connue. Là encore, σ est fortement modifiée au voisinage d'une surface, pour les mêmes raisons que ϕ . Mais β^X faisant intervenir le rapport des sections efficaces d'absorption, on peut tout de même tenter d'estimer ce facteur. On obtient ainsi $\beta^X \approx 0,181$.

Le dispositif expérimental et les espèces chimiques mises en jeu étant identiques pour les situations de [D] à [DAIR], ces valeurs restent constantes. On peut alors calculer les distributions de E et S à partir des équations (2.2.25) et (2.2.26) et tracer les valeurs de S en fonction de E – Figure 5.22.

47. Les données constructeur de nos filtres, indiquées dans le chapitre 2, section 2.4.1.4, annoncent un même taux de transmission (93 %) pour leurs fenêtres spectrales respectives. J'admetts cela pour simplifier mes calculs.

$$\gamma^M = \frac{\phi_A \cdot \eta_{A\det}^{Aem}}{\phi_D \cdot \eta_{D\det}^{Dem}} = \frac{0,33 \cdot 1,00}{0,79 \cdot 0,90} \approx 0,464$$

$$\beta^X = \frac{\frac{L_A}{h\nu_A} \cdot \sigma_{A\det}^A}{\frac{L_D}{h\nu_D} \cdot \sigma_{D\det}^D} = \frac{\frac{1,013}{0,893} \cdot 160854}{\frac{1,013}{0,893} \cdot 729862} \approx 0,181$$



Comme attendu, le tracé sans calibration donne des valeurs complètement différentes de ce que nous avons obtenu par l'analyse spectrale ou par imagerie. À l'inverse, après calibration, les distributions de valeurs de E et S sont cohérentes avec nos précédents résultats.

FIGURE 5.22 – Distributions de $S(E)$ pour les différentes situations expérimentales.

	DA	DAR
E (%)	$68,1 \pm 0,9$	$46,6 \pm 1,5$ %
S	$0,23 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,02$
$n^{A/D}$	$3,34 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,04$

Les valeurs d'efficacités du FRET – Table 5.3 – sont situées à la bordure inférieure de l'écart-type de nos précédents calculs. Cette baisse de l'efficacité estimée peut être associée à une sur-estimation de γ^M , essentiellement causée par une sous-estimation de ϕ_D et/ou une sur-estimation de ϕ_A . La réduction de l'écart-type dans cette approche est quant à elle liée au fait que le calcul avec calibration de E est réalisé pixel par pixel. Or, d'après nos résultats d'imagerie, les donneurs comme les accepteurs sont répartis de façon plutôt homogène. De plus, les distances D–A devraient par construction être relativement identiques. Il est donc plutôt logique d'observer de faibles variations de E ⁴⁸. Les valeurs moyennes de S sont converties en valeurs de $n^{A/D}$ à l'aide de l'Éq. (2.2.26). On constate une grande cohérence avec nos estimations faites à partir des spectres⁴⁹. L'estimation faite de $n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D} = 2,3 \pm 0,7$, à partir des calculs d'efficacité du FRET basés sur les valeurs de *quenching* des donneurs obtenues par imagerie, est centrée sur une valeur légèrement plus basse que nos autres estimations mais reste proche. On peut associer ce léger décalage à la valeur de $E_{[DAR]} = 58 \pm 10$ % obtenue de cette façon, elle aussi légèrement différente. La légère asymétrie des spectres d'émission des QDs, et leur faible décalage vers le rouge entre la situation [D] et les situations [DA/DAR], auraient pu créer un biais affectant les valeurs de signal obtenues lors de la sélection spectrale réalisée pour l'imagerie. Cependant, si l'on re-calcule $E_{[DAR]}$ à partir des intégrales spectrales des QDs, sur l'intervalle 580-600 nm correspondant à notre fenêtre de détection, on retrouve le même résultat que le calcul réalisé précédemment sur l'intervalle 500-640 nm. Il ne s'agit donc pas de la source des légères différences constatées. Un phénomène de décrochage d'un certain nombre de donneurs, causée par les différents rinçages entre les situations de [D] à [DAIR], pourrait cependant expliquer cette valeur de E légèrement plus élevée lorsque calculée à partir du *quenching* des QDs.

Enfin, on constate aussi la présence de corrélations variables entre E - S . Avant calibration, cette corrélation est attendue, et les coefficients de Spearman R_S rapportés en Table 5.4 suggèrent qu'elle est faible en [DA] et modérée en [DAR]. Après calibration, elles deviennent très faible en [DA] et faible en [DAR], ce qui suggère⁵⁰ une pertinence réelle mais imparfaite de notre l'estimation de β^X et γ^M .

Avant calibration	DA	DAR	Après calibration	DA	DAR
R_S	-0,190	-0,436	R_S	-0,097	-0,35
p	0,007	0,007	p	0,007	0,007

TABLE 5.3 – Valeurs moyennes de E et S obtenues par QuanTI-FRET après calibration. $N \approx 7 \times 10^4$.

48. De par notre protocole expérimental, cela est possible uniquement par cette approche, où les signaux permettant de calculer E proviennent du même motif, avec la même aire d'extraction des valeurs de pixels. Par construction, le calcul de E à partir du *quenching* des donneurs donne des valeurs nécessairement plus dispersées ici, car nous observons un motif différent à chaque situation, de [D] à [DAIR].

49. Que ce soit par ratio des intégrales spectrales ou à partir des efficacités de FRET dans le cadre du modèle à multiples accepteurs.

50. La persistance d'une corrélation pourrait aussi s'expliquer par une répartition locale inhomogène des accepteurs sur les donneurs.

TABLE 5.4 – Évaluation de la corrélation entre les distributions E et S . $R_S \geq p$ indique la présence d'une corrélation ($|R_S^{max}| = 1$). $N \approx 7 \times 10^4$.

5.4 CONCLUSIONS SUR LES SURFACES ACTIVES POUR NEFI

Le ligand Im-AF647 a servi de plateforme de test pour démontrer la possibilité de mener une étude d'imagerie NEF. Les premières expériences, réalisées en solution, ont fourni des données aidant à la mise au point et l'interprétation de l'expérience de démonstration sur surfaces de QDs microstructurées. Les différentes configurations avec et sans accepteur FRET ont été caractérisées spectralement et par imagerie, ce qui m'a permis d'exposer la pertinence du montage optique présenté dans le chapitre 2. En déterminant précisément les bruits de fond issus du signal de débordement spectral des QDs dans la fenêtre de détection de l'accepteur, et de l'excitation directe de l'accepteur à 458 nm, j'ai démontré que la sélection spectrale et le régime d'irradiance privilégié permettent d'enregistrer des images dont le signal provient à 99 % du FRET. L'utilisation de méthodes variées pour déterminer les ratios accepteurs/donneurs et l'efficacité du FRET a permis de constater une grande proximité dans les résultats obtenus. Ces derniers sont compilés dans la Table 5.5. Enfin, l'émission du ligand Im-AF647 a permis de caractériser une méthode de passivation de la surface en verre de nos substrats, de manière à optimiser la spécificité de l'adsorption de nos ligands s'adsorbant par chélation sur les boîtes quantiques. Cet élément était nécessaire pour pouvoir réaliser du *micropatterning* cellulaire *via* des micro-motifs de QDs[His-RGD]. La démonstration de cette capacité, et l'exploration des études qui en découlent, sont l'objet du dernier chapitre.

Type de données	Méthode de calcul	$E_{[DA]}$ (%)	$E_{[DAR]}$ (%)	$n_{[DA]}^{A/D}$	$n_{[DAR]}^{A/D}$	$n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D}$
Spectres	Calibration solution	–	–	$3,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$	$3,3 \pm 1,1$
	<i>Quenching</i> donneurs	75 ± 9	45 ± 7	–	–	–
	Modèle FRET _{MA}	–	–	–	–	$3,7 \pm 1$
Imagerie	<i>Quenching</i> donneurs	76 ± 11	58 ± 10	–	–	–
	Modèle FRET _{MA}	–	–	–	–	$2,3 \pm 0,7$
	QuantI-FRET	$68,1 \pm 0,9$	$46,6 \pm 1,5$	$3,34 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,04$	$2,96 \pm 0,14$

Modèle FRET_{MA} renvoie au calcul du ratio $n_{[DA]}^{A/D} / n_{[DAR]}^{A/D}$ réalisable à partir du réarrangement de l'équation du modèle FRET à multiples accepteurs.

TABLE 5.5 – Compilation des estimations de E et $n^{A/D}$.

Applications à l'étude de l'adhésion cellulaire

6

Ce chapitre expose les travaux préliminaires réalisés sur les surfaces micro-structurées par imagerie NEF. J'y présente aussi les perspectives dans le domaine de la localisation latérale super-résolue des accepteurs FRET.

6.1 ADHÉSION CELLULAIRE SPÉCIFIQUE SUR MICROSTRUCTURES

Afin de vérifier le bon fonctionnement de la terminaison RGD du ligand de surface His-RGD présent sur les boîtes quantiques, j'ai observé l'adhésion de cellules sur des surfaces homogènes et sur des microstructures.

6.1.1 DYNAMIQUE D'ÉTALEMENT SUR SURFACES HOMOGÈNES

Comme nous l'avons présenté durant le chapitre 1, section 1.1.2, la séquence peptidique RGD contenue dans plusieurs de protéines de la matrice extra-cellulaire (ECM)¹, est reconnue par beaucoup d'intégrines². Lorsque le ligand RGD est présent sur une surface, la reconnaissance RGD-intégrines promeut l'adhésion (étalement) des cellules. À l'inverse, lorsque les surfaces sont recouvertes d'une molécule qui empêche l'adhésion spécifique, par exemple des PEGs, les cellules ne peuvent plus s'étaler. Elles adopteront une forme globulaire – i.e. sphérique. Après plusieurs heures, certains types cellulaires sont capables de s'étaler sur des surfaces non-adhésives en fabriquant leur propre matrice extra-cellulaire. Dans le cadre de ce projet doctoral, nous souhaitons étudier la lignée cellulaire U87-EGFR-WT, fournie par Laurence Choulier du LBP³ de l'Université de Strasbourg – cf. présentation partie 6.2. C'est donc à l'aide de ces cellules que j'ai réalisé mes expériences de dynamiques d'étalement. Pour observer un grand nombre de cellules dans les différentes conditions testées, nous utilisons ici des surfaces de QDs homogènes. Ces observations étant faites en microscopie à contraste de phase, il n'était pas nécessaire de marquer les cellules avec un fluorophore.

6.1.1.1 Première vérification de la bio-fonction du ligand His-RGD

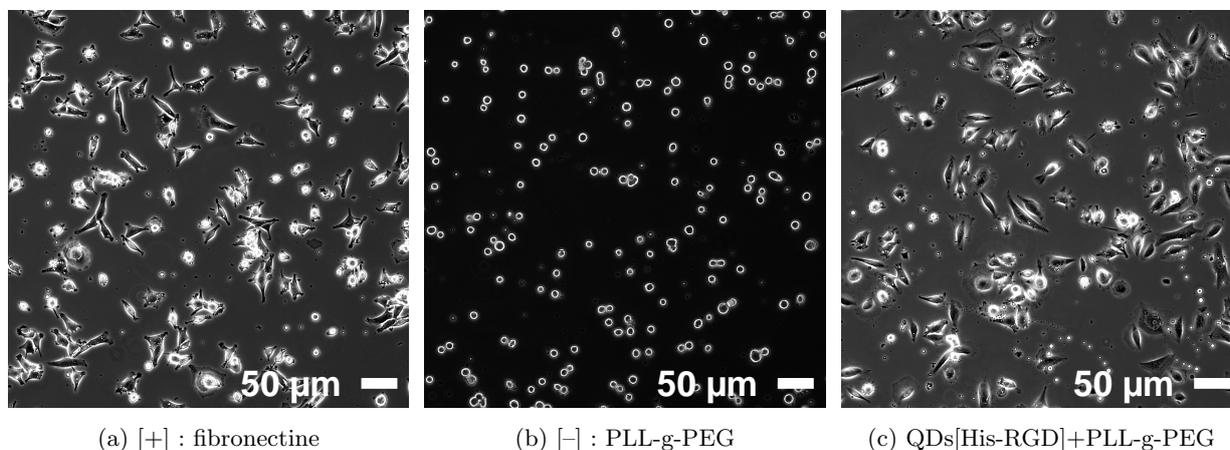
Dans cette expérience, une lamelle homogène de QDs est préparée selon le même protocole que pour nos microstructures en section 5.3.3.1, de manière à obtenir des états de surface identiques à ceux visés pour la *multipatterning* cellulaire – à la microstructuration près. Après une incubation durant 1 h avec du PLL-g-PEG à 0,3 mg/mL rincée à l'eau distillée, on réalise une incubation de 10 min avec une solution de

6.1 Adhésion cellulaire spécifique sur microstructures	131
Dynamique d'étalement sur surfaces homogènes	
Adhésion cellulaire sur microstructures	
6.2 Observation du récepteur EGFR	135
Marquages cellulaires	
Résultats de l'étude NEFI	
6.3 Perspectives	140
FRET sur cellules vivantes par marquage membranaire	
Super-résolution latérale par cliquage de l'accepteur	
6.4 Conclusions sur l'application aux études d'adhésion cellulaire	147

1. Rappel : *Extra Cellular Matrix*.
2. comme $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, etc.

3. Laboratoire de Bio-imagerie et Pathologies.

His-RGD à 1 μM , rincée 5 fois au tampon Hepes⁴, puis à l'eau distillée. Cette lamelle est l'objet du test d'adhésion. Pour comparaison, 2 lamelles de verre subissent un nettoyage Piranha. La première est fonctionnalisée avec du PLL-g-PEG à 0,3 mg/mL. Cela sert de témoin négatif (absence d'adhésion spécifique), qu'on note [-]. La seconde est incubée 1 h avec une solution de fibronectine⁵ à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puis rincée à l'eau distillée, ce qui nous donne un témoin positif (présence d'adhésion spécifique) noté [+]. Les 3 lamelles de test sont réalisées en parallèle, et des cellules provenant d'une même préparation y sont incubées en même temps, selon la procédure suivante. Après, un rinçage au PBS⁶, les cellules sont décollées avec une solution de Trypsine-EDTA 0,05 %⁷ pendant 5 min à 37°C. Après ajout du milieu de culture⁸, cette suspension de cellules est ensuite déposée sur les surfaces. Les 3 échantillons sont ensuite conservés dans l'enceinte d'un microscope⁹ à contraste de phase où la température est maintenue à 37°C, avec un taux de CO₂ à 5 %, et imagés toutes les 15 min durant 6 h. Dès 15 min, on observe un étalement des cellules sur les substrats recouverts de fibronectine [+] et sur nos lamelles de QDs biofonctionnalisées. Cet étalement s'intensifie au cours du temps, tandis que les cellules restent sphériques sur les lamelles recouvertes de PLL-g-PEG, témoin négatif [-]. La Figure 6.1 présente les images obtenues au bout d'une heure : les cellules sont quasiment toutes bien étalées, sauf sur le substrat recouvert de PLL-g-PEG, et cette différentiation n'évolue plus jusqu'à la fin des 6 h de l'expérience.



4. Hepes 10 mM; NaCl; 200 mM; pH ajusté à 8 par l'ajout de soude NaOH à 10 M.

5. F0895-1MG, Sigma-Aldrich.

6. *Phosphate-buffered saline*, Gibco.

7. Gibco.

8. EMEM

Eagle Minimum Essential Medium

Supplémenté avec :

10 % de Sérum de veau foetal (SVF)

1 % d'antibiotique :

Pénicilline/Streptomycine

1 % d'acides aminés non-essentiels

1 % de Pyruvate de sodium

(Tous provient de Gibco.)

9. IX73, Olympus; Objectif $\times 10$.

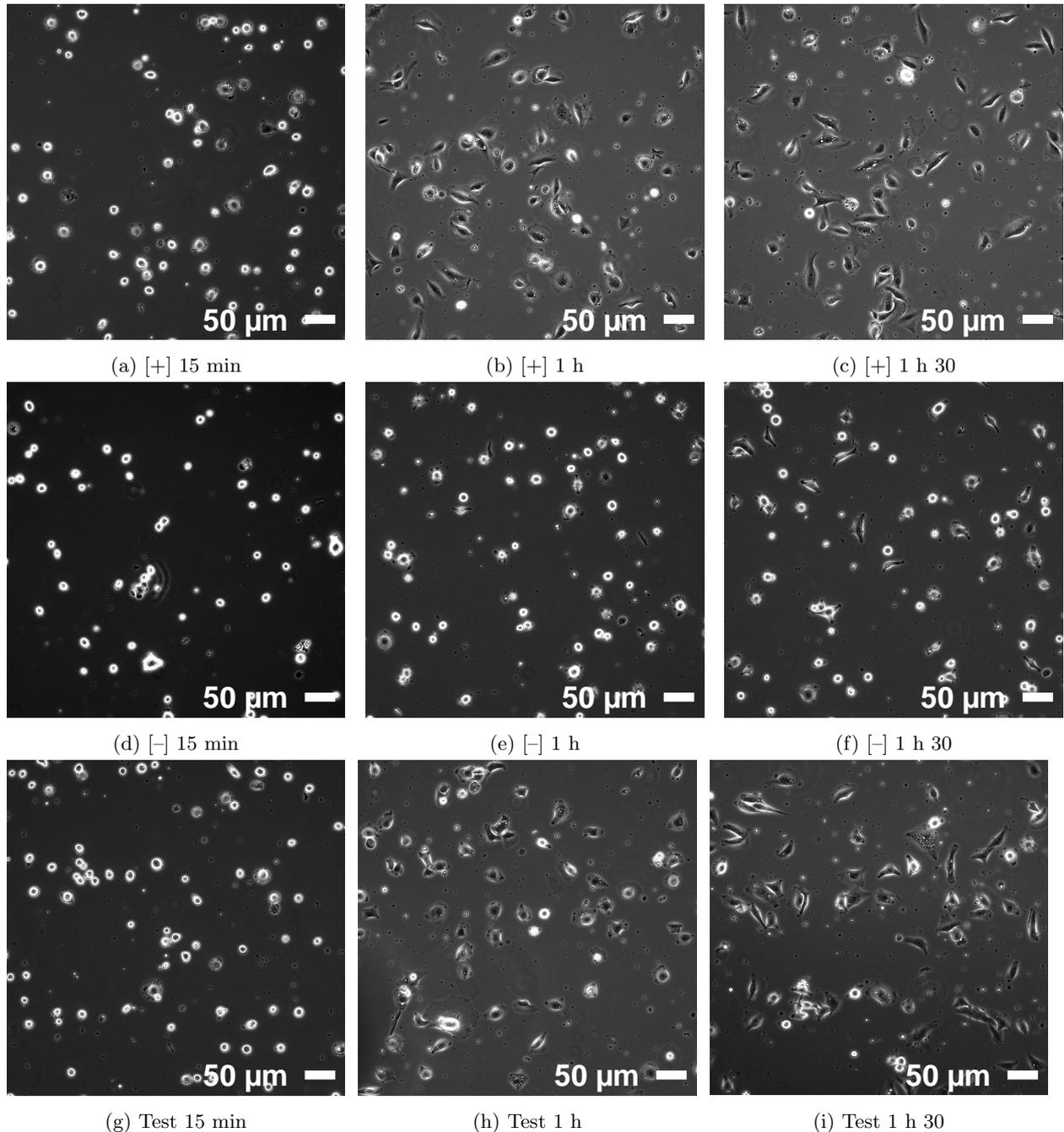
6.1.1.2 Confirmation de la spécificité de la liaison au His-RGD

Les résultats précédents ne permettent cependant pas de conclure définitivement sur un rôle "spécifique" du ligand. En effet, la surface des boîtes quantiques étant chargée¹⁰, il est possible que l'étalement observé soit aussi en partie attribuable à des interactions électrostatiques non spécifiques. Pour contrôler ce facteur, nous avons répété l'expérience d'étalement précédente en changeant les lamelles contrôles. La lamelle témoin positif pour l'adhésion [+], est cette fois-ci recouverte de PLL-g-PEG-RGD où, à l'extrémité des PEG qui forment une brosse sur

FIGURE 6.1 – Comparaison des étalements de cellules U87-EGFR-WT au bout d'1 h, par imagerie à contraste de phase.

10. Fait constaté par des expériences complémentaires d'adsorption de fluorophores organiques (Atto 643; Atto 647N; Alexa Fluor 647).

la surface, on trouve le tripeptide RGD. La lamelle témoin négatif [-] (absence d'adhésion), est une surface de QDs sur laquelle seule l'incubation de PLL-g-PEG a été faite. Les 3 échantillons sont de nouveau préparés en même temps, sur lesquels on dépose des cellules provenant d'une même préparation. Considérant les précédents résultats, nous avons réalisé des acquisitions toutes les 15 min dans les mêmes conditions, mais sans aller au-delà d'une durée de 1 h 30.



Identification des lamelles : [+] : PLL-g-PEG-RGD ; [-] : QDs+PLL-g-PEG ; Test : QDs[His-RGD]+PLL-g-PEG.

FIGURE 6.2 – Comparaison de l'étalement des cellules U87-EGFR-WT après 15 min, 1 h, et 1 h 30, par imagerie à contraste de phase.

Comme on peut le voir sur les images présentées sur la Figure 6.2 (a)-(c), les cellules s'étalent sur la surface recouverte de PLL-g-PEG-RGD [+]. En ce qui concerne la lamelle avec QDs+PLL-g-PEG, témoin négatif [-] sans ligand His-RGD, on constate cette fois-ci un début d'étalement entre 1 h et 1 h 30 – Figure 6.2 (d)-(f) – même si cette dynamique reste très lente. Le substrat Test, avec QDs[His-RGD]+PLL-g-PEG, présente quant à lui une dynamique similaire à notre contrôle positif [+]. Pris ensemble, ces éléments prouvent que notre ligand His-RGD à présent la surface des QDs induit une adhésion spécifique.

6.1.2 ADHÉSION CELLULAIRE SUR MICROSTRUCTURES

Les vérifications précédentes étant faites, je vais présenter maintenant les résultats obtenus *via* des lamelles microstructurées avec des QDs. Le protocole de préparation des lamelles microstructurées a été présenté durant le chapitre 4. Le dernier rinçage des lamelles à micro-motifs de QDs se fait au tampon PBS. La préparation des cellules U87-EGFR-WT est identique à celle exposée en section précédente. Afin d'anticiper la phase de marquage fluorescent présenté dans la suite de cette partie, l'observation finale des cellules se fait dans un tampon PBS cationique¹¹.

6.1.2.1 Démonstration du *micropatterning* cellulaire

Pour démontrer notre capacité à faire adhérer spécifiquement les cellules sur les microstructures, une suspension de cellules dans leur milieu de culture est déposée sur l'échantillon durant 30 min dans l'incubateur à 37°C avec 5 % de CO₂. Les lamelles sont rincées 1 à 2 fois au PBS cationique de manière à ne laisser que les cellules ayant effectivement pu adhérer. Les images des échantillons sont alors obtenues sur notre dispositif TIRF¹². Il est ainsi possible d'exciter les boîtes quantiques à 458 nm et en même temps d'éclairer les cellules en transmission avec de la lumière blanche – notée "diascopie LB" par la suite. Des exemples d'images ainsi acquises sont présentées Figure 6.3. Les cellules apparaissent uniquement au niveau des *micropatterns*.

11. Avec ions Ca²⁺ et Mg²⁺ à 1 mM.

12. Présenté au chapitre 2, section 2.4

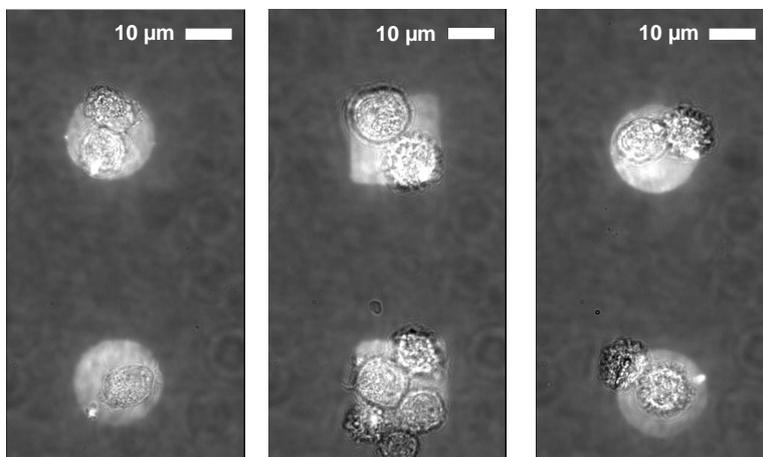


FIGURE 6.3 – Démonstration de l'adhésion spécifique de cellules U87-EGFR-WT sur micro-motifs de QDs[His-RGD].

Notons que les cellules semblent peu s'étaler, mêmes lorsqu'elles sont seules sur leur micro-motif de QDs.

Une façon d'évaluer de la qualité du procédé est de calculer le taux de remplissage, qui donne la proportion de motifs occupés ou remplis par une ou plusieurs cellules. Mais une telle mesure, pour faire sens, doit être réalisée pour un type de motifs donné, ce qui nécessite d'abord de tester différentes formes et tailles de motifs pour déterminer les plus appropriées. Or, pour des petits motifs à géométrie simple, les cellules U87-EGFR-WT ne réussissent pas vraiment à s'étaler, mêmes lorsqu'elles sont seules. Leur configuration peut aussi fortement varier pour une même forme de motif – Figure 6.4 – ce qui achève de démontrer le caractère inadapté des motifs choisis pour ces premières expériences.

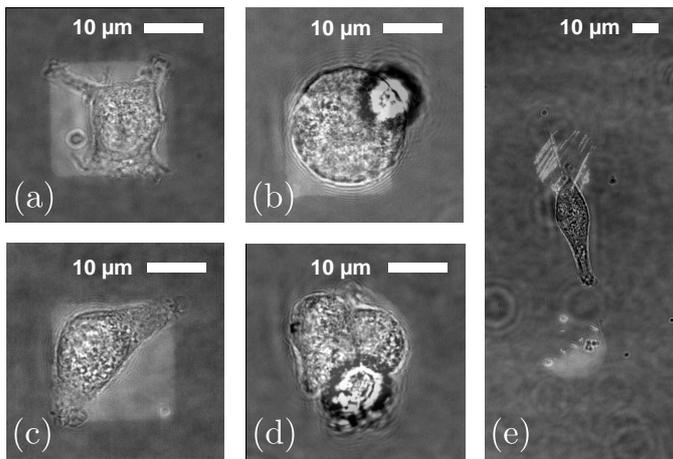


FIGURE 6.4 – Illustration de la nécessité d'un *design* adéquat des micro-motifs.

(a)-(c) Lorsqu'une seule cellule occupe un motif, elle peut présenter un début d'étalement à partir d'une adhésion sur les coins de micro-motifs, ce qui ne s'observe pas sur (d) les groupes de cellules. La seule cellule avec un étalement prononcé a été observée sur (e) des micro-motifs de QD très abimés.

Dans le cadre de ce projet doctoral, nous n'avons pas pu approfondir cet aspect. De plus, j'ai rencontré d'importantes difficultés lors des expériences d'imagerie NEF sur ces cellules, nous conduisant à nous détourner de cette lignée cellulaire – voir section suivante.

6.2 OBSERVATION DU RÉCEPTEUR EGFR

6.2.1 MARQUAGES CELLULAIRES

6.2.1.1 Aperçu des techniques existantes

Le but d'un marquage fluorescent est, par définition, de rendre visible un élément choisi des cellules. Même si certains composants cellulaires présentent une fluorescence intrinsèque¹³, il est quasi-systématiquement nécessaire de recourir à un marquage afin d'observer un élément particulier [326]. Les types de marquage peuvent se diviser en 3 grandes catégories : par adsorption physique, réaction biochimique, ou expression *in situ*. Une forme de marquage physique très commune est le marquage membranaire, par exemple avec des molécules de la famille des carbocyanines, colorants de synthèse composés d'une chaîne carbonée reliant des cycles aromatiques¹⁴ : DiD, DiO, etc. Ces espèces chimiques ont été conçues de manière à présenter une structure similaire aux phospholipides, et ainsi s'intercaler spontanément dans

13. On parle de phénomène d'auto-fluorescence.

14. Les propriétés d'absorption et d'émission peuvent être sélectionnées par la longueur de la chaîne carbonée ou par la présence d'espèces chimiques à certains endroits de la chaîne, comme de l'oxygène ou de l'azote.

les bicouches lipidiques. Une fois en place, ces fluorophores diffusent latéralement dans la membrane et permettent *in fine* d'obtenir une émission homogène à l'échelle de la cellule. Ce type de marquage très direct est cependant limité sur le plan des applications, dans la mesure où il existe peu de variantes différentes permettant de cibler des parties spécifiques des cellules.

Pour résoudre cela, des méthodes de marquage biochimique, comme l'immunofluorescence, ont été développées. Cela consiste par exemple à marquer une protéine d'intérêt à l'aide d'un ou deux anticorps couplés à un fluorophore¹⁵. La taille et la masse moléculaire importante de ces marqueurs¹⁶ les a historiquement limités aux applications sur cellules fixées, mais divers travaux depuis 10 ans tendent à dépasser cette barrière en conjuguant les fluorophores à des portions utiles d'anticorps¹⁷ uniquement [328]. Enfin, une autre méthode consiste à faire en sorte que les cellules étudiées expriment elles-mêmes des protéines fluorescentes. L'introduction dans une cellule – par transfection – de la séquence ADN codant la protéine souhaitée se traduit par une fabrication *in situ* de l'émetteur. La *Green Fluorescent Protein* (GFP) est la représentante la plus connue, et est massivement utilisée¹⁸ – telle quelle ou par l'un de ses dérivés.

6.2.1.2 U87-EGFR-WT et aptafluorescence

Comme mentionné précédemment, j'ai eu l'occasion de travailler avec la lignée cellulaire U87-EGFR-WT, fournie par Laurence Choulier (LBP). Les lignées U87 sont des cellules humaines dérivées de glioblastome¹⁹. La lignée U87-EGFR est le résultat d'une sélection visant à obtenir une sur-expression du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR)²⁰. Le récepteur EGF fait partie de la famille des récepteurs de surface ayant une activité tyrosine kinase (RTK)²¹, qui participent à des voies de signalisation régulant la croissance, la différenciation, le métabolisme, l'apoptose, ainsi que l'adhésion et la migration. Un aspect crucial des cancers est la dérégulation de cette voie de signalisation, qui est associée à la progression des tumeurs [329, 330]. Cette stimulation est croisée (*crossstalk*) avec des corécepteurs tels que les intégrines, dont on a déjà présenté le rôle dans l'adhésion cellulaire – chapitre 1. Ainsi, le *crossstalk* intégrines-EGFR favorise la progression et l'agressivité des tumeurs, et contribue de plus à la résistance aux traitements, que ce soit à la chimiothérapie, à la radiothérapie ou aux thérapies ciblées [331]. EGFR est également présent dans l'environnement immédiat des *clusters* d'intégrines au sein des plaques d'adhésion focale.

Après avoir développé des échantillons pour l'imagerie NEF compatibles avec l'exigence de *micropatterning*, nous avons donc entrepris d'étudier les récepteurs EGFR sur ces cellules U87-EGFR-WT à l'aide d'un marquage très spécifique. Ce marquage est en effet réalisé biochimiquement, à l'aide d'un aptamère conjugué à l'Alexa Fluor 647, aussi fourni par Laurence Choulier (LPB). Les aptamères sont des acides nucléiques que l'on peut considérer comme des anticorps de

15. Selon les cas, le marquage peut se faire en 2 étapes, avec un anticorps primaire monoclonal très spécifique à la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire polyclonal couplé à un fluorophore, qui va se lier avec l'anticorps primaire [327].

16. Environ 8 nm et 150-170 kDa [327, 328].

17. Réduisant ainsi la masse moléculaire à 30-55 kDa.

18. On peut donner un aperçu de l'ampleur de son usage en référant simplement les publications déjà citées dans ce document, et employant la GFP : [110, 120-124, 131, 132, 256].

19. Tumeur du cerveau agressive la plus répandue.

20. *Epithelial Growth Factor Receptor*. WT signifie *Wild Type*.

21. *Receptor Tyrosine Kinase*.

synthèse, se liant à leur cible²² avec une sélectivité et une spécificité remarquable [332]. Le marquage utilisé pour cette étude est employé sur des cellules déjà adhérentes. Le protocole est le suivant : un aliquot de 10 μL de solution d'aptamères fluorescents à 5 μM est chauffé 5 min à 95°C pour ouvrir l'aptamère. Cet aliquot est ensuite transféré sur un lit de glace durant 10 min, puis dilué dans 190 μL de solution tampon de PBS cationique pour obtenir une concentration finale de 250 nM. Ce mélange est laissé 5 min à température ambiante, puis ajouté sur les cellules déjà adhérentes pendant 30 min dans l'incubateur à 37°C (5 % CO_2). Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois à température ambiante avec la solution tampon et laissées 5 à 10 min dans l'incubateur avant l'observation TIRF à 37°C. Afin d'éviter la désorption de l'aptamère, l'observation doit se faire dans le PBS cationique et non dans un milieu de culture. Les lamelles utilisées sont des surfaces microstructurées de QDs sur lesquelles le ligand His-RGD est déposé spécifiquement après une première étape de passivation avec du PLL-g-PEG.

22. Sans interférer avec leur fonction biologique, ou très marginalement.

6.2.2 RÉSULTATS DE L'ÉTUDE NEFI

6.2.2.1 Adsorption de l'aptamère sur les microstructures

Nos premières observations ont révélé que l'aptamère fluorescent, s'il marquait les cellules U87-EGFR-WT de façon homogène – Figure 6.5 (d) – avait aussi tendance à s'adsorber de façon non-désirée sur les boîtes quantiques – Figure 6.5 (c). Cela crée un bruit de fond rendant invisible le signal FRET associé aux accepteurs présents à la surface des cellules – Figure 6.5 (b).

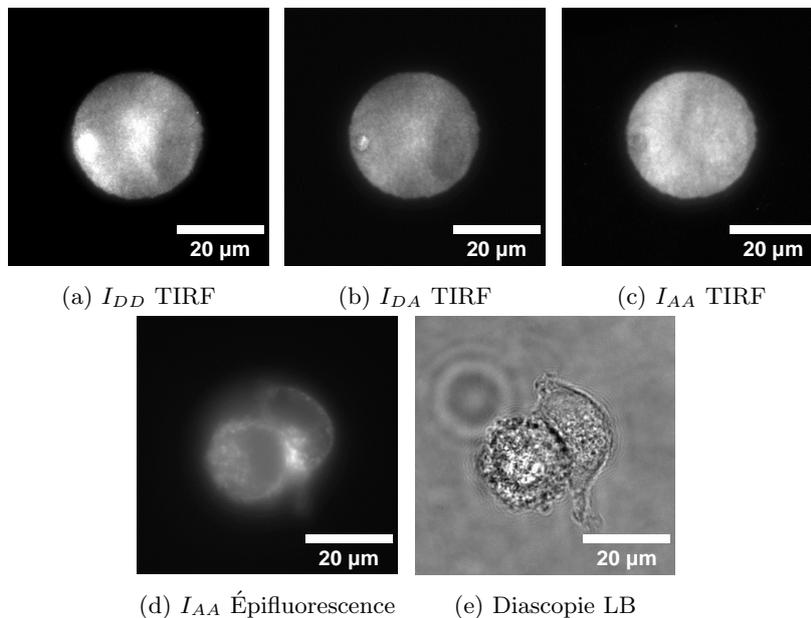


FIGURE 6.5 – Cellules U87-EGFR-WT marquées par l'aptamère fluorescent, sur micro-motif de QDs[His-RGD]+PLL-g-PEG.

Moyennes de 25 acquisitions de 0,2 s

Irradiance à 458 nm : 0,3 W/cm^2

Irradiance à 633 nm : 14,3 W/cm^2

I_{DD} : 1000-2000 coups/px

I_{DA} : 200-250 coups/px

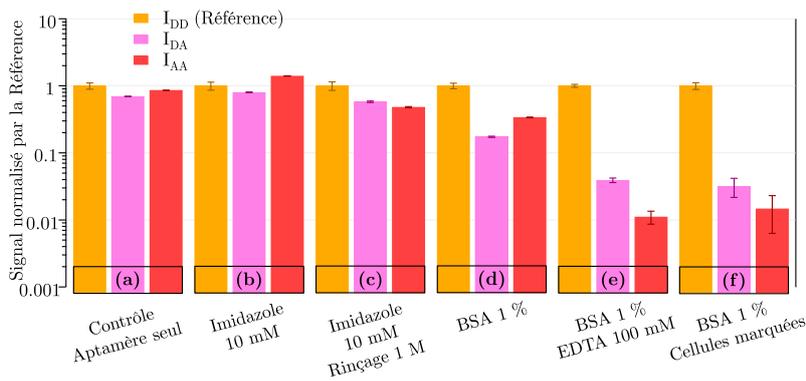
I_{AA} : 1000-1400 coups/px

Une expérience très simple m'a permis de confirmer l'adsorption de l'aptamère sur les QDs. Pour cela, j'ai simplement incubé des micro-motifs de QDs[His-RGD] avec la solution d'aptamère fluorescent. J'ai ainsi pu enregistrer des images très similaires à celles présentées dans

le chapitre précédent²³ où j'ai pu constater un signal FRET important corrélé à un *quenching* des QDs. Le signal important mesuré à 458 nm dans la fenêtre de détection du FRET – Figure 6.5 (b) – empêche toute possibilité de détection fine de EGFR dans les points focaux d'adhésion. Cette situation a rendu indispensable une passivation supplémentaire des surfaces avant l'adhésion des cellules et l'incubation de l'aptamère fluorescent.

6.2.2.2 Étude de la passivation des microstructures vis-à-vis de l'aptamère

Nous avons expérimenté des méthodes variées pour tenter de minimiser l'adsorption de l'aptamère. J'ai réalisé ces expériences sur des surfaces de QDs homogènes, en l'absence de cellules. Au vu de la spécificité de l'adsorption de l'aptamère sur les QDs, notre première stratégie a été de réaliser l'incubation de l'aptamère en l'accompagnant d'un agent chélatant²⁴ comme l'imidazole, de façon à créer une compétition entre eux. La présence d'imidazole à 10 mM n'a pas produit d'amélioration – Figure 6.6 (b).



Un rinçage des surfaces après coup, avec de l'imidazole à 1 M, n'a pas été plus probant – Figure 6.6 (c). Les résultats présentés en partie 5.3.2.2 nous ont aussi suggéré une passivation plus directe, en recouvrant les QDs par de la BSA, dont nous avons vu précédemment qu'elle empêchait l'adsorption du ligand de surface Im-AF647. De plus, comme le montre la Figure 6.7, l'ajout de BSA ne modifie pas l'allure du comportement photoluminescent des surfaces de QDs[His-RGD]. Cependant, la diminution de l'adsorption de l'aptamère reste peu prononcée ici – Figure 6.6 (d). Cette stratégie peut cependant être combinée avec notre première approche : nous avons obtenu des premiers résultats intéressants en combinant passivation des surfaces de QDs *via* la BSA et mise en compétition de l'adsorption par l'ajout d'un agent chélatant à la solution d'aptamère, ici avec de l'EDTA à 100 mM. Ces résultats restent malgré tout encore insuffisants – Figure 6.6 (e). Il faut aussi prendre en compte qu'en situation réelle, une partie des aptamères fluorescents marque effectivement le récepteur EGFR des cellules, ce qui diminue la population susceptible de s'adsorber sur les QDs. Si les surfaces de boîtes quantiques ont été préalablement

23. Voir Figure 5.20.

24. Voir section 5.1.1.1.

FIGURE 6.6 – Compilation des premiers tests de minimisation de l'adsorption de l'aptamère fluorescent.

Dans chaque situation, une image moyennée de 25 acquisitions est obtenue pour chaque configuration d'imagerie. La moyenne des valeurs de coups/px, accompagné de son écart-type, est extraite d'une aire de 50 μm de côté au centre de l'image. Les valeurs sont ensuite normalisées par le signal I_{DD} pour écarter le biais issu de différences de densités surfaciques de QDs.

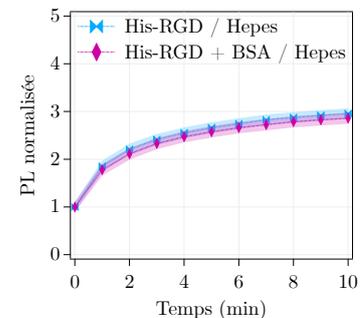
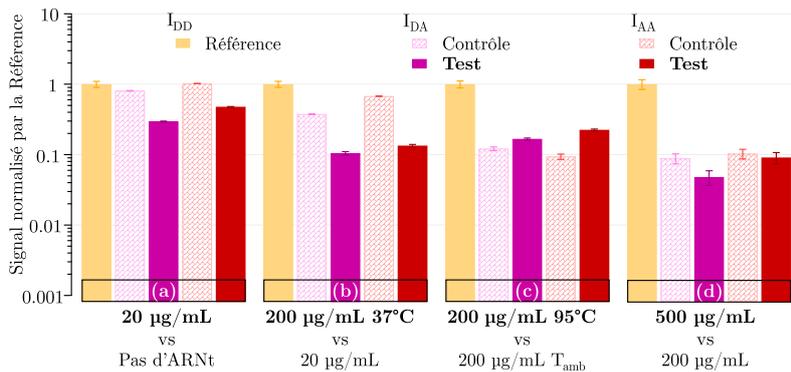


FIGURE 6.7 – Comparaison de l'évolution temporelle de la photoluminescence des QDs sous illumination continue, avec et sans passivation à la BSA 1 %. Irradiance : 0,15 W/cm²
 $t_{acq} = 50$ ms.

passivées à la BSA, la présence de cellules permet de retrouver des résultats d'adsorption de l'aptamère identiques à la situation BSA + EDTA 100 mM – Figure 6.6 (f).

Cependant, une molécule comme la BSA est relativement grande par rapport à un aptamère, et n'est donc *a priori* pas la meilleure candidate pour la passivation de la surface des QDs. Nous avons donc évalué si nous obtenions de meilleurs résultats en employant de l'ARN de transfert (ARNt) issu de levure²⁵, recommandé par Laurence Choulier. Ce composé est généralement utilisé à une concentration de 100 µg/mL. Tout comme pour la BSA, l'incubation est faite sur 1 h. Le rinçage des lamelles est réalisé avec la solution de tampon PBS cationique. Les résultats de ces expériences sont synthétisés sur la Figure 6.8. Dans chaque cas, 2 lamelles ont été préparées, la première servant de contrôle (texte normal et couleur hachurée) et la seconde correspondant à la concentration testée pour l'occasion (texte affiché en **gras** et couleur pleine). Par exemple, dans notre 1^{ère} expérience, le cas d'un dépôt d'ARNt à une faible concentration de **20 µg/mL** est comparé au cas sans ARNt – Figure 6.8 (a).



25. AM7119, Thermo Fisher.

FIGURE 6.8 – Compilation des tests de minimisation de l'adsorption de l'aptamère fluorescent *via* une passivation à l'ARNt.

Les valeurs sont obtenues selon la même procédure qu'en Figure 6.6. Seule une des 2 références I_{DD} servant à la normalisation est affichée pour chaque expérience (a)-(d), afin d'éviter la redondance d'information.

Dans notre 2^e expérience, ce dépôt à faible concentration de 20 µg/mL est reproduit, et sert de contrôle pour la comparaison avec un dépôt à une concentration importante de 200 µg/mL – Figure 6.8 (b) – où la lamelle est de plus conservée dans l'incubateur à 37°C. Nous avons ensuite souhaité évaluer l'effet d'une préparation de l'ARNt suivant le modèle de l'aptamère, avec l'ajout d'une étape de chauffe à 95°C, que l'on compare à la même concentration de dépôt sans chauffe préalable – Figure 6.8 (c). Enfin, nous avons testé une haute concentration de 500 µg/mL, comparée à 200 µg/mL, sans chauffe avant le dépôt ou pendant – Figure 6.8 (d). Comme le montre la Figure 6.8 dans son ensemble, les différentes conditions testées n'ont permis au maximum qu'une division par environ 10 de l'adsorption de l'aptamère, ce qui reste insuffisant même en prenant en compte la captation de l'aptamère par les cellules lorsqu'elles sont présentes – cf. Figure 6.6. De fait, dans la situation ayant produit les meilleurs résultats, l'adsorption de l'aptamère sur les QDs en présence de cellules reste suffisamment importante pour donner lieu à un bruit de fond empêchant d'enregistrer un signal FRET attribuable aux récepteurs EGFR.

Enfin, la Figure 6.9 met en lumière la propension de ces cellules à rapidement internaliser l'aptamère, ce qui se traduit par l'apparition de signaux associés à des vésicules rendant vite le marquage non-homogène. Pour ces différentes raisons, nous avons préféré abandonner l'utilisation de ces cellules pour nos expériences de démonstrations NEFI.

6.3 PERSPECTIVES

Malgré les résultats décevants présentés dans la partie précédente, plusieurs résultats permettent de penser que l'imagerie NEF peut continuer de se développer comme espéré dans le but de contribuer à l'étude de l'adhésion cellulaire.

6.3.1 FRET SUR CELLULES VIVANTES PAR MARQUAGE MEMBRANAIRE

À l'image des toutes premières observations faites à la fin des années 2000 par l'équipe [5], j'ai choisi d'observer les zones d'adhérence cellulaire en marquant simplement la membrane plasmique à l'aide de la DiD²⁶. Cette approche est très restrictive, car seules les zones où la membrane est très proche du substrat pourront être observées. Ces zones de contact proche entre la cellule et le substrat sont peu nombreuses et très dynamiques²⁷. L'avantage du marquage avec la DiD est que l'on peut observer les cellules à 37°C dans un milieu de culture sans générer de *quenching* de la fluorescence de l'accepteur, et ainsi conserver les cellules dans de bonnes conditions.

6.3.1.1 Cellules RPE-1

Sur le temps de ce projet doctoral, nous avons eu accès à d'autres lignées cellulaires que les U87-EGFR-WT, comme par exemple les RPE-1²⁸. Ces dernières sont marquées au niveau de leur membrane avec de la DiD, selon le protocole suivant. Une solution mère de DiD à $4,7 \cdot 10^{-4}$ M diluée dans le DMSO a été initialement préparée. Après avoir décollé les cellules avec de la Trypsine-EDTA 0,05 %, une solution d'environ 300000 cellules/mL a été préparée dans un tube contenant un milieu de culture²⁹ non-fluorescent à 458 nm. Un volume de 5 μ L de solution mère de DiD est ajouté afin d'obtenir une concentration finale d'environ 2 μ M. Après une agitation très douce, le tube est incubé à 37°C + 5 % de CO₂ pendant 5 min. Le tube est ensuite centrifugé 3 fois à 1500 RPM pendant 5 min de façon à éliminer la DiD non marquée. À chaque centrifugation, les cellules sont re-diluées dans le milieu non-fluorescent. À l'issue de ces étapes de centrifugations, une partie des cellules sont directement déposées sur le substrat et laissées 30 min à 1 h dans l'incubateur, avant d'être observées en TIRF. Dans l'exemple montré ici, la surface microstructurée de QDs n'est pas passivée à l'aide du PLL-g-PEG, ce qui conduit à une adhésion cellulaire non restreinte aux micro-motifs de QDs. L'intérêt était de pouvoir

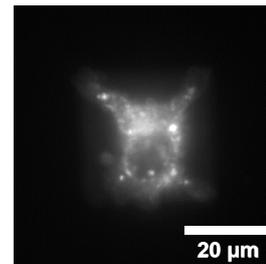


FIGURE 6.9 – Illustration du phénomène d'internalisation de l'aptamère.

Cellule U87-EGFR-WT sur micro-motif de QDs[His-RGD]+PLL-g-PEG passivée à la BSA 1 %. Illumination à 633 nm en épifluorescence.

26. D7757, Invitrogen.

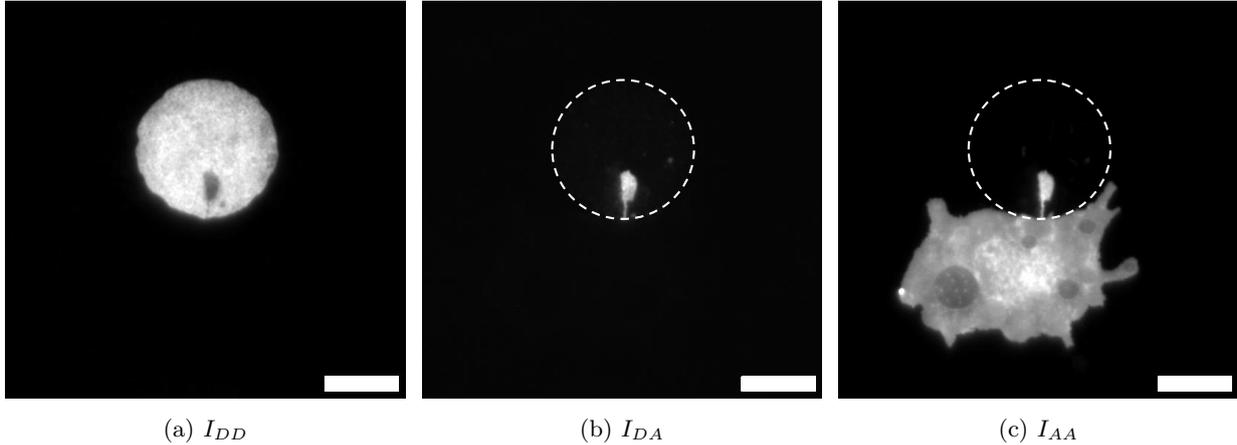
27. La méthode de va-TIRF développée dans l'équipe permet de les observer [74].

28. Leur dénomination exacte est hTERT RPE-1. Il s'agit de cellules humaines épithéliales des pigments de la rétine.

29. DMEMgtp-2, Evrogen.
Complémenté par :
Hepes à 10 mM
L-glutamine à 2 mM
1 % de SVF

observer des cellules à cheval sur des motifs, ce qui rend l'exemple particulièrement démonstratif. J'ai ainsi pu mettre en évidence un signal FRET issu de l'adhésion partielle d'une cellule, visible sur l'image FRET – Figure 6.10 (b) – et parfaitement corrélée à un *quenching* des QDs – Figure 6.10 (a). L'efficacité E du FRET, calculée à partir du *quenching*³⁰ des QDs, était ainsi de $0,49 \pm 0,10$, ce qui signifie que la membrane est très proche du substrat.

30. Voir Éq. (2.2.11).



(a-b) L'irradiance à 458 nm est de $0,3 \text{ W/cm}^2$, contre (c) 1 W/cm^2 à 633 nm. Les images sont toutes issues de la moyenne de 25 acquisitions de 0,5 s. Barre d'échelle : $10 \mu\text{m}$

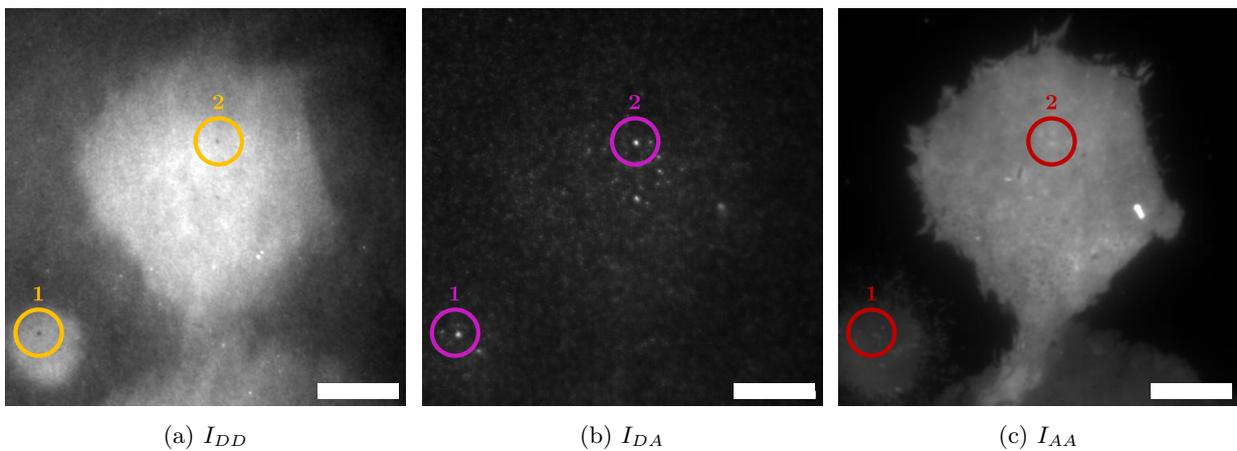
L'absence d'émission I_{DA} de la DiD en dehors du micro-motif est une preuve extrêmement forte du transfert d'énergie non-radiatif entre les QDs et la DiD.

FIGURE 6.10 – Démonstration de la possibilité d'obtenir du signal FRET sur une cellule RPE-1 en adhésion.

6.3.1.2 Cellules WPMY-1

Nous avons aussi réalisé des expériences préliminaires avec des cellules WPMY-1³¹. Ces cellules ont une dynamique d'adhésion lente. Le marquage à la DiD est réalisé de la même manière que dans le cas des cellules RPE-1. Les surfaces de QDs utilisées sont cette fois homogènes.

31. Cellules humaines épithéliales du tissu conjonctif de la prostate (myofibroblastes).



(a-b) L'irradiance à 458 nm est de $0,9 \text{ W/cm}^2$, contre (c) $0,6 \text{ W/cm}^2$ à 633 nm. Les images sont toutes issues de la moyenne de 25 acquisitions de 0,2 s. Barre d'échelle : $10 \mu\text{m}$

Dans ce cas, un signal de FRET corrélé à un *quenching* des boîtes

FIGURE 6.11 – Démonstration de la possibilité d'obtenir du signal FRET sur une cellule WPMY-1 en adhésion.

quantiques est une nouvelle fois observable, comme le montre la Figure 6.11. À partir de ce *quenching*, l'efficacité du FRET calculée pour les points 1 et 2 était respectivement de $26,3 \pm 1,9$ et $27,3 \pm 1,6$ %. La taille de la zone émettant un signal FRET est ici très réduite, ce qui montre que la cellule est essentiellement hors de portée du FRET.

6.3.2 SUPER-RÉSOLUTION LATÉRALE PAR CLIGNOTEMENT DE L'ACCEPTEUR

L'imagerie NEF offre naturellement une grande sélection axiale définie par la portée du transfert d'énergie non-radiatif, typiquement 10 à 20 nm. Cependant, la résolution latérale du système imageur reste limitée par diffraction. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux différentes méthodes de super-résolution potentiellement combinables avec l'imagerie NEF.

6.3.2.1 Principes des méthodes de super-résolution

Le terme générique de "microscopie de super-résolution" regroupe un ensemble de techniques de microscopie optique ayant pour but d'augmenter la résolution du système d'imagerie au-delà de la limite de diffraction – section 2.3.1.2 – valant typiquement ~ 250 nm dans le visible. Ces techniques sont très variées, comme en témoigne l'article de revue de 2020 par Jacquemet *et al.* [333]. Chacune présente des avantages et des inconvénients, que l'on peut classer selon différents critères : résolution XYZ ; résolution temporelle ; versatilité ; fidélité³² ; compatibilité avec l'imagerie multicolore ; avec l'épaisseur des échantillons³³ ; et, évidemment, capacité à étudier les cellules vivantes.

L'imagerie NEF s'inscrit dans ce programme de recherche et s'avère de plus complémentaire avec les techniques de super-résolution basées sur l'analyse des fluctuations de l'émission, notées FB-SRM³⁴. La variation de l'émission des fluorophores sous excitation continue³⁵ peut en effet être utilisée pour reconstruire numériquement une image de résolution latérale inférieure à la limite de diffraction. Le profil d'intérêt relatif des imageries NEF et FB-SRM est synthétisé en Figure 6.12, l'imagerie classique en épi-fluorescence servant de référence.

Il existe principalement 2 méthodes FB-SRM existantes³⁶, notées SOFI [334] et SRRF [335]. Elles demandent typiquement d'acquérir consécutivement quelques dizaines d'images, jusqu'à quelques centaines selon les échantillons. Cela limite légèrement leur résolution temporelle, mais celle-ci reste bien supérieure à ce qui peut être obtenu avec des techniques comme le PALM ou (d)STORM, où le nombre d'images à acquérir est typiquement de plusieurs milliers. En tant que méthodes purement numériques, elles sont intrinsèquement versatiles et utilisables dans de très nombreuses configurations expérimentales [336]. Par contre, il est nécessaire de pré-tester les réglages algorithmiques de manière à optimiser les résultats. En comparaison avec les techniques de super-résolution basées sur la détection de molécules uniques, les méthodes FB-SRM ne demandent pas des irradiations très importantes, notamment lorsqu'elles sont utilisées avec des émetteurs très

32. Capacité de l'image super-résolue à reproduire la distribution des molécules à imager.

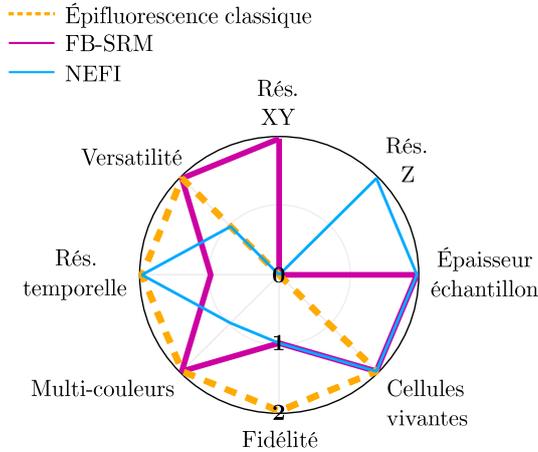
33. Susceptibilité aux artefacts produits par diffusion.

34. *Fluctuation-Based Super-Resolution Microscopy*.

35. Dont nous avons introduit les bases théoriques en section 2.1.2.2 pour les molécules organiques classiques, et en 3.1.2.2 pour les boîtes quantiques.

36. Respectivement :
Super-resolution Optical Fluctuation Imaging
Super-Resolution Radial Fluctuations

fluctuants, comme des protéines fluorescentes *photo-commutables* [337]. Cela les rend plus adaptées aux études sur cellules vivantes.



La qualité des reconstructions dépend de la densité des émetteurs, ce qui rend particulièrement puissante la combinaison de ces méthodes avec les dispositifs offrant une grande sélection axiale, comme par exemple le TIRF ou l'imagerie NEF, beaucoup moins sujets aux artefacts produits par diffusion dans les échantillons épais. Notons que les images générées par SOFI ou SRRF dépendent plus des fluctuations d'intensité que de l'intensité elle-même. Ainsi, l'intensité des pixels de ces reconstructions traduit surtout une confiance sur la localisation : la présence d'émetteurs non-fluctuants limitera d'ailleurs nécessairement la fidélité de l'image obtenue de l'échantillon. Ces 2 méthodes de FB-SRM sont parfaitement compatibles avec l'imagerie multi-couleurs. Leur limite la plus importante réside dans la résolution axiale Z : ces algorithmes ne permettent tout simplement pas de traiter directement cette dimension³⁷. Or, il s'agit précisément du domaine de prédilection de l'imagerie NEF. La méthode SRRF, la plus récente des deux, dispose d'une implémentation sous la forme d'un *plug-in* nommé NanoJ-SRRF [338] sur le logiciel libre Fiji (version étendue d'ImageJ), ce qui la rend très facilement utilisable. De plus, selon les réglages choisis, elle permet de réaliser un traitement algorithmique semblable à celui opéré par SOFI [339]. C'est donc cette méthode que nous avons choisie pour réaliser nos premiers tests.

6.3.2.2 L'algorithme SRRF

La première étape de l'algorithme consiste à diviser chaque pixel d'une image – symbolisés par les lignes larges en Figure 6.13 – en une matrice de sous-pixels. Le nombre de sous-pixels créés est défini par le 1^{er} paramètre entrant R_m (*Radiality Magnification*). Chaque sous-pixel se voit attribuer une probabilité de contenir un émetteur. Le calcul de cette probabilité repose en premier lieu sur une analyse spatiale, illustrée en Figure 6.14 (a). Pour chaque sous-pixel, des vecteurs représentant les gradients d'intensité sont mesurés pour un disque de sous-pixels voisins – les flèches indiquant la direction de l'augmentation

FIGURE 6.12 – Cartographie comparée des techniques d'imagerie par épifluorescence ; FB-SRM ; NEFI.

Les évaluations pour les méthodes épifluorescence et FB-SRM sont extraites de [333] et simplifiées à 3 niveaux pour mettre en avant les performances relatives. Les scores de l'imagerie NEF sont attribués par nos soins, en cohérence avec les aspects retenus dans la publication de Jacquemet *et al.* La bordure du cercle correspond à de bonnes performances relatives pour le critère considéré. Le centre du cercle correspond à de mauvaises performances relatives.

37. On doit alors recourir à des montages à multiples plans d'imagerie.

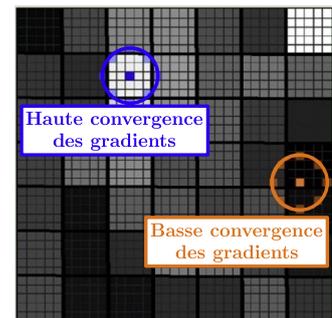


FIGURE 6.13 – Illustration de la création des matrices de sous-pixels par l'algorithme SRRF. Adapté de [336].

d'intensité. L'aire du champ circulaire évalué est définie par le rayon de l'anneau de circonférence, noté R_r (*Ring Radius*) – 2^e paramètre en entrée.

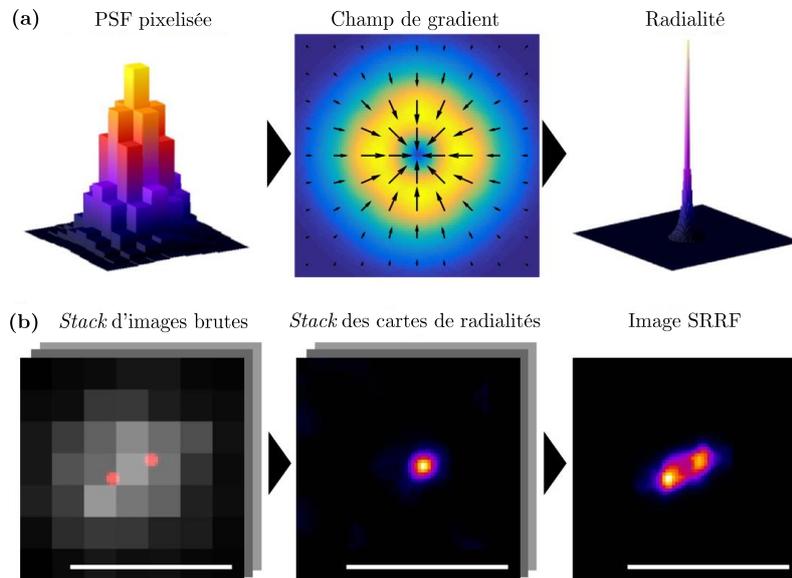


FIGURE 6.14 – Schéma du procédé SRRF. Adapté de [335]

(a) Processus d'analyse temporelle : une PSF sous illumination grand-champ devient une cartographie des radialités en établissant le degré de convergence des vecteurs de gradient d'intensité pour chaque sous-pixel de l'image artificielle.

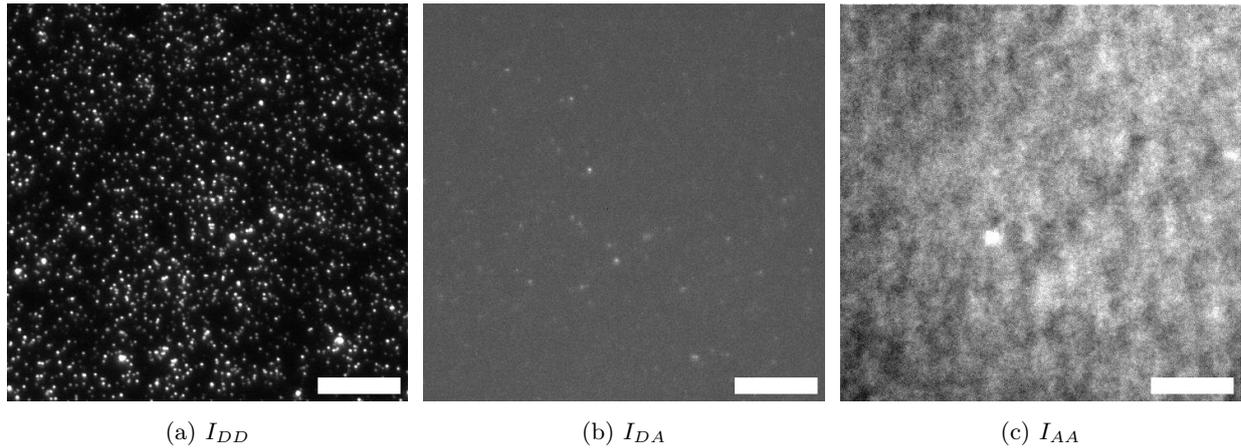
(b) L'acquisition d'un *stack* d'images permet de préciser la position des émetteurs par l'analyse de l'évolution des radialités.

Le 3^e et dernier paramètre est le nombre de points de calculs défini sur la circonférence de cet anneau – on le note A_r (*Axes in Ring*). Le degré de convergence des vecteurs de gradient est nommé *radialité*. Comme le montre la Figure 6.13, plus les sous-pixels sont proches de la "vraie" position de l'émetteur, plus leur radialité sera forte. On passe donc d'une PSF limitée par diffraction à une carte de probabilités de présence. Cette cartographie est effectuée pour chaque image de l'empilement (*stack*) analysé. L'analyse temporelle – Figure 6.14 (b) – complète ce premier niveau d'analyse à partir de l'évolution de la radialité. La fluctuation temporelle permet en effet d'évaluer à quel degré le sous-pixel est effectivement centré sur l'émetteur, ce qui peut permettre, sur l'image finale issue du *stack*, de résoudre 2 fluorophores là où l'imagerie limitée par diffraction ne permettait aucune distinction.

6.3.2.3 Étude préliminaire sur une surface de QDs à faible densité surfacique

Pour évaluer la possibilité de combiner l'imagerie NEF et méthode SRRF, nous avons réalisé une expérience "modèle" sur le même principe que notre expérience démonstrative de FRET sur microstructures. Cette fois-ci, des lamelles homogènes sont réalisées, où l'on diminue la densité de boîtes quantiques fonctionnalisées. Même avec des QDs[MPA] s'adsorbant rapidement sur la lamelle, il suffit de diminuer la concentration de la solution de QDs à 2 nM et de limiter le temps d'incubation à 30 s. Le reste du protocole de fonctionnalisation reste identique. Le ligand fluorescent Im-AF647 est incubé *via* une solution à 1 μ M sur ces lamelles³⁸ durant 10 min puis rincé au tampon Hepes. La Figure 6.15 donne l'allure typique des surfaces ainsi obtenues.

38. Sans pré-passivation avec du PLL-g-PEG.



(a-b) L'irradiance à 458 nm est de $14,1 \text{ W/cm}^2$, contre (c) 1 W/cm^2 à 633 nm. $I_{AA} = 175 \pm 11$ coups/px, soit 6 % de variation par rapport à la moyenne. Les images, dont le contraste est ajusté, sont toutes issues de la moyenne de 25 acquisitions de 0,1 s. Barre d'échelle : 10 μm

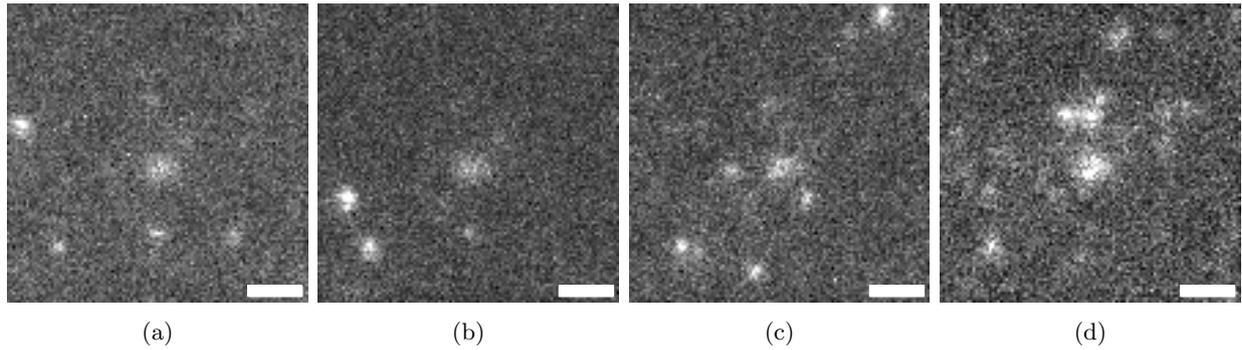
La puissance utilisée pour enregistrer les images I_{DD} et I_{DA} – Figure 6.15 (a) et (b) – est plus élevée que dans nos expériences précédentes. Cette configuration a été déterminée empiriquement afin d'obtenir un début de clignotement dans la fenêtre de détection de l'accepteur tout en conservant des durées d'acquisition relativement réduites. Il est alors possible de déterminer le niveau des différents bruits de fond³⁹.

La valeur moyenne de I_{AA} vaut ici 175 ± 11 coups/px et le coefficient de correction δ^{DE} pour cette irradiance laser vaut au maximum 0,18. Cela conduit à estimer une contribution maximum de $\delta^{DE} I_{AA} = 31 \pm 2$ coups/px pour l'excitation directe de l'accepteur. Ce type de bruit de fond est homogène sur l'image I_{DA} – Figure 6.15 (b) – puisque le dépôt de Im-AF647 est plus ou moins homogène sur l'ensemble de la surface – Figure 6.15 (c). Le coefficient de correction α^{BT} ne dépend pas de l'irradiance d'excitation, et vaut donc toujours $0,0018 \pm 0,0006$. Le signal mesuré I_{DD} sur la Figure 6.15 (a) vaut entre 1000 et 2000 coups/px, indiquant que la contribution du signal de débordement spectral $\alpha^{BT} I_{DD}$ des QDs lors d'une observation dans la fenêtre de l'accepteur ne dépasse pas 2 à 5 coups/px.

Le bruit de fond enregistré sur l'image I_{DA} vaut en moyenne 30 à 50 coups/px, ce qui correspond aux contributions dues au débordement spectral des QDs et à l'excitation directe de l'accepteur. Autrement dit, les *spots* brillants observés sur la fenêtre de détection de l'accepteur – et qui clignotent au cours du temps – correspondent à du FRET. Ce signal I_{DA}^{corr} , après correction des différents bruits, vaut typiquement 30 à 60 coups/px au minimum. Autrement dit, même dans une configuration expérimentale aussi défavorable, nous pouvons détecter un clignotement de l'accepteur issu du FRET. Pour tester différents réglages de l'algorithme SRRF, nous avons acquis 1000 images successives puis sélectionné une zone d'intérêt d'environ 10 μm de côté. La Figure 6.16 donne un aperçu de l'évolution temporelle du signal avant traitement.

FIGURE 6.15 – Signal détecté dans chacune des configurations en TIRF.

39. Toutes les valeurs données ici ont fait l'objet d'une correction par le bruit d'obscurité de la caméra à 0,1 s de temps d'acquisition, soit 100 coups/px.

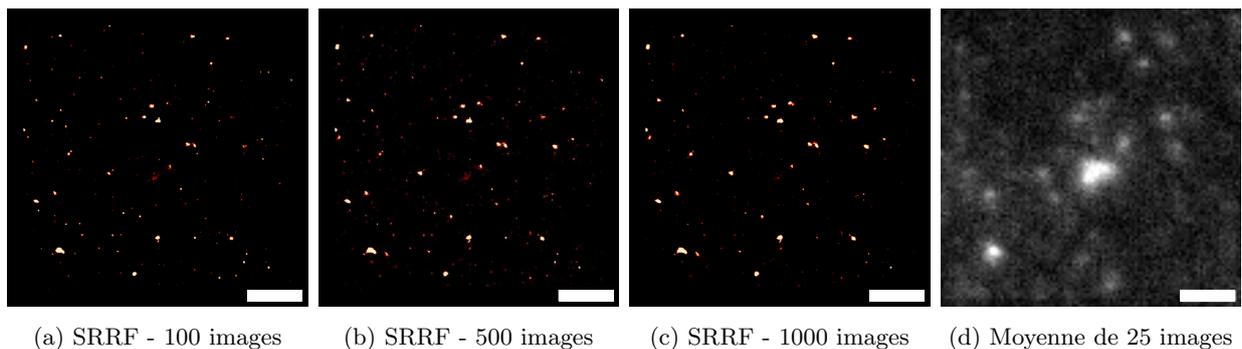


L'irradiance à 458 nm est de $14,1 \text{ W/cm}^2$, le temps d'acquisition par image est de 0,1 s. Barre d'échelle : $2 \mu\text{m}$.

Le signal de nos accepteurs est très bruité. Dans ce cas, il est recommandé d'ajouter un poids relatif aux gradients d'intensité calculés à partir de la largeur à mi-hauteur de notre PSF ($\sim 250 \text{ nm}$). Ce paramètre supplémentaire a donc été fixé à 2,5 dans le *plug-in* NanoJ-SRRF. Il s'articule avec l'aire du champ de gradients, qui doit être suffisamment grande pour éviter l'apparition d'artefacts sur l'image finale. La valeur de R_r a donc été laissée à 1, sa valeur par défaut. Dans ces conditions, il était inutile de chercher un très grand gain en résolution. La valeur de R_m maximum testée était donc de 5, ce qui correspond à une résolution maximum atteignable de 40 à 50 nm. À l'inverse, nous avons systématiquement maximisé le nombre de points considérés pour le calcul de radialité, soit $A_r = 8$, de manière à maximiser le contraste⁴⁰. Les Figures 6.17 (a) à (c) présentent les images résultantes du calcul SRRF, pour différents nombres d'images prises en compte dans l'analyse. On peut comparer ces résultats à l'image obtenue en moyennant 25 images, assimilable à ce qui aurait été obtenu pour une seule acquisition NEFI standard – Figure 6.17 (d).

FIGURE 6.16 – Exemple d'évolution du signal I_{DA} pour quelques images d'un *stack*.

40. Dans le cas des images employées pour ces tests, l'augmentation de temps de calcul causée était marginale, le temps total de traitement par *stack* d'images ne dépassant pas 1 min.



On constate un gain évident en résolution, même en ne prenant en compte que 100 images pour le calcul. Cela nous permet d'envisager des expositions relativement courtes (10 s) en situation réelle sur des cellules. Cependant, cet exemple nous permet aussi d'illustrer la limite principale de cette méthode : l'absence de fluctuation des émetteurs conduit à leur disparition sur l'image SRRF, comme on peut le voir pour le signal central présent sur toutes les images de la Figure 6.16 et sur la Figure 6.17 (d)⁴¹.

FIGURE 6.17 – Comparaison des images obtenues par analyse SRRF selon le nombre d'images prises en compte dans le calcul, et acquisition NEFI classique (moyenne de 25 images). Barre d'échelle : $2 \mu\text{m}$

41. Aucun *spot* n'est associé à ce signal FRET sur les images SRRF – Figure 6.17 (a-c).

6.4 CONCLUSIONS SUR L'APPLICATION AUX ÉTUDES D'ADHÉSION CELLULAIRE

Dans ce dernier chapitre, j'ai eu l'occasion de mettre à l'épreuve l'imagerie NEF dans des situations réelles d'imagerie cellulaire. Le ligand de surface His-RGD, introduit durant le chapitre 5, a pu être efficacement utilisé pour promouvoir l'adhésion spécifique de cellules sur nos microstructures de QDs. Cela a été l'occasion de montrer l'importance du *design* des micro-motifs, les cellules U87-EGFR-WT utilisées montrant des difficultés à bien s'étaler, en comparaison avec ce que nous avons pu observer sur des surfaces homogènes. Cela n'est pas la seule difficulté relevée : le choix d'une monocouche de QDs sans matrice d'immobilisation – jouant le rôle de couche protectrice – s'est révélé à double tranchant. Si cela permet effectivement une bioconjugaison directe de nos donneurs FRET, cela les rend aussi exposés à des phénomènes d'adsorption indésirables. Notre premier choix de marquage cellulaire, employant un aptamère conjugué à un accepteur FRET, a ainsi permis de mettre en évidence cette limitation. Un moyen de contourner ces problèmes serait de recourir à un marquage en amont, comme nous avons pu le montrer avec des cellules RPE-1 et WPMY-1 marquées à la DiD avant leur incubation sur nos surfaces. Enfin, nous avons présenté des résultats préliminaires encourageants quant au potentiel de combinaison de l'imagerie NEF avec les méthodes de super-résolution basées sur le traitement numérique des fluctuations d'émission, nous permettant d'envisager de futures études plus poussées sur la localisation et la dynamique des points focaux d'adhésion.

Conclusion

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon projet doctoral a consisté à poursuivre le développement de l'imagerie NEF, méthode de nanoscopie l'étude de l'adhésion cellulaire basée sur le transfert d'énergie non-radiatif de type Förster (FRET). Pour cela, j'ai sélectionné dans la littérature les travaux de FRET quantitatif les plus pertinents et monté un dispositif TIRF qui a servi de technique usuelle d'observation pour tous mes travaux.

Une part non-négligeable de mon travail a consisté à développer nos capacités d'utilisation des boîtes quantiques. Cela m'a demandé d'approfondir mes connaissances de leurs propriétés photo-physiques et chimiques, mais aussi l'apprentissage de la synthèse de QDs cœurs/coquilles de type CdSe/CdS/CdZnS/ZnS. La reproductibilité de ces synthèses a été étudiée, ainsi que les propriétés de photoluminescence des QDs obtenus. J'ai également mis en œuvre plusieurs protocoles d'échange des ligands de surfaces des QDs, afin de les solubiliser dans différents milieux.

Cette maîtrise de bout en bout m'a permis de reprendre la méthode de fonctionnalisation utilisée par l'équipe et d'en réaliser une caractérisation plus approfondie. J'ai ainsi pu mettre au point un protocole permettant d'obtenir des monocouches de QDs homogènes à grande échelle et de densité surfacique contrôlée. Un résultat particulièrement intéressant est la possibilité d'obtenir des densités surfaciques élevées (≥ 3000 QDs/ μm^2) en 20 min seulement lorsque l'on utilise le MPA comme ligands de surface, contre 24 h avec les ligands TOP utilisés précédemment. J'ai aussi pu montrer que la photoluminescence enregistrée de ces monocouches n'augmente pas linéairement avec la densité surfacique de QDs, mais suit un modèle de saturation où la photoluminescence progresse faiblement passé un seuil d'environ 150 QDs dans un *spot* limité par diffraction. Enfin, j'ai montré qu'à l'aide d'un échange de ligand adapté – ici, le His-RGD – après fonctionnalisation des QDs sur le verre, il était possible de stabiliser l'émission de nos QDs sur le domaine de faibles irradiances ≤ 1 W/cm².

La méthode de fonctionnalisation *bottom-up* a en outre été enrichie par une microstructuration *top-down* réalisée par photolithographie dans le proche UV, en utilisant le dispositif PRIMO d'Alvéole, initialement conçu pour la *micropatterning* de cellules. Cet outil repose sur l'utilisation d'un dispositif numérique à micro-miroirs (DMD). Nous pouvons dorénavant créer aisément des monocouches de QDs de n'importe quelle forme, avec une résolution de l'ordre de 2 μm . Les travaux d'amélioration de notre procédé devraient à ce titre viser l'élimination complète du phénomène d'agrégation des QDs au bord des motifs,

constaté lors de l'utilisation de QDs[MPA] en milieu aqueux.

Dans le but de biofonctionnaliser les monocouches de QDs avec un ligand de surface capable de se lier aux intégrines (His-RGD), j'ai montré la nécessité de passiver la surface en verre avec des PEG, à l'aide d'un ligand fluorescent (Im-AF647) s'adsorbant sur les QDs de la même manière. Cette passivation permet de déposer les ligands spécifiquement sur les QDs, par chélation, ce qui ouvre la voie à diverses applications dans le champ des bio-détecteurs. Nous en avons profité pour réaliser une étude FRET par voie spectrale et par imagerie. Le ligand Im-AF647 est en effet fluorescent par la présence d'Alexa Fluor 647, qui joue le rôle d'accepteur FRET. Cette expérience m'a permis de comparer diverses méthodes de calcul de l'efficacité du FRET mais aussi et surtout de démontrer la pertinence de la sélection spectrale réalisée sur le dispositif TIRF. Dans la fenêtre de détection de l'accepteur, et sous le régime d'irradiance adéquat, nous sommes capables d'obtenir un signal issu à 99 % du FRET, ce qui simplifie considérablement l'analyse des signaux.

La dernière partie de ma thèse a consisté à explorer les possibilités d'utiliser mes substrats pour l'étude de l'adhésion cellulaire. Après vérification de la capacité du ligand His-RGD à promouvoir l'adhésion cellulaire, j'ai pu démontrer la possibilité de *micropatternner* des cellules à l'aide de nos micro-motifs de QDs. Si nous avons pu obtenir des premiers résultats prometteurs en FRET sur cellules en adhésion, nos expériences ont surtout permis d'identifier la nécessité de bien optimiser et contrôler le marquage cellulaire avec l'accepteur, afin d'éviter que ce dernier ne s'adsorbe sur les QDs. Les travaux ultérieurs devront donc impérativement utiliser des méthodes où le marquage est réalisé avant dépôt des cellules sur les microstructures. Enfin, nous avons également obtenu des résultats préliminaires portant sur la combinaison de l'imagerie NEF avec les techniques de super-résolution latérale par traitement numérique des fluctuations d'émission, qui demandent à être développés.

PERSPECTIVES D'OPTIMISATION ÉCOLOGIQUE

PRINCIPES DE "CHIMIE VERTE" ET "NANOSCIENCES SOUTENABLES"

Tout travail de recherche devrait se préoccuper des conditions de sa compatibilité avec les enjeux socio-écologiques, *a fortiori* s'il souhaite ajouter une nouvelle couche matérielle à des techniques déjà existantes, comme c'est le cas de cette thèse. Les nanosciences, dans leur ensemble, tendent en pratique à fermer les yeux sur ces aspects, ou à les reléguer à un champ de recherche connexe. La discussion entre approches de *soutenabilité faible* et *soutenabilité forte* n'est donc même pas encore d'actualité. Pourtant, de nombreux cadres de travail existent depuis longtemps. En ce qui concerne la fabrication et la fonctionnalisation, qui relèvent souvent de processus chimiques, le cadrage qualitatif de la "chimie verte" a été posé – avec de nombreuses variantes – depuis le début des années 1990, et plusieurs estimateurs plus quantitatifs

ont été proposées pour les nanosciences. On peut par exemple citer le facteur d'économie atomique AE , le E -Factor, et diverses métriques basées sur l'énergie ou le flux de matière consommé [340]. Des feuilles de route spécifiques pour des démarches de "nanosciences soutenables" ont aussi pu être élaborées [341].

Cela étant dit, la meilleure base pour l'évaluation d'un procédé reste l'analyse de cycle de vie¹, ou ACV, méthode qui permet de donner une estimation quantitative et multifactorielle des impacts environnementaux. Comme le notait en 2012 une revue de l'emploi de l'ACV dans les nanosciences, plus de la moitié des (rares) études existantes se limitaient à l'analyse des flux d'énergie et de matières, sans prendre en compte les enjeux nanospécifiques de toxicité ou de fin de vie [342]. Lorsque ces éléments étaient présents, il n'y avait généralement pas d'évaluations quantitatives. En effet, une ACV approfondie nécessite que les éléments spécifiques aux nanoparticules soient effectivement compilés dans les bases de données sur le cycle de vie, ce qui se révèle d'une grande complexité tant ces éléments peuvent varier selon les matériaux, les géométries des nanoparticules, etc. Entre-temps, plusieurs outils plus qualitatifs ont été proposés (USE-tox, CalTOX, QSAR), mais ces derniers sont plus adaptés aux matériaux *bulk*. Plusieurs autres outils pertinents, comme les évaluations des risques, parallèles à l'ACV, ne doivent par ailleurs pas être écartés [342].

Contrairement à certains préjugés, il est cependant tout à fait possible de réaliser l'ACV de méthodes dont la maturité est celle du développement en laboratoire, à condition de définir adéquatement l'unité fonctionnelle étudiée². Par exemple, les différents procédés de synthèse de nanoparticules d'argent, de TiO_2 ou de Fe_3O_4 , ont fait l'objet d'analyses de cycle de vie comparées [340]. C'est aussi le cas de la synthèse historique des coeurs de QDs CdSe [343], et cela s'est développé jusqu'à plusieurs de leurs applications [344, 345].

ÉBAUCHE D'ANALYSE DE CYCLE DE VIE COMPARÉE

Cette préoccupation a été présente tout au long du travail de cette thèse. Le travail d'analyse du cycle de vie étant en cours, je me contenterais ici de présenter les stratégies mises en œuvre aux différentes étapes de notre procédé de microstructuration des QDs, et les premières estimations en termes de flux de matière que l'on peut en tirer. L'unité fonctionnelle choisie a ici été *la réalisation de 5 lamelles de QDs microstructurées*, car cela correspond au nombre classique de lamelles réalisées d'un coup, en raison du nombre de places du bac Hallendahl utilisé pour les incubations. La synthèse de QDs elle-même est prise comme un entrant fixé, car je n'ai pas eu l'occasion de tester des alternatives³. Cela permet par ailleurs de raisonner au niveau du procédé de microstructuration lui-même, qui est l'apport principal de mon travail.

En ce qui concerne l'étape de nettoyage et d'activation, j'ai mentionné durant le chapitre 4 que l'usage d'un Piranha et d'un Plasma-Air donnait des résultats comparables. Cela est vrai pour les QDs[MPA]

1. Telle que définie par les normes : ISO 14 040 et ISO 14 044.

2. D'après l'ISO 14 040 (2006) : Performance quantifiée d'un système de produits destinée à être utilisée comme unité de référence dans une analyse de cycle de vie. L'unité fonctionnelle définit la quantification des fonctions identifiées (caractéristiques de performance) du produit. L'objectif premier d'une unité fonctionnelle est de fournir une référence à laquelle les intrants et les extrants sont liés. Cette référence est nécessaire pour assurer la comparabilité des résultats d'une analyse du cycle de vie.

3. Une comparaison globale des 4 grandes catégories d'émetteurs pour l'imagerie et la bio-détection a été faite par Himmelstoß *et al.* [346]. Une étude comparée des synthèses existantes de nanocristaux semi-conducteurs a été faite par Reiss *et al.* [347], même si cela ne relève pas de l'ACV.

uniquement, où l'on peut facilement obtenir des densités surfaciques élevées. Avec des QDs[*TOP*], pour un même temps d'incubation de 24 h, la densité surfacique obtenue avec une étape d'activation initiale au Plasma-Air est 30 % inférieure – évaluation par imagerie TIRF du nb de coups/px moyen obtenu pour des lamelles préparées en même temps. Ce problème ne se pose plus avec les QDs[*MPA*], ce qui permet de supprimer totalement du processus la consommation d'acide sulfurique et d'eau oxygénée au profit d'environ 25 mL d'éthanol à 70 % – auquel il faudra ajouter, dans le cadre de l'ACV, la consommation électrique du bain d'ultrasons et de l'exposition au Plasma-Air.

J'ai montré dans ce même chapitre 4 que, pour l'étape de fonctionnalisation *bottom-up*, la monocouche d'accrochage à l'aide de silanes pouvait indifféremment se faire à l'aide de MPTMS solubles dans le toluène anhydre ou de MPTES solubles dans un mélange d'éthanol à 95 % et d'eau à 5 %. Cette dernière option devrait⁴, à volume utilisé constant, mener à une nette baisse des impacts de cette étape lorsqu'évalués dans le cadre d'une ACV. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas utiliser les MPTES pour obtenir des surfaces microstructurées en raison de la forte solubilité de la résine S1813 G2 dans l'éthanol. Une alternative intéressante pourrait être de réaliser l'étape de photolithographie à l'aide de PMMA associé à un photo-initiateur sensible dans l'UV⁵. Dans le cas d'une couche de PMMA d'épaisseur supérieure à 1 µm, on constate en effet une résistance à l'éthanol compatible avec notre incubation d'une nuit des MPTES dans le mélange éthanol/eau. De plus, le PMMA lui-même peut être solubilisé dans un solvant alternatif au toluène, l'éthyle de lactate, non-toxique et issu de sources renouvelables [349].

Enfin, la substitution des QDs[*TOP*] par les QDs[*MPA*] est très probablement⁶ une amélioration sous plusieurs aspects. Dans le cas des QDs[*TOP*], la réalisation de l'unité fonctionnelle choisie, avec notre matériel de laboratoire, nécessite environ 25 mL d'une solution à 1 µM, soit 25 nmol. Seule une faible proportion des QDs s'adsorbe effectivement sur les surfaces, une majorité est donc gâchée. Une manière de minimiser cela est de coller les lamelles par paires avec de la S1813 G2, car on ne souhaite microstructurer qu'une seule des faces de nos lamelles de verre⁷. On multiplie ainsi le nombre de lamelles préparées par 2 pour les mêmes quantités consommées, i.e. on divise les quantités consommées par 2 pour notre unité fonctionnelle. Cependant, l'utilisation de QDs[*MPA*] permet des économies bien plus importantes. Premièrement, on supprime l'utilisation de toluène comme solvant, au profit d'un tampon aqueux avec NaHCO₃ à 0,1 M. Deuxièmement, l'incubation des QDs[*MPA*] se fait hors boîte à gant : nous les incubons donc individuellement avec environ 100 à 150 µL de solution à 1 µM par lamelle, soit 0,75 nmol effectivement nécessaires au total. Autrement dit, pour notre unité fonctionnelle de 5 lamelles réalisées, l'utilisation des QDs[*MPA*] permet de diviser la quantité de QDs consommés par 15 à 30, par rapport aux QDs[*TOP*], selon que l'on considère ou non la possibilité de coller les lamelles par paires dans le protocole utilisant les QDs[*TOP*].

4. Sauf surprise concernant l'impact de fabrication des MPTES par rapport à celle des MPTMS.

5. Par exemple l'Irgacure 651, comme montré par Carbaugh *et al.* [348].

6. Sous réserve que les impacts du processus de fabrication du MPA ne soient pas significativement supérieurs à ceux de la fabrication des composés TOP et TOPO.

7. Cette étape s'insère entre l'étape de développement de la résine et l'étape de réactivation au Plasma-Air. Elle permet de plus de ne pas avoir à nettoyer l'arrière des lamelles après l'étape d'adsorption des QDs.

Ces différents éléments prometteurs, pour être confirmés, devront être confrontés aux impacts associés tout au long du cycle de vie (de la fabrication des consommables jusqu'à leur élimination et traitement comme déchets), de manière aussi exhaustive que possible, pour conclure sur les gains réels de ces différentes stratégies alternatives. De plus, il faut ajouter à ce type d'analyse une évaluation de la *criticité* des différents matériaux mis en œuvre [350]. Cette notion englobe la question des impacts environnementaux, pour aussi prendre en compte les enjeux de disponibilité des ressources et susceptibilité aux risques d'approvisionnement. À titre d'exemple, un écueil fréquent de la recherche sur les boîtes quantiques est de considérer les QDs à cœurs InP comme plus "verts" que les CdSe, sur la base de la toxicité inférieure des cœurs InP. Or, cette qualification implique de mettre de côté (a) le fait que l'utilisation d'indium est considérée comme ayant plus d'impact sur le changement climatique et (b) que l'indium est un matériau considéré significativement plus critique – résultats qui sont consistants à travers l'ensemble de la littérature concernée [351-353]. Il sera donc nécessaire, pour produire une évaluation rigoureuse de nos efforts d'optimisation écologique, de considérer tous ces aspects.

Bibliographie

- [1] R. MILO et al. *Cell biology by the numbers*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2016. 356 p. (cf. p. 7).
- [2] B. ALBERTS. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. Garland Science, Taylor et Francis Group, 2015. 1465 p. (cf. p. 7, 11, 12, 15, 16).
- [3] R. O. HYNES et al. *Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions*. In : Cold Spring Harb Perspect Biol 4.1 (2012), a004903. DOI : [10.1101/cshperspect.a004903](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903) (cf. p. 7).
- [4] J. Z. KECHAGIA et al. *Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment*. In : Nat Rev Mol Cell Biol 20.8 (2019), p. 457-473. DOI : [10.1038/s41580-019-0134-2](https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2) (cf. p. 7, 16).
- [5] P. WINCKLER et al. *Nonradiative Excitation Fluorescence: Probing Volumes Down to the Attoliter Range*. In : J. Phys. Chem. Lett. 1.16 (2010), p. 2451-2454. DOI : [10.1021/jz100917u](https://doi.org/10.1021/jz100917u) (cf. p. 8, 35, 36, 140).
- [6] L. RIACHY et al. *Nanometer-Scale Resolution Achieved with Nonradiative Excitation*. In : ACS Photonics 5.6 (2018), p. 2217-2224. DOI : [10.1021/acsp Photonics.8b00063](https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.8b00063) (cf. p. 8, 35).
- [7] M. THÉRY. *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*. In : J. Cell. Sci. 123 (Pt 24 2010), p. 4201-4213. DOI : [10.1242/jcs.075150](https://doi.org/10.1242/jcs.075150) (cf. p. 8, 24, 25, 97).
- [8] T. LECUIT. *Introduction : principes généraux de la motilité cellulaire — Collège de France*. 2021. URL : <https://www.college-de-france.fr/agenda/cours/motilite-de-cellules-unique/introduction-principes-generaux-de-la-motilite-cellulaire> (visité le 04/10/2022) (cf. p. 11, 12).
- [9] T. LECUIT. *Mécanique de la motilité I – (sur substrats) — Collège de France*. 2021. URL : <https://www.college-de-france.fr/agenda/cours/motilite-de-cellules-unique/mecanique-de-la-motilite-i-sur-substrats> (visité le 06/10/2022) (cf. p. 11, 14, 16).
- [10] J. TSAI et al. *Rigidity-Dependent Cross Talk between Integrin and Cadherin Signaling*. In : Biophysical Journal 96.6 (2009), p. L39-L41. DOI : [10.1016/j.bpj.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.005) (cf. p. 11).
- [11] N. BORGHI et al. *Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions*. In : PNAS 107.30 (2010), p. 13324-13329. DOI : [10.1073/pnas.1002662107](https://doi.org/10.1073/pnas.1002662107) (cf. p. 11).
- [12] E. RUOSLAHTI. *RGD and other Recognition Sequences for Integrins*. In : Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12.1 (1996), p. 697-715. DOI : [10.1146/annurev.cellbio.12.1.697](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697) (cf. p. 12).
- [13] J. D. HUMPHRIES et al. *Integrin ligands at a glance*. In : Journal of Cell Science 119.19 (2006), p. 3901-3903. DOI : [10.1242/jcs.03098](https://doi.org/10.1242/jcs.03098) (cf. p. 12).
- [14] S. SENGUPTA et al. *The principles of directed cell migration*. In : Nat Rev Mol Cell Biol 22.8 (2021), p. 529-547. DOI : [10.1038/s41580-021-00366-6](https://doi.org/10.1038/s41580-021-00366-6) (cf. p. 12, 13).
- [15] S. L. VECCHIO et al. *Collective Dynamics of Focal Adhesions Regulate Direction of Cell Motion*. In : cels 10.6 (2020), 535-542.e4. DOI : [10.1016/j.cels.2020.05.005](https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.05.005) (cf. p. 13).
- [16] C. IZZARD et al. *Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique*. In : Journal of Cell Science 21.1 (1976), p. 129-159. DOI : [10.1242/jcs.21.1.129](https://doi.org/10.1242/jcs.21.1.129) (cf. p. 13, 20).

- [17] M. ABERCROMBIE. *The Croonian Lecture, 1978 - The crawling movement of metazoan cells*. In : Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences (1980). DOI : [10.1098/rspb.1980.0017](https://doi.org/10.1098/rspb.1980.0017) (cf. p. 13, 20).
- [18] C. PESKIN et al. *Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet*. In : Biophysical Journal 65.1 (1993), p. 316-324. DOI : [10.1016/S0006-3495\(93\)81035-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81035-X) (cf. p. 14).
- [19] A. MOGILNER et al. *Cell motility driven by actin polymerization*. In : Biophysical Journal 71.6 (1996), p. 3030-3045. DOI : [10.1016/S0006-3495\(96\)79496-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79496-1) (cf. p. 14).
- [20] D. EL ARAWI. *Étude de l'adhérence de cellules individuelles par nanoscopie de fluorescence*. Thèse de doct. Université de Technologie de Troyes, 2019 (cf. p. 14, 20, 40, 41).
- [21] A. HALL. *Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton*. In : Science 279.5350 (1998), p. 509-514. DOI : [10.1126/science.279.5350.509](https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509) (cf. p. 14).
- [22] P. SENS et al. *Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility*. In : J. Phys.: Condens. Matter 27.27 (2015), p. 273103. DOI : [10.1088/0953-8984/27/27/273103](https://doi.org/10.1088/0953-8984/27/27/273103) (cf. p. 14).
- [23] P. KANCHANAWONG et al. *Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions*. In : Nature 468.7323 (2010), p. 580-584. DOI : [10.1038/nature09621](https://doi.org/10.1038/nature09621) (cf. p. 15, 16, 22, 23).
- [24] C. K. CHOI et al. *Actin and -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner*. In : Nat Cell Biol 10.9 (2008), p. 1039-1050 (cf. p. 15).
- [25] R. ZAIDEL-BAR et al. *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. In : Journal of Cell Science 116.22 (2003), p. 4605-4613. DOI : [10.1242/jcs.00792](https://doi.org/10.1242/jcs.00792) (cf. p. 15).
- [26] K. HU et al. *Differential Transmission of Actin Motion Within Focal Adhesions*. In : Science 315.5808 (2007), p. 111-115. DOI : [10.1126/science.1135085](https://doi.org/10.1126/science.1135085) (cf. p. 16).
- [27] L. B. CASE et al. *Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch*. In : Nat Cell Biol 17.8 (2015), p. 955-963. DOI : [10.1038/ncb3191](https://doi.org/10.1038/ncb3191) (cf. p. 16).
- [28] C. E. CHAN et al. *Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates*. In : Science 322.5908 (2008), p. 1687-1691. DOI : [10.1126/science.1163595](https://doi.org/10.1126/science.1163595) (cf. p. 16).
- [29] V. SWAMINATHAN et al. *The molecular clutch model for mechanotransduction evolves*. In : Nat Cell Biol 18.5 (2016), p. 459-461. DOI : [10.1038/ncb3350](https://doi.org/10.1038/ncb3350) (cf. p. 16).
- [30] A. A. KHALILI et al. *A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications*. In : International Journal of Molecular Sciences 16.8 (2015), p. 18149-18184. DOI : [10.3390/ijms160818149](https://doi.org/10.3390/ijms160818149) (cf. p. 17, 24).
- [31] P. ROCA-CUSACHS et al. *Quantifying forces in cell biology*. In : Nat Cell Biol 19.7 (2017), p. 742-751. DOI : [10.1038/ncb3564](https://doi.org/10.1038/ncb3564) (cf. p. 17).
- [32] K. V. CHRIST et al. *Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates*. In : Journal of Adhesion Science and Technology 24.13 (2010), p. 2027-2058. DOI : [10.1163/016942410X507911](https://doi.org/10.1163/016942410X507911) (cf. p. 17).
- [33] K.-L. P. SUNG et al. *Adhesion Strength of Human Ligament Fibroblasts*. In : Journal of Biomechanical Engineering 116.3 (1994), p. 237-242. DOI : [10.1115/1.2895725](https://doi.org/10.1115/1.2895725) (cf. p. 17).
- [34] R. MERKEL et al. *Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*. In : Nature 397.6714 (1999), p. 50-53. DOI : [10.1038/16219](https://doi.org/10.1038/16219) (cf. p. 17).
- [35] H. WANG et al. *Micropipette-based biomechanical nanotools on living cells*. In : Eur Biophys J 51.2 (2022), p. 119-133. DOI : [10.1007/s00249-021-01587-5](https://doi.org/10.1007/s00249-021-01587-5) (cf. p. 17).

- [36] E. EVANS et al. *Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces*. In : Biophysical Journal 68.6 (1995), p. 2580-2587. DOI : 10.1016/S0006-3495(95)80441-8 (cf. p. 17).
- [37] T.-W. QIN et al. *Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly(dl-lactide-co-glycolide) substrates*. In : Biomaterials 26.33 (2005), p. 6635-6642. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2005.04.023 (cf. p. 17).
- [38] C. P. PALMER et al. *Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression*. In : Eur Biophys J 37.4 (2008), p. 359-368. DOI : 10.1007/s00249-007-0219-2 (cf. p. 17).
- [39] Y. CHEN et al. *Fluorescence Biomembrane Force Probe: Concurrent Quantitation of Receptor-ligand Kinetics and Binding-induced Intracellular Signaling on a Single Cell*. In : J Vis Exp 102 (2015), p. 52975. DOI : 10.3791/52975 (cf. p. 17).
- [40] A. ASHKIN et al. *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. In : Opt. Lett., OL 11.5 (1986), p. 288-290. DOI : 10.1364/OL.11.000288 (cf. p. 18).
- [41] S. JENEY et al. *Monitoring ligand-receptor interactions by photonic force microscopy*. In : Nanotechnology 21.25 (2010), p. 255102. DOI : 10.1088/0957-4484/21/25/255102 (cf. p. 18).
- [42] D. CHOQUET et al. *Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages*. In : Cell 88.1 (1997), p. 39-48. DOI : 10.1016/S0092-8674(00)81856-5 (cf. p. 18).
- [43] F. BORDELEAU et al. *Measuring integrated cellular mechanical stress response at focal adhesions by optical tweezers*. In : JBO 16.9 (2011), p. 095005. DOI : 10.1117/1.3626864 (cf. p. 18).
- [44] M. SCHWINGEL et al. *Force Mapping during the Formation and Maturation of Cell Adhesion Sites with Multiple Optical Tweezers*. In : PLOS ONE 8.1 (2013), e54850. DOI : 10.1371/journal.pone.0054850 (cf. p. 18).
- [45] A. V. TAUBENBERGER et al. *Single-Cell Force Spectroscopy, an Emerging Tool to Quantify Cell Adhesion to Biomaterials*. In : Tissue Engineering Part B: Reviews 20.1 (2014), p. 40-55. DOI : 10.1089/ten.teb.2013.0125 (cf. p. 18).
- [46] E.-L. FLORIN et al. *Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs*. In : Science 264.5157 (1994), p. 415-417. DOI : 10.1126/science.8153628 (cf. p. 18).
- [47] P. P. LEHINKARI et al. *Single Integrin Molecule Adhesion Forces in Intact Cells Measured by Atomic Force Microscopy*. In : Biochemical and Biophysical Research Communications 259.3 (1999), p. 645-650. DOI : 10.1006/bbrc.1999.0827 (cf. p. 18).
- [48] F. LI et al. *Force Measurements of the 51 Integrin-Fibronectin Interaction*. In : Biophysical Journal 84.2 (2003), p. 1252-1262. DOI : 10.1016/S0006-3495(03)74940-6 (cf. p. 18).
- [49] L. CHIÈZE et al. *Quantitative characterization of single-cell adhesion properties by atomic force microscopy using protein-functionalized microbeads*. In : J Mol Recognit 32.3 (2019), e2767. DOI : 10.1002/jmr.2767 (cf. p. 18).
- [50] A. K. HARRIS et al. *Silicone Rubber Substrata: A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion*. In : Science 208.4440 (1980), p. 177-179. DOI : 10.1126/science.6987736 (cf. p. 18).
- [51] M. DEMBO et al. *Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts*. In : Biophys J 76.4 (1999), p. 2307-2316 (cf. p. 18).
- [52] S. R. POLIO et al. *Topographical control of multiple cell adhesion molecules for traction force microscopy*. In : Integrative Biology 6.3 (2014), p. 357-365. DOI : 10.1039/c3ib40127h (cf. p. 18).
- [53] M. BERGERT et al. *Confocal reference free traction force microscopy*. In : Nat Commun 7.1 (2016), p. 12814. DOI : 10.1038/ncomms12814 (cf. p. 18).

- [54] H. DELANOË-AYARI et al. *4D Traction Force Microscopy Reveals Asymmetric Cortical Forces in Migrating Dictyostelium Cells*. In : Phys. Rev. Lett. 105.24 (2010). Publisher: American Physical Society, p. 248103. DOI : [10.1103/PhysRevLett.105.248103](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.248103) (cf. p. 19).
- [55] T. M. KOCH et al. *3D Traction Forces in Cancer Cell Invasion*. In : PLOS ONE 7.3 (2012), e33476. DOI : [10.1371/journal.pone.0033476](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033476) (cf. p. 19).
- [56] S. I. FRALEY et al. *A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility*. In : Nat Cell Biol 12.6 (2010), p. 598-604. DOI : [10.1038/ncb2062](https://doi.org/10.1038/ncb2062) (cf. p. 19).
- [57] H. J. KONG et al. *FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 102.12 (2005), p. 4300-4305. DOI : [10.1073/pnas.0405873102](https://doi.org/10.1073/pnas.0405873102) (cf. p. 19).
- [58] A. FREIKAMP et al. *Investigating piconewton forces in cells by FRET-based molecular force microscopy*. In : Journal of Structural Biology. Molecular Forces to Cellular Function 197.1 (2017), p. 37-42. DOI : [10.1016/j.jsb.2016.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.011) (cf. p. 19).
- [59] H. COLIN-YORK et al. *Dissection of mechanical force in living cells by super-resolved traction force microscopy*. In : Nat Protoc 12.4 (2017), p. 783-796. DOI : [10.1038/nprot.2017.009](https://doi.org/10.1038/nprot.2017.009) (cf. p. 19).
- [60] L. BARBIERI et al. *Two-dimensional TIRF-SIM-traction force microscopy (2D TIRF-SIM-TFM)*. In : Nat Commun 12.1 (2021), p. 2169. DOI : [10.1038/s41467-021-22377-9](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22377-9) (cf. p. 19).
- [61] U. S. SCHWARZ et al. *Traction force microscopy on soft elastic substrates: A guide to recent computational advances*. In : Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. Mechanobiology 1853.11 (2015), p. 3095-3104. DOI : [10.1016/j.bbamcr.2015.05.028](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.028) (cf. p. 19).
- [62] J. I. DIGABEL et al. *Magnetic micropillars as a tool to govern substrate deformations*. In : Lab Chip 11.15 (2011), p. 2630-2636. DOI : [10.1039/C1LC20263D](https://doi.org/10.1039/C1LC20263D) (cf. p. 19).
- [63] C. M. BIDAN et al. *Magneto-active substrates for local mechanical stimulation of living cells*. In : Sci Rep 8.1 (2018), p. 1464. DOI : [10.1038/s41598-018-19804-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19804-1) (cf. p. 19).
- [64] S. LEE et al. *Cell motility regulation on a stepped micro pillar array device (SMPAD) with a discrete stiffness gradient*. In : Soft Matter 12.8 (2016), p. 2325-2333. DOI : [10.1039/C5SM00649J](https://doi.org/10.1039/C5SM00649J) (cf. p. 19, 25).
- [65] S. GHASSEMI et al. *Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 109.14 (2012), p. 5328-5333. DOI : [10.1073/pnas.1119886109](https://doi.org/10.1073/pnas.1119886109) (cf. p. 19).
- [66] C. R. BURCH et al. *Phase-Contrast Microscopy*. In : J. Sci. Instrum. 19.5 (1942), p. 71-75. DOI : [10.1088/0950-7671/19/5/302](https://doi.org/10.1088/0950-7671/19/5/302) (cf. p. 19).
- [67] A. TAYLOR. *Attachment and spreading of cells in culture*. In : Experimental Cell Research 8 (1961), p. 154-173. DOI : [10.1016/0014-4827\(61\)90346-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90346-9) (cf. p. 19).
- [68] J. RÄDLER et al. *Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces*. In : J. Phys. II France 3.5 (1993), p. 727-748. DOI : [10.1051/jp2:1993163](https://doi.org/10.1051/jp2:1993163) (cf. p. 20).
- [69] L. LIMOZIN et al. *Quantitative Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) in Soft Matter and Cell Adhesion*. In : Chem. Eur. J. of Chem. Phys. 10.16 (2009), p. 2752-2768. DOI : [10.1002/cphc.200900601](https://doi.org/10.1002/cphc.200900601) (cf. p. 20).
- [70] O. J. T. MCCARTY et al. *Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion*. In : Journal of Thrombosis and Haemostasis 2.10 (2004), p. 1823-1833. DOI : [10.1111/j.1538-7836.2004.00925.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00925.x) (cf. p. 20).
- [71] D. AXELROD. *Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence*. In : Journal of Cell Biology 89.1 (1981), p. 141-145. DOI : [10.1083/jcb.89.1.141](https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141) (cf. p. 20, 40).

- [72] M. CARDOSO DOS SANTOS. *Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence*. Thèse de doct. Troyes, 2015 (cf. p. 20, 48, 82).
- [73] M. CARDOSO DOS SANTOS et al. *Topography of Cells Revealed by Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*. In : Biophysical Journal 111.6 (2016), p. 1316-1327. DOI : 10.1016/j.bpj.2016.06.043 (cf. p. 21, 48).
- [74] D. EL ARAWI et al. *Advanced quantification for single-cell adhesion by variable-angle TIRF nanoscopy*. In : Biophysical Reports 1.2 (2021), p. 100021. DOI : 10.1016/j.bpr.2021.100021 (cf. p. 21, 48, 140).
- [75] L. SCHERMELLEH et al. *Super-resolution microscopy demystified*. In : Nat Cell Biol 21.1 (2019), p. 72-84. DOI : 10.1038/s41556-018-0251-8 (cf. p. 21).
- [76] M. G. L. GUSTAFSSON et al. *Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination*. In : Biophysical Journal 94.12 (2008), p. 4957-4970. DOI : 10.1529/biophysj.107.120345 (cf. p. 21).
- [77] P. KNER et al. *Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination*. In : Nat Methods 6.5 (2009), p. 339-342. DOI : 10.1038/nmeth.1324 (cf. p. 21).
- [78] D. LI et al. *Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics*. In : Science 349.6251 (2015), aab3500. DOI : 10.1126/science.aab3500 (cf. p. 21).
- [79] A. F. CARISEY et al. *Nanoscale Dynamism of Actin Enables Secretory Function in Cytolytic Cells*. In : Current Biology 28.4 (2018), 489-502.e9. DOI : 10.1016/j.cub.2017.12.044 (cf. p. 21).
- [80] Y. GUO et al. *Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales*. In : Cell 175.5 (2018), 1430-1442.e17. DOI : 10.1016/j.cell.2018.09.057 (cf. p. 21).
- [81] E. BETZIG et al. *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. In : Science 313.5793 (2006), p. 1642-1645. DOI : 10.1126/science.1127344 (cf. p. 22).
- [82] B. HUANG et al. *Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*. In : Science 319.5864 (2008), p. 810-813. DOI : 10.1126/science.1153529 (cf. p. 22).
- [83] H. LI et al. *Switchable Fluorophores for Single-Molecule Localization Microscopy*. In : Chem. Rev. 118.18 (2018), p. 9412-9454. DOI : 10.1021/acs.chemrev.7b00767 (cf. p. 22).
- [84] S. CULLEY et al. *Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts*. In : Nat Methods 15.4 (2018), p. 263-266. DOI : 10.1038/nmeth.4605 (cf. p. 22).
- [85] M. HEILEMANN et al. *Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes*. In : Angew. Chem. Int. Ed. 47.33 (2008), p. 6172-6176. DOI : 10.1002/anie.200802376 (cf. p. 22).
- [86] T. A. KLAR et al. *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 97.15 (2000), p. 8206-8210. DOI : 10.1073/pnas.97.15.8206 (cf. p. 22).
- [87] F. GÖTTFERT et al. *Coaligned Dual-Channel STED Nanoscopy and Molecular Diffusion Analysis at 20 nm Resolution*. In : Biophysical Journal 105.1 (2013), p. L01-L03. DOI : 10.1016/j.bpj.2013.05.029 (cf. p. 22).
- [88] C. OSSEFORTH et al. *Simultaneous dual-color 3D STED microscopy*. In : Opt. Express, OE 22.6 (2014), p. 7028-7039. DOI : 10.1364/OE.22.007028 (cf. p. 22).
- [89] K. C. GWOSCH et al. *MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells*. In : Nat Methods 17.2 (2020), p. 217-224. DOI : 10.1038/s41592-019-0688-0 (cf. p. 23).

- [90] M. WEBER et al. *MINSTED fluorescence localization and nanoscopy*. In : Nat. Photonics 15.5 (2021), p. 361-366. DOI : [10.1038/s41566-021-00774-2](https://doi.org/10.1038/s41566-021-00774-2) (cf. p. 23).
- [91] O. ROSSIER et al. *Integrins 1 and 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions*. In : Nat Cell Biol 14.10 (2012), p. 1057-1067. DOI : [10.1038/ncb2588](https://doi.org/10.1038/ncb2588) (cf. p. 23).
- [92] A. I. CHIZHIK et al. *Metal-Induced Energy Transfer Imaging*. In : Nanoscale Photonic Imaging. Sous la dir. de T. SALDITT et al. Topics in Applied Physics. Springer International Publishing, 2020, p. 227-239 (cf. p. 23).
- [93] M. Y. BEREZIN et al. *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*. In : Chem Rev 110.5 (2010), p. 2641-2684. DOI : [10.1021/cr900343z](https://doi.org/10.1021/cr900343z) (cf. p. 23).
- [94] A. I. CHIZHIK et al. *Metal-induced energy transfer for live cell nanoscopy*. In : Nature Photon 8.2 (2014), p. 124-127. DOI : [10.1038/nphoton.2013.345](https://doi.org/10.1038/nphoton.2013.345) (cf. p. 23).
- [95] N. KAREDLA et al. *Single-Molecule Metal-Induced Energy Transfer (smMIET): Resolving Nanometer Distances at the Single-Molecule Level*. In : ChemPhysChem 15.4 (2014), p. 705-711. DOI : [10.1002/cphc.201300760](https://doi.org/10.1002/cphc.201300760) (cf. p. 23).
- [96] N. KAREDLA et al. *Three-dimensional single-molecule localization with nanometer accuracy using Metal-Induced Energy Transfer (MIET) imaging*. In : J. Chem. Phys. 148.20 (2018), p. 204201. DOI : [10.1063/1.5027074](https://doi.org/10.1063/1.5027074) (cf. p. 23).
- [97] W. HWANG et al. *Large field-of-view nanometer-sectioning microscopy by using metal-induced energy transfer and biexponential lifetime analysis*. In : Commun Biol 4.1 (2021), p. 1-7. DOI : [10.1038/s42003-020-01628-3](https://doi.org/10.1038/s42003-020-01628-3) (cf. p. 23).
- [98] A. M. CHIZHIK et al. *Dual-color metal-induced and Förster resonance energy transfer for cell nanoscopy*. In : MBoC 29.7 (2018), p. 846-851. DOI : [10.1091/mbc.E17-05-0314](https://doi.org/10.1091/mbc.E17-05-0314) (cf. p. 23).
- [99] P. ROBERT et al. *Minimal Encounter Time and Separation Determine Ligand-Receptor Binding in Cell Adhesion*. In : Biophysical Journal 100.11 (2011), p. 2642-2651. DOI : [10.1016/j.bpj.2011.04.011](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.011) (cf. p. 24).
- [100] P. RUPPRECHT et al. *A tapered channel microfluidic device for comprehensive cell adhesion analysis, using measurements of detachment kinetics and shear stress-dependent motion*. In : Biomicrofluidics 6.1 (2012), p. 014107. DOI : [10.1063/1.3673802](https://doi.org/10.1063/1.3673802) (cf. p. 24).
- [101] Y. ALAPAN et al. *Heterogeneous Red Blood Cell Adhesion and Deformability in Sickle Cell Disease*. In : Sci Rep 4.1 (2014), p. 7173. DOI : [10.1038/srep07173](https://doi.org/10.1038/srep07173) (cf. p. 24).
- [102] K. C. CHAW et al. *Multi-step microfluidic device for studying cancer metastasis*. In : Lab Chip 7.8 (2007), p. 1041. DOI : [10.1039/b707399m](https://doi.org/10.1039/b707399m) (cf. p. 24).
- [103] K. V. CHRIST et al. *Measurement of single-cell adhesion strength using a microfluidic assay*. In : Biomed Microdevices 12.3 (2010), p. 443-455. DOI : [10.1007/s10544-010-9401-x](https://doi.org/10.1007/s10544-010-9401-x) (cf. p. 24).
- [104] C. VÉZY et al. *Adhesion induced non-planar and asynchronous flow of a giant vesicle membrane in an external shear flow*. In : Soft Matter 3.7 (2007), p. 844-851. DOI : [10.1039/B700550D](https://doi.org/10.1039/B700550D) (cf. p. 24).
- [105] P. MAIURI et al. *The first World Cell Race*. In : Curr Biol 22.17 (2012), R673-R675. DOI : [10.1016/j.cub.2012.07.052](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.052) (cf. p. 25).
- [106] B. VALEUR. *Introduction: On the Origin of the Terms Fluorescence, Phosphorescence, and Luminescence*. In : New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Sous la dir. de B. VALEUR et al. Réd. par O. WOLFBEIS. T. 1. Springer Berlin Heidelberg, 2001, p. 3-6 (cf. p. 27).
- [107] B. VALEUR et al. *A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory*. In : J. Chem. Educ. 88.6 (2011), p. 731-738. DOI : [10.1021/ed100182h](https://doi.org/10.1021/ed100182h) (cf. p. 27).

- [108] F. P. SCHÄFER et al., éd. *Dye lasers*. 3rd enl. and rev. ed. Topics in applied physics v. 1. Springer-Verlag, 1990. 244 p. (cf. p. 27).
- [109] U. KUBITSCHKEK, éd. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. Second edition. Wiley-VCH, 2017. 482 p. (cf. p. 27, 30, 33, 34, 40).
- [110] R. M. DICKSON et al. *On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein*. In : Nature 388.6640 (1997), p. 355-358. DOI : 10.1038/41048 (cf. p. 29, 136).
- [111] A. P. DEMCHENKO. *Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection*. In : 8.2 (2020), p. 022001. DOI : 10.1088/2050-6120/ab7365 (cf. p. 29).
- [112] I. MEDINTZ et al., éd. *FRET - Förster resonance energy transfer: from theory to applications*. Wiley-VCH, 2014. 791 p. (cf. p. 30, 31, 34).
- [113] T. FÖRSTER. *Energy migration and fluorescence*. In : J. Biomed. Opt. 17.1 (2012), p. 011002. DOI : 10.1117/1.JBO.17.1.011002 (cf. p. 31).
- [114] A. R. CLAPP et al. *Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors*. In : J. Am. Chem. Soc. 126.1 (2004), p. 301-310. DOI : 10.1021/ja037088b (cf. p. 32, 124).
- [115] P. K. WOLBER et al. *An analytic solution to the Förster energy transfer problem in two dimensions*. In : Biophysical Journal 28.2 (1979), p. 197-210. DOI : 10.1016/S0006-3495(79)85171-1 (cf. p. 33).
- [116] B. W. van der MEER. *Kappa-squared: from nuisance to new sense*. In : Reviews in Molecular Biotechnology. FRET in Biology 82.3 (2002), p. 181-196. DOI : 10.1016/S1389-0352(01)00037-X (cf. p. 34).
- [117] L. STRYER. *Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler*. In : Annu. Rev. Biochem. 47.1 (1978), p. 819-846. DOI : 10.1146/annurev.bi.47.070178.004131 (cf. p. 35).
- [118] E. A. JARES-ERIJMAN et al. *FRET imaging*. In : Nat Biotechnol 21.11 (2003), p. 1387-1395. DOI : 10.1038/nbt896 (cf. p. 35).
- [119] K. TROFYMCHUK et al. *Giant light-harvesting nanoantenna for single-molecule detection in ambient light*. In : Nature Photonics 11 (2017), p. 9. DOI : 10.1038/s41566-017-0001-7 (cf. p. 35).
- [120] Y. NAGAI et al. *A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo*. In : Nat Biotechnol 18.3 (2000), p. 313-316. DOI : 10.1038/73767 (cf. p. 35, 136).
- [121] R. D. MITRA et al. *Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein*. In : Gene 173.1 (1996), p. 13-17. DOI : 10.1016/0378-1119(95)00768-7 (cf. p. 35, 136).
- [122] X. XU et al. *Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer*. In : Nucleic Acids Research 26.8 (1998), p. 2034-2035. DOI : 10.1093/nar/26.8.2034 (cf. p. 35, 136).
- [123] A. G. HARPUR et al. *Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells*. In : Nat Biotechnol 19.2 (2001), p. 167-169. DOI : 10.1038/84443 (cf. p. 35, 136).
- [124] A. MIYAWAKI et al. *Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin*. In : Nature 388.6645 (1997), p. 882-887. DOI : 10.1038/42264 (cf. p. 35, 136).
- [125] C. GAYRARD et al. *FRET-based Molecular Tension Microscopy*. In : Methods. Experimental Approaches in Mechanotransduction 94 (2016), p. 33-42. DOI : 10.1016/j.ymeth.2015.07.010 (cf. p. 35).
- [126] C. GRASHOFF et al. *Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics*. In : Nature 466.7303 (2010), p. 263-266. DOI : 10.1038/nature09198 (cf. p. 35).

- [127] N. BORGHI et al. *E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 109.31 (2012), p. 12568-12573. DOI : 10.1073/pnas.1204390109 (cf. p. 35).
- [128] A. ZEUG et al. *Quantitative Intensity-Based FRET Approaches—A Comparative Snapshot*. In : Biophysical Journal 103.9 (2012), p. 1821-1827. DOI : 10.1016/j.bpj.2012.09.031 (cf. p. 36).
- [129] C. THALER et al. *Quantitative Multiphoton Spectral Imaging and Its Use for Measuring Resonance Energy Transfer*. In : Biophysical Journal 89.4 (2005), p. 2736-2749. DOI : 10.1529/biophysj.105.061853 (cf. p. 36).
- [130] G. W. GORDON et al. *Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy*. In : Biophysical Journal 74.5 (1998), p. 2702-2713. DOI : 10.1016/S0006-3495(98)77976-7 (cf. p. 36).
- [131] D. C. YOUVAN et al. *Fluorescence Imaging Micro-Spectrophotometer (FIMS)*. In : Biotechnology et alia 1 (1997), p. 16 (cf. p. 36, 136).
- [132] D. C. YOUVAN et al. *Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads*. In : Biotechnology et alia 3 (1997), p. 18 (cf. p. 36, 136).
- [133] Z. XIA et al. *Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes*. In : Biophysical Journal 81.4 (2001), p. 2395-2402. DOI : 10.1016/S0006-3495(01)75886-9 (cf. p. 36).
- [134] B. HOCHREITER et al. *Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells*. In : Sci Rep 9.1 (2019), p. 8233. DOI : 10.1038/s41598-019-44650-0 (cf. p. 36).
- [135] C. BERNEY et al. *FRET or No FRET: A Quantitative Comparison*. In : Biophys J 84.6 (2003), p. 3992-4010 (cf. p. 37, 127).
- [136] J. WLODARCZYK et al. *Analysis of FRET Signals in the Presence of Free Donors and Acceptors*. In : Biophysical Journal 94.3 (2008), p. 986-1000. DOI : 10.1529/biophysj.107.111773 (cf. p. 37).
- [137] P. T. ARSENOVIC et al. *SensorFRET: A Standardless Approach to Measuring Pixel-based Spectral Bleed-through and FRET Efficiency using Spectral Imaging*. In : Sci Rep 7.1 (2017), p. 15609. DOI : 10.1038/s41598-017-15411-8 (cf. p. 37).
- [138] T. ZAL et al. *Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells*. In : Biophysical Journal 86.6 (2004), p. 3923-3939. DOI : 10.1529/biophysj.103.022087 (cf. p. 37).
- [139] S. V. KOUSHIK et al. *Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET Reference Standards*. In : Biophysical Journal 91.12 (2006), p. L99-L101. DOI : 10.1529/biophysj.106.096206 (cf. p. 37).
- [140] N. K. LEE et al. *Accurate FRET Measurements within Single Diffusing Biomolecules Using Alternating-Laser Excitation*. In : Biophysical Journal 88.4 (2005), p. 2939-2953. DOI : 10.1529/biophysj.104.054114 (cf. p. 37).
- [141] B. HELLENKAMP et al. *Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study*. In : Nat Methods 15.9 (2018), p. 669-676. DOI : 10.1038/s41592-018-0085-0 (cf. p. 37).
- [142] A. COULLOMB. *Développement de substrats actifs et d'une méthode d'analyse de FRET quantitative pour décoder la mécanotransduction*. Theses. Université Grenoble Alpes, 2018 (cf. p. 37).
- [143] A. COULLOMB et al. *QUANTI-FRET: a framework for quantitative FRET measurements in living cells*. In : Sci Rep 10.1 (2020), p. 6504. DOI : 10.1038/s41598-020-62924-w (cf. p. 37, 123, 127).
- [144] D. E. ARAWI et al. *Incidence angle calibration for prismless total internal reflection fluorescence microscopy*. In : Opt. Lett., OL 44.7 (2019), p. 1710-1713. DOI : 10.1364/OL.44.001710 (cf. p. 46).

- [145] M. OHEIM et al. *Supercritical Angle Fluorescence Microscopy and Spectroscopy*. In : Biophysical Journal 118.10 (2020), p. 2339-2348. DOI : 10.1016/j.bpj.2020.03.029 (cf. p. 46).
- [146] N. BOURG et al. *Direct optical nanoscopy with axially localized detection*. In : Nature Photon 9.9 (2015), p. 587-593. DOI : 10.1038/nphoton.2015.132 (cf. p. 46).
- [147] J. DESCHAMPS et al. *3D superresolution microscopy by supercritical angle detection*. In : Opt. Express, OE 22.23 (2014), p. 29081-29091. DOI : 10.1364/OE.22.029081 (cf. p. 46).
- [148] A. I. EKIMOV et al. *The quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductors*. In : JETP Lett 34.6 (1981), p. 363 (cf. p. 51).
- [149] A. I. EKIMOV et al. *Quantum size effect in semiconductor microcrystals*. In : Solid State Communications 56.11 (1985), p. 921-924. DOI : 10.1016/S0038-1098(85)80025-9 (cf. p. 51).
- [150] R. ROSSETTI et al. *Electron-hole recombination emission as a probe of surface chemistry in aqueous cadmium sulfide colloids*. In : J. Phys. Chem. 86.23 (1982), p. 4470-4472. DOI : 10.1021/j100220a003 (cf. p. 51).
- [151] Z. ALFASSI et al. *Photochemistry of colloidal metal sulfides. 3. Photoelectron emission from cadmium sulfide and cadmium sulfide-zinc sulfide cocolloids*. In : J. Phys. Chem. 86.24 (1982), p. 4656-4657. DOI : 10.1021/j100221a002 (cf. p. 51).
- [152] C. B. MURRAY et al. *Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites*. In : J. Am. Chem. Soc. 115.19 (1993), p. 8706-8715. DOI : 10.1021/ja00072a025 (cf. p. 51, 73).
- [153] A. L. EFROS. *Luminescence polarization of CdSe microcrystals*. In : Phys. Rev. B 46.12 (1992), p. 7448-7458. DOI : 10.1103/PhysRevB.46.7448 (cf. p. 51).
- [154] A. L. EFROS et al. *Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band: Dark and bright exciton states*. In : Phys. Rev. B 54.7 (1996), p. 4843-4856. DOI : 10.1103/PhysRevB.54.4843 (cf. p. 51, 66).
- [155] A. L. EFROS et al. *Quantum size level structure of narrow-gap semiconductor nanocrystals: Effect of band coupling*. In : Phys. Rev. B 58.11 (1998), p. 7120-7135. DOI : 10.1103/PhysRevB.58.7120 (cf. p. 51).
- [156] A. L. EFROS et al. *The Electronic Structure of Semiconductor Nanocrystals*. In : Annual Review of Materials Science 30.1 (2000), p. 475-521. DOI : 10.1146/annurev.matsci.30.1.475 (cf. p. 51, 53, 54, 66).
- [157] A. AUBRET. *Nanoparticules semi-conductrices et plasmoniques comme sondes locales de l'environnement diélectrique*. Thèse de doct. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015 (cf. p. 51).
- [158] E. CASSETTE. *Nanocristaux de semi-conducteurs II-VI et I-III-VI : Contrôle des propriétés optiques de structures coeur/coque*. Thèse de doct. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012 (cf. p. 52, 53, 54, 66).
- [159] L. E. BRUS. *Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state*. In : The Journal of Chemical Physics 80.9 (1984), p. 4403-4409. DOI : 10.1063/1.447218 (cf. p. 52).
- [160] V. G. RESHMA et al. *Quantum dots: Applications and safety consequences*. In : Journal of Luminescence 205 (2019), p. 287-298. DOI : 10.1016/j.jlumin.2018.09.015 (cf. p. 53).
- [161] M. A. HINES et al. *Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals*. In : J. Phys. Chem. 100.2 (1996), p. 468-471. DOI : 10.1021/jp9530562 (cf. p. 53).
- [162] C. A. LEATHERDALE et al. *On the Absorption Cross Section of CdSe Nanocrystal Quantum Dots*. In : J. Phys. Chem. B 106.31 (2002), p. 7619-7622. DOI : 10.1021/jp025698c (cf. p. 54, 59).

- [163] I. MOREELS et al. *Band-Edge Exciton Fine Structure of Small, Nearly Spherical Colloidal CdSe/ZnS Quantum Dots*. In : ACS Nano 5.10 (2011), p. 8033-8039. DOI : 10.1021/nn202604z (cf. p. 54, 67).
- [164] M. NIRMAL et al. *Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals*. In : Nature 383.6603 (1996), p. 802-804. DOI : 10.1038/383802a0 (cf. p. 54).
- [165] M. KUNO et al. *Nonexponential "blinking" kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior*. In : The Journal of Chemical Physics 112.7 (2000), p. 3117-3120. DOI : 10.1063/1.480896 (cf. p. 54).
- [166] G. BACHER et al. *Biexciton versus Exciton Lifetime in a Single Semiconductor Quantum Dot*. In : Phys. Rev. Lett. 83.21 (1999), p. 4417-4420. DOI : 10.1103/PhysRevLett.83.4417 (cf. p. 54).
- [167] N. YOSHIKAWA et al. *Biexciton state causes photoluminescence fluctuations in CdSe/ZnS core/shell quantum dots at high photoexcitation densities*. In : Phys. Rev. B 88.15 (2013), p. 155440. DOI : 10.1103/PhysRevB.88.155440 (cf. p. 54, 68).
- [168] Y.-S. PARK et al. *Auger Recombination of Biexcitons and Negative and Positive Trions in Individual Quantum Dots*. In : ACS Nano 8.7 (2014), p. 7288-7296. DOI : 10.1021/nn5023473 (cf. p. 54, 68).
- [169] B. R. FISHER et al. *Emission Intensity Dependence and Single-Exponential Behavior In Single Colloidal Quantum Dot Fluorescence Lifetimes*. In : J. Phys. Chem. B 108.1 (2004), p. 143-148. DOI : 10.1021/jp035756+ (cf. p. 55, 68).
- [170] K. ZHANG et al. *Continuous Distribution of Emission States from Single CdSe/ZnS Quantum Dots*. In : Nano Lett. 6.4 (2006), p. 843-847. DOI : 10.1021/nl060483q (cf. p. 55, 68).
- [171] R. SCHMIDT et al. *The Fluorescence Intermittency for Quantum Dots Is Not Power-Law Distributed: A Luminescence Intensity Resolved Approach*. In : ACS Nano 8.4 (2014), p. 3506-3521. DOI : 10.1021/nn406562a (cf. p. 55).
- [172] G. YUAN et al. *Two Mechanisms Determine Quantum Dot Blinking*. In : ACS Nano 12.4 (2018), p. 3397-3405. DOI : 10.1021/acsnano.7b09052 (cf. p. 55).
- [173] S. R. CORDERO et al. *Photo-Activated Luminescence of CdSe Quantum Dot Monolayers*. In : J. Phys. Chem. B 104.51 (2000). Publisher: American Chemical Society, p. 12137-12142. DOI : 10.1021/jp001771s (cf. p. 55).
- [174] M. JONES et al. *Photoenhancement of Luminescence in Colloidal CdSe Quantum Dot Solutions*. In : J. Phys. Chem. B 107.41 (2003), p. 11346-11352. DOI : 10.1021/jp035598m (cf. p. 55).
- [175] L. MANNA et al. *Epitaxial Growth and Photochemical Annealing of Graded CdS/ZnS Shells on Colloidal CdSe Nanorods*. In : J. Am. Chem. Soc. 124.24 (2002). Publisher: American Chemical Society, p. 7136-7145. DOI : 10.1021/ja025946i (cf. p. 55).
- [176] C. CARRILLO-CARRIÓN et al. *Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light*. In : Chem. Commun. 35 (2009), p. 5214. DOI : 10.1039/b904381k (cf. p. 55).
- [177] B. MAHLER et al. *Towards non-blinking colloidal quantum dots*. In : Nature Mater 7.8 (2008), p. 659-664. DOI : 10.1038/nmat2222 (cf. p. 55).
- [178] Y. CHEN et al. *"Giant" Multishell CdSe Nanocrystal Quantum Dots with Suppressed Blinking*. In : J. Am. Chem. Soc. 130.15 (2008), p. 5026-5027. DOI : 10.1021/ja711379k (cf. p. 55).
- [179] P. SPINICELLI et al. *Bright and Grey States in CdSe-CdS Nanocrystals Exhibiting Strongly Reduced Blinking*. In : PHYSICAL REVIEW LETTERS (2009), p. 4 (cf. p. 55).
- [180] G. E. CRAGG et al. *Suppression of Auger Processes in Confined Structures*. In : Nano Lett. 10.1 (2010), p. 313-317. DOI : 10.1021/nl903592h (cf. p. 55).
- [181] O. CHEN et al. *Compact high-quality CdSe/CdS core/shell nanocrystals with narrow emission line-widths and suppressed blinking*. In : Nat Mater 12.5 (2013), p. 445-451. DOI : 10.1038/nmat3539 (cf. p. 55).

- [182] H. QIN et al. *Single-Dot Spectroscopy of Zinc-Blende CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals: Nonblinking and Correlation with Ensemble Measurements*. In : J. Am. Chem. Soc. 136.1 (2014), p. 179-187. DOI : 10.1021/ja4078528 (cf. p. 55).
- [183] K. SANDERSON. *Quantum dots go large*. In : Nature 459.7248 (2009), p. 760-761. DOI : 10.1038/459760a (cf. p. 56).
- [184] Y. A. YANG et al. *Synthesis of CdSe and CdTe Nanocrystals without Precursor Injection*. In : Angew. Chem. 117.41 (2005), p. 6870-6873. DOI : 10.1002/ange.200502279 (cf. p. 57, 61, 73).
- [185] V. K. LAMER et al. *Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols*. In : J. Am. Chem. Soc. 72.11 (1950), p. 4847-4854. DOI : 10.1021/ja01167a001 (cf. p. 58).
- [186] J. J. LI et al. *Large-Scale Synthesis of Nearly Monodisperse CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals Using Air-Stable Reagents via Successive Ion Layer Adsorption and Reaction*. In : J. Am. Chem. Soc. 125.41 (2003), p. 12567-12575. DOI : 10.1021/ja0363563 (cf. p. 58, 73).
- [187] W. W. YU et al. *Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals*. In : Chem. Mater. 15.14 (2003), p. 2854-2860. DOI : 10.1021/cm034081k (cf. p. 58).
- [188] M. GRABOLLE et al. *Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties*. In : Anal. Chem. 81.15 (2009), p. 6285-6294. DOI : 10.1021/ac900308v (cf. p. 64).
- [189] L. PORRÈS et al. *Absolute Measurements of Photoluminescence Quantum Yields of Solutions Using an Integrating Sphere*. In : J Fluoresc 16.2 (2006), p. 267-273. DOI : 10.1007/s10895-005-0054-8 (cf. p. 64).
- [190] X. BROKMANN. *Propriétés de fluorescence de nanocristaux de CdSe individuels*. Thèse de doct. 2004 (cf. p. 65).
- [191] X. BROKMANN et al. *Measurement of the Radiative and Nonradiative Decay Rates of Single CdSe Nanocrystals through a Controlled Modification of their Spontaneous Emission*. In : Phys. Rev. Lett. 93.10 (2004), p. 107403. DOI : 10.1103/PhysRevLett.93.107403 (cf. p. 65).
- [192] X. BROKMANN et al. *Emission properties of single CdSe/ZnS quantum dots close to a dielectric interface*. In : Chemical Physics. Molecular Nanoscience 318.1 (2005), p. 91-98. DOI : 10.1016/j.chemphys.2005.06.032 (cf. p. 65, 78, 81).
- [193] A. I. CHIZHIK et al. *Quantum Yield Measurement in a Multicolor Chromophore Solution Using a Nanocavity*. In : Nano Lett. 13.3 (2013), p. 1348-1351. DOI : 10.1021/nl400313z (cf. p. 65).
- [194] R. A. CRUZ et al. *Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry*. In : Journal of Applied Physics 107.8 (2010), p. 083504. DOI : 10.1063/1.3343517 (cf. p. 65).
- [195] D. A. HANIFI et al. *Redefining near-unity luminescence in quantum dots with photothermal threshold quantum yield*. In : Science 363.6432 (2019), p. 1199-1202. DOI : 10.1126/science.aat3803 (cf. p. 65).
- [196] S. J. STRICKLER et al. *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*. In : J. Chem. Phys. 37.4 (1962), p. 814-822. DOI : 10.1063/1.1733166 (cf. p. 65, 66).
- [197] J. B. BIRKS et al. *The relations between the fluorescence and absorption properties of organic molecules*. In : Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences 275.1360 (1963), p. 135-148. DOI : 10.1098/rspa.1963.0159 (cf. p. 65, 66).
- [198] H. LAMI et al. *Rendements quantiques de fluorescence et durées de vie radiative de quelques solutés utilisés dans les scintillateurs liquides*. In : J. Phys. France 27.7 (1966), p. 398-404. DOI : 10.1051/jphys:01966002707-8039800 (cf. p. 66).

- [199] K. GONG et al. *Extinction Coefficients, Oscillator Strengths, and Radiative Lifetimes of CdSe, CdTe, and CdTe/CdSe Nanocrystals*. In : J. Phys. Chem. C 117.39 (2013), p. 20268-20279. DOI : 10.1021/jp4065449 (cf. p. 66).
- [200] K. GONG et al. *Radiative Lifetimes of Zincblende CdSe/CdS Quantum Dots*. In : J. Phys. Chem. C 119.4 (2015), p. 2231-2238. DOI : 10.1021/jp5118932 (cf. p. 66).
- [201] M. CALIFANO et al. *Temperature Dependence of Excitonic Radiative Decay in CdSe Quantum Dots: The Role of Surface Hole Traps*. In : Nano Lett. 5.12 (2005), p. 2360-2364. DOI : 10.1021/nl051027p (cf. p. 66).
- [202] J. M. AN et al. *The Excitonic Exchange Splitting and Radiative Lifetime in PbSe Quantum Dots*. In : Nano Lett. 7.7 (2007), p. 2129-2135. DOI : 10.1021/nl071219f (cf. p. 66).
- [203] B. FISHER et al. *Multiexciton fluorescence from semiconductor nanocrystals*. In : Chemical Physics. Molecular Nanoscience 318.1 (2005), p. 71-81. DOI : 10.1016/j.chemphys.2005.05.036 (cf. p. 68).
- [204] M. ŚCIESIEK et al. *Effect of electron-hole separation on optical properties of individual Cd(Se,Te) Quantum Dots*. In : Phys. Rev. B 93.19 (2016), p. 195313. DOI : 10.1103/PhysRevB.93.195313 (cf. p. 68).
- [205] M. A. BOLES et al. *The surface science of nanocrystals*. In : Nature Mater 15.2 (2016), p. 141-153. DOI : 10.1038/nmat4526 (cf. p. 70, 71, 72).
- [206] J. ZHOU et al. *Surface ligands engineering of semiconductor quantum dots for chemosensory and biological applications*. In : Materials Today 20.7 (2017), p. 360-376. DOI : 10.1016/j.mattod.2017.02.006 (cf. p. 71).
- [207] A. SIGEL et al., éd. *Metal ions and their complexes in medication*. Metal ions in biological systems v. 41. CRC Press, 2004. 519 p. (cf. p. 72, 107).
- [208] M. D. PETERSON et al. *The Role of Ligands in Determining the Exciton Relaxation Dynamics in Semiconductor Quantum Dots*. In : Annu. Rev. Phys. Chem. 65.1 (2014), p. 317-339. DOI : 10.1146/annurev-physchem-040513-103649 (cf. p. 72).
- [209] A. J. MORRIS-COHEN et al. *Model for Adsorption of Ligands to Colloidal Quantum Dots with Concentration-Dependent Surface Structure*. In : ACS Nano 6.1 (2012), p. 557-565. DOI : 10.1021/nn203950s (cf. p. 72).
- [210] R. KOOLE et al. *Time-Dependent Photoluminescence Spectroscopy as a Tool to Measure the Ligand Exchange Kinetics on a Quantum Dot Surface*. In : ACS Nano 2.8 (2008), p. 1703-1714. DOI : 10.1021/nn8003247 (cf. p. 72).
- [211] A. M. MUNRO et al. *Quantitative Study of the Effects of Surface Ligand Concentration on CdSe Nanocrystal Photoluminescence*. In : J. Phys. Chem. C 111.17 (2007), p. 6220-6227. DOI : 10.1021/jp068733e (cf. p. 72).
- [212] K. E. KNOWLES et al. *Chemical Control of the Photoluminescence of CdSe Quantum Dot/Organic Complexes with a Series of Para-Substituted Aniline Ligands*. In : J. Am. Chem. Soc. 132.3 (2010), p. 1041-1050. DOI : 10.1021/ja907253s (cf. p. 72).
- [213] X. YIN et al. *Quantitative Analysis of Different Formation Modes of Platinum Nanocrystals Controlled by Ligand Chemistry*. In : Nano Lett. 17.10 (2017), p. 6146-6150. DOI : 10.1021/acs.nanolett.7b02751 (cf. p. 73).
- [214] L. QU et al. *Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals*. In : Nano Lett. 1.6 (2001), p. 333-337. DOI : 10.1021/nl0155532 (cf. p. 73).
- [215] X. PENG. *Green Chemical Approaches toward High-Quality Semiconductor Nanocrystals*. In : Chem. Eur. J. 8.2 (2002), p. 334-339. DOI : 10.1002/1521-3765(20020118)8:2<334::AID-CHEM334>3.0.CO;2-T (cf. p. 73).

- [216] Z. DENG et al. *A New Route to Zinc-Blende CdSe Nanocrystals: Mechanism and Synthesis*. In : J. Phys. Chem. B 109.35 (2005), p. 16671-16675. DOI : 10.1021/jp052484x (cf. p. 73).
- [217] W. W. YU et al. *Formation of High-Quality CdS and Other II-VI Semiconductor Nanocrystals in Noncoordinating Solvents: Tunable Reactivity of Monomers*. In : Angew. Chem. Int. Ed. 41.13 (2002), p. 2368-2371. DOI : 10.1002/1521-3773(20020703)41:13<2368::AID-ANIE2368>3.0.CO;2-G (cf. p. 73).
- [218] M. B. MOHAMED et al. *Synthesis of High Quality Zinc Blende CdSe Nanocrystals*. In : J. Phys. Chem. B 109.21 (2005), p. 10533-10537. DOI : 10.1021/jp051123e (cf. p. 73).
- [219] K. J. NORDELL et al. *A Safer, Easier, Faster Synthesis for CdSe Quantum Dot Nanocrystals*. In : J. Chem. Educ. 82.11 (2005), p. 1697. DOI : 10.1021/ed082p1697 (cf. p. 73).
- [220] N. AL-SALIM et al. *Synthesis of CdSeS Nanocrystals in Coordinating and Noncoordinating Solvents: Solvent's Role in Evolution of the Optical and Structural Properties*. In : Chem. Mater. 19.21 (2007), p. 5185-5193. DOI : 10.1021/cm070818k (cf. p. 73).
- [221] H. Q. NGUYEN. *Synthesis and optical properties of CdSe nanocrystals and CdSe/ZnS core/shell nanostructures in non-coordinating solvents*. In : Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol. 1.2 (2010), p. 025004. DOI : 10.1088/2043-6254/1/2/025004 (cf. p. 73).
- [222] D. S. MAZING et al. *Preparation of cadmium selenide colloidal quantum dots in non-coordinating solvent octadecene*. In : J. Phys.: Conf. Ser. 661 (2015), p. 012033. DOI : 10.1088/1742-6596/661/1/012033 (cf. p. 73).
- [223] S. M. STUCZYNSKI et al. *Formation of metal-chalcogen bonds by the reaction of metal-alkyls with silyl chalcogenides*. In : Inorg. Chem. 28.25 (1989), p. 4431-4432. DOI : 10.1021/ic00324a001 (cf. p. 73).
- [224] E. MURO et al. *Small and Stable Sulfobetaine Zwitterionic Quantum Dots for Functional Live-Cell Imaging*. In : J. Am. Chem. Soc. 132.13 (2010), p. 4556-4557. DOI : 10.1021/ja1005493 (cf. p. 74, 75).
- [225] E. MURO. *Quantum Dots pour le Ciblage en Cellules Vivantes et la Microscopie HiLo Bi-couleur*. Thèse de doct. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011 (cf. p. 74).
- [226] E. GIOVANELLI et al. *Highly Enhanced Affinity of Multidentate versus Bidentate Zwitterionic Ligands for Long-Term Quantum Dot Bioimaging*. In : Langmuir 28.43 (2012), p. 15177-15184. DOI : 10.1021/la302896x (cf. p. 74).
- [227] Y. XUE et al. *Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control*. In : Nat Commun 5.1 (2014), p. 4348. DOI : 10.1038/ncomms5348 (cf. p. 74).
- [228] L. WU et al. *Carboxybetaine, sulfobetaine, and cationic block copolymer coatings: A comparison of the surface properties and antibiofouling behavior*. In : Journal of Applied Polymer Science 124.3 (2012), p. 2154-2170. DOI : <https://doi.org/10.1002/app.35233> (cf. p. 74, 109).
- [229] A. LASCHEWSKY et al. *Molecular Design of Zwitterionic Polymer Interfaces: Searching for the Difference*. In : Langmuir 35.5 (2019), p. 1056-1071. DOI : 10.1021/acs.langmuir.8b01789 (cf. p. 74, 109).
- [230] F. ZACCARIAN et al. *Biomedical Uses of Sulfobetaine-Based Zwitterionic Materials*. In : Organic Materials 02.4 (2020), p. 342-357. DOI : 10.1055/s-0040-1721741 (cf. p. 74, 109).
- [231] J. ALDANA et al. *Photochemical Instability of CdSe Nanocrystals Coated by Hydrophilic Thiols*. In : J. Am. Chem. Soc. 123.36 (2001), p. 8844-8850. DOI : 10.1021/ja016424q (cf. p. 74).
- [232] J. ALDANA et al. *Size-Dependent Dissociation pH of Thiolate Ligands from Cadmium Chalcogenide Nanocrystals*. In : J. Am. Chem. Soc. 127.8 (2005), p. 2496-2504. DOI : 10.1021/ja047000+ (cf. p. 74).

- [233] A. M. SMITH et al. *A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor quantum dots*. In : Phys. Chem. Chem. Phys. 8.33 (2006), p. 3895. DOI : [10.1039/b606572b](https://doi.org/10.1039/b606572b) (cf. p. 74).
- [234] G. P. MITCHELL et al. *Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots*. In : J. Am. Chem. Soc. 121.35 (1999), p. 8122-8123. DOI : [10.1021/ja991662v](https://doi.org/10.1021/ja991662v) (cf. p. 74).
- [235] H. MATTOUSSI et al. *Self-Assembly of CdSe/ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein*. In : J. Am. Chem. Soc. 122.49 (2000), p. 12142-12150. DOI : [10.1021/ja002535y](https://doi.org/10.1021/ja002535y) (cf. p. 76).
- [236] M. LUNZ et al. *Influence of quantum dot concentration on Förster resonant energy transfer in monodispersed nanocrystal quantum dot monolayers*. In : Phys. Rev. B 81.20 (2010), p. 205316. DOI : [10.1103/PhysRevB.81.205316](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.81.205316) (cf. p. 78).
- [237] A. S. KARAKOTI et al. *Surface functionalization of quantum dots for biological applications*. In : Advances in Colloid and Interface Science 215 (2015), p. 28-45. DOI : [10.1016/j.cis.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.004) (cf. p. 81).
- [238] D. HAHM et al. *Surface Engineered Colloidal Quantum Dots for Complete Green Process*. In : ACS Appl. Mater. Interfaces 12.9 (2020), p. 10563-10570. DOI : [10.1021/acsami.9b23265](https://doi.org/10.1021/acsami.9b23265) (cf. p. 81, 95).
- [239] U. WOGGON et al. *Hybrid Epitaxial Colloidal Semiconductor Nanostructures*. In : Nano Lett. 5.3 (2005), p. 483-490. DOI : [10.1021/nl0480870](https://doi.org/10.1021/nl0480870) (cf. p. 81).
- [240] J. J. URBAN et al. *Self-Assembly of PbTe Quantum Dots into Nanocrystal Superlattices and Glassy Films*. In : J. Am. Chem. Soc. 128.10 (2006), p. 3248-3255. DOI : [10.1021/ja058269b](https://doi.org/10.1021/ja058269b) (cf. p. 81).
- [241] S. H. KIM et al. *Luminescence from single CdSe nanocrystals embedded in ZnO thin films using atomic layer deposition*. In : Nanotechnology 19.36 (2008), p. 365202. DOI : [10.1088/0957-4484/19/36/365202](https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/36/365202) (cf. p. 81).
- [242] V. ZUCOLOTTO et al. *Nanoscale manipulation of CdSe quantum dots in layer-by-layer films: influence of the host polyelectrolyte on the luminescent properties*. In : Applied Surface Science. 9th European Conferences on Organised Films 246.4 (2005), p. 397-402. DOI : [10.1016/j.apsusc.2004.11.044](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.11.044) (cf. p. 81).
- [243] C. ROPP et al. *Positioning and Immobilization of Individual Quantum Dots with Nanoscale Precision*. In : Nano Lett. 10.11 (2010), p. 4673-4679. DOI : [10.1021/nl1029557](https://doi.org/10.1021/nl1029557) (cf. p. 81).
- [244] K. W. SONG et al. *Electrophoretic Deposition of CdSe/ZnS Quantum Dots for Light-Emitting Devices*. In : Adv. Mater. 25.10 (2013), p. 1420-1423. DOI : [10.1002/adma.201203079](https://doi.org/10.1002/adma.201203079) (cf. p. 81).
- [245] D. W. MA et al. *Preparations of PbSe quantum dots in silicate glasses by a melt-annealing technique*. In : Optical Materials 37 (2014), p. 834-839. DOI : [10.1016/j.optmat.2014.09.018](https://doi.org/10.1016/j.optmat.2014.09.018) (cf. p. 81).
- [246] M. ELISA et al. *CdSe/ZnS-doped silicophosphate films prepared by sol-gel method*. In : J Sol-Gel Sci Technol 73.3 (2015), p. 660-665. DOI : [10.1007/s10971-015-3616-5](https://doi.org/10.1007/s10971-015-3616-5) (cf. p. 81).
- [247] A. AUBRET et al. *Nondestructive Encapsulation of CdSe/CdS Quantum Dots in an Inorganic Matrix by Pulsed Laser Deposition*. In : ACS Appl. Mater. Interfaces 8.34 (2016), p. 22361-22368. DOI : [10.1021/acsami.6b07367](https://doi.org/10.1021/acsami.6b07367) (cf. p. 81).
- [248] T. H. AU et al. *Controllable movement of single-photon source in multifunctional magneto-phonic structures*. In : Sci Rep 10.1 (2020), p. 4843. DOI : [10.1038/s41598-020-61811-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61811-8) (cf. p. 81).
- [249] W. WU et al. *In-situ immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery*. In : Biomaterials 31.11 (2010), p. 3023-3031. DOI : [10.1016/j.biomaterials.2010.01.011](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.011) (cf. p. 81).
- [250] A. SHARMA et al. *Chitosan encapsulated quantum dots platform for leukemia detection*. In : Biosensors and Bioelectronics 38.1 (2012), p. 107-113. DOI : [10.1016/j.bios.2012.05.010](https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.05.010) (cf. p. 81).

- [251] K. E. SAPSFORD et al. *Surface-Immobilized Self-Assembled Protein-Based Quantum Dot Nanoassemblies*. In : *Langmuir* 20.18 (2004), p. 7720-7728. DOI : 10.1021/1a049263n (cf. p. 82, 95).
- [252] M. BÄUMLE et al. *Highly Fluorescent Streptavidin-Coated CdSe Nanoparticles: Preparation in Water, Characterization, and Micropatterning*. In : *Langmuir* 20.10 (2004), p. 3828-3831. DOI : 10.1021/1a0363940 (cf. p. 82).
- [253] W. KHALID et al. *Immobilization of Quantum Dots via Conjugated Self-Assembled Monolayers and Their Application as a Light-Controlled Sensor for the Detection of Hydrogen Peroxide*. In : *ACS Nano* 5.12 (2011), p. 9870-9876. DOI : 10.1021/nn2035582 (cf. p. 82).
- [254] W. R. ALGAR et al. *Multidentate Surface Ligand Exchange for the Immobilization of CdSe/ZnS Quantum Dots and Surface Quantum Dot-Oligonucleotide Conjugates*. In : *Langmuir* 24.10 (2008), p. 5514-5520. DOI : 10.1021/1a703812t (cf. p. 82).
- [255] M.-C. TU et al. *A quantum dot-based optical immunosensor for human serum albumin detection*. In : *Biosensors and Bioelectronics* 34.1 (2012), p. 286-290. DOI : 10.1016/j.bios.2011.11.035 (cf. p. 82).
- [256] P.-C. LAU et al. *An effective nanosensor for organic molecules based on water-soluble mercaptopropionic acid-capped CdTe nanocrystals with potential application in high-throughput screening and high-resolution optical microscopy*. In : *Biomed. Opt. Express*, BOE 5.7 (2014), p. 2420-2434. DOI : 10.1364/BOE.5.002420 (cf. p. 82, 136).
- [257] M.-R. CHAO et al. *Glass substrates crosslinked with tetracycline-imprinted polymeric silicate and CdTe quantum dots as fluorescent sensors*. In : *Analytica Chimica Acta* 925 (2016), p. 61-69. DOI : 10.1016/j.aca.2016.04.037 (cf. p. 82).
- [258] C. WANG et al. *Ultrasensitive, high-throughput and multiple cancer biomarkers simultaneous detection in serum based on graphene oxide quantum dots integrated microfluidic biosensing platform*. In : *Analytica Chimica Acta* 1178 (2021), p. 338791. DOI : 10.1016/j.aca.2021.338791 (cf. p. 82).
- [259] G. GAUR et al. *Immobilization of Quantum Dots in Nanostructured Porous Silicon Films: Characterizations and Signal Amplification for Dual-Mode Optical Biosensing*. In : *Adv. Funct. Mater.* 23.29 (2013), p. 3604-3614. DOI : 10.1002/adfm.201202697 (cf. p. 82).
- [260] J. J. PARK et al. *Langmuir Adsorption Study of the Interaction of CdSe/ZnS Quantum Dots with Model Substrates: Influence of Substrate Surface Chemistry and pH*. In : *Langmuir* 25.1 (2009), p. 443-450. DOI : 10.1021/1a802324c (cf. p. 82, 85).
- [261] T. A. PHAM et al. *Facile covalent immobilization of cadmium sulfide quantum dots on graphene oxide nanosheets: preparation, characterization, and optical properties*. In : *Nanotechnology* 21.46 (2010), p. 465603. DOI : 10.1088/0957-4484/21/46/465603 (cf. p. 82).
- [262] G. T. HERMANSON. *Bioconjugate techniques*. 3d edition. Academic Press, 2013. 1140 p. (cf. p. 83, 84, 85, 88).
- [263] L. RIACHY. *Nouvelle technique de nanoscopie de fluorescence par excitation non radiative pour l'étude des interactions membrane/substrat*. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Troyes, 2017 (cf. p. 85, 95, 106).
- [264] C. A. GOSS et al. *Application of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapor-deposited gold electrodes on glass substrates*. In : *Anal. Chem.* 63.1 (1991), p. 85-88. DOI : 10.1021/ac00001a018 (cf. p. 85).
- [265] M. HU et al. *Structure and morphology of self-assembled 3-mercaptopropyltrimethoxysilane layers on silicon oxide*. In : *Applied Surface Science* 181.3 (2001), p. 307-316. DOI : 10.1016/S0169-4332(01)00399-3 (cf. p. 85).

- [266] K. STAWICKA et al. *The importance of residual water for the reactivity of MPTMS with silica on the example of SBA-15*. In : Applied Surface Science 513 (2020), p. 145802. DOI : 10.1016/j.apsusc.2020.145802 (cf. p. 85).
- [267] T. G. HABTEYES et al. *Metallic Adhesion Layer Induced Plasmon Damping and Molecular Linker as a Nondamping Alternative*. In : ACS Nano 6.6 (2012), p. 5702-5709. DOI : 10.1021/nn301885u (cf. p. 85).
- [268] P. K. GOTHE et al. *MPTMS self-assembled monolayer deposition for ultra-thin gold films for plasmonics*. In : J. Phys. Commun. 2.3 (2018), p. 035005. DOI : 10.1088/2399-6528/aaaedd (cf. p. 85).
- [269] B. H. KIM et al. *High-Resolution Patterns of Quantum Dots Formed by Electrohydrodynamic Jet Printing for Light-Emitting Diodes*. In : Nano Lett. 15.2 (2015), p. 969-973. DOI : 10.1021/nl1503779e (cf. p. 95).
- [270] Y. LIU et al. *Efficient All-Solution Processed Quantum Dot Light Emitting Diodes Based on Inkjet Printing Technique*. In : ACS Appl. Mater. Interfaces 9.30 (2017), p. 25506-25512. DOI : 10.1021/acsami.7b05381 (cf. p. 95).
- [271] G. AZZELLINO et al. *Micron-Scale Patterning of High Quantum Yield Quantum Dot LEDs*. In : Advanced Materials Technologies 4.7 (2019), p. 1800727. DOI : 10.1002/admt.201800727 (cf. p. 95).
- [272] P. YANG et al. *High-Resolution Inkjet Printing of Quantum Dot Light-Emitting Microdiode Arrays*. In : Advanced Optical Materials 8.1 (2020), p. 1901429. DOI : 10.1002/adom.201901429 (cf. p. 95).
- [273] Y. LIU et al. *Quantum Dot Self-Assembly Deposition in Physically Confined Microscale Space by Using an Inkjet Printing Technique*. In : J. Phys. Chem. Lett. 12.35 (2021), p. 8605-8613. DOI : 10.1021/acs.jpcllett.1c02470 (cf. p. 95).
- [274] A. GOPAL et al. *Photolithographic patterning of subwavelength top emitting colloidal quantum dot based inorganic light emitting diodes on silicon*. In : Appl. Phys. Lett. 96.13 (2010), p. 131109. DOI : 10.1063/1.3373832 (cf. p. 95).
- [275] T.-H. KIM et al. *Full-colour quantum dot displays fabricated by transfer printing*. In : Nature Photon 5.3 (2011), p. 176-182. DOI : 10.1038/nphoton.2011.12 (cf. p. 95).
- [276] Z. WANG et al. *Microcontact printing of polyelectrolytes on PEG using an unmodified PDMS stamp for micropatterning nanoparticles, DNA, proteins and cells*. In : Soft Matter 8.29 (2012), p. 7630. DOI : 10.1039/c2sm25835h (cf. p. 95).
- [277] M. K. CHOI et al. *Wearable red-green-blue quantum dot light-emitting diode array using high-resolution intaglio transfer printing*. In : Nat Commun 6.1 (2015), p. 7149. DOI : 10.1038/ncomms8149 (cf. p. 95).
- [278] H. KEUM et al. *Photoresist Contact Patterning of Quantum Dot Films*. In : ACS Nano 12.10 (2018), p. 10024-10031. DOI : 10.1021/acsnano.8b04462 (cf. p. 95).
- [279] S. LEE et al. *High-density quantum dots composites and its photolithographic patterning applications*. In : Polymers for Advanced Technologies 30.3 (2019), p. 749-754. DOI : 10.1002/pat.4513 (cf. p. 95).
- [280] J. YANG et al. *High-resolution patterning of colloidal quantum dots via non-destructive, light-driven ligand crosslinking*. In : Nature Communications 11.1 (2020), p. 2874. DOI : 10.1038/s41467-020-16652-4 (cf. p. 95).
- [281] J. KO et al. *Direct Photolithographic Patterning of Colloidal Quantum Dots Enabled by UV-Crosslinkable and Hole-Transporting Polymer Ligands*. In : ACS Appl. Mater. Interfaces 12.37 (2020), p. 42153-42160. DOI : 10.1021/acscami.0c11988 (cf. p. 95).
- [282] H. CHO et al. *Direct Optical Patterning of Quantum Dot Light-Emitting Diodes via In Situ Ligand Exchange*. In : Adv. Mater. 32.46 (2020), p. 2003805. DOI : 10.1002/adma.202003805 (cf. p. 95).

- [283] H. GAO et al. *High-performance, high-resolution quantum dot light-emitting devices through photolithographic patterning*. In : Organic Electronics 108 (2022), p. 106609. DOI : 10.1016/j.orgel.2022.106609 (cf. p. 95).
- [284] K. LAMBERT et al. *Quantum Dot Micropatterning on Si*. In : Langmuir 24.11 (2008), p. 5961-5966. DOI : 10.1021/la703664r (cf. p. 95).
- [285] Y. J. NA et al. *Photolithographic process for the patterning of quantum dots*. In : Ultramicroscopy 108.10 (2008), p. 1297-1301. DOI : 10.1016/j.ultramicro.2008.04.071 (cf. p. 95, 96).
- [286] C. HU et al. *The micropatterning of layers of colloidal quantum dots with inorganic ligands using selective wet etching*. In : Nanotechnology 25.17 (2014), p. 175302. DOI : 10.1088/0957-4484/25/17/175302 (cf. p. 95).
- [287] G.-H. KIM et al. *High-Resolution Colloidal Quantum Dot Film Photolithography via Atomic Layer Deposition of ZnO*. In : ACS Appl. Mater. Interfaces 13.36 (2021), p. 43075-43084. DOI : 10.1021/acscami.1c11898 (cf. p. 95).
- [288] F. PRINS et al. *Direct Patterning of Colloidal Quantum-Dot Thin Films for Enhanced and Spectrally Selective Out-Coupling of Emission*. In : Nano Lett. 17.3 (2017), p. 1319-1325. DOI : 10.1021/acs.nanolett.6b03212 (cf. p. 95).
- [289] M. ZHANG et al. *Ultrasmooth Quantum Dot Micropatterns by a Facile Controllable Liquid-Transfer Approach: Low-Cost Fabrication of High-Performance QLED*. In : J. Am. Chem. Soc. 140.28 (2018), p. 8690-8695. DOI : 10.1021/jacs.8b02948 (cf. p. 95).
- [290] G. DEVATHA et al. *Förster Resonance Energy Transfer Regulated Multicolor Photopatterning from Single Quantum Dot Nanohybrid Films*. In : ACS Energy Lett. 4.7 (2019), p. 1710-1716. DOI : 10.1021/acsenergylett.9b00832 (cf. p. 95).
- [291] Q. ZHANG et al. *Large ordered arrays of single photon sources based on II-VI semiconductor colloidal quantum dot*. In : Opt. Express, OE 16.24 (2008), p. 19592-19599. DOI : 10.1364/OE.16.019592 (cf. p. 95).
- [292] Y. PARK et al. *Nanoscale patterning of colloidal quantum dots on transparent and metallic planar surfaces*. In : Nanotechnology 23.35 (2012), p. 355302. DOI : 10.1088/0957-4484/23/35/355302 (cf. p. 95).
- [293] T. S. MENTZEL et al. *Nanopatterned Electrically Conductive Films of Semiconductor Nanocrystals*. In : Nano Lett. 12.8 (2012), p. 4404-4408. DOI : 10.1021/nl3022863 (cf. p. 95).
- [294] F. T. RABOUW et al. *Nanoscale lithographic positioning of fluorescing quantum dot nanocrystals on planar samples*. In : Optical Materials 35.7 (2013), p. 1342-1347. DOI : 10.1016/j.optmat.2013.01.039 (cf. p. 95).
- [295] M. JIANG et al. *Reusable Inorganic Templates for Electrostatic Self-Assembly of Individual Quantum Dots, Nanodiamonds, and Lanthanide-Doped Nanoparticles*. In : Nano Lett. 15.8 (2015), p. 5010-5016. DOI : 10.1021/acs.nanolett.5b01009 (cf. p. 95).
- [296] W. XIE et al. *Nanoscale and Single-Dot Patterning of Colloidal Quantum Dots*. In : Nano Lett. 15.11 (2015), p. 7481-7487. DOI : 10.1021/acs.nanolett.5b03068 (cf. p. 95).
- [297] C. D. DIELEMAN et al. *Universal direct patterning of colloidal quantum dots by (extreme) ultraviolet and electron beam lithography*. In : Nanoscale 12.20 (2020), p. 11306-11316. DOI : 10.1039/D0NR01077D (cf. p. 95).
- [298] A. WALDBAUR et al. *Maskless Projection Lithography for the Fast and Flexible Generation of Grayscale Protein Patterns*. In : Small 8.10 (2012), p. 1570-1578. DOI : 10.1002/smll.201102163 (cf. p. 96, 97).

- [299] S. ZHAO et al. *Direct projection on dry-film photoresist (DP2): do-it-yourself three-dimensional polymer microfluidics*. In : Lab Chip 9.8 (2009), p. 1128-1132. DOI : 10.1039/B817925E (cf. p. 97).
- [300] D. KATTIPARAMBIL RAJAN et al. *A maskless exposure device for rapid photolithographic prototyping of sensor and microstructure layouts*. In : Procedia Engineering 5 (2010), p. 331-334. DOI : 10.1016/j.proeng.2010.09.115 (cf. p. 97).
- [301] S. CHEN et al. *Photopatterned Thiol Surfaces for Biomolecule Immobilization*. In : Langmuir 25.20 (2009), p. 12275-12282. DOI : 10.1021/1a9017135 (cf. p. 97).
- [302] P.-O. STRALE et al. *Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption*. In : Adv. Mater. (2015), p. 6. DOI : 10.1002/adma.201504154 (cf. p. 97).
- [303] ALVÉOLE. *Technologie de photopatterning PRIMO: publications d'utilisateurs*. Alvéole. 2022. URL : <https://www.alveolelab.com/fr/ressources/publications/> (visité le 30/06/2022) (cf. p. 98).
- [304] R. LEUCI et al. *Importance of Biometals as Targets in Medicinal Chemistry: An Overview about the Role of Zinc (II) Chelating Agents*. In : Applied Sciences 10.12 (2020), p. 4118. DOI : 10.3390/app10124118 (cf. p. 107, 108).
- [305] D. KOŁODYŃSKA. *Complexing Agents*. In : Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Sous la dir. de JOHN WILEY & SONS, INC. 1^{re} éd. Wiley, 2019, p. 1-26 (cf. p. 108).
- [306] S. ZECHEL et al. *Healing through Histidine: Bioinspired Pathways to Self-Healing Polymers via Imidazole-Metal Coordination*. In : Biomimetics 4.1 (2019), p. 20. DOI : 10.3390/biomimetics4010020 (cf. p. 108).
- [307] W. LIU et al. *Compact Biocompatible Quantum Dots via RAFT-Mediated Synthesis of Imidazole-Based Random Copolymer Ligand*. In : J. Am. Chem. Soc. 132.2 (2010), p. 472-483. DOI : 10.1021/ja908137d (cf. p. 108).
- [308] W. WANG et al. *A Multifunctional Polymer Combining the Imidazole and Zwitterion Motifs as a Biocompatible Compact Coating for Quantum Dots*. In : J. Am. Chem. Soc. 137.44 (2015), p. 14158-14172. DOI : 10.1021/jacs.5b08915 (cf. p. 108).
- [309] J. H. DUNLAP et al. *Multiply-Binding Polymeric Imidazole Ligands: Influence of Molecular Weight and Monomer Sequence on Colloidal Quantum Dot Stability*. In : J. Phys. Chem. C 122.46 (2018), p. 26756-26763. DOI : 10.1021/acs.jpcc.8b08984 (cf. p. 108).
- [310] N. P. JAYAWEERA et al. *Coordination of Quantum Dots in a Polar Solvent by Small-Molecule Imidazole Ligands*. In : Inorg. Chem. 61.28 (2022), p. 10942-10949. DOI : 10.1021/acs.inorgchem.2c01494 (cf. p. 108).
- [311] E. PETRYAYEVA et al. *Quantum Dot and Gold Nanoparticle Immobilization for Biosensing Applications using Multidentate Imidazole Surface Ligands*. In : Langmuir 28.39 (2012), p. 13943-13951. DOI : 10.1021/1a302985x (cf. p. 108).
- [312] R. J. SUNDBERG et al. *Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems*. In : Chem. Rev. 74.4 (1974), p. 471-517. DOI : 10.1021/cr60290a003 (cf. p. 113).
- [313] S. SJÖBERG. *Critical evaluation of stability constants of metal-imidazole and metal-histamine systems (Technical Report)*. In : Pure and Applied Chemistry 69.7 (1997), p. 1549-1570. DOI : 10.1351/pac199769071549 (cf. p. 113).
- [314] J. N. ISRAELACHVILI. *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed. Academic press, 2011. 706 p. (cf. p. 113).
- [315] R. P. D. BANK. *RCSB PDB - 3V03: Crystal structure of Bovine Serum Albumin*. 2012. URL : <https://www.rcsb.org/structure/3V03> (visité le 10/08/2022) (cf. p. 118).

- [316] K. A. MAJOREK et al. *Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*. In : Molecular Immunology 52.3 (2012), p. 174-182. DOI : [10.1016/j.molimm.2012.05.011](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011) (cf. p. 118).
- [317] Y. XIAO et al. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)—not all BSAs are alike*. In : Journal of Immunological Methods 384.1 (2012), p. 148-151. DOI : [10.1016/j.jim.2012.06.009](https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.06.009) (cf. p. 118).
- [318] T. MAHMOOD et al. *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. In : N Am J Med Sci 4.9 (2012), p. 429-434. DOI : [10.4103/1947-2714.100998](https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998) (cf. p. 118).
- [319] C. SCHRADER et al. *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*. In : Journal of Applied Microbiology 113.5 (2012), p. 1014-1026. DOI : [10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x) (cf. p. 118).
- [320] L. CONVERT et al. *Passivation of KMPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides*. In : Sensors and Actuators B: Chemical 173 (2012), p. 447-454. DOI : [10.1016/j.snb.2012.07.061](https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061) (cf. p. 118).
- [321] J. MARIAM et al. *Albumin corona on nanoparticles – a strategic approach in drug delivery*. In : Drug Delivery 23.8 (2016), p. 2668-2676. DOI : [10.3109/10717544.2015.1048488](https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1048488) (cf. p. 118).
- [322] V. H. NGUYEN et al. *Protein corona: a new approach for nanomedicine design*. In : IJN 12 (2017), p. 3137-3151. DOI : [10.2147/IJN.S129300](https://doi.org/10.2147/IJN.S129300) (cf. p. 118).
- [323] V. E. LEE et al. *Reversible precipitation of bovine serum albumin by metal ions and synthesis, structure and reactivity of new tetrathiomallate chelating agents*. In : Journal of Inorganic Biochemistry 101.11 (2007), p. 1707-1718. DOI : [10.1016/j.jinorgbio.2007.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.07.015) (cf. p. 118).
- [324] SuSoS. *PLL-g-PEG Polymere*. SuSoS Commercial Website. URL : <https://susos.com/beschichtungstechnologie/pll-g-peg-polymere/> (visité le 08/08/2022) (cf. p. 119).
- [325] A. S. SAWHNEY et al. *Poly(ethylene oxide)-graft-poly(L-lysine) copolymers to enhance the biocompatibility of poly(L-lysine)-alginate microcapsule membranes*. In : Biomaterials 13.12 (1992), p. 863-870. DOI : [10.1016/0142-9612\(92\)90180-V](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90180-V) (cf. p. 119).
- [326] T. UENO et al. *Fluorescent probes for sensing and imaging*. In : Nat Methods 8.8 (2011), p. 642-645. DOI : [10.1038/nmeth.1663](https://doi.org/10.1038/nmeth.1663) (cf. p. 135).
- [327] M. V. SEDNEV et al. *Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review*. In : Methods Appl. Fluoresc. 3.4 (2015), p. 042004. DOI : [10.1088/2050-6120/3/4/042004](https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/4/042004) (cf. p. 136).
- [328] E. A. SPECHT et al. *A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging*. In : Annu. Rev. Physiol. 79.1 (2017), p. 93-117. DOI : [10.1146/annurev-physiol-022516-034055](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034055) (cf. p. 136).
- [329] M. K. PAUL et al. *Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer*. In : Int J Med Sci 1.2 (2004), p. 101-115 (cf. p. 136).
- [330] V. SANGWAN et al. *Receptor Tyrosine Kinases: Role in Cancer Progression*. In : Current Oncology 13.5 (2006), p. 191-193. DOI : [10.3390/curroncol13050019](https://doi.org/10.3390/curroncol13050019) (cf. p. 136).
- [331] E. CRUZ DA SILVA et al. *Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer*. In : Cancers 11.5 (2019), p. 692. DOI : [10.3390/cancers11050692](https://doi.org/10.3390/cancers11050692) (cf. p. 136).
- [332] M.-C. MERCIER et al. *Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers*. In : Cancers 9.6 (2017), p. 69. DOI : [10.3390/cancers9060069](https://doi.org/10.3390/cancers9060069) (cf. p. 137).
- [333] G. JACQUEMET et al. *The cell biologist's guide to super-resolution microscopy*. In : Journal of Cell Science 133.11 (2020), jcs240713. DOI : [10.1242/jcs.240713](https://doi.org/10.1242/jcs.240713) (cf. p. 142, 143).

- [334] T. DERTINGER et al. *Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 106.52 (2009), p. 22287-22292. DOI : 10.1073/pnas.0907866106 (cf. p. 142).
- [335] N. GUSTAFSSON et al. *Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations*. In : Nat Commun 7.1 (2016), p. 12471. DOI : 10.1038/ncomms12471 (cf. p. 142, 144).
- [336] S. CULLEY et al. *SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy*. In : The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 101 (2018), p. 74-79. DOI : 10.1016/j.bioce.2018.05.014 (cf. p. 142, 143).
- [337] X. ZHANG et al. *Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy*. In : Proceedings of the National Academy of Sciences 113.37 (2016), p. 10364-10369. DOI : 10.1073/pnas.1611038113 (cf. p. 143).
- [338] R. F. LAINE et al. *NanoJ: a high-performance open-source super-resolution microscopy toolbox*. In : J. Phys. D: Appl. Phys. 52.16 (2019), p. 163001. DOI : 10.1088/1361-6463/ab0261 (cf. p. 143).
- [339] PHOTOMETRICS. *SRRF Beginner's guide*. Teledyne Photometrics. URL : <https://www.photometrics.com/learn/super-resolution-microscopy/srrf-beginners-guide> (visité le 20/09/2022) (cf. p. 143).
- [340] A. GARCÍA-QUINTERO et al. *A critical analysis of environmental sustainability metrics applied to green synthesis of nanomaterials and the assessment of environmental risks associated with the nanotechnology*. In : Science of The Total Environment 793 (2021), p. 148524. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2021.148524 (cf. p. 151).
- [341] A. HUGUET-CASQUERO et al. *Towards Green Nanoscience: From extraction to nanoformulation*. In : Biotechnology Advances 46 (2021), p. 107657. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2020.107657 (cf. p. 151).
- [342] S. GAVANKAR et al. *Life cycle assessment at nanoscale: review and recommendations*. In : Int J Life Cycle Assess 17.3 (2012), p. 295-303. DOI : 10.1007/s11367-011-0368-5 (cf. p. 151).
- [343] H. SENGHIL et al. *Life Cycle Inventory of Semiconductor Cadmium Selenide Quantum Dots for Environmental Applications*. In : Nanotechnology Applications for Clean Water. Elsevier, 2009, p. 561-582. DOI : 10.1016/B978-0-8155-1578-4.50047-0 (cf. p. 151).
- [344] H. ŞENGÜL et al. *An environmental impact assessment of quantum dot photovoltaics (QDPV) from raw material acquisition through use*. In : Journal of Cleaner Production 19.1 (2011), p. 21-31. DOI : 10.1016/j.jclepro.2010.08.010 (cf. p. 151).
- [345] S. SCALBI et al. *Environmental assessment of new technologies: Production of a Quantum Dots-Light Emitting Diode*. In : Journal of Cleaner Production 142 (2017), p. 3702-3718. DOI : 10.1016/j.jclepro.2016.10.098 (cf. p. 151).
- [346] S. F. HIMMELSTOSS et al. *A critical comparison of lanthanide based upconversion nanoparticles to fluorescent proteins, semiconductor quantum dots, and carbon dots for use in optical sensing and imaging*. In : Methods Appl. Fluoresc. 7.2 (2019), p. 022002. DOI : 10.1088/2050-6120/ab0bfa (cf. p. 151).
- [347] P. REISS et al. *Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials*. In : Chem. Rev. 116.18 (2016), p. 10731-10819. DOI : 10.1021/acs.chemrev.6b00116 (cf. p. 151).
- [348] D. J. CARBAUGH et al. *Photolithography with polymethyl methacrylate (PMMA)*. In : Semicond. Sci. Technol. 31.2 (2015), p. 025010. DOI : 10.1088/0268-1242/31/2/025010 (cf. p. 152).

- [349] C. S. M. PEREIRA et al. *Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review*. In : Green Chem. 13.10 (2011), p. 2658-2671. DOI : [10.1039/C1GC15523G](https://doi.org/10.1039/C1GC15523G) (cf. p. 152).
- [350] T. E. GRAEDEL et al. *Criticality of metals and metalloids*. In : Proc Natl Acad Sci USA 112.14 (2015), p. 4257-4262. DOI : [10.1073/pnas.1500415112](https://doi.org/10.1073/pnas.1500415112) (cf. p. 153).
- [351] P. NUSS et al. *Life Cycle Assessment of Metals: A Scientific Synthesis*. In : PLOS ONE 9.7 (2014), e101298. DOI : [10.1371/journal.pone.0101298](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101298) (cf. p. 153).
- [352] S. M. HAYES et al. *Critical minerals: A review of elemental trends in comprehensive criticality studies*. In : Resources Policy. Sustainable management and exploitation of extractive waste: towards a more efficient resource preservation and waste recycling 59 (2018), p. 192-199. DOI : [10.1016/j.resourpol.2018.06.015](https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2018.06.015) (cf. p. 153).
- [353] T. WATARI et al. *Review of critical metal dynamics to 2050 for 48 elements*. In : Resources, Conservation and Recycling 155 (2020), p. 104669. DOI : [10.1016/j.resconrec.2019.104669](https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104669) (cf. p. 153).

Paul ROBINEAU

Doctorat : Matériaux, Mécanique, Optique, Nanotechnologie

Année 2022

Microstructuration 2D de boîtes quantiques : biofonctionnalisation & imagerie NEF

La nanoscopie de fluorescence par excitation non radiative (NEF) est une technique d'imagerie basée sur le FRET. L'imagerie NEF s'inscrit dans la famille des méthodes optiques utilisées pour étudier l'adhésion cellulaire en imageant la dynamique spatio-temporelle des points focaux d'adhésion. À partir de la maîtrise de la synthèse de boîtes quantiques (QDs) et des échanges de leurs ligands, j'ai mis en oeuvre une microstructuration 2D des QDs conjuguant fonctionnalisation covalente *bottom-up* et microstructuration *top-down* par photolithographie UV. Ce procédé permet d'obtenir des monocouches denses de QDs organisées en motifs de forme variable, avec une résolution spatiale micrométrique. Ces motifs jouent le rôle de donneurs FRET pour l'imagerie NEF, donnant accès à une résolution axiale nanométrique pour des temps d'acquisition faibles et des puissances laser minimales. J'ai montré la possibilité de biofonctionnaliser les QDs de façon spécifique avec un ligand chélatant le zinc à leur surface. Ce ligand terminé RGD permet l'adhésion des cellules et peut être utilisé pour réaliser du micropatterning cellulaire. Outre la démonstration du FRET entre des cellules et nos substrats, j'ai exploré la combinaison de l'imagerie NEF avec des méthodes de super-résolution basées sur l'analyse des fluctuations de fluorescence.

Mots clés : nanophotonique – points quantiques – fonctionnalisation des surfaces (chimie) – transfert d'énergie entre molécules fluorescentes – microscopie de fluorescence – biophysique – cellules, adhésivité.

Quantum Dots 2D Micropatterning: Bio-functionalization & NEF Imaging

Non-radiative Excitation Fluorescence (NEF) nanoscopy is a promising FRET-based imaging technique, recently introduced in the advanced optical tools family devoted to study cell adhesion by imaging the spatio-temporal dynamics of focal adhesion plaques. From the quantum dots (QDs) synthesis to their ligand exchange skills, I developed a 2D microstructuration method of QDs combining bottom-up covalent functionalization and top-down micropatterning with UV- photolithography. This method allows to obtain dense monolayers of QDs organized in patterns of various shape, with a micrometric resolution. These active patterns act as FRET donors for NEF imaging, thus giving access to nanometric axial resolution for high acquisition rate and minimal laser power. I show the possibility to biofunctionalize the QDs, especially with a ligand chelating zinc atoms onto the QD surface. This RGD-terminated ligand enables specific cell adhesion and therefore QDs can be used to perform cell micropatterning. In addition to usual FRET observations between cells and our substrates, I explored the imaging breakthrough offer by fluorescence fluctuations-based Super-Resolution technique in association with NEF.

Keywords: nanophotonics – quantum dots – surface functionalization – forster resonance energy transfert – fluorescence Microscopy – biophysics – cell adhesion.

Thèse réalisée en partenariat entre :



Ecole Doctorale "Sciences pour l'Ingénieur"