



**HAL**  
open science

# Evaluation des potentiels effets induits lors d'une co-exposition aux ondes radiofréquences et aux nanoparticules sur cellules humaines

Benjamin Cerdan

► **To cite this version:**

Benjamin Cerdan. Evaluation des potentiels effets induits lors d'une co-exposition aux ondes radiofréquences et aux nanoparticules sur cellules humaines. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA Toulouse, 2023. Français. NNT : . tel-04446943

**HAL Id: tel-04446943**

**<https://laas.hal.science/tel-04446943>**

Submitted on 8 Feb 2024

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

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



# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de  
Toulouse

---

**Présentée et soutenue par  
Benjamin CERDAN**

Le 22 décembre 2023

**Évaluation des potentiels effets induits lors d'une co-exposition  
aux ondes radiofréquences et aux nanoparticules sur cellules  
humaines**

---

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique, Télécommunications et  
Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **Electromagnétisme et Systèmes Haute Fréquence**

Unité de recherche :

**LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes**

Thèse dirigée par

**Katia GRENIER et Emmanuel FLAHAUT**

Jury

**M. Maxim ZHADOBOV, Rapporteur**

**M. Philippe LÉVÊQUE, Rapporteur**

**M. Yann PERCHERANCIER, Examineur**

**M. Jérémie GRISOLIA, Examineur**

**Mme Ludivine FADEL, Examinatrice**

**Mme Katia GRENIER, Directrice de thèse**

**M. Emmanuel FLAHAUT, Co-directeur de thèse**



*À mon petit frère Emmanuel que j'admire tant,*



# TABLE DES MATIERES

Résumé.....9

Introduction générale.....11

Tables des Tableaux et Figures.....14

Glossaire des Abréviations .....15

## Chapitre 1 : Description et Caractérisation de Nanomatériaux pour une étude toxicologique

1) Introduction aux Nanomatériaux .....	23
a) Les Nanomatériaux, des matériaux aux propriétés exceptionnelles mais potentiellement dangereux .....	23
b) Pertinence des NM choisis par rapport aux expositions quotidiennes .....	24
c) Connaissances actuelles sur la toxicité des NM sélectionnés.....	27
2) Méthodes de caractérisation des NM.....	33
a) Critères de caractérisation des NM.....	33
b) Taille des NM .....	33
c) Forme des NM .....	35
d) La surface spécifique .....	35
e) Phases cristallographiques .....	35
f) Chimie de surface.....	35
g) Charge de surface .....	35
h) Etat d'agglomération ou agrégation.....	36
i) Dispersibilité et solubilité.....	36
3) Bilan des résultats de caractérisation :.....	37
a) Taille des NM et des agrégats/agglomérats .....	37
b) Forme des NM .....	41
c) La surface spécifique .....	45

d) Composition.....	45
e) Chimie de surface .....	46
f) Etat d'agglomération ou agrégation .....	46
g) Dispersibilité et solubilité.....	48
4) Protocole de préparation des NM en suspension.....	49
a) Problématique des suspensions et pertinence de l'exposition en suspension.....	49
b) Description du protocole.....	49
Conclusion .....	50

## Chapitre 2 : Développement et caractérisation d'un système d'exposition aux ondes radiofréquences pour une analyse de toxicité à haut débit

1) Introduction sur les ondes RF et l'évaluation délicate de leur toxicité.....	56
2) Les différents systèmes d'exposition aux ondes RF.....	57
a) Systèmes d'exposition aux ondes RF <i>in vitro</i> utilisés dans la littérature.....	57
i) Les systèmes à propagation .....	57
ii) Les systèmes résonnants.....	58
iii) Les systèmes rayonnants .....	58
iv) Bilan sur les technologies d'expositions aux ondes RF <i>in vitro</i> .....	58
b) Système utilisé pour application en plaque à puits ou permettant beaucoup de conditions en parallèle.....	59
c) Cahier des charges de notre dispositif .....	60
3) Notre système d'exposition aux ondes RF .....	60
a) Moyens développés pour exposer localement des cellules aux ondes RF sur plaque à puits.....	60
i) Principe d'exposition.....	61
ii) Un système développé pour plaque à 96 puits .....	62
iii) Choix d'une configuration en îlot pour une parallélisation des expositions RF .....	65
b) Description de notre banc d'exposition aux ondes RF .....	68
i)Eléments clés de notre banc d'exposition aux ondes RF.....	68
ii) Conditions biologiques à assurer aux cellules.....	70
iii) Description globale du banc d'exposition aux ondes RF .....	71

4) Grandeur évaluée pour caractériser notre exposition RF : le Débit d’Absorption Spécifique (DAS)	72
a) Introduction du DAS et des seuils autorisés	72
b) Modèle théorique de DAS	73
c) Méthode de détermination du DAS:	75
i) Par mesure du champ électrique :	75
ii) Par mesure de l’incrément thermique :	77
5) Dosimétrie numérique	78
a) Modélisation 3D	78
b) Analyse du DAS maximal, de l’homogénéité et de l’isolation	80
6) Dosimétrie expérimentale	83
A) Principes généraux mis en œuvre	83
a) Caractérisation par échauffement thermique	83
b) Problématiques liées à la détermination expérimentale du DAS dans notre configuration	84
c) Protocole d’exposition pour la détermination du DAS	86
B) Optimisation des matériels et techniques de traitement de données	86
a) Choix des capteurs en température	86
b) comparaison TC/FO pour la détermination du DAS	90
c) Comparaison des méthodes de régression et paramètres d’étude	93
C) Premières caractérisations	94
a) Validation de la méthode de dosimétrie expérimentale	94
b) Dosimétrie expérimentale de la plateforme RF développée	95
c) Comparaison des résultats entre dosimétries expérimentale et numérique	97
d) Bilan de la caractérisation	98
D) Différents enjeux à considérer	98
a) Planéité de la plaque à puits	98
b) Problème de détermination du DAS dans les puits voisins en comparaison aux résultats simulés	107
c) Visualisation de l’échauffement de la plateforme RF par caméra thermique	110
d) Adaptation à ces enjeux	115

# Chapitre 3 : Interactions entre ondes RF et matière : de l'exposition aux ondes RF avec des cellules humaines à l'analyse de solutions biologiques complexe par spectroscopie diélectrique micro-onde

1) Etude <i>in vitro</i> de la co-exposition aux ondes RF et nanomatériaux .....	123
a) Principe du projet Nanowave : .....	123
b) Partenariat avec l'entreprise Anti Oxidant Power (AOP) pour les analyses biologiques associées à l'étude.....	123
c) Méthode LUCS développée par l'entreprise AOP pour l'évaluation <i>in vitro</i> de la toxicité.....	124
d) Description des modèles cellulaires pertinents utilisés pour cette étude.....	125
e) Premiers tests Nanowave : impact des NM à forte concentration sur les différents modèles cellulaires .....	125
f) Détermination de concentrations spécifiques : EC10, EC50 et EC90 pour les NM évalués comme toxiques .....	130
g) Evaluation de la toxicité des ondes RF seules.....	132
h) Co-exposition des ondes RF à différents DAS avec des nanomatériaux à concentration maximale .....	134
i) Protocole pour évaluer les effets synergiques à forte concentration des NM avec les ondes RF .....	134
ii) Protocole pour évaluer les effets synergiques à l'EC10 des NM avec les ondes RF .....	137
2) Problématique de l'évaporation du milieu de culture provoquée par l'effet thermique des ondes RF .....	140
a) Chauffer le milieu de culture avec les ondes RF en amont d'une exposition sur cellules.....	140
b) Génération d'une évaporation du milieu de culture avec une autre méthode de chauffage que les ondes RF .....	142
c) Méthodes pour évaluer l'évaporation du milieu de culture .....	144
d) Recherches pour tenter de limiter l'évaporation du milieu de culture.....	145
i) Evaluation de la solution avec modification du couvercle des plaques à puits : .....	146
ii) Evaluation de la solution avec un couvercle percé de trous : .....	147
e) Réflexion sur les problématiques des effets thermiques induits par les RF .....	148
3) Caractérisation de la matière .....	150
a) Mesure par CPW avec station sous pointes .....	150
i) Principe de la technique.....	150

ii) Description et préparation du dispositif .....	150
iii) Banc de test RF.....	151
iv) Exemple type de mesure.....	152
b) Caractérisation d'échantillons contenant des NTC en concentration inconnue mélangés à une matrice organique.....	152
i) Principe et enjeux .....	153
ii) Préparation des échantillons .....	153
iii) Détermination des concentrations inconnues et premiers résultats.....	154
iv) Caractérisation d'une variation à la fois en concentration de MO et de NTC.....	157
v) Nouveau protocole de préparation.....	158
vi) Traitement des données et résultats finaux.....	159
c) Analyse des propriétés du milieu de culture (DMEM).....	162

Conclusion générale.....165

Perspectives.....166

Contribution Scientifique.....167

Bibliographie.....168



# Résumé

Depuis l'avènement de l'ère industrielle, la société et notre rapport à l'environnement ont totalement été bouleversés. Au XIXe siècle, Flora Tristan écrit « À Londres, on respire la tristesse ; elle est dans l'air, elle entre par tous les pores. Ah ! Rien de plus lugubre, de plus spasmodique, que l'aspect de cette ville par un jour de brouillard, de pluie et de froid noir. », pour décrire les paysages encrassés de suie alors que l'exploitation du charbon dans les bassins industriels britanniques bat son plein. Aujourd'hui le charbon est remplacé par des choses bien plus invisibles mais tout autant dangereuses : les pesticides, les particules ultra fines, les ondes électromagnétiques, les perturbateurs endocriniens etc. L'ensemble de ces facteurs auxquels nous sommes exposés quotidiennement est appelé l'exposome. Les inquiétudes se font grandissantes, à juste titre, quant à ces nouvelles technologies rapidement utilisées dans les procédés industriels et dans les produits de grande consommation sans que des études sur le long terme n'aient été réalisées. En plus de cela, l'impact de ces agents est généralement évalué pour une exposition unique, sans considérer la réalité d'un exposome beaucoup plus complexe.

Dans ce cadre, l'objet de cette thèse porte sur l'étude d'une co-exposition de cellules humaines aux ondes radiofréquences et aux nanomatériaux pour déterminer les potentiels effets cocktails qui pourraient survenir lorsqu'une cellule est exposée simultanément à ces deux agents. Par exemple ils pourraient être cumulatifs, antagonistes, synergiques ou encore sans impact.

Les nanomatériaux sont utilisés dans tous les domaines, allant de l'alimentaire au cosmétique en passant par l'électronique. Leur toxicité est de mieux en mieux documentée, et les réglementations à leur égards plus strictes au fil des ans. La France a par exemple interdit l'utilisation de l'additif alimentaire E171 (dioxyde de titane) en 2020.

Quant aux ondes radiofréquences, on les retrouve dans les protocoles de communication Bluetooth, téléphonie 4G et 5G, Wi-Fi, domotique, antennes relais etc. Les débats concernant leur dangerosité sont toujours d'actualité, et les conclusions d'études toxicologiques restent contradictoires. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de l'OMS a classé les ondes radiofréquences comme possiblement cancérigène en 2011 et n'a pas changé sa ligne depuis.

Dans cette thèse seront abordées dans un premier temps les caractérisations des nanomatériaux sélectionnés (plusieurs oxydes métalliques, métaux, nanotubes de carbone), suivies de l'évaluation de leur toxicité sur des modèles cellulaires pertinents pour notre étude.

Par la suite nous détaillerons le système que nous avons développé pour l'exposition aux ondes radiofréquences à 2,45 GHz (bande de fréquence utilisée pour les communications sans fil de type Bluetooth, téléphonie ou Wifi). Ce système fonctionne en champ proche et permet d'éclairer de multiples échantillons biologiques contenus dans des plaques à puits. Sa caractérisation ainsi que sa dosimétrie seront ensuite données dans le contexte de notre étude.

Enfin, nous analyserons les résultats obtenus lors de la co-exposition aux nanomatériaux et aux ondes radiofréquences sur les modèles cellulaires choisis, en faisant varier la nature et la concentration des nanomatériaux ainsi que la puissance des ondes émises.

# Abstract

Since the advent of the industrial era, society and our relationship with the environment have been completely disrupted. In the 19th century, Flora Tristan wrote, "In London, one breathes sadness; it is in the air, it enters through every pore. Ah! Nothing more dismal, more spasmodic, than the appearance of this city on a day of fog, rain, and black cold," to describe the soot-laden landscapes as coal exploitation in British industrial basins was in full swing. Today, coal has been replaced by things much more invisible but still dangerous: pesticides, ultra-fine particles, electromagnetic waves, endocrine disruptors, etc. The combination of these factors to which we are exposed daily is referred to as the exposome. Concerns are growing, rightly so, about these new technologies rapidly used in industrial processes and consumer products without long-term studies having been conducted. In addition, the impact of these agents is generally assessed for a single exposure, without considering the reality of a much more complex exposome.

In this context, the object of this thesis is the study of co-exposure of human cells to radiofrequency waves and nanomaterials to determine the potential cocktail effects that may occur when a cell is simultaneously exposed to these two agents. For example, they could be cumulative, antagonistic, synergistic, or without any impact. Nanomaterials are used in all fields, ranging from food and cosmetics to electronics. Their toxicity is becoming better documented, and regulations regarding them are stricter over the years. For example, France banned the use of the food additive E171 (titanium dioxide) in 2020.

As for radiofrequency waves, they are found in Bluetooth communication protocols, 4G and 5G telephony, Wi-Fi, home automation, relay antennas, etc. Debates regarding their harmfulness are still ongoing, and toxicological study conclusions remain contradictory. The International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO) classified radiofrequency waves as possibly carcinogenic in 2011 and has not changed its stance since.

In this thesis, the characterizations of the selected nanomaterials (various metal oxides, metals, carbon nanotubes) will first be discussed, followed by the evaluation of their toxicity on cell models relevant to our study. Subsequently, we will detail the system we have developed for exposure to 2.45 GHz radiofrequency waves (frequency band used for Bluetooth, telephony, or Wi-Fi wireless communications). This system operates in the near field and illuminates multiple biological samples contained in well plates. Its characterization and dosimetry will then be provided in the context of our study. Finally, we will analyze the results obtained during the co-exposure to nanomaterials and radiofrequency waves on the chosen cell models, varying the nature and concentration of nanomaterials as well as the power of the emitted waves.

# Introduction générale

Notre santé est largement dépendante de nos expositions quotidiennes aux facteurs environnementaux. L'eau que nous buvons, la nourriture que nous mangeons, l'air que l'on respire, l'endroit où nous habitons, les bactéries et virus que nous rencontrons, ou encore nos interactions sociales. On appelle exposome l'ensemble de tous ces facteurs non génétiques auxquels est soumis un individu par son environnement quotidien et passé. [1]–[3] Il est très important de se rendre compte que l'exposome auquel nous avons été confronté étant fœtus, enfant ou adolescent peut jouer un rôle sur les maladies que nous développerons plus tard. Certaines périodes de notre vie sont particulièrement étudiées, on les appelle fenêtres d'expositions : la grossesse, la petite enfance, la puberté et le travail. [4] Ce sont les contextes où il faut être le plus vigilant aux facteurs environnementaux.

Historiquement on a associé les maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, affections respiratoires ou le diabète à des prédispositions génétiques. Aujourd'hui on se rend compte que cette hypothèse est limitée.

Prenons le cas des maladies cardiovasculaires, soit environ 530 millions de personnes affectées dans le monde et 90 millions de décès en 2019. Les avancées scientifiques récentes nous ont permis de déterminer que les facteurs génétiques étaient responsables d'environ 20% de ces maladies. Ce sont donc des facteurs extérieurs provenant de notre exposome qui seraient responsables des 80% restant. On peut par exemple citer les comportements sédentaires, l'obésité, le tabagisme qui sont liés au mode de vie de l'individu mais aussi la pollution de l'air, l'exposition aux métaux lourds ou le stress qui proviennent de l'environnement extérieur. [5], [6]

Aujourd'hui on estime que 70% à 90% des maladies chroniques seraient imputées aux facteurs environnementaux. Elles sont définies comme multifactorielles. [7]

Enfin avec cette notion d'exposome émerge l'idée que la maladie d'une personne est le produit de son histoire individuelle avec la superposition des expositions environnementales et de sa susceptibilité génétique.

Si l'on considère les espèces chimiques de notre environnement, on estime notre exposition à l'heure actuelle en Europe à près de 100 000 molécules différentes. On connaît en détail les effets toxiques de 500 d'entre elles, et environ 30 000 pour lesquelles nous avons des données, ce qui signifie que nous ne connaissons pas les impacts sanitaires d'environ 70% des molécules auxquelles nous pouvons être exposés. Le problème de l'exposome est que c'est une variable dynamique, qui évolue dans le temps et il est difficile de retracer l'exposome complet d'un individu. Autre problème, pour corrélérer une combinaison d'exposition à un problème sanitaire il faudrait une puissance statistique énorme et des dizaines de milliers de patients.

De plus, le principal problème est que ces facteurs interagissent entre eux. On parle alors d'effet cocktail. Depuis peu, on commence à s'intéresser à ces combinaisons de facteurs, s'ils ont des effets cumulatifs, antagonistes, synergiques ou bien aucune interaction.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à des co-expositions faisant intervenir deux facteurs physiques auxquels nous sommes tous soumis, les ondes électromagnétiques et les

nanomatériaux (NM). Les analyses toxicologiques ou comportementales de co-expositions sont assez récentes. La littérature associée est très limitée, pour ne pas dire quasi inexistante.

Plusieurs études se sont intéressées à une co-exposition entre ondes radiofréquences et un autre facteur, toxique ou non. Les modes d'application des ondes radiofréquences varient beaucoup d'une étude à une autre. Les fréquences étudiées sont comprises généralement autour de 800 MHz jusqu'à 2GHz pour cadrer avec les standards de la téléphonie mobile, et il arrive que des études soient réalisées à plus hautes fréquences, soit à plusieurs dizaines de GHz. Les modulations appliquées peuvent être en mode continu ou avec les protocoles de communication courant (LTE, WCMA, GSM etc.). Les puissances restent faibles, généralement en dessous avec des débits d'absorption spécifiques inférieurs ou égaux à 2W/kg, seuil autorisé pour le grand public, ce qui conforte l'idée d'une exposition réelle, en dessous des réglementations européennes.

Il faut distinguer cependant les études menées sur des cellules, soit *in vitro*, de celles utilisant des modèles animaux comme des rats ou des souris, dites *in vivo*. Elles diffèrent principalement par les durées d'expositions appliquées, qui ne sont pas du même ordre de grandeur avec quelques heures à 3 jours pour les cellules contre des semaines à des mois et même années pour les études *in vivo*. Les modèles cellulaires sont variables selon les études, certains proviennent de lignées immortalisées tandis que d'autres sont des cellules primaires.

Le co-exposant associé aux ondes RF est généralement un agent chimique (molécules, particules) ou physique (rayonnement, bruit).

D'un point de vue biologique, les effets recherchés sont très variés et dépendent principalement de l'expertise des équipes menant l'étude. On retrouve majoritairement des tests biologiques visant à évaluer l'apparition d'espèces réactives oxydantes (ROS) par de multiples méthodes. D'autres se concentrent sur les dommages causés à l'ADN par l'apparition de micronuclei ou de ruptures de brins. La majorité des études n'ont pas montré à ce jour une corrélation entre application aux ondes radiofréquences et dommages à l'ADN. En revanche, certains agents de co-exposition comme les rayons X en provoque, d'où l'intérêt d'évaluer cet aspect.

Enfin, un paramètre important à nos yeux est la manière de réaliser l'exposition, c'est-à-dire le protocole d'exposition aux agents investigués. Certaines études appliquent les ondes RF en amont, puis ajoutent le deuxième agent tandis que d'autres font l'inverse. On retrouve aussi des expositions en simultané aux deux agents, ou de manière alternée et cyclique. Les conclusions de ces études sont très différentes. 6 ne montrent aucune interaction entre les deux agents. [8]–[13] 1 seule montre clairement un effet cumulatif des deux agents lorsqu'ils sont appliqués de manière combinée. [14] Enfin 5 études démontrent un effet protecteur des ondes RF. [15]–[19] Dans ces 5 études, l'exposition RF est réalisée avant l'application de la condition toxique. Le mécanisme de défense rentrant en jeu est connu. On peut retrouver cet effet protecteur lorsque des cellules sont stressées par un agent chimique à très faible concentration par exemple. Cela produit un effet de stress qui augmente le métabolisme cellulaire et prépare la cellule à l'exposition d'une condition toxique. Ces résultats sont intéressants, particulièrement pour les effets protecteurs des ondes RF. En revanche dans notre modèle, nous cherchons à mimer un environnement quotidien où les deux agents agissent simultanément.

Comme mentionné précédemment, comparativement aux études liées à l'impact des ondes électromagnétiques appliquées seules sur un organisme vivant, la thématique de co-exposition

des ondes électromagnétiques avec un autre agent chimique ou physique n'intègre pas encore beaucoup d'investigations. Dans notre cas, nous nous sommes donc intéressés en particulier à la co-exposition de deux agents bien connus de tous : les ondes radiofréquences que l'on retrouve dans les protocoles de communication sans fil et les nanoparticules, largement utilisées dans l'industrie textile, alimentaire ou cosmétique. Cette étude est réalisée dans un contexte *in vitro*, sur différents modèles cellulaires ciblés, pertinents compte tenu d'une exposition réelle. Dans la littérature, l'étude des potentiels effets toxiques provoqués par l'exposition d'ondes radiofréquences et des nanomatériaux choisis est inexistante. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un projet financé par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, l'ANSES, dont l'acronyme est NANOWAVE.

Le premier chapitre précisera ce qu'est un nanomatériau (NM), pourquoi ils sont aussi largement utilisés aujourd'hui dans la recherche ou l'industrie et par quels moyens nous sommes exposés dans notre vie quotidienne aux nanomatériaux sélectionnés. Puis, nous nous intéresserons aux différentes caractérisations des échantillons de nanomatériaux, nécessaires à toute étude toxicologique. Enfin je détaillerai le protocole de préparation des échantillons pour une exposition sur des modèles cellulaires.

Le deuxième chapitre se concentre sur le système d'exposition aux ondes radiofréquences que nous avons développé, à savoir la configuration choisie, la dosimétrie numérique et expérimentale ainsi que les enjeux et problématiques que nous avons rencontrés et sur lesquels nous travaillons encore.

Le troisième chapitre se divise en deux thèmes. Le premier correspond à l'objet principal de ces travaux de thèse, à savoir les résultats de la co-exposition d'ondes RF et NM sur les modèles cellulaires sélectionnés pour différentes conditions d'exposition. L'autre partie est une étude annexe que j'ai réalisée sur la caractérisation de NM par spectroscopie diélectrique. L'objectif est de déterminer une concentration inconnue en nanoparticules dans une matrice organique par leurs propriétés diélectriques.

## Table des tableaux

Tableau 1: Degré de toxicité des échantillons utilisés d'après différentes études analysées.....	29
Tableau 2: Niveau de dangerosité en fonction des différentes voies d'exposition.....	31
Tableau 3 : Tailles des nanoparticules déterminées par observation au MET.....	37
Tableau 4: Rayon hydrodynamique obtenus d'après les mesures DLS pour les différents NM.....	40
Tableau 5 : Tailles et paramètres de la loi normale associés à la répartition en taille des NM .....	41
Tableau 6 : Valeurs des surface spécifiques des différents NM .....	45
Tableau 7 : Structure cristallines déterminées par diffraction rayon X pour les différents NM.....	46
Tableau 8 : Eléments chimiques présents en surface déterminés par XPS pour les différents NM .....	46
Tableau 9 : Comparatif des différents système d'exposition .....	59
Tableau 10 : Récapitulatif des dimensions des applicateurs RF vus dans les figures techniques précédentes.....	64
Tableau 11 : Récapitulatif des normes européennes liées au DAS.....	73
Tableau 12: Bilan des valeurs selon les critères de caractérisation définis : efficacité, homogénéité et isolation déterminés de manière numérique.....	83
Tableau 13 : Valeur des DAS obtenus d'après les profils thermiques mesurés .....	91
Tableau 14: Comparatif des DAS obtenus en fonction de la méthode de régression et de la portion de courbe analysée .....	94
Tableau 15 : Résultats obtenus pour les différentes configurations de test afin d'estimer les erreurs de variabilités .....	96
Tableau 16 : Tableau comparatif des valeurs du DAS obtenues par dosimétrie expérimentale et numérique.....	97
Tableau 17 : Comparaison des paramètres analysés en simulation en fonction du gap d'air entre la plateforme RF et le fond de la plaque à puits .....	115
Tableau 18: Tableau comparatif des valeurs du DAS obtenues par dosimétrie expérimentale et numérique mis à jour.....	116
Tableau 19. Synthèse des résultats de toxicité des NM seuls suivant le modèle cellulaire pour une concentration en NM de 100 µg/mL .....	129
Tableau 20: Récapitulatif des valeurs des EC50 pour les 3 NM toxiques en fonction des modèles cellulaires .....	131
Tableau 21: Tableau récapitulatif de l'étude menée sur la détermination d'une concentration inconnue en NTC .....	162

## Table des Figures

Figure 1: Photographie d'une daphnie à gauche ; d'un isopode à droite .....	30
Figure 2: Schéma des entrées et sorties de l'évaluation des risques de l'approche semi-quantitative ...	31
Figure 3: Valeurs de l'indice QEH en fonction des différents NM étudiés et du moyen d'exposition ..	32
Figure 4: A gauche : photo de la DLS Dynamics V7. A droite : schéma de principe de la DLS .....	38
Figure 5: Courbes obtenues d'après la mesures DLS.....	39
Figure 6: Graphiques en intensité et en nombre d'une analyse du NM200 par DLS .....	39
Figure 7: Répartition en taille des nanoparticules d'argent mesurée par NTA .....	40
Figure 8: NM-103 observé au MET à plusieurs grossissements [34].....	41
Figure 9: NM-104 observé au MET à plusieurs grossissements [34].....	42
Figure 10: NM-105 observé au MET à plusieurs grossissements [34].....	42
Figure 11: NM-110 observé au MET et MEB à plusieurs grossissements [37] .....	42
Figure 12: NM-200 observé au MET à plusieurs grossissements .....	43
Figure 13: NM-211 observé au MET à plusieurs grossissements [36].....	43
Figure 14: NTC observés au MEB à plusieurs grossissements .....	43
Figure 15 : NM-600 observé au MEB à plusieurs grossissements [113].....	44
Figure 16: NP d'or observées au MET à plusieurs grossissements .....	44
Figure 17: NP d'argent observées au MET à plusieurs grossissements .....	44
Figure 18 : Résultats obtenus par diffraction rayon X des échantillons NML-104 et NM-105 .....	45
Figure 19 : Nanoparticules d'argent observées par MET en cellule liquide .....	47
Figure 20: a) TiO <sub>2</sub> b) ZnO et c) SiO <sub>2</sub> observés par MET en cellule liquide .....	48
Figure 21: Courbes de cinétique de déstabilisation obtenues par turbiscan pour les différents NM.....	48
Figure 22: Propagation d'une onde dans une système dit à propagation .....	58
Figure 23: Images de plaque 96 puits pour culture cellulaire .....	60
Figure 24: Schéma de principe d'exposition d'une plaque à puits à l'aide d'une plateforme d'applicateurs RF.....	61
Figure 25: Schéma de principe d'un applicateur RF alimenté par un câble coaxial .....	62
Figure 26: Schémas techniques d'un applicateur RF dit « simple » et ses dimensions: en haut, vue en coupe ; en bas à gauche, vue de dessus ; en bas à droite, vue de dessous .....	63
Figure 27: Schémas techniques d'un applicateur RF dit « doublet » et ses dimensions : en haut, vue en coupe ; en bas à gauche, vue de dessus ; en bas à droite, vue de dessous .....	64
Figure 28: Photographie d'un îlot de 4 applicateurs a) vue de dessus, b) vue de dessous sans connecteur SMA, c) vue de dessous avec connecteurs SMA soudés .....	66
Figure 29 : Photographie d'un îlot avec plaque à puits positionné au-dessus .....	66
Figure 30: Plateforme d'exposition RF comportant 4 îlots RF, positionnés sous une plaque à 96 puits	66
Figure 31: Schéma de principe et photographie de la plateforme placée sur son support.....	67

Figure 32: Plaque d'incubateur adaptée pour laisser passer les câbles RF.....	68
Figure 33: Photographie et caractéristiques du générateur de signal sélectionné, Transcom G6.....	68
Figure 34: Photographie et caractéristiques de l'amplificateur RF sélectionné, ZHL 20W 20 2S+ de Minicircuit.....	69
Figure 35: Caractérisation de l'amplificateur choisi $P_s=f(P_e)$ à 2,3 GHz.....	69
Figure 36: Synoptique du banc d'exposition RF.....	71
Figure 37: Banc de test avec plateforme d'exposition RF.....	72
Figure 38 : Schéma de principe de la rotation dipolaire de la molécule d'eau sous un champ électrique.....	74
Figure 39 : Courbe représentant l'évolution de la température d'un échantillon liquide soumis aux ondes RF et les différentes phases associées à ce phénomène.....	75
Figure 40 : Schéma du banc de test de l'ANFR pour la détermination du DAS.....	76
Figure 41 :Exemple de visualisation du DAS après analyse par le logiciel de mesure de l'ANFR.....	77
Figure 42: Schéma de principe de l'exposition dans la configuration de notre applicateur RF avec un tapis cellulaire en fond de plaque à puits.....	77
Figure 43: Modélisation 3D d'un îlot de la plateforme d'exposition RF avec puits remplis de DMEM.....	79
Figure 44: Vue de dessus du modèle 3D avec différentes lignes d'analyse du DAS situées à 5 $\mu$ m au dessus des applicateurs RF.....	80
Figure 45: Répartition du DAS dans le plan à 5 $\mu$ m au dessus des applicateurs RF.....	81
Figure 46: Répartition du DAS en coupe par le milieu des applicateurs RF.....	81
Figure 47: DAS simulé sur les lignes précédemment évoquées.....	82
Figure 48 : DAS en simulé sur les lignes précédemment évoquées en échelle log.....	82
Figure 49 : Profil thermique relevé expérimentalement lors de l'application des ondes RF sur un liquide.....	84
Figure 50: Schéma de principe du support permettant l'adaptation d'un capteur thermique au puits....	85
Figure 51: Images des bouchons 96 puits et 24 puits imprimés en résine.....	85
Figure 52: Image à fort grossissement du TC et de la FO.....	87
Figure 53: Schéma de la méthode de préparation du TC dans la gaine thermorétractable.....	88
Figure 54: Positionnement final du TC avec le bouchon dans le puits : l'extrémité du TC vient en contact avec le fond du puits.....	88
Figure 55: FO et TC adaptés sur bouchon support pour la mesure thermique.....	89
Figure 56: Modules d'acquisition a) pour TC b) pour FO.....	90
Figure 57: Synoptique du banc de test incluant les deux moyens d'acquisition en température.....	90
Figure 58: Profil thermique relevé par les deux capteurs : moyenné sur 4 mesures.....	91
Figure 59: Zoom sur l'enclenchement des RF pour les profils thermiques relevés par TC et FO.....	92
Figure 60: Schéma des différents point d'intérêt à mesurer pour la caractérisation du dispositif.....	96
Figure 61: Schéma récapitulatif des DAS moyens obtenus pour les différents points d'intérêt.....	97

Figure 62: Image du profilomètre TENCOR utilisé .....	99
Figure 63: Schéma de la mesure en fond de puits avec le profilomètre .....	100
Figure 64: Exemples de mesure obtenue en fond de puits grâce au profilomètre .....	100
Figure 65: Schéma de la mesure réalisée au profilomètre sur l'arrière de la plaque à puits .....	101
Figure 66: Profil obtenu pour l'arrière de plaque du puits E5 vers le puits E9 .....	101
Figure 67: Profil du PCB contenant les applicateurs RF .....	102
Figure 68: Jauge de mesure PALMER .....	102
Figure 69: Profil d'une plaque à puits selon 3 lignes (A,B et D) d'après les mesures au Palmer .....	103
Figure 70: Profil d'une plaque à puits selon les 12 colonnes d'après les mesures au Palmer .....	104
Figure 71: Cartographie de 3 plaques à puits différentes d'après les mesures au Palmer.....	104
Figure 72: Représentation des îlots d'intérêt sur la cartographie d'une plaque à puits .....	105
Figure 73: Photographie et schéma de l'observation réalisée à l'HIROX pour déterminer l'espacement entre plaque à puits et PCB .....	106
Figure 74: Image montrant l'écart observé entre la plaque à puits et le PCB .....	106
Figure 75: Profil thermique obtenu pour un puits central exposé au RF (orange) et un puits voisin (bleu).....	107
Figure 76 : Analyse du retard de la montée en température pour le puits voisin.....	108
Figure 77: DAS obtenu par modélisation pour notre dispositif en échelle log.....	108
Figure 78: Réponse thermique obtenue lors de l'application d'un DAS très élevé .....	109
Figure 79: Schéma de la disposition des thermocouple .....	110
Figure 80: Profil thermique relevé pour dans le puits central et le puits voisin en présence ou non de liquide pour différentes combinaisons .....	111
Figure 81: Mesure thermique directe de l'applicateur RF .....	111
Figure 82 : Photographie du banc de test pour la mesure IR de la plateforme RF .....	112
Figure 83: Ilot d'applicateurs RF avec les 8 zones pour l'analyse du comportement thermique .....	112
Figure 84: Distinction des différentes zones d'analyse en fonction de la géométrie de l'îlot d'applicateurs RF.....	113
Figure 85: Profils thermiques obtenus pour les zones d'analyse présentés en Figure 82 .....	113
Figure 86: Comparaison du profil thermique obtenu pour la plateforme seul et la plateforme surmontée de la plaque à puits.....	114
Figure 87: Profils thermiques obtenus pour la plateforme seule et la plateforme surmonté de la plaque à puits .....	114
Figure 88 : Schéma de principe de la réponse en fluorescence de la technique LUCS .....	125
Figure 89: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules HepG2 par la technique LUCS .....	126
Figure 90: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules SHS-Y5Y par la technique LUCS.....	127

Figure 91: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules RPE par la technique LUCS .....	127
Figure 92: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules HACAT par la technique LUCS .....	128
Figure 93: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules primaires Fibroblastes par la technique LUCS.....	128
Figure 94: Résultats LUCS sur les NM-600 et NTC pour une exposition de 24h sur cellules HepG2	130
Figure 95: Dose réponse du NM-200 (SiO <sub>2</sub> ) déterminée par la méthode LUCS sur le modèle cellulaire HepG2 .....	131
Figure 96: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS des ondes RF à différents DAS pour les modèles cellulaires choisis.....	132
Figure 97: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS des ondes RF à différents DAS pour les modèles cellulaires choisis, normalisé.....	133
Figure 98: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à C <sub>max</sub> et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire HepG2 .....	135
Figure 99: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à C <sub>max</sub> et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire SHS-Y5Y .....	135
Figure 100: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à C <sub>max</sub> et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire RPE .....	136
Figure 101: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à C <sub>max</sub> et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire HACAT .....	136
Figure 102: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à C <sub>max</sub> et ondes RF à 6W/kg sur cellules primaire Fibroblaste .....	137
Figure 103: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à la concentrations spécifique EC10 propre à chacun des NM ZnO, SiO <sub>2</sub> et Ag et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire HepG2 .....	138
Figure 104: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à la concentrations spécifique EC10 propre à chacun des NM ZnO, SiO <sub>2</sub> et Ag et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire SHS-Y5Y .....	138
Figure 105: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à des concentrations spécifique EC10 EC20 EC30 et EC50 du NM-200 ( SiO ) et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire HepG2 .....	139
Figure 106: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 20W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2.....	141

Figure 107 : Evaluation de la toxicité par méthode MTT liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 20W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2.....	142
Figure 108 : Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation générée par chauffage à l'étuve sur modèle cellulaire HepG2 .....	143
Figure 109: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 10W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2.....	143
Figure 110: Schéma de principe pour l'analyse de l'évaporation du milieu par la hauteur de milieu présent dans le puits .....	144
Figure 111: Capture d'écran de l'analyse 3D réalisée par l'HIROX avec une coupe selon le plan jaune .....	145
Figure 112: Plaque 96 puits avec couvercle à picots imprimé en 3D .....	146
Figure 113: Image des gouttes déposées sur les couvercles imprimés en 3D suite à l'évaporation du milieu .....	147
Figure 114 : Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 10W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2 pour différents couvercles.....	148
Figure 115: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS de différents modèles cellulaires maintenues 24h dans un environnement à 37°C ou 40°C.....	149
Figure 116: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS de différents modèles cellulaires maintenues 24h dans un environnement à 37°C ou 40°C (normalisé).....	149
Figure 117: Photo du dispositif utilisé avec les dimensions correspondantes .....	151
Figure 118: Synoptique du banc de test pour la mesure sous pointe .....	151
Figure 119: Tamis contenant les déchet (à gauche) et poudre filtrée grâce au tamis (à droite) .....	154
Figure 120: Spectre obtenu pour différentes concentrations en NTC, E1 en fonction de la fréquence.....	155
Figure 121: Spectre obtenu pour différentes concentrations en NTC, valeur de E2 en fonction de la fréquence.....	155
Figure 122: Diagramme Cole-Cole obtenus avec les paramètres E1 à 1,54 GHz et E2 à 16 GHz.....	156
Figure 123: Dispersion des points pour une même concentration : valeurs (à gauche) et moyennes (à droite).....	157
Figure 124 : Diagramme Cole-Cole pour 3 concentration en MO différentes et pour chacune d'entre elle 4 concentrations en NTC.....	158
Figure 125: Diagramme Cole-Cole de la MO et l'eau mesurées pour 4 expériences indépendantes. A droite, représentation visuelle de la correction à effectuer .....	160
Figure 126: Exemple de Diagramme Cole-Cole obtenu pour une manip, avec 10 mesures pour chacune des solutions.....	160

Figure 127: Graphique de E1 et E2 en fonction de la concentration obtenus en moyennant deux manip indépendantes.....	161
Figure 128: Dispersion des points pour E1 et E2 en fonction de la concentration en NTC .....	162
Figure 129: Sonde diélectrique utilisée avec son kit de calibration.....	163
Figure 130: Permittivité diélectrique de l'eau à 37°C en fonction de la fréquence, mesurée grâce à la sonde Keysight.....	163

## Glossaire des abréviations

AFM : Atomic Force Microscope
BET : Brunauer-Emmett-Teller
CLS : Chromatographie Liquide Solide
CMC : carboxyméthylcellulose
DAS : Débit d’Absorption Spécifique
DLS : Dynamic Light Scattering
DMEM : Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EDS : Energy Dispersive Spectroscopy
EDX : Energy Dispersive X-ray
JRC : Joint Research Center
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MET : Microscope Electronique à Transmission
MO : Matrice Organique
NM : Nanomatériau(x)
NP : Nanoparticule(s)
NTA : Nanoparticle Tracking Analysis
NTC : Nanotube de Carbone
ROS : Reactive Oxygen Species
SAXS : Small Angle X-ray Scattering
STEM : Scanning Transmission Electron Microscopy
TO : Thiazole Orange
XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

# Chapitre 1 : Description et Caractérisation de Nanomatériaux pour une étude toxicologique

1) Introduction aux Nanomatériaux .....	23
a) Les Nanomatériaux, des matériaux aux propriétés exceptionnelles mais potentiellement dangereux .....	23
b) Pertinence des NM choisis par rapport aux expositions quotidiennes.....	24
c) Connaissances actuelles sur la toxicité des NM sélectionnés .....	27
2) Méthodes de caractérisation des NM.....	33
a) Critères de caractérisation des NM .....	33
b) Taille des NM .....	33
c) Forme des NM.....	35
d) La surface spécifique .....	35
e) Phases cristallographiques .....	35
f) Chimie de surface .....	35
g) Charge de surface.....	35
h) Etat d'agglomération ou agrégation.....	36
i) Dispersibilité et solubilité .....	36
3) Bilan des résultats de caractérisation : .....	37
a) Taille des NM et des agrégats/agglomérats .....	37
b) Forme des NM .....	41
c) La surface spécifique.....	45
d) Composition.....	45
e) Chimie de surface.....	46
f) Etat d'agglomération ou agrégation .....	46
g) Dispersibilité et solubilité .....	48
4) Protocole de préparation des NM en suspension.....	49
a) Problématique des suspensions et pertinence de l'exposition en suspension .....	49
b) Description du protocole.....	49
Conclusion .....	50

# 1) Introduction aux Nanomatériaux

## a) Les Nanomatériaux, des matériaux aux propriétés exceptionnelles mais potentiellement dangereux

Il existe de nombreuses définitions possibles pour définir ce qu'est un nanomatériau. Selon les recommandations de l'Europe en 2011, on appelle nanomatériau un échantillon dont la moitié de sa population (en nombre) est composée d'objets dont au moins l'une des dimensions est inférieure à 100nm [20]. En réalité ces particules extrêmement petites se retrouvent rarement seules, et sont mélangées à des populations de particules plus macroscopiques. Il faut ainsi différencier nanoparticules (particules d'une dimension inférieure à 100nm) et nanomatériaux (objets qui contiennent des nanoparticules). Dans notre cas les échantillons que nous utiliserons par la suite sont majoritairement constitués de nanoparticules, mais on fera souvent le raccourci nanomatériaux pour les nommer. Du fait de leur taille infiniment petite pour l'une de ses dimensions, la proportion de ses atomes situés à la surface devient considérablement plus élevée par rapport à ceux présents à l'intérieur du matériau. La surface spécifique (surface par unité de masse) de l'objet augmente donc considérablement, et plus il y a de surface, plus il y a de contact avec l'environnement extérieur. En conséquence, les nanomatériaux présentent des caractéristiques uniques et des comportements souvent différents de leurs homologues de taille supérieure, qu'on appelle matériaux massifs. [21], [22] Voici quelques exemples de modifications des propriétés de nanomatériaux du fait de leur grande surface spécifique et leur échelle nanométrique.

La grande quantité d'atomes en périphérie des nanoparticules les rend extrêmement réactives chimiquement. Cette réactivité élevée peut être exploitée pour catalyser des réactions chimiques spécifiques avec une grande efficacité. Par exemple les nanoparticules de platine sont largement utilisées comme catalyseurs dans les piles à combustible. [23] Elles peuvent catalyser plus efficacement la réaction d'oxydation de l'hydrogène et de l'oxygène pour produire de l'électricité. On utilise par exemple les oxydes de Graphène comme capteur de gaz toxique grâce à l'énorme sensibilité qu'ils offrent du fait de leur grande surface spécifique et donc des interactions avec les molécules environnantes. [24] Ils permettent ainsi de détecter des concentrations extrêmement faibles.

Récemment une équipe chinoise a développé des aérogels de Graphène formés de réseaux de nanoparticules permettant de lutter contre les marées noires. L'aérogel est à la fois ultra léger (un des matériaux les plus légers du monde) et extrêmement poreux, permettant d'absorber jusqu'à 900 fois son propre poids en huile. Étant hydrophobe il est une arme efficace pour absorber uniquement l'huile et diminuer l'impact environnemental des marées noires. [25]

Les NM sont aussi utilisées pour leurs propriétés optiques uniques. On parle souvent de la coupe de Lycurgue, objet romain du IV<sup>e</sup> siècle, qui change de couleur en fonction de l'orientation de la lumière : vert en lumière réfléchie et rouge en lumière incidente. Ce phénomène est lié à la présence de NP métalliques d'or, d'argent et de cuivre. Aujourd'hui on les utilise dans la photonique car un semi-conducteur massif possède des bandes interdites que l'on peut discrétiser lorsqu'on réduit sa taille à l'échelle nanométrique, permettant ainsi de cibler les

longueurs d'onde absorbées et émises en fonction de la taille des NP. [26], [27] Les propriétés optiques des NP sont aussi utilisées dans le traitement de l'eau pour enlever divers polluants grâce notamment aux NP de TiO<sub>2</sub> qui peuvent capter les contaminants organiques et les décomposer sous l'influence de la lumière ultraviolette par photocatalyse. [28]

On retrouve bien entendu tout ce qui est lié aux propriétés mécaniques qui permettent aujourd'hui de développer des matériaux composites plus résistants, légers, souples etc. On utilise les nanoparticules de Graphène et les nanotubes de carbone dans des polymères pour former des composites aux propriétés améliorées. [29]

Enfin les NM ont un potentiel intéressant en tant que vecteur pour la distribution médicamenteuse en ciblant spécifiquement des cellules ou des zones d'intérêt (ces travaux sont cependant actuellement relativement à l'arrêt du fait des questions de toxicité potentielle des NM envers l'homme et l'environnement, toujours à l'étude). Elles sont alors fonctionnalisées avec des agents de ciblage pour agir sur les tissus ou cellules malades. On pourrait aussi les utiliser aussi pour l'imagerie médicale par résonance magnétique (IRM). [30], [31]

Pour tous ces aspects les nanomatériaux sont aujourd'hui largement utilisés dans l'industrie et la recherche. On les retrouve de plus en plus dans notre vie quotidienne (stockage de l'énergie, alimentation et médicaments (enrobages), matériaux composites, cosmétiques) et les préoccupations quant à leur nocivité se font grandissantes. En effet en plus d'avoir des propriétés nouvelles ou bien décuplées (ce qu'on appelle communément « les effets de taille ») les nanomatériaux sont des objets extrêmement petits pouvant franchir les barrières biologiques.

Ces NM peuvent pénétrer la paroi cellulaire qui est semi perméable et ne permet normalement pas le passage de molécules potentiellement nuisibles. Les NM peuvent aussi être internalisés dans les cellules par endocytose : grâce à des vésicules, la cellule enveloppe un objet externe et l'amène en son sein. Une fois au cœur de la cellule ces NM peuvent éventuellement entrer en interaction avec le noyau, les mitochondries ou des protéines et provoquer un stress oxydatif au détriment de la cellule. Les NM pourraient aussi franchir la barrière hématoencéphalique, pourtant bien hermétique, et donc atteindre le cerveau ainsi que le système nerveux central. [32], [33]

L'objet de cette thèse est d'étudier en partie la toxicité des NM même si celle-ci est relativement bien documentée (du moins pour les NM que nous avons sélectionnés), mais surtout de voir les effets de ces NM lors d'une co-exposition avec des ondes radiofréquences. Dans notre cas nous avons choisi de mener une étude *in vitro*, sur différents modèles cellulaires humains : HepG2 (hépatocarcinome), SHS-Y5Y (neurone-like), RPE (cellules épithéliales), HaCaT (kératinocytes) et Fibroblastes.

## b) Pertinence des NM choisis par rapport aux expositions quotidiennes

Pour ce faire nous avons choisi d'étudier les NM suivants, et je préciserai dans quel cadre quotidien nous pouvons les retrouver. Il faut préciser que ces NM ont été choisis, pour l'essentiel, parmi les NM de références offerts par le Centre Commun de Recherche de la Commission Européenne (JRC), qui met gratuitement à la disposition des laboratoires de

recherche des NM qui ont été stockés en grandes quantités et caractérisés de manière à permettre des études comparatives. [34]–[37] Notre choix s'est orienté à la fois vers différentes morphologies (0D, 2D) et différentes fonctionnalisations de surface. Nous avons ainsi obtenu du nano TiO<sub>2</sub> (NM103 NM104 et NM105), du nano ZnO (NM110), du nano SiO<sub>2</sub> (NM200), du nano CeO<sub>2</sub> (NM211) et du nano argile (NM600). Du nano Ag (ref : 576832) et nano Au (ref : 636347) ont été choisis chez Sigma Aldrich. Enfin, nous avons aussi complété cette sélection avec des nanotubes de carbone (NTC) synthétisés au CIRIMAT et ayant eux aussi été utilisés dans de nombreuses études (éco)toxicologiques et très bien caractérisés.

### **Le dioxyde de titane TiO<sub>2</sub>**

L'exemple le plus connu est l'additif alimentaire E171. Il est couramment utilisé pour améliorer l'apparence des aliments en leur donnant une couleur blanche éclatante. Cette couleur blanche est liée à des particules de l'ordre du µm. Cependant lors des processus de synthèse de ces particules, des nanoparticules sont aussi générées et sont bien présentes dans le produit final. Elles représentent 2 à 3% en masse mais jusqu'à 50% en nombre de particules. Le dioxyde de titane était jusqu'à récemment très souvent présent dans des produits tels que les bonbons, les gâteaux, les chewing-gums, les glaces, les confiseries et les produits laitiers. [38] La France a interdit son utilisation dès 2020, suivie par l'Europe en 2022. Ces interdictions font suite aux travaux de différentes agences sanitaires, notamment l'Anses en France [39] et l'EFSA au niveau Européen. [40] Cependant les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sont toujours utilisées dans d'autres secteurs non alimentaire, et ne sont pas concernées par ces interdictions.

On le retrouve aussi dans les cosmétiques tels que les crèmes solaires, les fonds de teint, les poudres et les lotions. Les nanoparticules de dioxyde de titane sont appréciées pour leur capacité à agir comme filtres UV, offrant une protection accrue contre les rayons du soleil en comparaison avec les particules de plus grande taille, tout en restant transparentes sur la peau du fait de leur taille nanométrique. [41], [42]

Ce qui fonctionne dans le maquillage fonctionne aussi dans le BTP. Ils sont utilisés dans les peintures, les revêtements et les encres pour améliorer leur opacité, leur résistance aux rayons UV et leur grand pouvoir couvrant. Cette utilisation permet d'obtenir des surfaces peintes de meilleure qualité et plus durables. [43]

Le dioxyde de titane sous forme de nanoparticules peut être intégré dans des textiles et des matériaux pour leur conférer des propriétés antibactériennes, antifongiques et autonettoyantes. Cela est utile dans diverses applications, notamment les vêtements de sport, les rideaux, les vitrages et les revêtements de bâtiments. [44]

### **L'oxyde de zinc ZnO :**

Majoritairement utilisées dans les produits cosmétiques, les particules de ZnO agissent comme filtre UV dans les crèmes solaires pour protéger la peau des rayons ultraviolets. Pour leur effet apaisant et protecteurs on les retrouve dans les lotions pour le corps, les baumes à lèvres ou encore les crèmes pour peaux sensibles et les éruptions cutanées. [45], [46]

Elles sont ajoutées dans les textiles prévus pour le sport entre autres, du fait de leurs propriétés antibactériennes. [47], [48]

On peut aussi les retrouver dans les peintures et les revêtements pour lutter contre la corrosion et les intempéries. [49], [50]

Rarement utilisée dans l'alimentaire, elles sont quelques fois ajoutées pour améliorer la texture et la conservation des aliments. [51], [52]

### **Le dioxyde de silicium ou silice SiO<sub>2</sub>**

Dans l'industrie alimentaire, il s'agit du E551. Elles sont couramment utilisées comme agent antiagglomérant dans les produits alimentaires en poudre tels que les épices, le sel, les compléments alimentaires et les préparations pour gâteaux. [53], [54]

De même que le TiO<sub>2</sub> les NP de SiO<sub>2</sub> sont utilisées dans certains produits cosmétiques, notamment les crèmes pour le visage, les lotions pour le corps et les produits de maquillage. Elles peuvent être utilisées comme agents épaississants, absorbants ou matifiants. [55] On les retrouve aussi dans les dentifrices du fait de leurs propriétés abrasives. [56]

On les utilise dans le milieu médical et paramédical comme excipients, aidant à stabiliser les formulations et à améliorer la biodisponibilité des principes actifs. [57]

Elles permettent d'améliorer les propriétés mécaniques des plastiques, caoutchoucs, revêtements et peintures, améliorant la résistance aux rayures, la durabilité et leur adhérence. [58], [59]

### **Dioxyde de Cérium CeO<sub>2</sub> :**

CeO<sub>2</sub> sous forme nanométrique est beaucoup moins utilisé dans la vie courante que les 3 NM précédents. On en retrouve pour des applications de recherche et industrielles mais voici quelques aspects où on peut les retrouver.

Leur plus grande utilisation est dans l'industrie automobile. Elles sont placées dans les pots catalytiques des véhicules, une partie du pot d'échappement des moteurs à combustion interne. Elles servent à réduire par catalyse les émissions de polluants comme les oxydes d'azotes (NO<sub>x</sub>) et autres gaz toxiques. [60], [61]

Elles sont plus rarement ajoutées dans l'industrie du verre et de la céramique pour polir et renforcer les matériaux. [62]

### **Nanoargiles :**

Elles sont principalement utilisées pour améliorer les propriétés mécaniques de matériaux. On les retrouve dans les revêtements de sol, les peintures, les mastics mais aussi dans les emballages alimentaires pour leur conférer une bonne imperméabilité à l'humidité et aux gaz. [63]

Ces NP sont plus rarement utilisées dans les produits cosmétiques comme les masques, les crèmes pour la peau et les produits capillaires. [64]

### **Les NTC bruts et oxydés :**

Beaucoup utilisés dans les nouvelles technologies, les NTC présentent une combinaison unique de propriétés mécaniques et électriques ou thermiques, associées à leur diamètre nanométrique et des longueurs généralement micrométriques (facteur de forme très élevé) qui leurs confèrent des applications dans de nombreux domaines. De nombreuses applications sont ainsi proposées en nanoélectronique (transistors pour les NTC mono-paroi semi-conducteurs, surtout à visée de capteurs) ou encore charge conductrice de l'électricité pour les NTC multiparois. On les

retrouve dans le stockage de l'énergie, souvent comme additifs dans les batteries et les super condensateurs. [65]–[67]

Les NTC servent à développer des matériaux composites aux propriétés mécaniques incroyables tout en étant très légers, comme les gilets pare-balles, les raquettes de tennis ou les vélos. Ils sont aussi utilisés comme renforts mécaniques dans les céramiques [68], les polymères et encres [69] ou des hydrogels [70], [71] pour leur conférer simultanément une conductivité électrique.

Enfin on peut aussi les retrouver dans des systèmes de filtration avancés pour éliminer les contaminants de l'eau et de l'air. [72], [73]

#### **L'or (Au) :**

Plus rares dans la vie quotidienne, nous avons choisi de les étudier car elles sont utilisées dans le domaine médical en particulier couplées avec des ondes radiofréquences dans les traitements thermiques contre les tumeurs. [74]

Elles permettent de délivrer des médicaments directement sur des cellules cibles pour des thérapies spécifiques. [31], [75]

Aussi utilisées dans l'imagerie médicale par résonance magnétique ou imagerie photo acoustique. [30], [76].

#### **L'Argent (Ag) :**

Les nanoparticules d'argent sont connues pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. [77]–[79] On les retrouve donc dans les textiles mais aussi dans les pansements, les bandages et des dispositifs médicaux. Dans les emballages alimentaires elles permettent de prolonger la durée de conservation des aliments et empêchent la croissance bactérienne. On les retrouve aussi dans les produits ménagers et les désinfectants.

### **c) Connaissances actuelles sur la toxicité des NM sélectionnés**

La toxicité des nanoparticules sous forme de poudre (inhalation) est avérée, entraînant des réactions inflammatoires au niveau du système respiratoire. Elles ont pour la majorité d'entre elles des conséquences environnementales à la fois toxicologique et comportementale. Dans notre cas nous allons évaluer leur toxicité en suspension, sur des modèles cellulaires *in vitro*. Il faut cependant bien faire attention : toutes les nanoparticules d'un même type ne sont pas identiques de par leur taille, leur forme ou encore leur chimie de surface. Nous le verrons par la suite, il est important de caractériser nos NM selon des critères / paramètres bien définis pour pouvoir les comparer. Dans cette partie je vais donc m'attarder particulièrement sur les études utilisant les NM issus du JRC, c'est-à-dire identiques à ceux que nous avons mis en œuvre dans ces travaux. Signalons dès à présent que nos choix permettent de couvrir plusieurs grandes classes de NM : 0D, 1D, 2D mais aussi oxydes métalliques, métaux, silicates, nanomatériaux carbonés. L'influence de la solubilité (qui varie de manière très importante en fonction des NM) est aussi à souligner.

### 1) Dioxyde de titane TiO<sub>2</sub> :

Nous avons choisi 3 types de TiO<sub>2</sub> qui diffèrent par leur phase cristalline et leur chimie de surface :

- Le NM-103 du JRC : phase rutile, coating hydrophile
- Le NM-104 du JRC : phase rutile, coating hydrophobe
- Le NM-105 du JRC : phase majoritairement anatase sans coating

Dans la littérature, ces échantillons sont assez utilisés. On retrouve des études sur différents modèles cellulaires, pour différentes concentrations allant de quelques µg/mL jusqu'à 200µg/mL et des durées d'exposition de 3h à 72h. Les analyses biologiques sont variées que ce soit pour détecter de la cytotoxicité, génotoxicité, apparition de micronoyaux, formation d'espères réactives de l'oxygène (ROS), ou encore des ruptures de brin d'ADN. Très majoritairement, on ne constate aucune toxicité de ces nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. [80]–[84] Il s'avère cependant que la phase anatase (comme le NM-105) serait plus susceptible de provoquer une toxicité, mais toujours très faible. Le coating n'aurait aucun impact sur la potentielle toxicité de ces NM.

### 2) Oxyde de zinc, ZnO

Nous nous sommes procuré le ZnO NM-110 du JRC. Quelle qu'en soit la provenance, ces NM sont majoritairement toxiques par les ions Zn<sup>2+</sup> qu'ils libèrent lors de la dissolution de l'oxyde, assez facile en milieu acide. Contrairement à d'autres NM, le ZnO est toxique pour la quasi-totalité des modèles cellulaires exposés. [85]–[89]

### 3) Dioxyde de silicium SiO<sub>2</sub> :

Nous avons utilisé un échantillon de SiO<sub>2</sub> provenant aussi du JRC, le NM-200. Dans la littérature ces NM sont observés comme toxiques pour la plupart des modèles cellulaires, et ce quel que soit leur origine. La taille des particules primaires est reliée au potentiel de provoquer des ROS. Des interactions complexes interviennent avec les protéines et les dénaturent, créant des espèces toxiques. [90]–[92]

### 4) Dioxyde de Cérium, CeO<sub>2</sub>

Nous avons utilisé le NM-211 du JRC. Très peu d'études ont été réalisées avec cet échantillon NM-211 en particulier, et elles sont toutes sur des modèles *in vivo*. [93], [94] Cependant si l'on s'intéresse à la toxicité du CeO<sub>2</sub>, en général sur les modèles *in vitro*, il est généralement considéré comme non toxique. [95]–[98]

### 5) Nano Argile

Nous avons choisi le NM-600 du JRC qui est principalement composé de bentonite. On peut retrouver une autre forme dans les nanoargile, la kaolinite. Pour la bentonite on relève un comportement légèrement toxique due à la production de ROS. [99], [100]

### 6) Nanotubes de carbone, NTC

Les NTC utilisés sont synthétisés au CIRIMAT à Toulouse depuis plus de 20 ans. Produits initialement sous forme brute, nous les modifierons par un processus chimique pour les obtenir aussi sous forme oxydée. Ils ont été utilisés dans l'équipe NNCED pour des études

toxicologiques et environnementales depuis près de 15 ans, mais aussi pour des applications biomédicales, ou dans le domaine des matériaux composites.

La toxicité des NTC dépend de la dose, du modèle cellulaire ou encore des conditions d'exposition. Les études montrent généralement peu de génération de ROS, mais d'autres mécanismes entraînent quand même des inflammations (activation de l'inflammasome [101], polarisation des macrophages vers la forme M2 anti-inflammatoire [102], mais aussi l'induction de mort cellulaire par autophagie dans certains cas [103], ou encore le blocage de la division cellulaire dans le cas de cellules cancéreuses. Les NTC sont un bon exemple de la complexité de l'étude toxicologique des nanomatériaux en sachant que la grande majorité de ces études sont réalisées avec les même nanotube.

Concernant l'éco-toxicologie, les études montrent peu d'impact, des retards de croissance apparaissent en général à partir de 10 mg/L chez les amphibiens [104] ; dans le cas des diatomées, ce retard est transitoire, elles récupèrent avec le temps ; chez les plantes, un effet "boost" est provoqué à très faibles doses que ce soit en hydroponie ou directement dans le sol, puis par la suite les effets négatifs surviennent. [105] La forme oxydée des NTC induit toujours des effets à une dose plus faible que la non-oxydée.

## 7) Or (Au)

Les nanoparticules d'or choisies proviennent de Sigma Aldrich (ref : 636347). Aucune étude toxicologique *in vitro* n'a été réalisé sur cet échantillon en particulier. En revanche on peut relever dans la littérature des potentiels effets toxiques lorsque les NP sont internalisées dans les cellules et génèrent alors l'apparition de ROS [106].

## 8) Argent (Ag)

Nous nous sommes procuré les NP d'Argent chez Sigma Aldrich (ref : 576832). Ces NP connues pour leurs propriétés biocides notamment, induisent des stress oxydatifs chez les cellules humaines, elles sont donc considérées comme toxiques. [107]

Le Tableau 1 rassemble les références des NM que nous avons utilisés ainsi qu'un résumé très simplifié de la toxicité généralement décrite dans la bibliographie.

Tableau 1: Degré de toxicité des échantillons utilisés d'après différentes études analysées

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Réf. NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	CIRIMAT	SA 636347	SA 576832
toxicité	Nulle	Nulle	Quasi-nulle	Oui	Oui	Nulle	Faible	Faible à modérée	Nulle	Oui

En fonction des modèles biologiques (*in vivo*, *in vitro*), des modèles cellulaires dans le cas des études *in vitro*, des doses et des conditions d'exposition (dans tous les cas), il est inévitable de relever des résultats différents pour un même NM.

Dans le cas des modèles cellulaires, ces derniers sont généralement exposés sur des temps relativement courts (quelques jours maximum). Qu'il s'agisse d'études *in vitro*, *in vivo* ou bien épidémiologiques, les manières d'évaluer la toxicité ne sont le plus souvent pas représentatives d'une exposition réaliste de la vie courante, à la fois à cause des conditions d'exposition (une mono exposition) et des doses (généralement très élevées).

Une équipe d'écotoxicologues de l'Université de Linden en Suisse s'est intéressée à l'impact des nanoparticules courantes sur des organismes marins et sur le long terme. Ils ont pour cela exposé des daphnies, un microorganisme marin, à des doses réalistes de nano TiO<sub>2</sub>. Ces NM se retrouvent dans les eaux par le biais des crèmes solaires notamment. Sur le court terme, les scientifiques n'observent aucune toxicité. Cependant lorsqu'ils étudient la toxicité sur plusieurs générations de ces daphnies, alors les effets néfastes liés au NM apparaissent et entraînent des problèmes sur la reproduction de ces organismes. [108] Cette même équipe a étudié un autre modèle vivant, les isopodes, des petits crustacés de l'ordre du cm. Lorsqu'ils sont exposés aux NM, on n'observe aucun effet sur la santé ou le développement. En revanche si l'on expose leur nourriture à ces même NM, la population microbienne à la surface de cette nourriture est modifiée et la composition en est altérée. Une nette diminution de la croissance et du développement des isopodes dont la nourriture est exposée aux NM est alors constatée, en comparaison avec le groupe témoin. [109]



Figure 1: Photographie d'une daphnie à gauche ; d'un isopode à droite

Je tiens maintenant à faire une autre parenthèse sur l'aspect toxique des NM, et l'évaluation des risques auprès d'une population. Ce sont deux questions bien différentes. Si l'on prend une substance d'une grande toxicité mais à laquelle la majorité de la population n'est pas exposée, il aura un facteur risque beaucoup plus faible qu'une substance bien moins toxique mais très répandue dans notre environnement quotidien. Je vais rapidement résumer une étude qui met en garde sur les risques que les NM peuvent entraîner aujourd'hui. [110] En effet de nombreux autres critères rentrent en jeu pour évaluer les risques qu'un NM peut avoir sur la population ou l'environnement. Par exemple la fréquence d'exposition à laquelle est confronté un consommateur, le fait de le retrouver dans l'eau ou dans les sols, sa dégradation, etc. Dans cette étude les chercheurs se sont penchés sur une approche Q.E.H, prenant en compte trois scores :

- Q : la quantité de NM (Q pour "quantity")
- E : le coefficient d'exposition (E pour "exposure")
- H : les effets toxiques des NM (H pour "hazard")

Cette méthode d'analyse permet d'obtenir des scores quantitatifs et qualitatifs sur un objet d'étude, dans notre cas les NM auxquels nous sommes exposés. Pour cette étude elle prend la forme du schéma suivant :

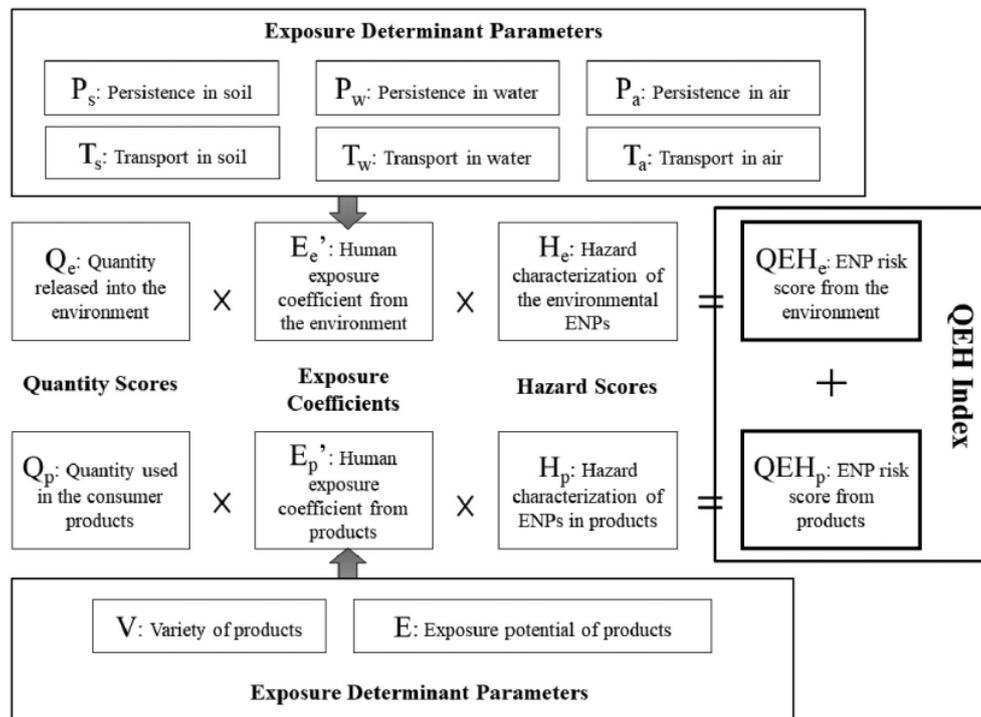


Figure 2: Schéma des entrées et sorties de l'évaluation des risques de l'approche semi-quantitative

Elle prend donc en compte dans un premier temps les NM issus de 3 voies d'exposition qui sont environnementales : l'eau, le sol et l'air. D'un autre côté les auteurs s'intéressent aux NM provenant de notre consommation : l'électronique, la santé, l'alimentaire, les aliments et la cosmétique. Enfin les modes d'exposition sont l'inhalation, la voie orale et le contact avec la peau. (Figure 2)

Ils attribuent à chacun des paramètres (Q, E et H) des valeurs en fonction de la bibliographie sur le sujet. Par exemple ci-dessous le Tableau 2 des effets toxiques (H) pour les NM :

Tableau 2: Niveau de dangerosité en fonction des différentes voies d'exposition

ENPs	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe	ZnO	CeO <sub>2</sub>	CNT	Ag	Cu	Nanoclays
Hazard scores through different exposure pathways										
Oral	1 <sup>a</sup>	4 <sup>c</sup>	4 <sup>f</sup>	1 <sup>h</sup>	5 <sup>j</sup>	1 <sup>m</sup>	5 <sup>o</sup>	5 <sup>r</sup>	5 <sup>u</sup>	4 <sup>w</sup>
Inhalation	1 <sup>b</sup>	5 <sup>d</sup>	1 <sup>g</sup>	4 <sup>i</sup>	5 <sup>k</sup>	4 <sup>n</sup>	4 <sup>p</sup>	5 <sup>s</sup>	5 <sup>v</sup>	5 <sup>x</sup>
Dermal	1 <sup>b</sup>	1 <sup>e</sup>	4	4	1 <sup>l</sup>	4	5 <sup>q</sup>	3 <sup>t</sup>	5	5
Hazard scores through exposure to environmental phases										
H <sub>w</sub>	1	4	4	4	5	4	5	5	5	5
H <sub>s</sub>	1	4	4	1	5	1	5	5	5	4
H <sub>a</sub>	1	5	4	4	5	4	5	5	5	5

Les valeurs vont de 1 à 5 selon la toxicité du NM dans le mode d'exposition. Certains NM auxquels nous nous intéressons dans notre étude sont aussi présents dans cette étude. (Par

exemple on voit que le  $\text{TiO}_2$  ou le  $\text{CeO}_2$  pour lesquels nous n'observons aucune toxicité sur des modèles *in vivo*, peuvent être toxiques par voie orale ou dermique.)

Enfin après calcul du QEH global, ils obtiennent les résultats suivants :

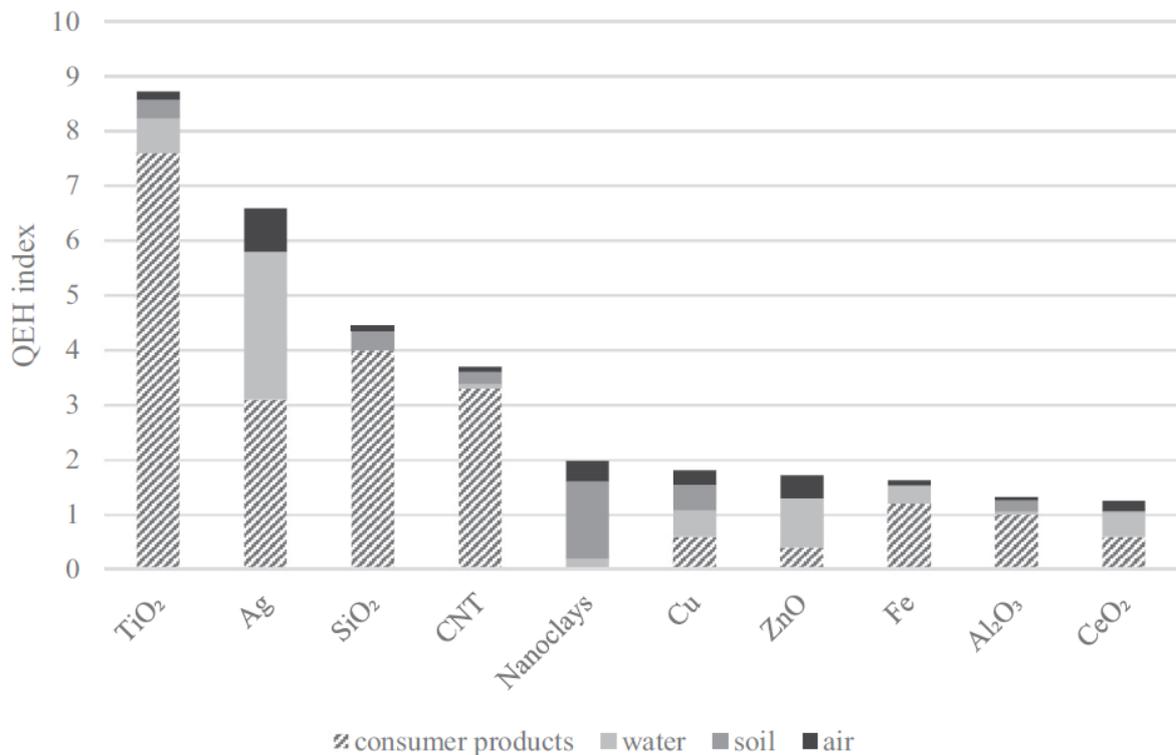


Figure 3: Valeurs de l'indice QEH en fonction des différents NM étudiés et du moyen d'exposition

On observe deux choses importantes sur la Figure 3. Premièrement que le facteur de risque est bien différent de la toxicité d'un NM. Ici le  $\text{TiO}_2$  largement utilisé dans les produits de consommation culmine à 8,7 tandis que le Cu qui est toxique sous toutes ses formes d'exposition n'atteint même pas un score de 2. Si l'on s'intéresse maintenant à la manière dont nous sommes exposés à ces NM, on remarque que 66% de notre exposition est due aux produits de consommation, 18% par l'eau et 9% et 8% pour le sol et l'air. Il est à noter que cette étude ne prend pas en compte la bioaccumulation dans les organismes, qui pourrait avoir un impact non négligeable sur la chaîne trophique. Pour finir les auteurs précisent qu'il y a un manque de données très important sur le transport et la persistance des NM dans l'environnement naturel. Tout ceci illustre bien l'intérêt de se préoccuper le plus en amont possible de ces questions afin d'anticiper des situations potentiellement problématiques.

## 2) Méthodes de caractérisation des NM

### a) Critères de caractérisation des NM

L'utilisation croissante des nanomatériaux a entraîné des réflexions sur les réglementations qui encadrent leur utilisation. Les propriétés uniques qu'ils offrent sont souvent utilisées dans des procédés industriels avant même que des études suffisamment abouties concernant leur impact potentiel sur l'homme ou l'environnement ne soient faites. Des caractérisations précises des différentes propriétés physico-chimiques d'un nanomatériau sont nécessaires pour comprendre l'influence des paramètres physicochimiques.[111] [112] Bien entendu ces seules caractérisations ne suffisent pas à déterminer la potentielle toxicité des NM mais représentent une étape incontournable, tout en sachant bien que certaines propriétés peuvent être modifiées une fois les NM dispersés dans un milieu biologique (dissolution, modification de la chimie de surface, réagglomération, etc.).

Pour cela l'ISO a défini 8 critères qui permettent de caractériser les NM :

- La taille : distribution en taille dans un échantillon de NM, exprimée de préférence en nombre
- La forme : comme une seule dimension importe pour définir l'objet comme « nano » il est important de savoir s'il est sous forme de tube (1D), de feuillet (2D), ou plutôt sphérique (0D).
- La surface spécifique : comme nous l'avons vu précédemment ce critère joue un rôle particulier pour l'interaction des NM avec le vivant.
- La composition : connaître la nature chimique d'un échantillon et les concentrations de ses constituants
- La chimie de surface : ce sont les fonctionnalisations ou revêtements de surface du NM.
- La charge de surface : associée à la stabilité des NM en solution et à leur potentiel d'agglomération.
- L'état d'agglomération/ agrégation dans le milieu : si les particules s'agglomèrent ou se désagglomèrent facilement il est important d'évaluer cette taille réelle des objets auxquels sera confronté l'organisme.
- Dispersibilité / solubilité dans le milieu : en cas de faible stabilité dans le milieu, l'exposition sera modifiée.

La majorité des échantillons proviennent du JRC (Joint Research Center) qui est un service de recherche de la commission européenne. Leurs échantillons sont donc largement utilisés pour les études toxicologiques et permettent de comparer les résultats sur les mêmes échantillons entre différentes études. Ces échantillons sont aussi amplement caractérisés, et ces données sont directement accessibles depuis le site web du JRC, ou encore pour la plupart dans les publications les ayant utilisées. Pour autant, nous avons réalisé nous-même de nombreuses caractérisations à la fois pour les comparer à celles déjà existantes mais aussi pour des conditions plus spécifiques à notre étude, notamment dans du milieu de culture cellulaire.

### b) Taille des NM

Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer la taille des NM. On peut en tirer 3 groupes :

- Méthode individuelle de comptage (MEB, MET, AFM ...)
- Méthode d'ensemble (DLS, SAXS ...)
- Méthodes séparative (CLS...)

Les techniques de mesures ont des approches radicalement différentes : certaines vont mesurer exactement le diamètre de l'objet tandis que d'autre vont modéliser une taille en fonction d'un phénomène physique associé à une propriété de la particule.

Dans notre cas nous avons utilisé des méthodes d'analyse directe (MEB et MET) ainsi qu'un diamètre fonction d'une phénomène physique (DLS et NTA). Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients.

Concernant le MEB et le MET, la préparation des échantillons nécessite de déposer les NM en suspension sur une grille (MET) ou un support (MEB) puis de sécher. L'inconvénient est que lorsque le liquide s'évapore, les particules vont se rapprocher les unes des autres et créer des agglomérats. On ne peut donc pas remonter à l'état de dispersion dans le milieu. Les particules plutôt isolantes seront plus difficiles à observer. Cette technique permet en revanche d'accéder de manière directe à la taille de différentes particules, individuelles, agglomérées ou agrégées mais aussi à leur forme et leur nature chimique (analyses *in situ*, EDX-EDS notamment).

La DLS (Dynamic Light Scattering) permet de remonter à la taille des particules par leur rayon hydrodynamique. Les particules en suspension subissent un mouvement brownien qui vont dévier les rayons d'un laser. En récupérant le laser diffusé et son angle par rapport à la position initiale il est possible via la relation de Stokes Einstein de remonter au rayon hydrodynamique. Cela entraine deux limitations :

- Il est impossible de savoir si les NP sont individuelles ou agglomérées (ou encore agrégées le cas échéant),
- Il est supposé que les particules sont sphériques.

Il faut aussi que le liquide utilisé pour la dispersion du NM soit incolore et translucide. Nous avons rencontré un problème technique lors de nos premières mesures dans du milieu de culture (DMEM), ce dernier contenant un indicateur coloré rouge (rouge phénol) alors que le laser utilisé pour l'analyse était rouge lui aussi, rendant la mesure impossible. Nous avons donc utilisé du DMEM sans rouge phénol. Nous avons obtenu de bons résultats avec cette technique lorsque la population analysée est monomodale ou peu dispersée. Dès lors que certaines particules sont beaucoup plus grosses que les autres, elles vont écraser le signal des plus petites particules et il sera difficile de remonter à la distribution en taille. En revanche l'avantage de cette technique et que l'on réalise nos observations directement dans le milieu de culture, au plus proche de ce à quoi seront exposées les cellules. Ces mesures sont aussi très rapides.

L'analyse NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) est probablement la plus pertinente. Basée sur le même principe que la DLS et le rayon hydrodynamique, elle permet à la fois d'observer les nanoparticules, et d'analyser leur distribution en taille sur plusieurs mL. L'appareil dispose d'un pousse seringue permettant de faire circuler le liquide contenant les NM et de travailler ainsi sur un large échantillonnage des particules.

Toutes ces techniques sont complémentaires et utilisées dans la bibliographie (la DLS en particulier).

### c) Forme des NM

Concernant la forme des NM nous avons simplement utilisé les images MEB et MET.

### d) La surface spécifique

Il a été montré que lorsque la surface spécifique d'un NM augmente, sa toxicité augmente aussi. Sa détermination constitue donc un élément fondamental pour évaluer les risques. La méthode la plus couramment utilisée pour déterminer la surface spécifique est le BET (Brunauer, Emmett, Teller), par adsorption de gaz. Le principe de base du BET repose sur l'adsorption d'une molécule spécifique (généralement de l'azote) sous la forme d'une monocouche sur la surface du matériau étudié. Le processus d'adsorption se produit lorsque les molécules d'azote se lient physiquement aux sites actifs de la surface du matériau solide. La quantité de gaz désorbée permet, connaissant la surface occupée par une molécule individuelle, de remonter à la surface spécifique de l'échantillon.

### e) Phases cristallographiques

Pour analyser la composition (phases cristallines présentes) de nos échantillons nous avons utilisé la technique de diffraction des rayons X sur poudre. Un faisceau de rayons X (longueur d'onde dépendant de la cathode utilisée, du cuivre dans notre cas) incident sous un certain angle  $\theta$  sera diffracté selon la loi de Bragg à un angle  $2\theta$  si une orientation cristallographique particulière de l'échantillon existe à cet angle. En analysant les pics de diffraction on peut remonter aux structures cristallines et déterminer indirectement la nature chimique des éléments qui composent notre échantillon (d'après la nature des phases cristallographiques, dont la signature est unique). Cette méthode est complémentaire des analyses chimiques par EDX-EDS en microscopie électronique.

### f) Chimie de surface

La chimie de surface comprend les fonctionnalisations et les revêtements de surface qui peuvent avoir un impact important dans la toxicité d'un NM. Elle est utile pour évaluer le comportement dans les milieux aqueux (par exemple revêtement hydrophobe ou hydrophile) ou les interactions avec les protéines et les cellules. Dans notre cas nous avons utilisé la Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS). Cette technique repose sur le phénomène d'émission de photoélectrons par un matériau lorsque celui-ci est exposé à des rayons X de haute énergie. Lorsque les rayons X rentrent en contact avec la surface du matériau, les atomes du matériau absorbent l'énergie des photons X et certains électrons de valence sont éjectés du matériau pour conduire à l'émission de photoélectrons. L'énergie de ces photoélectrons nous donne des informations sur les niveaux d'énergie des électrons des éléments présents dans le matériau, et donc sur la composition chimique et l'état de valence des éléments (liaisons chimiques).

### g) Charge de surface

La charge de surface peut être caractérisée par le potentiel Zêta. Il est utilisé pour étudier la stabilité des suspensions, l'interaction entre particules et la cinétique des réactions de surface dans les solutions. Le potentiel Zêta est associé à la charge électrique à la surface des particules. On peut l'analyser par technique DLS combinée avec un calcul de la mobilité électrophorétique. C'est la vitesse à laquelle les particules se déplacent sous l'influence d'un champ électrique. La mobilité électrophorétique est directement liée au potentiel zêta par l'équation de Smoluchowski.

## h) Etat d'agglomération ou agrégation

La DLS est une technique pertinente pour cette mesure. En effet elle permet de connaître l'état réel des nanomatériaux en suspension dans le milieu d'exposition, à savoir du DMEM. L'analyse précise des données de DLS nécessite cependant de s'assurer de la morphologie des nanoparticules. Afin de déterminer cette dernière in situ dans le milieu de culture, nous avons réalisé une caractérisation directe par MET en cellule liquide (classiquement, les échantillons sont préalablement séchés sur une grille conductrice ; en cellule liquide, l'échantillon est directement observé en suspension dans le liquide grâce à une cellule adaptée. Cette observation permet donc de s'affranchir de l'agglomération au séchage, ce dernier étant évité. Ces observations ont été réalisées sur la plateforme METSA (fédération de recherche FR CNRS 3507), au laboratoire MPQ (Paris Diderot) en collaboration avec D. Alloeyau. L'idée était de pouvoir observer nos nanomatériaux en suspension et évaluer leur état d'agglomération. L'inconvénient est que le milieu de culture contient des sels, qui cristallisent rapidement sous l'effet du faisceau, perturbant l'analyse des NP. Nous avons donc dilué nos échantillons dans de l'eau. Nous avons pu constater la présence d'amas de particules assez gros. Il y a très certainement des particules individuelles (d'après la DLS) cependant il est impossible de les observer avec le MET en cellule liquide, car ces particules bougent extrêmement rapidement dans le liquide.

## i) Dispersibilité et solubilité

La dispersibilité est la propension d'un matériau à se disperser de manière uniforme dans une matrice (solide ou liquide). C'est un paramètre qui dépend à la fois des caractéristiques du matériau et de sa matrice, il n'est donc pas intrinsèque au NM.

La solubilité d'un NM est un paramètre important dans le sens où si le matériau est totalement soluble, alors nous n'étudions plus sa nature particulière mais sa forme ionique ou moléculaire. En revanche admettons qu'un NM atteigne un élément biologique sous forme solide puis se solubilise, alors l'étude de la toxicité de la forme soluble devient tout aussi importante.

Pour la dispersibilité et la stabilité des suspensions de NM nous avons utilisé le Turbiscan. Similaire à la DLS mais utilisant un large spectre lumineux, c'est la lumière rétrodiffusée qui a traversé l'échantillon qui est analysée en scannant l'échantillon sur toute sa hauteur. Il est ainsi possible de suivre le comportement d'un échantillon sur des longue périodes (une ou plusieurs journées). Une solution mal dispersée et instable va sédimenter rapidement : la majorité des particules tombe au fond du flacon. L'intensité de la lumière traversant l'échantillon sera alors plus forte. Les expositions cellulaires ayant été réalisées majoritairement sur une durée de 24h, c'est la durée d'analyse qui a été retenue dans ces travaux.

### 3) Bilan des résultats de caractérisation :

#### a) Taille des NM et des agrégats/agglomérats

L'avantage d'avoir choisi une majorité de NM provenant du JRC est de pouvoir bénéficier de caractérisation de ces échantillons dans la littérature. Dans le Tableau 3 une partie des résultats proviennent des caractérisations fournies par le JRC et les laboratoires partenaires. Nous avons observé par nous même les échantillons au MET (Castaing UAR3623) pour confirmation. Par ailleurs l'or et l'argent provenant de Sigma Aldrich sont très peu documentés et les grandeurs proviennent donc de nos propre observations et mesures.

Tableau 3 : Tailles des nanoparticules déterminées par observation au MET

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Référence NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	CIRIMAT	SA 636347	SA 576832
particules primaires	26 ± 10 nm	26 ± 10 nm	21 ± 9 nm	55,5 ± 26 nm	14 ± 7 nm	7 ± 2 nm	288 nm	∅ext 3nm L 10 µm	-	10 ± 6 nm
distribution	8-200 nm	10-45 nm	10-45 nm	30-150 nm	5-25 nm	4,7-9 nm	87-630 nm	-	10-50 nm	5-150 nm
agrégats	500 nm	130 nm	200 nm	100-1000 nm	31 nm	12,5 nm	plusieurs µm	∅ext 10 nm L 100 µm	1000 nm	800 nm

Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont des valeurs de particules primaires sensiblement similaires quelle que soit la référence. Le NM-103 a tout de même des particules primaires pouvant être 10 fois plus grandes à 200nm. Ceci se retrouve aussi au niveau des agrégats, qui sont beaucoup plus gros pour le NM-103 que les NM-104 et NM-105.

Les NP primaires de ZnO sont d'un diamètre un peu plus important et peuvent générer des agrégats très gros de l'ordre du micromètre.

Le SiO<sub>2</sub> et le CeO<sub>2</sub> sont quant à eux plus petits. On retrouve des particules inférieures à 10 nm et les dimensions des agrégats restent faibles (moins du double de la taille des particules individuelles).

L'argile (bentonite NM-600) et les NTC sont d'une autre nature. Contrairement aux autres NM qui sont plutôt sphérique, on les retrouve sous des formes de feuillets ou de fils, respectivement. Ils ont donc des dimensions beaucoup plus importantes que les autres NM. Les dimensions observées sont latérales et non l'épaisseur du feuillet qui est bien plus faible.

Concernant l'or, les particules primaires sont supposées être inférieures à 100 nm d'après la fiche technique du revendeur (Sigma Aldrich). Cependant sur nos observations nous n'avons trouvé que des agglomérats et agrégats. Il est quand même possible de discerner sur les images l'allure des NP primaires et d'estimer le diamètre entre 10 et 50 nm. Les amas de NP sont très gros, pouvant aller jusqu'à plusieurs µm.

Pour l'Argent on peut observer de nombreuses particules isolées. Majoritairement de l'ordre de 10 nm, certaines plus grosse sont tout de même visibles. Elles ont tendance à former de gros agrégats (jusqu'à 800 nm), tout comme l'or.

Ces observations MET nous donnent une idée approximative de la taille des objets que l'on peut retrouver dans nos NM. Il faut cependant prendre ces résultats avec un certain recul, notamment en ce qui concerne les agglomérats et agrégats. Lors de la préparation des échantillons de MET par exemple, quelques gouttes de suspension de NM dans de l'éthanol (sonication à la cuve à ultrasons) sont déposées sur une grille. Lors de l'évaporation de l'éthanol, les objets contenus dans le liquide vont avoir tendance à se rapprocher entre eux et former des amas.

Dans un second temps nous avons utilisé la technique par DLS pour estimer la taille de nos objets en suspension. L'avantage de cette technique est que la mesure est effectuée directement dans le milieu d'exposition. Cette information était non pertinente à récupérer dans les publications antérieures ayant utilisé les mêmes NM pour cause de variabilité des concentrations et des milieux de culture utilisés. Il est aussi possible de choisir la température de la mesure. Nous avons réalisé une première série de mesures à 25°C dans le DMEM puis une seconde à 37°C comme lors de l'exposition sur cellules, sans mettre en évidence de différences significative entre les deux températures. En revanche cette technique présente un inconvénient non négligeable puisqu'une hypothèse forte pour l'analyse des données et l'approximation que les objets analysés sont sphériques. Nous n'avons donc pas analysé ne le NM-600 ni les NTC qui ont des formes beaucoup trop éloignées d'une sphère.

Pour ces mesures nous avons utilisé un DLS Dynamics V7 de chez Wyatt. Cet instrument permet de réaliser la DLS sur plaque 96 puits, en scannant rapidement chaque puits de la plaque. Nous avons beaucoup de nanomatériaux et comme nous avons testé plusieurs concentrations pour chacun afin d'en tirer les meilleures, cet instrument a été très pratique.

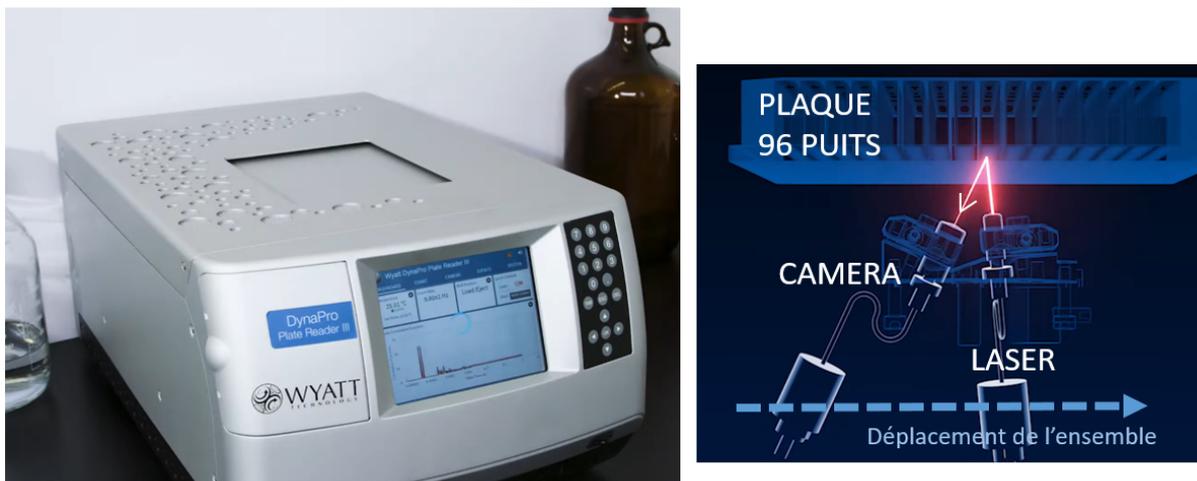


Figure 4: A gauche : photo de la DLS Dynamics V7. A droite : schéma de principe de la DLS

La mesure par DLS fournit un graphe de corrélation qui permet d'interpréter la qualité de la mesure. Sur la Figure 5 ci-dessous à gauche on observe un comportement normal tandis qu'à droite la mesure est perturbée par de la poussière, des bulles ou une contamination.

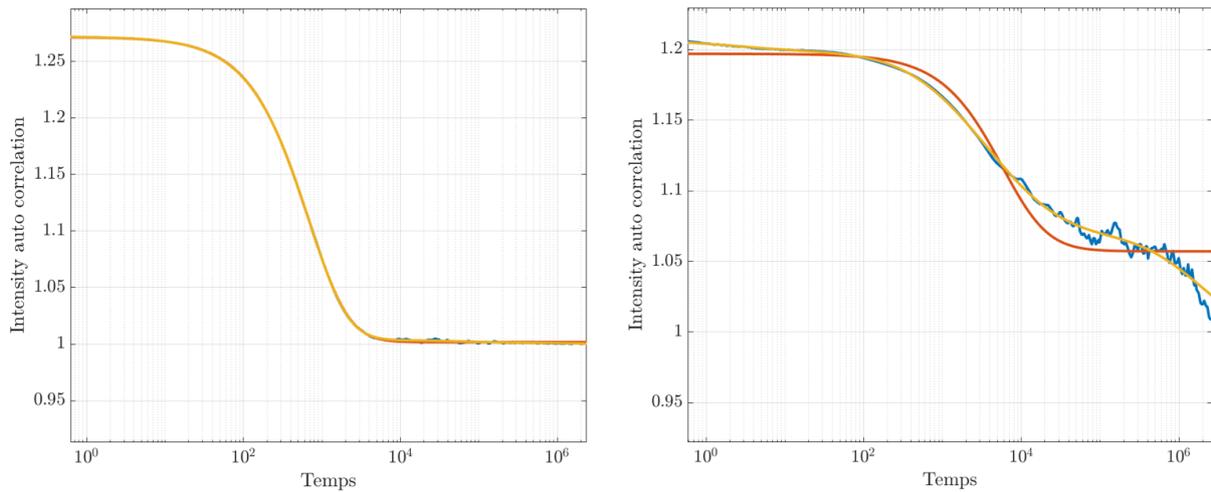


Figure 5: Courbes obtenues d'après la mesures DLS.

Une fois la qualité de la mesure validée, deux données intéressantes sont obtenues : l'intensité des NM en fonction de leur taille, et le nombre de NM en fonction de leur taille. L'intensité permet principalement de détecter les gros objets, donc les agrégats ou agglomérats contrairement au nombre qui va représenter une majorité de NM individuels. Sur les graphiques de la Figure 6 ci-dessous 3 pics sont visibles pour l'intensité : un très faible à 48.43nm, un très fort à 218.2nm et un moyen à 2881nm. Sur la même analyse mais pour le graphe en nombre deux pics forts à 48.43nm et 218.2nm ressortent ; celui à 2881 nm à disparu. L'intensité est corrélée au pouvoir réfléchissant de l'objet, plus l'objet est gros, plus la lumière diffractée sera importante. Le pic d'intensité moyen à 2881nm est certainement le résultat de quelques grosses particules, alors que l'intensité de la multitude des particules à 48,43 nm reste très faible en dépit de leur grand nombre.

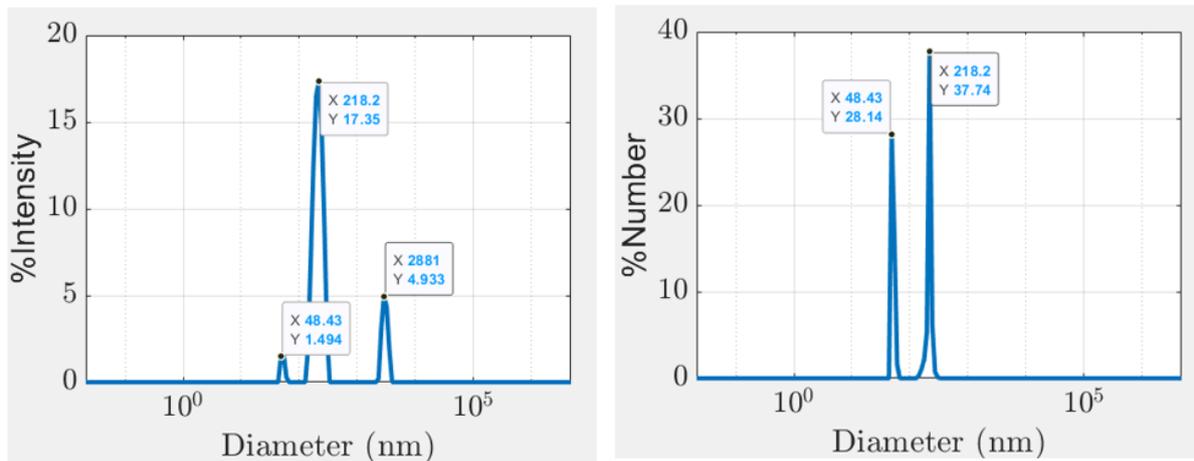


Figure 6: Graphiques en intensité et en nombre d'une analyse du NM200 par DLS

Après analyse des différents échantillons et comparaison avec la littérature sur le sujet, voici les résultats des dimensions de nos NM par DLS dans le Tableau 4 :

Tableau 4: Rayon hydrodynamique obtenus d'après les mesures DLS pour les différents NM

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Référence NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	CIRIMAT	SA 636347	SA 576832
rayon hydro-dynamique	119 ± 11	130 ± 4	124 ± 3	226 ± 12	181 ± 4	218 ± 14	-	-	211	170

Ces résultats sont assez éloignés de ceux obtenus par microscopie électronique. En particulier pour les NM les plus petits SiO<sub>2</sub> et ZnO pour lesquels les valeurs mesurées sont très élevées. C'est une technique qui a certes des limites mais nous permet d'avoir une approche directement dans le milieu de culture, et donne une distribution en taille. Il faut aussi noter que le rayon hydrodynamique correspondant à la taille d'un objet supposé sphérique. Dans le cas de particules primaires allongées ou bien des agglomérées, le rayon hydrodynamique sera calculé sur la plus grande des dimensions de l'objet, conduisant à une erreur. C'est la raison pour laquelle l'analyse correcte des données de DLS ne peut s'affranchir de la caractérisation par microscopie électronique, les deux venant se compléter.

Enfin nous avons pu utiliser un instrument peu connu et pourtant très efficace : Le Nanoparticle Tracker Analysis ou NTA. Il utilise le même principe physique que la DLS mais en flux continu. L'hypothèse que les NM à analyser sont sphérique est identique. L'avantage du flux continu est d'obtenir un échantillonnage beaucoup plus conséquent et réaliste des NP présentes dans le milieu.

Nous avons pu tester 3 échantillons avec ce dispositif, l'or, l'argent et l'oxyde de zinc. Pour chacun d'entre eux nous avons fait circuler quelque mL de suspension 5 fois pendant 1 minute. Les résultats se présentent comme suit Figure 7 :

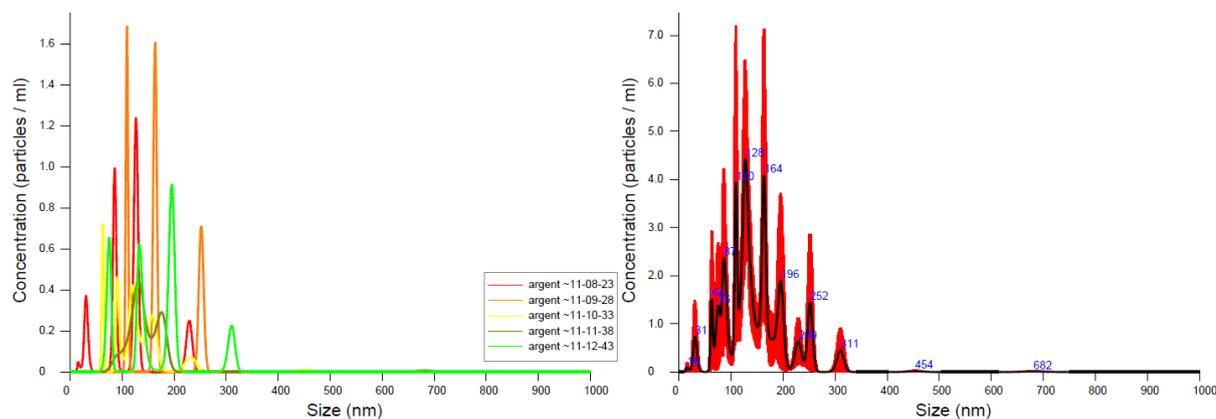


Figure 7: Répartition en taille des nanoparticules d'argent mesurée par NTA

Sur la Figure 7(a) sont représentées les 5 mesures successive de l'échantillon de NP d'Ag. Sur la Figure 7(b), le graphique récapitulatif des 5 mesures avec les tailles des NP pour chacun des pics. Une forme de type loi normale est observée, allant de 16 nm jusqu'à 454 nm, et centrée autour de 128 nm pour l'Argent. Des comportements similaires sont observés pour l'or et l'oxyde de zinc. Le Tableau 5 liste les valeurs principales associée à ces distributions normales :

Tableau 5 : Tailles et paramètres de la loi normale associés à la répartition en taille des NM

Nature NM	ZnO	Ag	Au
Moyenne	<b>118,7 ± 11,5 nm</b>	<b>145,8 ± 9,6 nm</b>	<b>174,4 ± 7,9 nm</b>
Mode	106,6 ± 5,8 nm	125,1 ± 21,3 nm	132,3 ± 17 nm
SD	60,3 ± 6,3 nm	57,5 ± 8,7 nm	66,7 ± 2,2 nm
D10	48,3 ± 11,8 nm	77,2 ± 13,9 nm	92,0 ± 7,4 nm
D50	104,6 ± 11,8 nm	145,2 ± 9,6 nm	167,9 ± 8,5 nm
D90	183,7 ± 20,6 nm	226,8 ± 9,6 nm	262,2 ± 22,4 nm

Cette technique est beaucoup plus précise et plus puissante statiquement que la DLS classique. Elle est ainsi la plus représentative de la taille et distribution des NM (s'ils sont sphériques) car elles ont été réalisées directement dans le DMEM et le flux continu permet un grand nombre d'échantillonnages. Comme évoqué plus haut, l'observation par microscopie électronique entraîne un biais lié à l'évaporation du liquide qui génère beaucoup d'agglomérats. Grâce à la NTA nous avons pu déterminer que des particules primaires sont aussi présentes dans l'échantillon d'or, de l'ordre de la vingtaine de nm, alors que ces derniers n'avaient pas été mis en évidence par MET. Les agglomérats de plusieurs micromètres vus pour l'argent et l'or entre autres dans le tableau 3 sont certainement liés à la préparation des grilles d'observation pour le MET.

Avec ces différentes techniques d'observation nous avons pu confirmer que nous travaillons avec des Nano-objets, dont l'une des dimensions (voir le rayon pour les plus sphérique) est bien inférieure à 100nm.

## b) Forme des NM

Nous avons déterminé la forme des NM et des agrégats/agglomérats associés par microscopie électronique à transmission. Ci-dessous sont présentés les différents images prises pour les NM à plusieurs grossissements (Figure 8 à Figure 17).

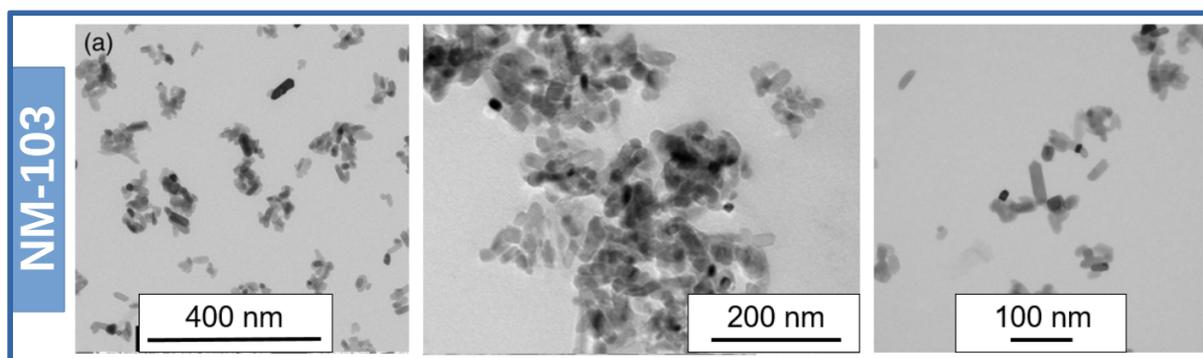


Figure 8: NM-103 observé au MET à plusieurs grossissements [34]

NM-103 : Les nanoparticules sont de la forme sphérique jusqu'à allongée. La dispersion est plutôt homogène. Les agglomérats sont compacts et peuvent être constitués d'agrégats.

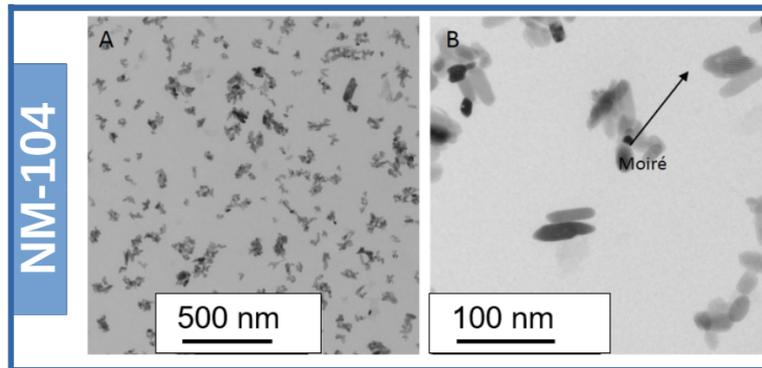


Figure 9: NM-104 observé au MET à plusieurs grossissements [34]

NM-104 : Similaire au NM-103, les particules ont tendance à être plus allongées.

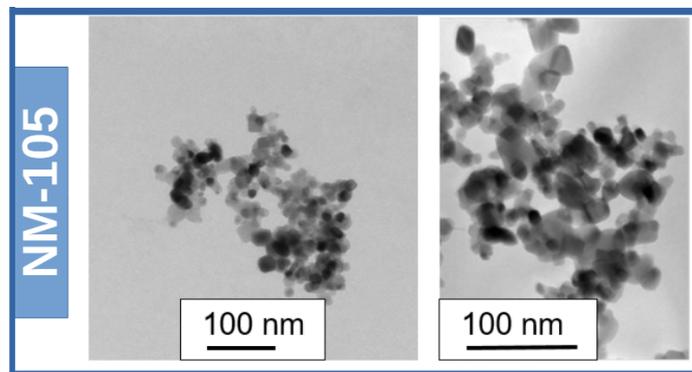


Figure 10: NM-105 observé au MET à plusieurs grossissements [34]

NM-105 : Particule plus sphériques que le NM-103 et NM-104, mais un comportement similaire dans l'agrégation et la dispersion.

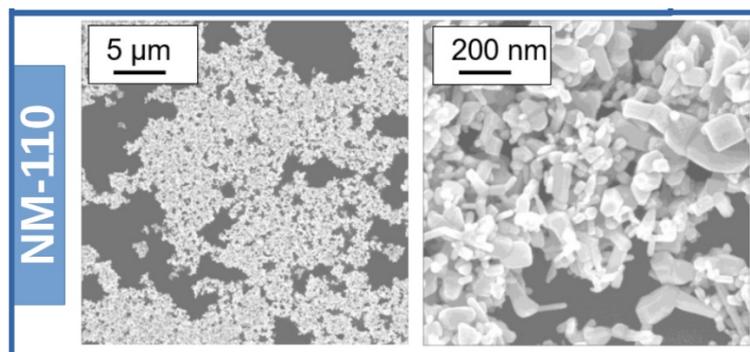


Figure 11: NM-110 observé au MET et MEB à plusieurs grossissements [37]

NM-110 : Les particules sont majoritairement cubiques, et bien dispersées. La population est hétérogène car les tailles des NP individuelles varient beaucoup. Les agglomérats sont tout autant hétérogène allant d'amas compact à des structures faiblement liées.

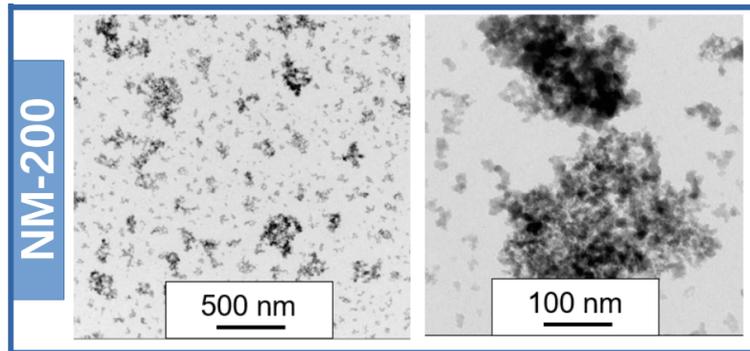


Figure 12: NM-200 observé au MET à plusieurs grossissements

NM-200 : Ce sont surtout des agrégats qui sont mis en évidence, avec très peu de NP primaires isolées. En revanche ces agrégats sont très petits, de quelques dizaines de nm à une centaine pour les plus gros. Ces amas sont légèrement sphériques, et très anguleux.

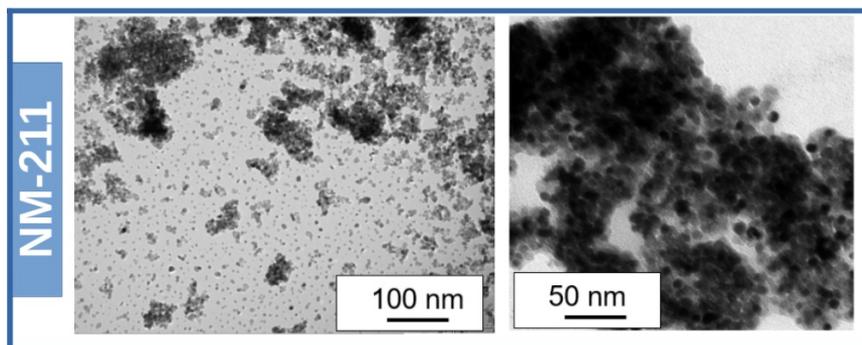


Figure 13: NM-211 observé au MET à plusieurs grossissements [36]

NM-211 : Les particules primaires sont sphériques et régulières, avec une distribution homogène. Elles sont relativement bien dispersées et forment des amas de quelques centaines de  $\mu\text{m}$ , mais sont probablement liés au séchage de la suspension. Noter l'absence d'agrégats/agglomérats aussi gros que les autres NM.

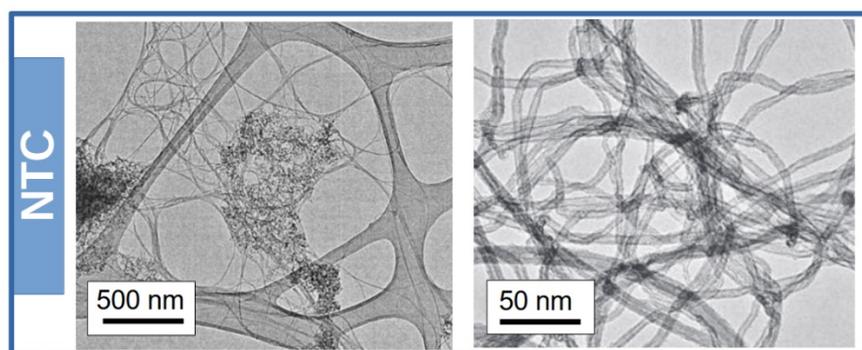


Figure 14: NTC observés au MEB à plusieurs grossissements

NTC : Ils ont une géométrie totalement différente des autres NM. Les NTC forment des fils de plusieurs  $\mu\text{m}$  de long mais seulement quelques nm de diamètre. On voit sur ces images que les fils s'entremêlent mais aussi des agglomérats dit « désorganisés » (sur la gauche de la figure à faible grossissement qui ne sont pas sous forme tubulaire).

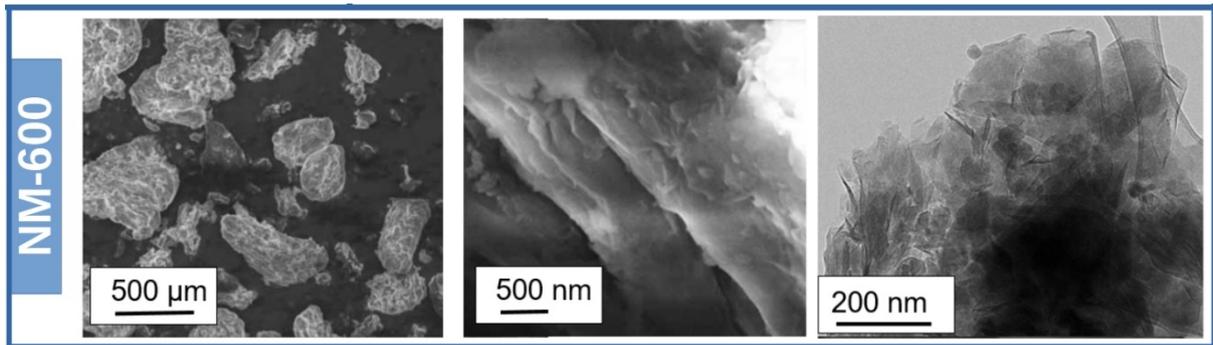


Figure 15 : NM-600 observé au MEB à plusieurs grossissements [113]

NM-600 : Les particules sont hautement agrégées/agglomérées, avec des structures de plus de 10 μm. Les particules sont formées de feuillets liés entre eux.

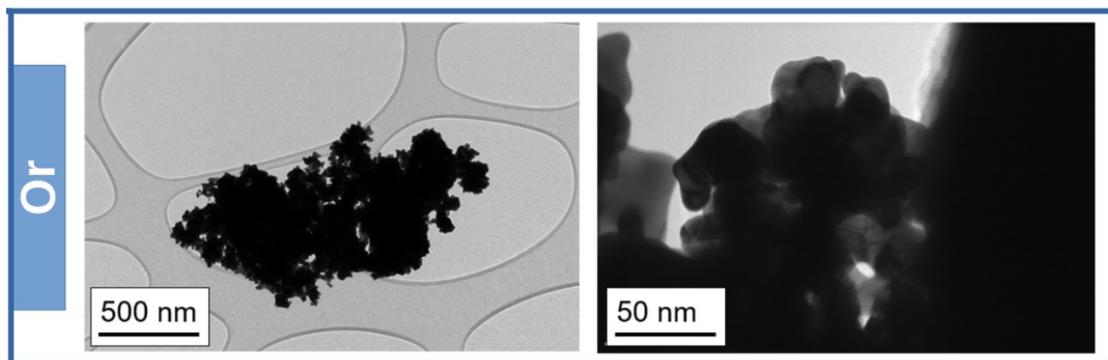


Figure 16: NP d'or observées au MET à plusieurs grossissements

Or : Nous retrouvons de très gros agrégats très certainement liés au protocole de préparation puisque par DLS et NTA nous avons observé des particules isolées de plus petite taille. Les particules semblent être plutôt polyédrales.

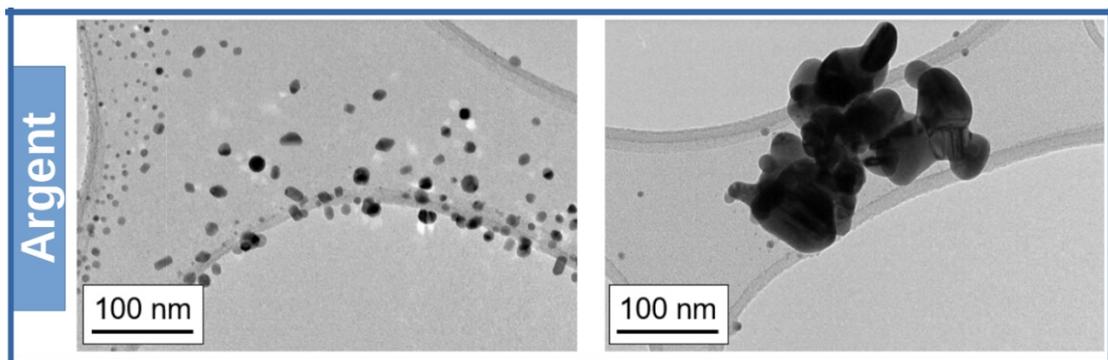


Figure 17: NP d'argent observées au MET à plusieurs grossissements

Argent : D'après nos observations nous retrouvons à la fois des particules primaires de forme sphérique ou polyédrales ainsi que des assez agrégats allant d'une centaine de nm à quelques μm.

### c) La surface spécifique

Le Tableau 6 rassemble les mesures de la surface spécifique par BET :

Tableau 6 : Valeurs des surface spécifiques des différents NM

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Référence NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	CIRIMAT	SA 636347	SA 576832
Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	51,69	57,07	55,49	12,4	189,2	66,2	51,9	931,3	-	-

La majorité des NM ont une surface spécifique comprise entre 50 et 60 m<sup>2</sup>/g. Nous remarquons néanmoins une surface spécifique très faible pour le NM-110 probablement associée à la taille de ses cristallites plus élevée. La surface spécifique du NM-200 est beaucoup plus grande que les autres. On peut donc s'attendre à une très grande réactivité de la part de SiO<sub>2</sub>. La surface spécifique des NTC est grandement supérieure à tous les autres échantillons de par leur géométrie particulière. En effet par la structure tubulaire, ils offrent aussi une grande surface intérieure en plus de celle externe. [114]

### d) Composition

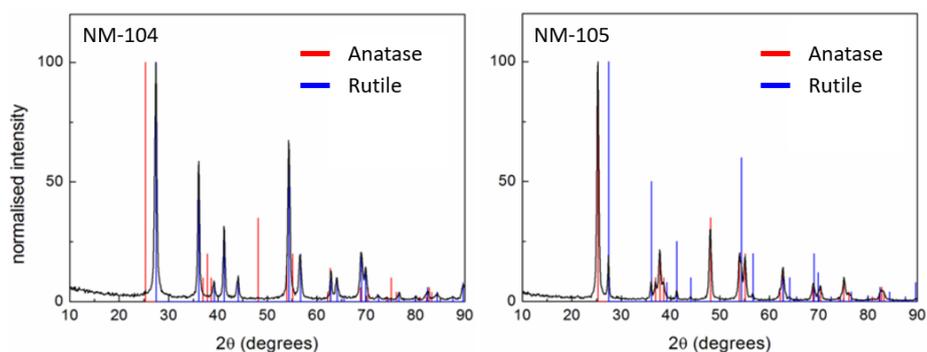


Figure 18 : Résultats obtenus par diffraction rayon X des échantillons NML-104 et NM-105

La Figure 18 illustre le type de résultat obtenu grâce à la diffraction par rayon X. Le graphe en noir représente celui de l'échantillon mesuré. Les lignes en bleu et rouge sont des données comparatives qui sont obtenues dans le logiciel d'analyse par comparaison avec les fiches de référence des composés cristallins, ici caractéristiques des deux phases cristallines principales pour TiO<sub>2</sub>, anatase et rutile. Les pics mesurés sont comparés avec les données de référence et permettent de conclure que le NM-104 correspond uniquement à une phase rutile (bleue) tandis que le NM-105 contient les deux phases anatase et rutile (rouge et bleu). La comparaison de l'intensité des pics avec ceux de la base de données permet d'estimer la proportion de chaque phase. Les résultats de nos analyses cristallographiques sont regroupés dans le Tableau 7:

Tableau 7 : Structure cristallines déterminées par diffraction rayon X pour les différents NM

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Référence NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	CIRIMAT	SA 636347	SA 576832
Structure cristalline ou amorphe	rutile	rutile	anatase 85% rutile 15%	zincite hexagonale	amorphe	cerionite cubique	TOT : tétraèdre/ octaèdre/ tétraèdre	nid d'abeille	cubique faces centrées	cubique faces centrées

## e) Chimie de surface

Le Tableau 8 récapitule les éléments chimiques détectés par XPS pour les échantillons analysés :

Tableau 8 : Eléments chimiques présents en surface déterminés par XPS pour les différents NM

Nature NM	TiO <sub>2</sub>			ZnO	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	Argile	NTC	Au	Ag
Référence NM	NM-103	NM-104	NM-105	NM-110	NM-200	NM-211	NM-600	-	-	-
Eléments en surface	O : 56.0 % C : 25.9 % Ti : <b>10.7 %</b> Al : 4.9 % Fe/Ca : 2.5	O : 63.5 % C : 13.3 % Ti : <b>13.1 %</b> Al : 7.1 %	O : 54.0 % C : 24.5 % Ti : <b>21.5 %</b>	C : 69.0 % O : 25.1 % Zn : <b>5.6 %</b> Si : 0.3 %	O : 70.8 % Si : <b>24.1 %</b> C : 4.1 % Na : 1.0 %	O : 43.5 % C : 36.3 % Ce : <b>20.2 %</b>	O : 62.84 % Si : <b>22.25 %</b> Al : <b>8.61 %</b> Na : 2.85 % Mg/Fe/Ca <1%	O : 14,95 % C : 85,05 %	-	-

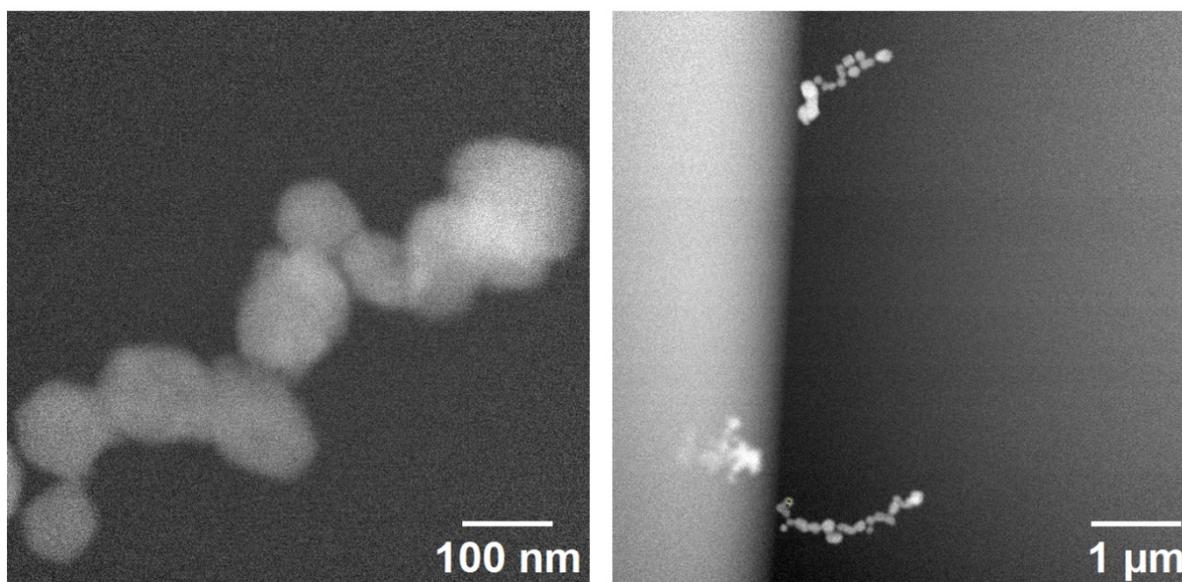
Les différents échantillons sont bien constitués majoritairement de leurs éléments chimiques correspondant (Ti et O pour le TiO<sub>2</sub>, Zn et O pour le ZnO etc...). En revanche on constate une quantité importante de carbone C dans chacune des analyses : c'est un biais de l'expérience, cet élément chimique provient du support dans lequel est positionné la poudre. Le carbone n'est donc pas présent dans nos échantillons hormis les NTC bien sûr. L'aluminium présent dans les NM-103 et NM-104 est en fait du aux coating de ces derniers. On remarque quelques impuretés pour le NM-110, NM-200 ou le NM-600 mais en très faibles quantités.

## f) Etat d'agglomération ou agrégation

Grâce à la microscopie électronique (MEB et MET) ainsi que le NTA et/ou la DLS nous avons obtenus différentes valeurs pour la taille des agglomérats et des agrégats des NM utilisés. La microscopie est très utile pour déterminer la forme, et l'état d'agglomération plus ou moins compact de nos NP. En revanche il faut tenir compte d'un biais important associé au séchage du liquide contenant les NP. De ce fait les NP vont créer des amas et donc la dispersion n'est plus représentative de la réalité de la suspension initiale. Concernant la DLS et NTA, les mesures ont été réalisées en suspension mais elles font l'approximation (hypothèse contraignante) d'objets sphériques, or nous avons observé que les agglomérats ont des formes souvent très complexes.

Nous pouvons combiner les avantages des deux techniques grâce à la microscopie en cellule liquide que nous avons introduite préalablement.

Le microscope utilisé est un Jeol ARM 200 en mode STEM. La majorité des NM que nous avons pu observer étaient des oxydes métalliques, qui présentaient peu de contraste. En revanche nous avons pu prendre de beaux clichés de l'argent. De plus comme mentionné plus haut, les mesures ont été réalisées dans du DMEM dilué dans de l'eau. La solution initiale avec du DMEM seul entraînait la cristallisation de sel sous le faisceau ce qui perturbait la mesure. Nous nous sommes un peu éloignés de la réalité des conditions d'exposition sur cellules mais cette dilution était nécessaire. Par ailleurs les particules primaires ne sont pas visibles du fait de leur mouvement extrêmement rapide, mais en revanche on peut observer les grosses structures de NM. Un autre inconvénient majeur de l'observation en cellule liquide concerne le phénomène de radiolyse du solvant (l'eau dans ce cas) du fait de la forte fluence électronique pour les observations, mais surtout en mode analyse. Ceci conduit à la génération de radicaux qui sont susceptibles de réagir avec les NM, facilitant par exemple leur dissolution. Pour cette raison, les NTC n'ont pas été observés (susceptibles d'être détruits très rapidement dans ces conditions).



*Figure 19 : Nanoparticules d'argent observées par MET en cellule liquide*

Sur ces images (Figure 19) il est possible de mettre en évidence le comportement de l'argent en solution. Les structures formées ressemblent à des chapelets contrairement aux agglomérats qui ont été observés au MET classique (séchage sur grille) qui étaient plus compact et rassemblés en amas. Cela prouve bien que les analyses des NM par les méthodes DLS ou MET sont relativement éloignées de la réalité. Malheureusement cette technique de MET en cellule liquide est peu répandue, et possède de grosses contraintes sur la préparation des échantillons et la nature des échantillons. Nos observations des échantillons de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  et  $\text{SiO}_2$  ont conduit à des images relativement inexploitable telles qu'illustré sur la Figure 20.

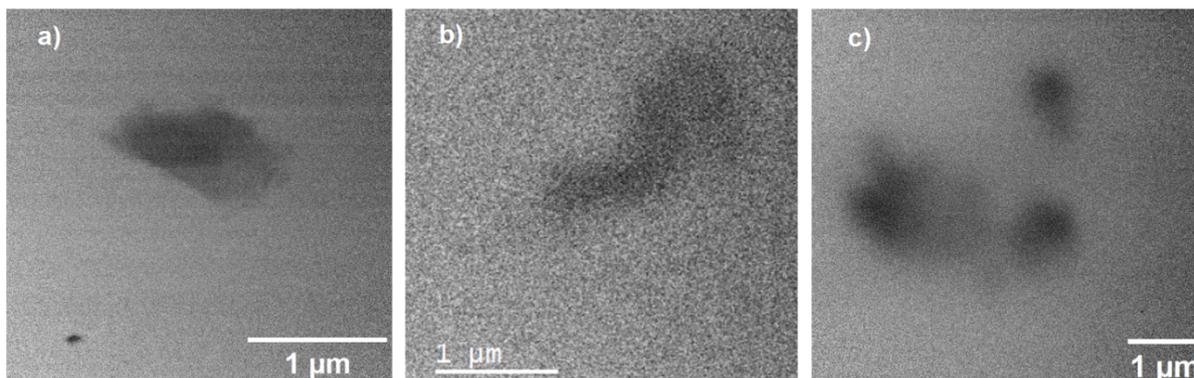


Figure 20: a)  $\text{TiO}_2$  b)  $\text{ZnO}$  et c)  $\text{SiO}_2$  observés par MET en cellule liquide

Nous pouvons tout de même y observer des tailles d'agglomérats de l'ordre de  $1\ \mu\text{m}$ , mais il est difficile de distinguer les NP indépendamment.

### g) Dispersibilité et solubilité

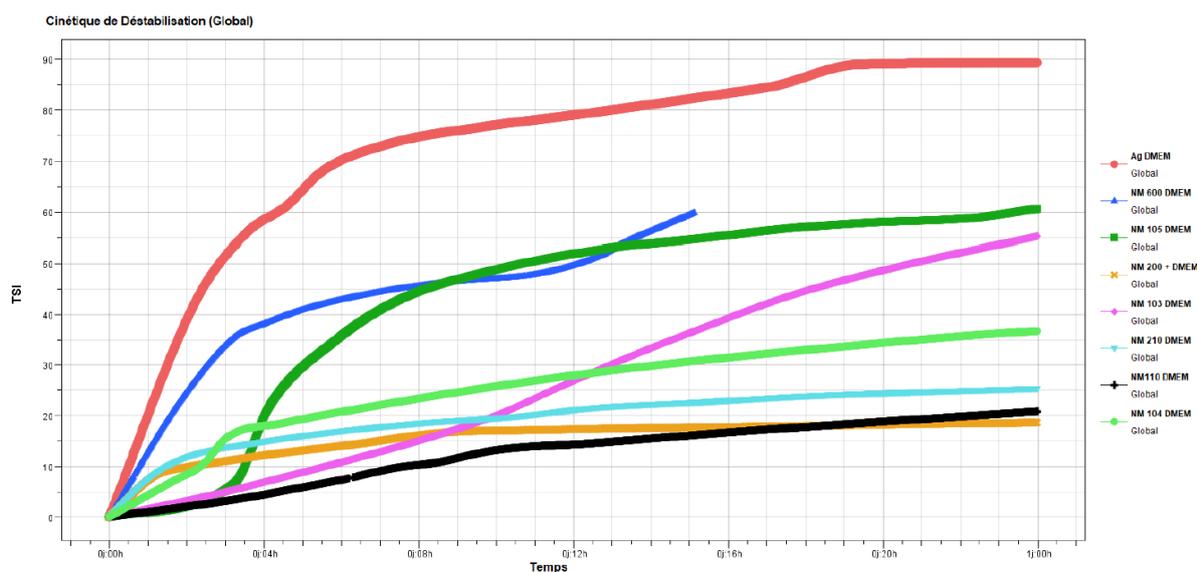


Figure 21: Courbes de cinétique de déstabilisation obtenues par turbiscan pour les différents NM

Les analyses au Turbiscan nous ont permis de d'observer les cinétiques de déstabilisation des échantillons sur 24 heures (Figure 21). Nous remarquons ici deux groupes de NM. Le premier avec les NM-200 ( $\text{SiO}_2$ ), NM-110 ( $\text{ZnO}$ ), NM-210 ( $\text{CeO}_2$ ), NM-103 ( $\text{TiO}_2$ ) et NM-104 ( $\text{TiO}_2$ ) : ces derniers présentent une réponse relativement linéaire dans le temps et atteignent des valeurs assez faibles de déstabilisation. Au niveau macroscopique, ce sont ceux qui une fois dispersés à la sonde à ultrasons restent relativement homogène dans le temps. L'autre groupe avec l'Ag, le NM-600 (argile), le NM-105 ( $\text{TiO}_2$ ) et l'or sont quant à eux beaucoup moins stable. Ils atteignent rapidement, en quelques heures, des valeurs semblables à celles de l'autre groupe au bout de 24h. Cela signifie qu'ils sédimentent rapidement.

Les caractérisations que nous avons réalisées nous donnent des résultats similaires à celles conduites par le JRC et ses organismes partenaires. En plus de cela nous avons pu obtenir des données nouvelles sur le comportement de ces NM en solution dans le milieu de culture.

## 4) Protocole de préparation des NM en suspension

### a) Problématique des suspensions et pertinence de l'exposition en suspension

La préparation des suspensions est une étape clé pour notre étude. Sachant que les expositions cellulaires sont réalisées sur 24h (ou plus), il est nécessaire de disposer de suspensions homogènes et stables dans le temps. En effet si les NM sédimentent en fond de puits, il est possible d'être confronté à des phénomènes de toxicité qui ne seront pas forcément induits par la nature des NM mais plus par le fait qu'ils tapissent les cellules. Il est donc important de bien disperser nos nanomatériaux lors de la préparation des échantillons mais aussi avant de les déposer sur les cellules. Nous avons choisi une concentration maximale d'exposition de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ce qui est bien au-dessus des concentrations réelles auxquelles nous sommes exposés, mais qui nous donnera une première vue sur la nature toxique ou non des NM. Pour cela nous préparons une gamme de concentrations à partir d'une suspension mère à 1mg/mL dans du milieu de culture DMEM. Les puits dans lesquels sont placés les cellules contiendront 90  $\mu\text{L}$  et nous rajouterons 10  $\mu\text{L}$  de nos suspensions mères pour arriver à la concentration souhaitée de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (dilué 10x)

### b) Description du protocole

Après avoir recherché des protocoles de préparation de suspensions dans la bibliographie, notamment associés à des études toxicologiques *in vitro*, je me suis inspiré des résultats du programme Européen Nanogenotox.

Le protocole adapté pour nos expériences est décrit ci-dessous :

- Prendre autant de flacon en verre de 10mL que de NM à préparer
- Peser entre 5 et 8 mg de chaque NM et noter la valeur exacte sur le flacon. Prélever délicatement à l'aide d'une petite spatule en métal la quantité nécessaire de poudre de NM. Il est nécessaire de décharger électrostatiquement tout le matériel, à savoir la spatule, le flacon contenant le NM et le flacon cible.
- Ajouter 60 $\mu\text{L}$  d'éthanol sur la poudre pour la mouiller. Il s'agit d'une étape cruciale pour les NM comportant un revêtement hydrophobe. Une si faible quantité d'éthanol sera négligeable dans la suspension finale (de l'ordre de de 1% volumique).
- Agiter délicatement en faisant rouler entre les mains pour bien mélanger. Ceci permet de bien mouiller la poudre avec l'éthanol, ce qui facilite grandement la dispersion après ajout de milieu.

Nous avons utilisé un agent dispersant : la carboxyméthylcellulose (CMC "medium viscosity", CAS : 9004-32-4). Nous avons testé la toxicité de cette molécule à très forte concentration (5mg/mL) sur les modèles cellulaires et nous n'avons observé aucun impact sur l'homéostasie cellulaire. Elle est donc utilisable pour notre protocole de dispersion.

- Prendre une fiole de 100mL
- Peser 80 mg de CMC
- Ajouter 20 mL de milieu de culture DMEM sans sérum et avec antibiotique HEPES.
- Chauffer au micro-onde (30sec) puis disperser au bain à ultrason pendant quelques minutes pour bien homogénéiser la solution. Le fait de chauffer la solution accélère la cinétique de dissolution de la CMC.
- Rajouter 60 mL de DMEM pour compléter pour parvenir à une concentration finale de 1 mg/mL de CMC dans le milieu. (Identique à la concentration de NM dans la suspension mère)
- Disperser au bain à ultrasons pendant 5 minutes.

Pour continuer sur les échantillons...

- Ajouter à la poudre de NM le DMEM + CMC, la quantité en mL correspondant au poids pesé : ex 6,3 mg → 6,3 mL afin de d'aboutir à la concentration de 1 mg/mL.
- Disperser les échantillons 12min à 20% en continu à la sonde à ultrasons petit diamètre. Les échantillons sont maintenus dans un récipient avec des glaçons pour éviter l'échauffement de la suspension. La sonde à ultrason est un outil très efficace pour la dispersion des échantillons, nous l'utilisons systématiquement lors des tests avant de déposer les NM dans les plaques à puits.
- Juste après la sonication, prélever 1mL du flacon dans un eppendorf, en veillant bien à ce qu'il ait un fond conique (Les eppendorf à fond presque rond ne permettent pas une sonication à la sonde a ultrason, le liquide s'échappe, peu importe le volume)
- Enfin rincer la sonde à ultrasons en la plongeant dans un b cher d'eau et en soniquant 20 sec.

Grâce à ce protocole nous pouvons préparer des solutions stables dans le temps tout en réduisant fortement la quantité d'agglomérats, décomposés par la sonication à la sonde à ultrason.

## Conclusion

Dans ce premier chapitre nous avons exposé ce qu'était un nanomatériau et les raisons pour lesquelles ils sont largement utilisés dans l'industrie et la recherche. Après avoir sélectionné un panel d'étude de nanomatériau et donné des exemples des utilisations courantes de ces derniers dans la vie quotidienne, nous avons abordé leur toxicité. Cette problématique est complexe et nous avons évoqué plusieurs méthodes d'analyse pour évaluer cette toxicité dans des scénarii différents. Dans notre cas, nous ciblerons une toxicité sur des modèles in vitro par une exposition directe aux NM. Par la suite, nous avons discuté des réglementations et des caractérisations nécessaires pour évaluer correctement la toxicité d'un nanomatériau spécifique. Enfin nous avons exposé les résultats de nos caractérisations d'échantillons par différentes méthodes pour les multiples critères définis par l'ANSES. Les résultats obtenus par nos tests sont similaires à ceux des études réalisées par le JRC. Pour finir nous avons détaillé le protocole de préparation de nos échantillons de NM pour l'exposition in vitro dans le milieu de culture.

Dans le chapitre suivant, nous allons nous concentrer sur le système d'exposition aux ondes radiofréquences ainsi que sa dosimétrie, nécessaire à une exposition calibrée et contrôlée.





## Chapitre 2 : Développement et caractérisation d'un système d'exposition aux ondes radiofréquences pour une analyse de toxicité à haut débit

1) Introduction sur les ondes RF et l'évaluation délicate de leur toxicité .....	56
2) Les différents systèmes d'exposition aux ondes RF .....	57
a) Systèmes d'exposition aux ondes RF <i>in vitro</i> utilisés dans la littérature .....	57
i) Les systèmes à propagation .....	57
ii) Les systèmes résonnants .....	58
iii) Les systèmes rayonnants .....	58
iv) Bilan sur les technologies d'expositions aux ondes RF <i>in vitro</i> .....	58
b) Système utilisé pour application en plaque à puits ou permettant beaucoup de conditions en parallèle .....	59
c) Cahier des charges de notre dispositif .....	60
3) Notre système d'exposition aux ondes RF .....	60
a) Moyens développés pour exposer localement des cellules aux ondes RF sur plaque à puits .....	60
i) Principe d'exposition .....	61
ii) Un système développé pour plaque à 96 puits .....	62
iii) Choix d'une configuration en îlot pour une parallélisation des expositions RF .....	65
b) Description de notre banc d'exposition aux ondes RF .....	68
i) Eléments clés de notre banc d'exposition aux ondes RF .....	68
ii) Conditions biologiques à assurer aux cellules .....	70
iii) Description globale du banc d'exposition aux ondes RF .....	711
4) Grandeur évaluée pour caractériser notre exposition RF : le Débit d'Absorption Spécifique (DAS) .....	72
a) Introduction du DAS et des seuils autorisés .....	72
b) Modèle théorique de DAS .....	73
c) Méthode de détermination du DAS: .....	75
i) Par mesure du champ électrique : .....	75
ii) Par mesure de l'incrément thermique : .....	77
5) Dosimétrie numérique .....	78
a) Modélisation 3D .....	78
b) Analyse du DAS maximal, de l'homogénéité et de l'isolation .....	80
6) Dosimétrie expérimentale .....	83
A) Principes généraux mis en œuvre .....	83
a) Caractérisation par échauffement thermique .....	83
b) Problématiques liées à la détermination expérimentale du DAS dans notre configuration .....	84

c) Protocole d'exposition pour la détermination du DAS.....	86
B) Optimisation des matériels et techniques de traitement de données .....	86
a) Choix des capteurs en température.....	86
b) comparaison TC/FO pour la détermination du DAS .....	90
c) Comparaison des méthodes de régression et paramètres d'étude .....	93
C) Premières caractérisations .....	94
a) Validation de la méthode de dosimétrie expérimentale.....	94
b) Dosimétrie expérimentale de la plateforme RF développée .....	95
c) Comparaison des résultats entre dosimétries expérimentale et numérique.....	97
d) Bilan de la caractérisation.....	98
D) Différents enjeux à considérer .....	98
a) Planéité de la plaque à puits .....	98
b) Problème de détermination du DAS dans les puits voisins en comparaison aux résultats simulés .....	107
c) Visualisation de l'échauffement de la plateforme RF par caméra thermique .....	110
d) Adaptation à ces enjeux .....	115

# 1) Introduction sur les ondes RF et l'évaluation délicate de leur toxicité

Nous évoluons dans un environnement quotidien où l'exposome est de plus en plus riche et complexe. L'exposition aux facteurs environnementaux tant chimiques, physiques, biologiques et psychologiques constitue une problématique sanitaire importante. Parmi ces facteurs, et en lien avec l'apparition des nouvelles technologies de communication, les ondes radiofréquences occupent une place importante dans les débats quant à leur toxicité. Il est encore aujourd'hui difficile d'identifier si les ondes radiofréquences peuvent présenter un risque sanitaire suivant les conditions d'exposition, tant les résultats des multiples études réalisées sur cette thématique depuis plusieurs décennies divergent en fonction des modèles étudiés, des systèmes d'exposition utilisés, des types de signaux RF étudiés [115]. Les critères importants à prendre à compte dans les études toxicologiques aussi critiques résident dans la maîtrise et le contrôle aussi bien de l'exposition aux ondes radiofréquences que des analyses biologiques rigoureuses et complètes. Ainsi, d'un point de vue électromagnétique, la caractérisation des moyens d'exposition, la rigueur des protocoles expérimentaux, la redondance des tests et leur reproductibilité sont nécessaires dans toute étude. De nombreux systèmes d'exposition existent, qu'ils soient adaptés à des études *in vivo* [116] et des études *in vitro* [117]. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à développer un système d'exposition aux ondes radiofréquences adapté à un consommable couramment utilisé par les biologistes lors de tests à haut débit, à savoir des plaques à puits. Ce type de consommables présente l'atout intrinsèque de faciliter les post-analyses biologiques réalisées après exposition, investigations nécessaires pour établir l'impact de l'exposition aux ondes RF sur les cellules. Il est en effet compatible avec les lecteurs optiques automatisés et les systèmes de microscopie traditionnels. D'un point de vue électromagnétique, nous nous sommes attachés à exploiter au maximum la redondance et l'individualité des puits de ce consommable pour multiplier les capacités d'exposition RF. Afin de donner de la flexibilité d'utilisation, nous avons développé des applicateurs individualisés à un puits et les avons associés pour augmenter les capacités d'exposition aux ondes RF. Dans ce chapitre nous détaillerons la plateforme d'exposition développée, sa caractérisation en dosimétrie d'après une étude numérique basée sur des simulations électromagnétiques par éléments finis et une approche expérimentale à l'aide de mesures thermiques pour extraire la valeur de DAS appliqué suivant la puissance RF incidente. Au préalable, nous allons présenter les différents types de systèmes d'exposition *in vitro* aux ondes RF qui existent afin de mettre de bien mettre en exergue les atouts du système que nous avons développé et qui sera introduit dans ce chapitre.

## 2) Les différents systèmes d'exposition aux ondes RF

### a) Systèmes d'exposition aux ondes RF *in vitro* utilisés dans la littérature

On peut classer les systèmes d'expositions aux ondes RF en 3 grandes familles :

- Les systèmes à propagation
- Les systèmes résonnants
- Les systèmes rayonnants

Dans notre cas, nous allons comparer plusieurs facteurs déterminants pour une exposition RF sur des modèles *in vitro*, à savoir :

- L'uniformité du DAS : la distribution du DAS sur l'ensemble des cellules exposées doit être la plus uniforme possible. On peut aussi l'appeler homogénéité.
- L'efficacité du DAS : c'est le ratio entre le DAS moyen généré et la puissance produite par la chaîne RF en amont.
- L'encombrement : nous évaluerons le rapport entre le volume d'occupation des échantillons exposés et la place requise pour le système d'exposition. Ce facteur est déterminant car une exposition *in vitro* nécessite un incubateur biologique.
- Le nombre d'échantillons exposés simultanément : ce critère est particulièrement important dans notre cas, pour pouvoir évaluer de multiples NM en triplicats et de façon parallélisée.
- Facilité d'utilisation : il s'agit de pouvoir positionner et enlever simplement nos échantillons biologiques.
- Versatilité de l'instrument : il est intéressant de pouvoir modifier les conditions d'exposition facilement avec le même dispositif (fréquences, puissance, nombre d'échantillons etc...).

#### i) Les systèmes à propagation

Ces systèmes sont principalement utilisés dans la gamme de fréquence du GHz au THz. Le principe est de guider l'onde électromagnétique au travers d'un tube métallique (cuivre, laiton, parfois plaqué en argent ou or, ou fibre de carbone plus récemment) [118]. Ce tube peut avoir une section circulaire, rectangulaire ou encore elliptique. Le champ électromagnétique est confiné dans cet espace et subit très peu de pertes (Figure 22). Ce sont majoritairement des systèmes fermés qui confinent le champ, mais, plus récemment, on voit apparaître des systèmes ouverts comme le Montena TEM 3000. Les structures comme les cellules TEM ou GTEM font partie de cette famille. Très versatiles, on les retrouve dans un grand nombre d'études sur la problématique d'exposition aux ondes RF car ils permettent d'exposer tout type de contenant [117]. En revanche leur encombrement est non négligeable comparé au volume qu'ils permettent d'exposer. L'efficacité moyenne de ce dispositif est de l'ordre de 1 (W/kg)/W, mais varie énormément en fonction du contenant utilisé (les valeurs maximales sont autour de 6 (W/kg)/kg). Ce système est plutôt recommandé pour des expositions sur couche cellulaire 2D

car l'homogénéité du DAS dans la suspension cellulaire n'est pas optimale (< 30 % en suspension contre 60 à 80% en couche cellulaire).

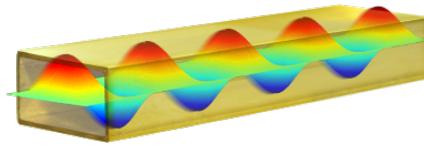


Figure 22: Propagation d'une onde dans un système dit à propagation

## ii) Les systèmes résonnants

Les systèmes résonnants sont des systèmes fermés permettant d'exposer aux ondes stationnaires provoquées par la réflexion totale du dispositif. On y retrouve principalement les guides d'ondes rectangulaires fermés par un court-circuit. Ce sont les systèmes les plus compacts, et sont de ce fait pratiques à utiliser dans un incubateur. Ils ont un bon rapport encombrement/volume exposé et permettent d'avoir les cellules exposées et les témoins dans le même incubateur. Leur efficacité est très bonne mais dépend de la fréquence d'utilisation : à 900 MHz 1,3 (W/kg)/W [119] sur des tapis cellulaires, contre 10 (W/kg)/W pour 1800 MHz [120]. On peut arriver jusqu'à du 70 (W/kg)/W à 2,45 GHz dans certains cas [121] mais l'homogénéité en pât. Concernant l'homogénéité, elle dépend énormément de la localisation de l'échantillon par rapport aux maxima locaux des champs E et H. En positionnant bien l'échantillon, on obtient une excellente homogénéité (70%) pour tout type de contenant.

## iii) Les systèmes rayonnants

Les systèmes les plus utilisés sont les antennes cornets. Les expositions de ce type sont principalement en champ lointain et en chambre anéchoïque ce qui rend l'implémentation dans un incubateur biologique difficile. Elles sont utilisées dans des chambres en plexiglas par exemple à la place de l'incubateur [122]. Dans une grande partie des études, elles permettent d'exposer beaucoup d'échantillons à la fois, mais l'homogénéité du DAS reste faible (entre 20% et 50%). Par ailleurs l'efficacité de ce genre de dispositif est faible comparée aux autres systèmes d'exposition, avec typiquement 0,3 (W/kg)/W.

## iv) Bilan sur les technologies d'expositions aux ondes RF in vitro

Nous avons ici ciblé l'aspect exposition in vitro pour les 3 familles de systèmes présentés précédemment. Ces technologies évoluent dans le temps mais à l'heure actuelle nous pouvons dresser un bilan des différents points sur lesquels nous souhaitons comparer ces technologies (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparatif des différents système d'exposition

	Systèmes à propagation	Systèmes Résonnants	Systèmes rayonnant
Efficacité typique du DAS	1 - 10 (W/kg)/W	1 - 10 (W/kg)/W	0,3 (W/kg)/W
Homogénéité du DAS sur culture cellulaire 2D	60-80%	70-90%	20-80%
Largeur de la gamme de fréquence d'utilisation	faible	faible	grande
Implémentation sur incubateur	facile pour les TEM, difficile pour les guides d'onde	facile	difficile pour antenne cornet facile pour microstrip
Nombre de contenants exposé	plusieurs	plusieurs	beaucoup

Concernant l'efficacité et l'homogénéité, elles varient énormément en fonction des études et du système d'exposition. Généralement les systèmes à propagation et résonnants restent meilleurs que les antennes cornets. En revanche de par leur nature ces dispositifs restent limités sur la gamme de fréquence d'utilisation comparé aux système rayonnants. L'implémentation dans les incubateurs biologiques reste difficile pour beaucoup de systèmes qui sont encombrant et dont les performances peuvent varier à 37°C. Enfin un point crucial et le nombre d'échantillons pouvant être exposées en simultanément afin de dupliquer les conditions : ici les systèmes rayonnant sont les plus adaptés.

## b) Système utilisé pour application en plaque à puits ou permettant beaucoup de conditions en parallèle

Dans la littérature on retrouve quelques systèmes d'expositions qui nous permettent d'obtenir un nombre assez conséquent d'échantillons en parallèle. On trouve certaines études avec de nombreuses boîtes de Petri exposées simultanément mais l'encombrement est très conséquent ([119], [123], [124]). En réduisant d'échelle, on peut mentionner des expositions sur plaque à 6, 12, 24, 48 ou encore 96 puits ([125]–[130])

L'inconvénient majeur dans tous les exemples évoqués précédemment est que l'ensemble de la plaque à puits est irradié (de manière homogène ou non). Il faut donc avoir le même banc de test mais sans exposition RF pour les témoins biologiques. Les dispositifs émettant les ondes RF utilisés ne sont pas de la même échelle que le volume ou l'unité biologique exposée. Il faudrait pouvoir réduire ces dispositifs et les multiplier pour adapter notre système d'exposition au puits d'une plaque par exemple. L'idéal serait de pouvoir confiner le champ sur un faible volume et pouvoir le reproduire sur plusieurs emplacements de la plaque à puits, tout en ayant une zone non exposée pour les contrôles biologiques. De plus, une partie des études citées précédemment calibrent leur dispositif uniquement de manière numérique, ce qui pourrait générer un biais avec la réalité.

### c) Cahier des charges de notre dispositif

Comme dit précédemment nous avons choisi de nous orienter vers une étude in vitro.

Nous devons répondre à plusieurs critères fondamentaux pour le dispositif développé :

- Etre adapté à du consommable usuel de biologiste pour faciliter l'analyse biologique,
- Permettre un grand nombre de conditions de test en simultané, et donc avoir une grande puissance statistique,
- Pouvoir faire varier la puissance, la fréquence et le mode d'exposition au sein du même système d'exposition,
- Avoir un dispositif permettant une exposition calibrée et contrôlée,
- Pouvoir exposer de manière homogène un tapis cellulaire 2D,
- Etre facilement implantable dans un incubateur pour des expositions dans les conditions biologiques nécessaires aux cellules (37°C, taux d'humidité supérieur à 90% et CO<sub>2</sub> à 5%).

## 3) Notre système d'exposition aux ondes RF

### a) Moyens développés pour exposer localement des cellules aux ondes RF sur plaque à puits

Nous avons fait le choix d'utiliser des plaques à 96 puits comme type de consommable (Figure 23). En effet ces plaques sont très utilisées dans le monde de la biologie et beaucoup de technique d'analyse sont adaptés à ce modèle. De plus 96 puits nous laissent énormément de liberté pour multiplier les conditions lors d'un seul et même test. Avoir des triplica d'une même condition sera donc une chose aisée.



Figure 23: Images de plaque 96 puits pour culture cellulaire

Il y a plusieurs manières de réaliser une exposition aux ondes RF sur des cellules contenues dans ces plaques à puits. On peut les retrouver en suspension, donc libres dans le liquide du puits. Ces modèles cellulaires n'ont pas besoin d'adhérer à une surface pour pousser et se développer. Ces modèles cellulaires sont plutôt rares et la majorité des cellules ont besoin de se lier entre elles et d'adhérer à une surface pour croître. Dans ce cas, on les retrouvera en fond de

puits, formant un tapis cellulaire. On pourra aussi citer les modèles 3D type organoïdes ou sphéroïdes. Dans notre cas, nous utilisons des tapis cellulaires 2D.

### i) Principe d'exposition

Notre principe d'exposition est simple : on souhaite placer un élément rayonnant en contact du dessous de plaque à puits pour exposer aux ondes RF les cellules qui tapissent le fond de puits. Cet élément rayonnant sera dimensionné pour rayonner exactement sous un puits et limiter son impact sur les puits voisins. Une chaîne RF permettant la génération du signal et son amplification sera positionnée en amont. L'idée est donc de développer une plateforme s'imbriquant sous une plaque à puits et contenant un réseau d'applicateurs RF centrés sur les puits. (Figure 24)

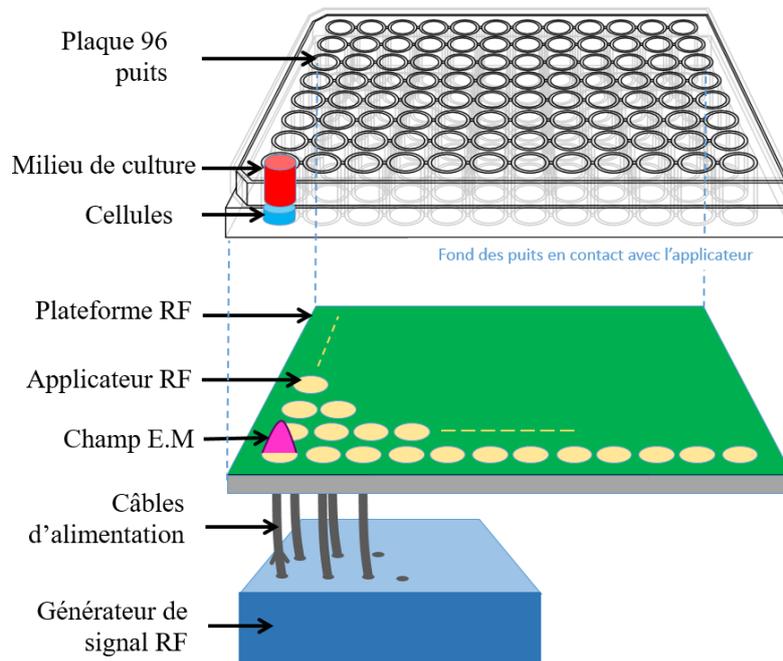


Figure 24: Schéma de principe d'exposition d'une plaque à puits à l'aide d'une plateforme d'applicateurs RF

Ce principe avait déjà été développé dans l'équipe pour l'exposition en plaque à 24 puits. L'applicateur d'onde RF se base sur une technologie coplanaire avec l'élément rayonnant sur le dessus et la masse en face arrière. La partie rayonnante et isolée du plan de masse par une ouverture dans le métal. Le connecteur SMA en face arrière vient se souder sur la masse et son point chaud au centre de la ligne d'accès permettant d'envoyer le signal sur la partie supérieure par des vias connectant les deux parties métalliques des faces avant et arrière. Ce design est en fait un prolongement du câble coaxial. Le champ électrique se propage comme indiqué sur la Figure 25

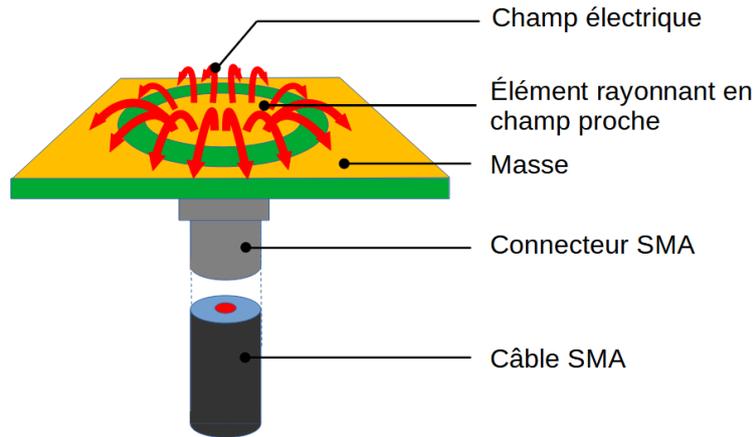


Figure 25: Schéma de principe d'un applicateur RF alimenté par un câble coaxial

## ii) Un système développé pour plaque à 96 puits

A l'origine l'équipe avait déjà développé cette technologie d'applicateur adapté à des plaques à 24 puits. Quelques tests avaient été réalisés avec ces dispositifs et la preuve de concept avait été concluante. Rapidement, on s'est rendu compte de la nécessité de multiplier les conditions lors d'un même test. Pour cela, on souhaitait adapter cette technologie aux dimensions d'une plaque à 96 puits.

Cela a été le sujet de mon stage de Master 2 au cours duquel j'ai travaillé pendant 6 mois au design, prototypage puis tests des nouveaux applicateurs RF adaptés à une plaque à 96 puits. J'avais mené un plan d'expérience complet pour optimiser les dimensions en fonction des performances d'après le logiciel de simulation électromagnétique HFSS. De plus la ligne d'accès asymétrique alimentant l'applicateur à 24 puits générait de fortes perturbations dans les puits situés au-dessus de celle-ci. J'ai donc déplacé le point chaud directement sous le nouvel applicateur pour s'affranchir de ce rayonnement parasite. Cela a abouti à un premier prototype concluant, qui a été amélioré par la suite, notamment en connectant deux applicateurs sur un même connecteur par une piste. Ainsi nous avons réduit le nombre de câbles nécessaires pour notre réseau d'applicateurs RF, sachant de toute façon qu'une redondance des tests biologiques est nécessaire. Ce type d'applicateur a été utilisé en parallèle du projet Nanowave par Ali Moscatiello dans le cadre d'un autre projet, collègue avec qui j'ai beaucoup travaillé sur les modélisations et caractérisations de ce dispositif.

Sur la Figure 26 est présenté l'applicateur dit « simple ». Il comprend un connecteur SMA qui alimente un seul applicateur. On voit que le point chaud du connecteur SMA est directement soudé au centre de l'applicateur en face arrière. Les dimensions sont rapportées dans le Tableau 10.

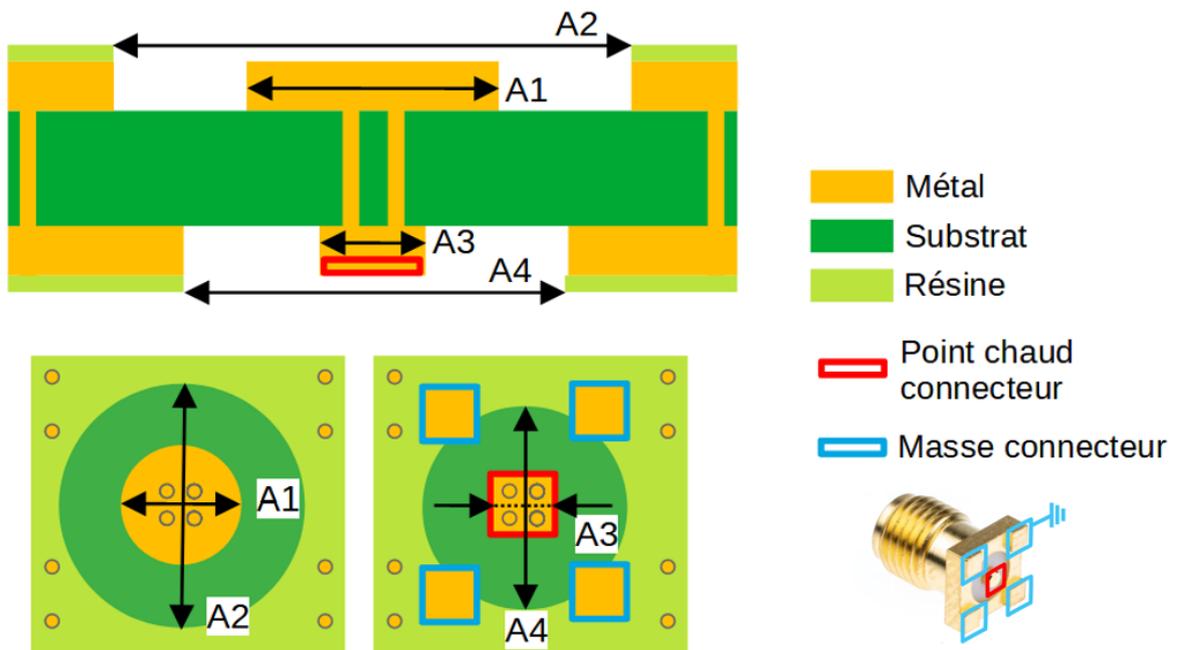


Figure 26: Schémas techniques d'un applicateur RF dit « simple » et ses dimensions: en haut, vue en coupe ; en bas à gauche, vue de dessus ; en bas à droite, vue de dessous

Comme précisé plus haut, nous avons ensuite amélioré ce dispositif « simple » pour en faire un « doublet », soit deux applicateurs RF alimentés par un seul connecteur via une ligne métallique pour répartir équitablement le signal RF, comme indiqué sur la Figure 27.

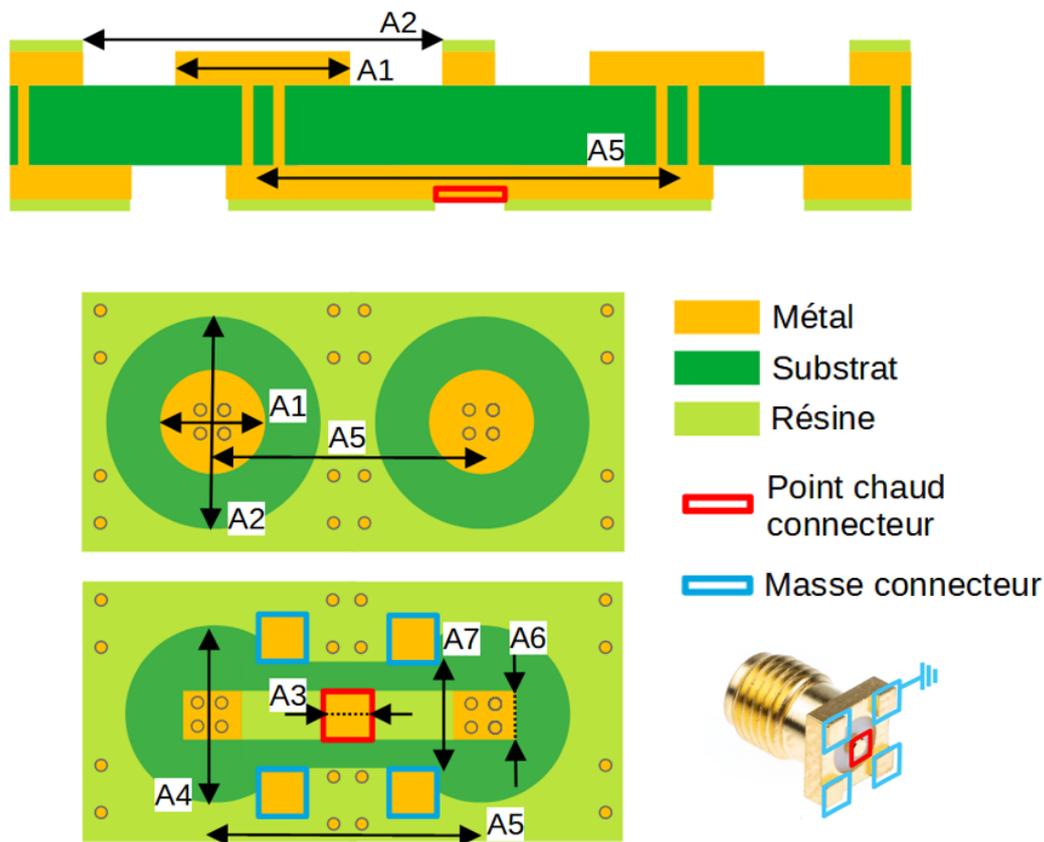


Figure 27: Schémas techniques d'un applicateur RF dit « doublet » et ses dimensions : en haut, vue en coupe ; en bas à gauche, vue de dessus ; en bas à droite, vue de dessous

Tableau 10 : Récapitulatif des dimensions des applicateurs RF vus dans les figures techniques précédentes

A1	3,8 mm	Diamètre de l'élément rayonnant
A2	7,8 mm	Diamètre de l'ouverture de l'élément rayonnant
A3	1,6 mm	Largeur de la zone de soudure pour le point chaud du câble SMA
A4	5,8 mm	Diamètre de l'ouverture côté connecteur SMA
A5	9 mm	Distance entre deux éléments rayonnant / deux puits de plaque 96 puits
A6	1,28 mm	Largeur de la piste d'alimentation du doublet
A7	3,25 mm	Largeur de l'ouverture entre piste et masse

D'après nos premiers tests et simulations, les performances du doublet sont semblables à celles de deux applicateurs simples juxtaposés. L'avantage est donc principalement le gain de place et la facilité d'utilisation, puisque deux fois moins de câbles sont à connecter à la plateforme RF.

### iii) Choix d'une configuration en îlot pour une parallélisation des expositions RF

Comme nous l'avons vu dans la partie du principe du système d'exposition RF, l'idée est de préparer une matrice d'applicateurs RF, qui sont positionnés sous les puits que nous souhaitons exposer. Il faut donc choisir où nous allons positionner nos applicateurs au regard des tests que nous envisageons. Dans un premier temps, nous avons choisi des configurations spécifiques mais il est bien entendu possible de préparer une plateforme avec les 96 applicateurs RF et 48 connecteurs, puis connecter uniquement ceux souhaités pour une expérience en question.

Plusieurs configurations sont envisageables avec cette plateforme, mais deux principales nous ont paru pertinentes. La première est une disposition en colonne, utilisée pour le projet CELL FI. Elle permet d'avoir 4 colonnes de 8 puits illuminés. L'objectif est d'appliquer des puissances différentes pour chacune d'entre elles en y ajoutant des atténuateurs spécifiques à chaque colonne d'applicateurs. Cela aboutit à 4 colonnes d'applicateurs avec la possibilité d'appliquer 4 puissances différentes. Dans le cadre de mon projet nous avons opté pour une autre configuration, des doublets placés côte à côte. Comme on le montrera par la suite, nous faisons face à deux problématiques pour la conception globale de la plateforme :

- Les puits de bordure de plaque à puits ne sont pas utilisables pour l'analyse biologique que nous avons choisie (LUCS, chapitre 3). Les conditions de culture cellulaire diffèrent et amène intrinsèquement des disparités sur le comportement cellulaire.
- Notre applicateur RF rayonne au-delà du puits sous lequel il est positionné, et on se retrouve avec des contributions parasites chez le premier voisin. Ceci sera montré ultérieurement dans ce chapitre.

En prenant en compte ces deux aspects, il faut donc :

- Considérer que les applicateurs positionnés sur le bord de plaques ne seront pas utilisables,
- Disposer les applicateurs RF pour que les contributions parasites de chacun soient symétriques,
- Prévoir un espacement entre les contrôles biologiques et les zones d'applicateurs RF.

Le fait de positionner deux doublets côte à côte nous permet d'avoir des contributions symétriques pour chacun des puits et donc d'homogénéiser le champ de la même manière sur chacun des puits exposés dans l'îlot. Un puits exposé aux ondes RF sera la résultante de l'illumination de l'applicateur situé directement en dessous, des deux applicateurs voisins directs et de celui situé en diagonale.

On appellera « îlot » cette configuration de deux doublets côte à côte.

Sur l'image a) de la Figure 28, on voit la partie supérieure de l'îlot avec les 4 éléments rayonnants qui seront en contact avec le fond des puits (Figure 29)). Les images b) et c) de la Figure 28 montrent la partie inférieure de l'îlot avec et sans les connecteurs SMA.

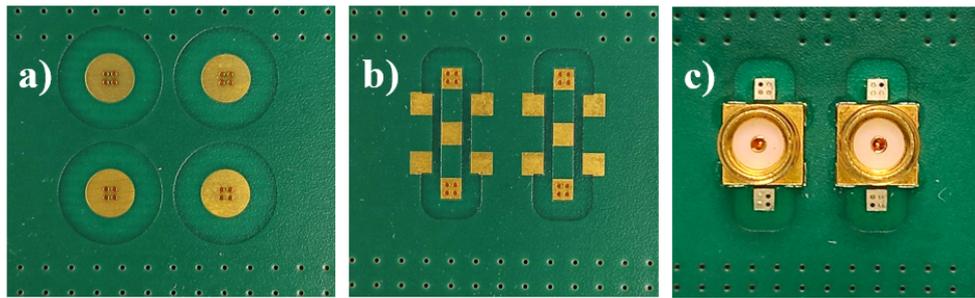


Figure 28: Photographie d'un îlot de 4 applicateurs a) vue de dessus, b) vue de dessous sans connecteur SMA, c) vue de dessous avec connecteurs SMA soudés

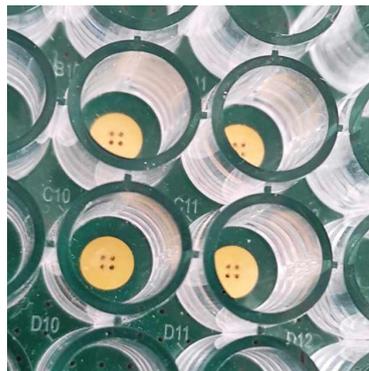


Figure 29 : Photographie d'un îlot avec plaque à puits positionné au-dessus

Sur une même plateforme, nous avons décidé de disposer 4 îlots éloignés par un espacement de deux puits pour les isoler entre eux. Ceci nous amène à 16 puits illuminés simultanément sur une plaque 96 puits. Une zone non RF est réservée sur le côté de la plaque pour y placer deux colonnes de 6 puits, utilisées pour les contrôles biologiques positifs et négatifs. La configuration choisie est représentée sur la Figure 30 ci-dessous.

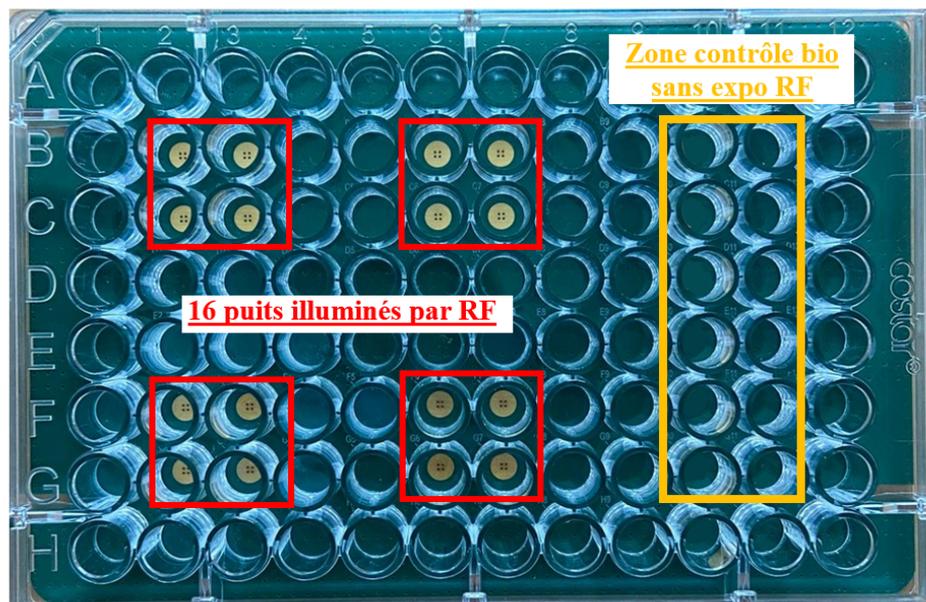


Figure 30: Plateforme d'exposition RF comportant 4 îlots RF, positionnés sous une plaque à 96 puits

Comme nous l'avons vu précédemment, cette plateforme RF est connectée par le dessous avec des câbles SMA. Il faut donc la surélever avec un support pour permettre l'arrivée et gérer l'encombrement des câbles placés dans la continuité des connecteurs SMA. Des trous ont été réalisés sur le bord de la plateforme afin de la maintenir sur un support. Ces trous sont ensuite polis de manière conique afin que les vis ne dépassent pas de la plateforme. Un support découpé dans du PLA a été préparé, dans lequel nous avons laissé une ouverture pour permettre l'arrivée des câbles parallèlement aux connecteurs, sans utiliser d'adaptateurs coudés. La plateforme est fixée à ce support par des entretoises et des vis. (Figure 31)

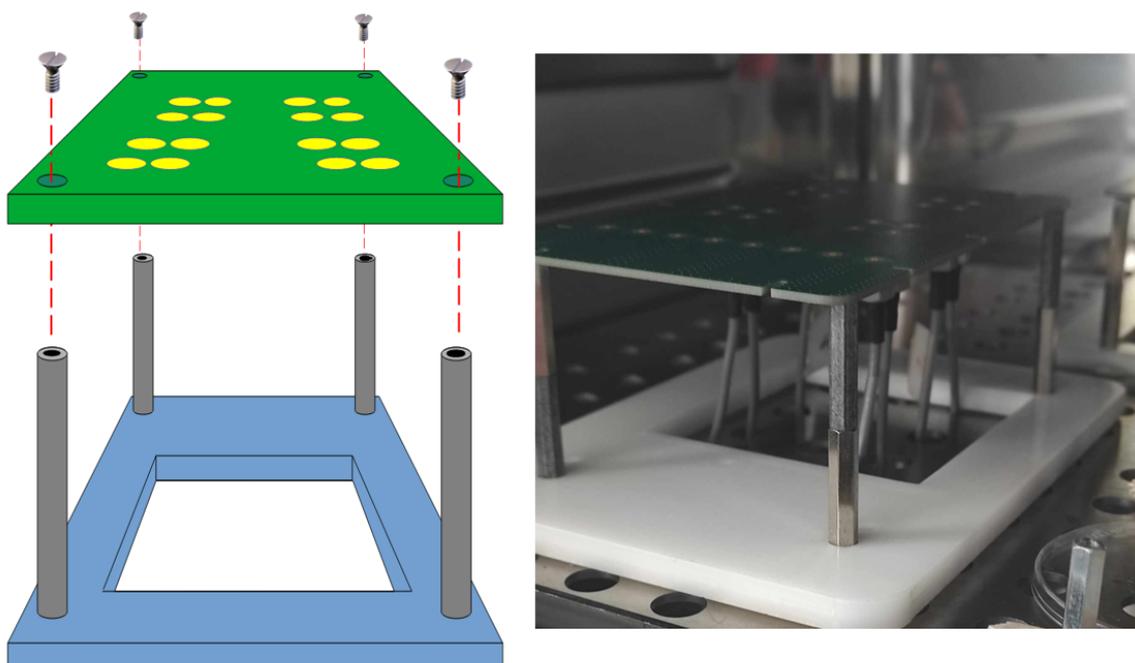


Figure 31: Schéma de principe et photographie de la plateforme placée sur son support

Les incubateurs commerciaux sont munis de plaques métalliques que l'on positionne comme on le souhaite à différents étages de l'incubateur. L'inconvénient de ces plaques est qu'elles ne sont pas forcément trouées là où on le souhaite. Il est alors difficile dans notre cas d'optimiser la gestion des câbles SMA pour notre plateforme RF. Nous avons donc fait fabriquer par le personnel de l'atelier mécanique du LAAS des plaques en polymère partiellement ouvertes de la même manière que les supports de PCB pour laisser passer les câbles RF, comme indiqué sur la Figure 32.

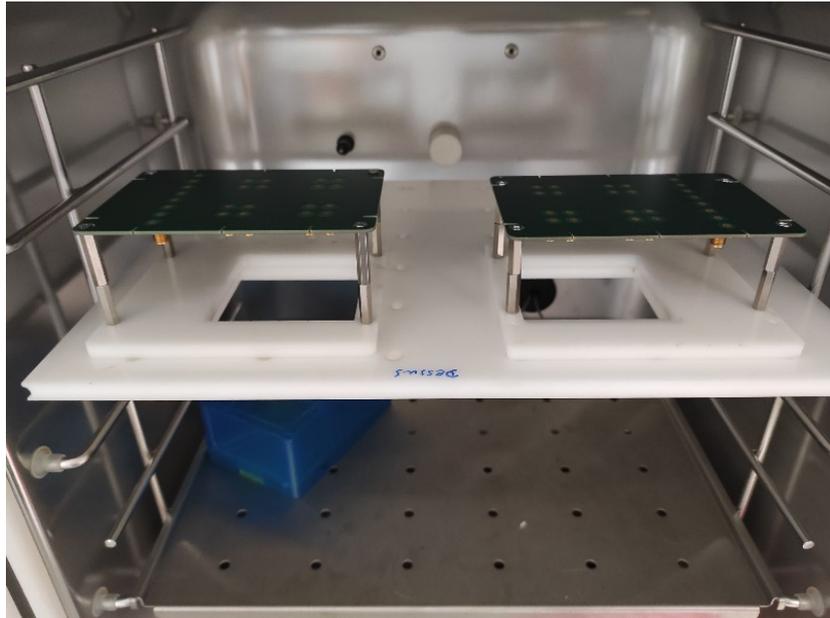


Figure 32: Plaque d'incubateur adaptée pour laisser passer les câbles RF

## b) Description de notre banc d'exposition aux ondes RF

### i) Eléments clés de notre banc d'exposition aux ondes RF

Afin d'alimenter nos applicateurs RF, il faut une chaîne RF en amont. Celle-ci est constituée initialement par un générateur de signal ou synthétiseur RF. Nous avons opté pour un Transcom G6. Ce générateur présente une large bande de fréquence allant de 10 MHz à 6 GHz, et peut simuler des signaux typiques de systèmes de communications comme GSM, EDGE, CDMA ou encore LTE.



Type	Vector Signal Generator
Equipment Type	Benchtop
Configuration	USB / computer controlled
Frequency	10MHz to 6 GHz
Resolution	1Hz
Modulation	BPSK, QPSK, OQPSK, 8-PSK, QAM, MSK, FSK
Output power	-110 to 10 dBm
Phase Noise	-104 dBc
Number of channels	1
Power requirements	220 V
Harmonics	-30 dBc
Spurious	-55 dBc
Dimension	180x50x290 mm

Figure 33: Photographie et caractéristiques du générateur de signal sélectionné, Transcom G6

Ensuite vient notre amplificateur RF ZHL-20W-202-S+ de chez Minicircuit qui est alimenté en DC par une alimentation BK precision 9104. Cet amplificateur possède un gain de +45 dBm. Notre choix s'est porté sur cet amplificateur pour plusieurs raisons. Notre système d'applicateur RF est mal adapté à notre fréquence de travail et n'est donc pas chargé en 50 ohms. Notre circuit est donc quasiment ouvert. Cet amplificateur à l'avantage de pouvoir supporter des circuits ouverts. En plus de cela, nous ajoutons un isolateur à sa sortie pour éviter toute onde réfléchie

pour protéger l'amplificateur et le générateur. Compte tenu de la forte réflexion de nos applicateurs RF, l'amplificateur doit être assez puissant pour pouvoir atteindre les seuils d'exposition que nous voulons atteindre.



Parameter	min	typ	max	unit
Frequency Range	20		2400	MHz
Gain	44	53	56	dB
Gain Flatness	-	+2	+2.7	dB
Output Power at 3dB compression	-	+39	-	dBm
Output Power at saturation	42	+45	-	dBm
Noise figure		10	-	dB
Output 3rd order intercept point	-	+45	-	dBm
Input VSWR	-	2	-	:1
Output VSWR	-	3.5	-	:1
DC supply voltage	-	28	30	V
Supply current	-	4	7	A

Figure 34: Photographie et caractéristiques de l'amplificateur RF sélectionné, ZHL 20W 20 2S+ de Minicircuit

Notre plateforme RF dispose de 8 doublets RF. Pour l'alimenter complètement, il faut donc 8 câbles SMA. Pour cela on ajoute à notre chaîne RF un diviseur de puissance de 1 vers 8 qui nous permet d'alimenter de manière égale les applicateurs. Nous avons choisi un diviseur de puissance PULDAS PS8 05 454/2S (2-4 GHz) adapté à notre fréquence et qui peut supporter jusqu'à 30 W en entrée.

Nous avons calibré notre amplificateur en  $P_s/P_e$  à la fréquence des tests, 2.3GHz. La puissance en sortie de l'amplificateur a été mesurée à l'aide d'un power meter Anritsu ML2437A et d'une sonde Anritsu MA2474D. Puis on trace cette puissance en fonction de la puissance en sortie du générateur de signal (de -40 à 0 dBm).

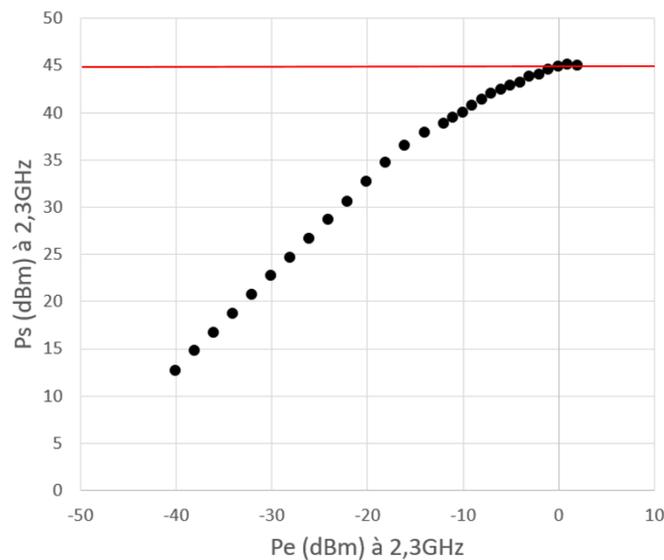


Figure 35: Caractérisation de l'amplificateur choisi  $P_s=f(P_e)$  à 2,3 GHz

Nous observons bien un comportement linéaire qui vers les hautes puissances tend vers la valeur limite de l'amplificateur à 45 dBm.

## ii) Conditions biologiques à assurer aux cellules

Nous avons défini avec l'ANSES un cadre d'exposition pour nos tests. Le type d'expositions auquel nous sommes quotidiennement confrontés est très complexe, varie en fonction des lieux fréquentés, de notre localisation sur le territoire, de notre mode de vie etc. Imiter une exposition réelle pour nos tests est donc impossible. Nous avons défini ce que l'on considère comme pire cas : une exposition continue à des puissances non négligeables, et aussi supérieures aux normes européennes. Il sera bien entendu difficile de faire le parallèle entre une exposition variable sur des années pour un organisme complexe comme un être humain et notre exposition de quelques heures sur cellules humaines issues de lignées cancéreuses. En revanche si lors de nos tests nous observons une toxicité, nous pourrions investiguer les mécanismes cellulaires qui rentrent en jeu dans ce cas d'exposition aux ondes RF.

Pour revenir sur les paramètres de nos tests : la fréquence est fixée à 2,3 GHz tandis que la puissance d'exposition varie pour évaluer des seuils de 0,2, 2 et 20 W/kg en termes de DAS. Le DAS (débit d'absorption spécifique) sera détaillé dans la partie suivante. Nous allons faire nos tests sur 24h puis 48h. Enfin nous exposerons plusieurs modèles cellulaires, cohérents avec des expositions plausibles.

Lors de l'exposition les cellules seront disposées au fond des puits sous forme de tapis cellulaire 2D. L'objectif de cette étude n'est pas de s'intéresser à des modèles 3D qui sont beaucoup plus complexes à mettre en œuvre mais aussi à analyser. Dans cette optique nous caractériserons par la suite notre moyen d'exposition aux ondes RF pour le type de configuration cellulaire 2D. Les cellules ont besoin d'être plongées dans du milieu de culture pour les maintenir en vie : celui-ci apporte les nutriments nécessaires à leur survie et permet les échanges gazeux avec l'extérieur. Les liquides interagissent fortement avec les champs électromagnétiques en particulier dans le spectre des micro-ondes. Il faut donc prendre en compte le volume de liquide de ce milieu de culture. Comme ce sera évoqué également dans le chapitre suivant dans la section traitant de la co-exposition aux ondes RF et à des nanomatériaux, nos travaux se sont déroulés en collaboration avec l'entreprise Anti Oxidant Power composée de chercheurs biologistes spécialisés dans la détection de perte d'homéostasie lors de toxicités diverses à l'aide de la technique dite LUCS brevetée qui leur est propre. Les développements de notre système d'exposition RF sont réalisés en collaboration avec ces collègues. Ainsi, nous avons déterminé ensemble de manière empirique qu'un volume de 100 $\mu$ L de milieu de culture pour les cellules en plaques 96 puits est nécessaire à la stabilité des cellules lors d'expositions durant 24 à 48h. Les tests nous ont montré que si ce volume est trop faible, une évaporation apparaît et devient importante, entraînant une mort cellulaire accrue. À l'inverse si le volume est trop élevé, la hauteur de liquide est trop importante pour permettre les échanges gazeux entre l'air de l'incubateur et le tapis cellulaire en fond de puits. Ceci provoque une hypoxie des cellules et donc la mort cellulaire. De plus, les tests sont effectués dans un incubateur biologique à 37°C, avec une hygrométrie supérieure à 90% et 5% de CO<sub>2</sub> afin d'apporter un environnement propice à une prolifération cellulaire normale.

### iii) Description globale du banc d'exposition aux ondes RF

Le banc d'exposition aux ondes RF peut être décomposé en 2 parties, l'une correspondant à la chaîne de génération des ondes RF, tandis que la seconde est constituée de notre plateforme d'applicateurs RF au sein d'un incubateur, afin d'être compatible avec des conditions de prolifération cellulaire. La température initiale est donc de 37°C avec un environnement en CO<sub>2</sub> de 5% et un taux d'humidité supérieur à 90%, conditions idéales pour les cellules et la stabilisation en pH du milieu de culture. Les applicateurs précédemment présentés sont alimentés par une chaîne RF composée comme suit (Figure 36).

- Un générateur de signal **(1)** utilisé en mode continuous wave (CW) en début de chaîne qui génère l'onde RF.
- Un amplificateur RF **(2)** disposé à sa sortie permet d'atteindre la puissance nécessaire à nos tests.
- Un isolateur **(3)** est ajouté à la suite de cet amplificateur afin d'éviter toute onde réfléchie des applicateurs vers l'amplificateur et le générateur afin de les protéger.
- Enfin pour connecter l'amplificateur aux 8 doublets RF de la plateforme d'exposition, un diviseur de puissance 1 vers 8 **(4)** est intégré.

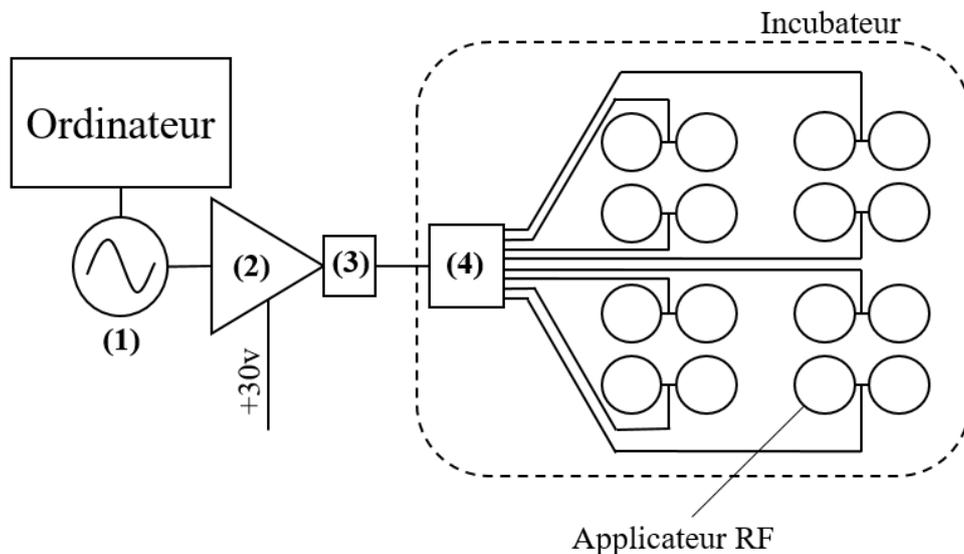


Figure 36: Synoptique du banc d'exposition RF

Les éléments présentés précédemment sont indiqués sur la Figure 36 qui présente la photo du banc d'exposition RF en Figure 37.

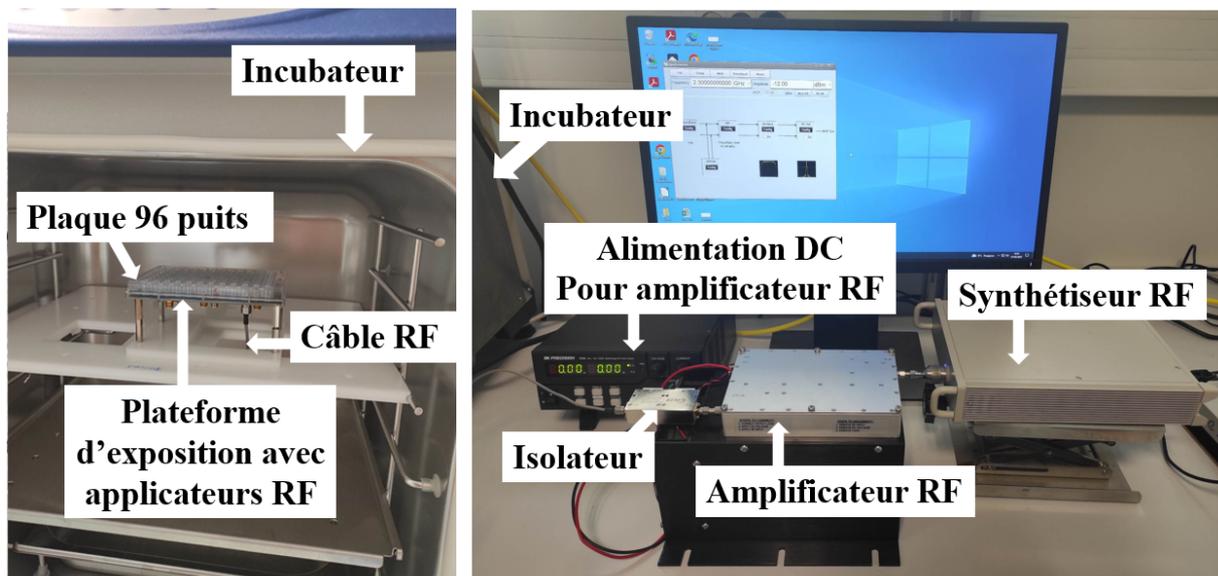


Figure 37: Banc de test avec plateforme d'exposition RF

Avant toute exposition de cellules, ce banc doit être calibré, c'est à dire que ses caractéristiques dosimétriques doivent être définies.

## 4) Grandeur évaluée pour caractériser notre exposition RF : le Débit d'Absorption Spécifique (DAS)

### a) Introduction du DAS et des seuils autorisés

Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous cherchons à développer un système d'exposition RF calibré. Il faut donc calibrer notre dispositif sur une grandeur physique pertinente aux vues de notre objectif. Déterminer de manière quantitative la « dose » de cette grandeur physique administrée pour l'objet d'étude s'appelle la dosimétrie. Pour une exposition à des ondes électromagnétiques, il s'agit d'évaluer la quantité d'énergie absorbée par l'objet exposé. Pour cela, il s'agit de s'intéresser au Débit d'Absorption Spécifique - DAS, dans la gamme de fréquence étudiée, à savoir à quelques GHz. Au-delà d'une dizaine de GHz, la densité de puissance en  $W/mm^2$  est investiguée étant donné que la pénétration des ondes électromagnétiques décroît fortement avec la fréquence, ce qui aboutit essentiellement à une interaction avec les organes en surface du corps humain. Dans notre cas, nous avons axé notre étude à 2,3 et 2,45 GHz. En conséquence le DAS est le paramètre de dosimétrie à utiliser.

Il se définit comme la quantité d'énergie électromagnétique absorbé par unité de masse de l'objet étudié. Il s'exprime en  $[W/kg]$ . Cette grandeur sert à la définition de seuils pour la mise sur le marché des appareils radioélectriques et notamment des téléphones mobiles. En France,

ces appareils sont soumis aux niveaux évalués par la Recommandation du Conseil Européen 1999/519/CE du 12 Juillet 1999, relative à la limitation de l'exposition du public aux champs électromagnétiques (de 0 Hz à 300 GHz). La réglementation française a repris ces seuils dans l'arrêté du 8 octobre 2003, qui a été mis à jour le 01 Juillet 2020 : NOR :INDI0320366A. « Les équipements radioélectriques dont la puissance d'émission est supérieure à 20 mW (13dBm) et dont il est raisonnablement prévisible qu'ils seront utilisés à une distance n'excédant pas 20 cm de la tête ou d'une autre partie du corps humain, ne peuvent être mis en service que s'ils respectent les spécifications techniques annexées au présent arrêté ». Ces seuils sont indiqués dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Récapitulatif des normes européennes liées au DAS

Fréquence	DAS moyen (corps entier) (W/kg)	DAS local tête et tronc (W/kg)	DAS local membres (W/kg)
100 KHz- 10 GHz	<b>0,08</b>	<b>2</b>	<b>4</b>

- Le DAS corps entier est mesuré pour des expositions sur l'ensemble du corps, plutôt pertinent pour les sources éloignées comme les antennes relais.
- Le DAS tête : correspond à une utilisation lors d'un appel, lorsque le téléphone est proche ou en contact avec l'oreille ou la joue et selon des angles spécifiques de 15°.
- Le DAS tronc est considéré lorsque le téléphone est rangé dans la poche d'une veste ou dans un sac. Jusqu'en 2016 les constructeurs pouvaient réaliser leurs mesures de DAS tronc librement entre 0mm (contact du corps) et 25mm. Cette distance a été revue à 5mm maximum compte tenu de la réalité des pratiques et usages des téléphones connectés constamment.
- Le DAS membre est adapté pour des situations comme lorsqu'on tient le téléphone dans la main, un brassard de sport ou une poche près du corps

Ces valeurs sont obtenues pour une moyenne sur 10g de tissu et une exposition de 6min.

## b) Modèle théorique de DAS

Le DAS peut être déterminé à partir de 3 grandeur physiques :

- Le champ électrique E :

$$DAS = \sigma \cdot \frac{E^2}{2 \cdot \rho}$$

- La densité de courant J :

$$DAS = \frac{J^2}{\sigma \cdot \rho}$$

- L'incrément thermique généré par les ondes radiofréquences :

$$DAS = c \cdot \frac{dT}{dt} \text{ quand } t \rightarrow 0$$

Sachant que le champ électrique et la densité de courant sont directement liés par la formule,

$$J = \sigma \cdot E,$$

Où  $\sigma$  est la conductivité électrique du tissu (S/m),  $\rho$  la masse volumique du tissu (en kg/m<sup>3</sup>),  $dT/dt$  la dérivée de la température dans les tissus par rapport au temps (en K/s) et  $c$  la capacité thermique du tissu exposé (en J/(kg.K)).

Par la mesure du champ électrique, il est possible de remonter à la valeur du DAS. Il existe des sondes spécifiques pour ces mesures. Un exemple de cette méthode sera détaillé dans la partie suivante.

En revanche la 3<sup>ème</sup> formule du DAS qui prend en considération l'incrément thermique est spécifique aux ondes radiofréquences. En effet, les matériaux diélectriques soumis à un champ électromagnétique dans la gamme des ondes RF vont s'échauffer. Ceci est lié au processus de relaxation qui s'effectue à l'échelle microscopique. Dans les matériaux non conducteurs, les particules chargées (dipôles) vont interagir avec le champ électrique de ces ondes haute fréquences. Ces dipôles vont s'aligner continuellement avec la direction du champ électrique qui oscille et donc se réorienter en permanence (Figure 38) . Ce phénomène appelé rotation dipolaire va générer un échauffement au niveau macroscopique par la friction molécule-dipôle et dipole-dipole.

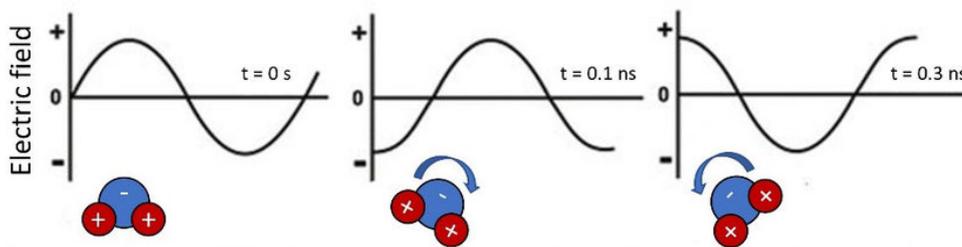


Figure 38 : Schéma de principe de la rotation dipolaire de la molécule d'eau sous un champ électrique

C'est ce phénomène qui est étudié expérimentalement pour remonter à la valeur du DAS.

Il faut savoir que cette montée en température est composée de 2 phases mettant en jeu des phénomènes physique bien différents :

- Une première phase dans les instants courts s'apparente à une droite. Cette montée quasi linéaire sur les premières secondes est directement liée au DAS. Elle apparait instantanément au moment où les onde RF sont appliquées. C'est pour cela qu'il faut se placer à  $t=0$  dans la formule pour déterminer le DAS à partir de l'incrément thermique.
- Viennent ensuite au bout d'une minute environ les échanges thermiques à long terme qui deviennent largement majoritaires. Ces derniers sont liés à la convection, conduction et évaporation du milieu. Nous évoquerons plus en détail ces échanges, et comment nous les avons modélisés mathématiquement dans la suite de ce chapitre. Grâce à ces échanges thermiques l'objet exposé atteint finalement une limite d'échauffement.

Sur la Figure 39 on peut distinguer les différentes phases de l'élévation de température causée par l'application d'ondes RF. La phase (1) correspond à l'état initial, avec un équilibre thermique dans le milieu et l'environnement sans application des ondes RF. Avec l'application des ondes RF au début de la phase (2), la température monte rapidement. Puis rentrent en jeu les phénomènes thermiques classiques pendant la phase (3). Enfin la température se stabilise à une valeur limite lorsque le système atteint son équilibre thermique (4). L'écart en température entre les états 4 et 1 définit l'incrément thermique.

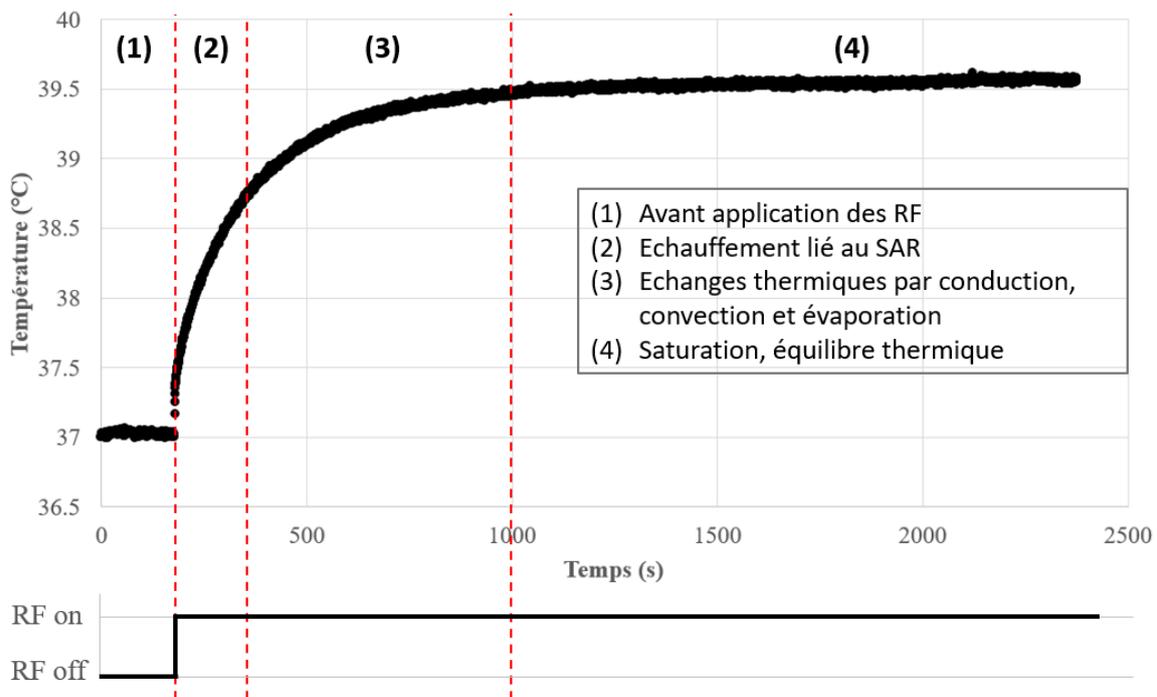


Figure 39 : Courbe représentant l'évolution de la température d'un échantillon liquide soumis aux ondes RF et les différentes phases associées à ce phénomène

### c) Méthode de détermination du DAS:

#### i) Par mesure du champ électrique :

Dans un premier temps nous allons nous intéresser à une méthode commune pour déterminer le DAS en analysant le champ électrique avec une sonde. C'est typiquement de cette manière que L'ANFR (Agence Nationale des Fréquences) évalue les équipements utilisant les ondes radiofréquences qui sont mis sur le marché. Elle suit un protocole de test bien défini visant à comparer les performances d'un appareil aux seuils en vigueur. Ces tests visent à simuler une exposition de l'appareil testé dans des conditions réelles d'utilisation.

Ce sujet est d'actualité puisque le 12 septembre 2023 l'ANFR a demandé le retrait de l'iPhone 12 car ce dernier ne répondait pas aux critères de conformité définis par la réglementation européenne. Comme indiqué dans le Tableau 11, Tableau 10 la limite de DAS membre est fixée à 4 W/kg pour les fréquences de téléphonie mobile. Après mesure des performances de l'iPhone 12 par l'ANFR, la valeur mesurée était de 5,74W/kg, bien supérieure à la valeur limite autorisée.

Pour ses tests, l'ANFR mesure les DAS à plusieurs modulations et fréquences utilisées dans les télécommunication (GSM, UMTS ou encore LTE). La Figure 40 représente un schéma de leur banc d'essai :

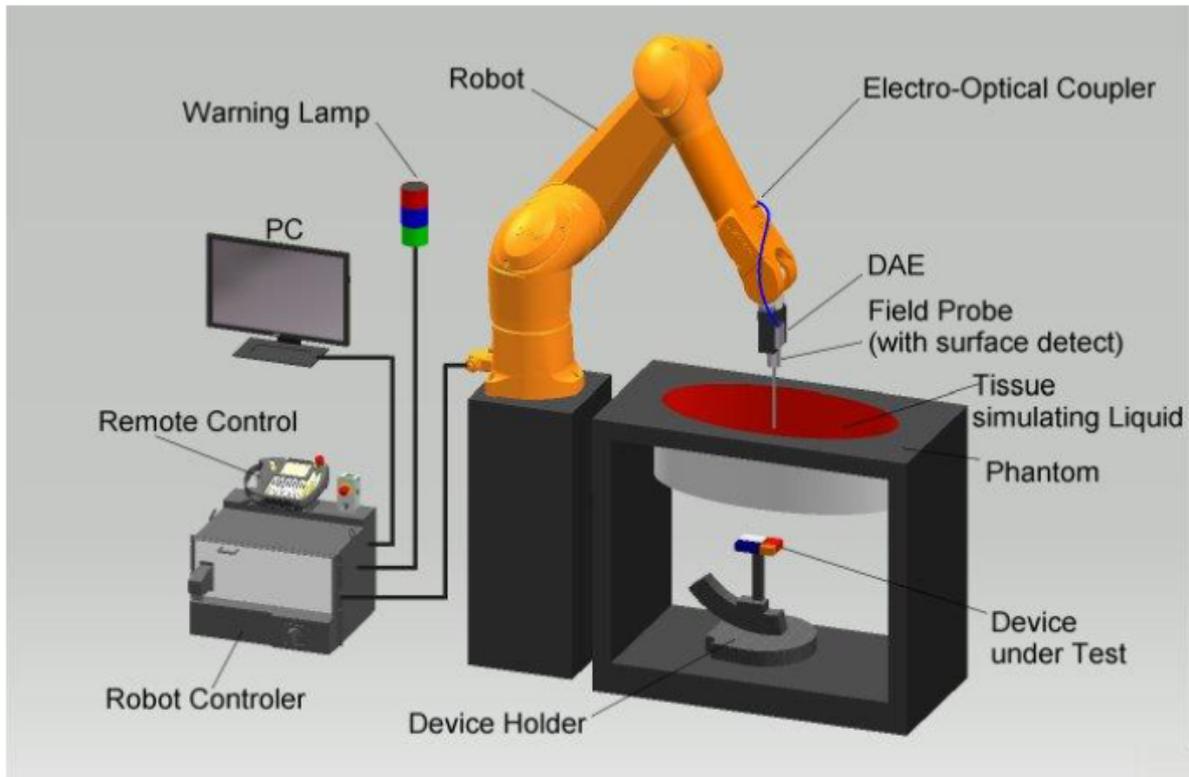


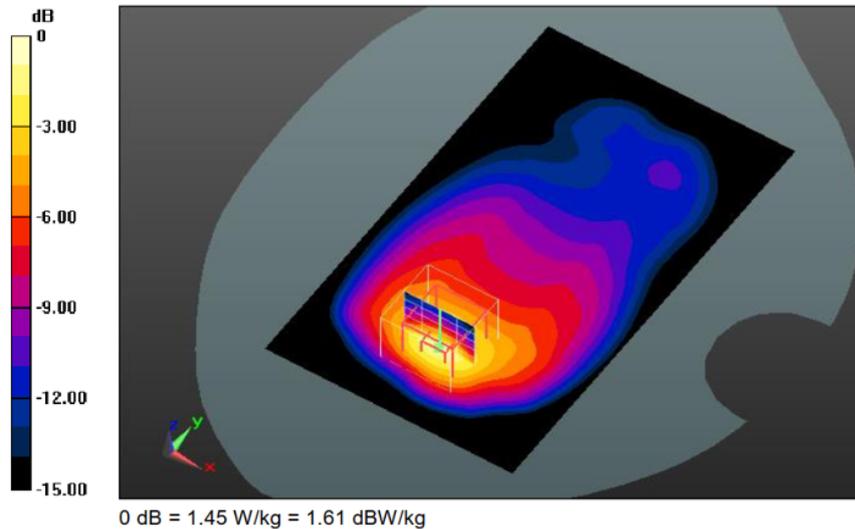
Figure 40 : Schéma du banc de test de l'ANFR pour la détermination du DAS

Un bras robotisé (en orange) maintient une sonde de champ électrique, et permet un contrôle selon 6 axes de la position de la sonde. Cette sonde est plongée dans un « fantôme », silhouette humaine remplie de liquide pour reproduire les propriétés diélectriques du liquide cérébral ou les tissus musculaires. L'appareil analysé est positionné (DUT, device under test) sous ce fantôme (SAM) à une distance de 5mm.

Le logiciel de mesure vient ensuite donner le scan du volume analysé et la valeur d'intérêt est le DAS moyenné sur 10g autour de la valeur maximale. Sur la Figure 41 la valeur retenue est donc 0.566 W/kg.

### HSL - 5 mm/Front position - Middle 0mm/Zoom Scan (5x5x7)/Cube 0:

Measurement grid: dx=7.5mm, dy=7.5mm, dz=5mm  
Reference Value = 32.022 V/m; Power Drift = -0.04 dB  
Peak SAR (extrapolated) = 2.01 W/kg  
**SAR(10 g) = 0.566 W/kg**  
Maximum value (measured) = 1.45 W/kg



#### Additional information:

**position or distance of DUT to SAM: 5 mm**  
ambient temperature: 24.5°C; liquid temperature: 23.9°C

Figure 41 :Exemple de visualisation du DAS après analyse par le logiciel de mesure de l'ANFR

#### ii) Par mesure de l'incrément thermique :

Dans notre cas comme nous l'avons vu plus haut, nous cherchons à évaluer le DAS d'un seul puits d'une plaque à 96 puits. Compte tenu des dimensions de ce dernier (diamètre de 6mm) il est impossible d'y positionner une sonde en champ électrique dont la dimension est de l'ordre de plusieurs centimètres. Nous nous sommes intéressés à déterminer le DAS expérimentalement par une mesure thermique. D'après l'étude de [131], [132] les résultats obtenus à partir d'une mesure de champ sont similaires à ceux obtenus par la mesure en température.

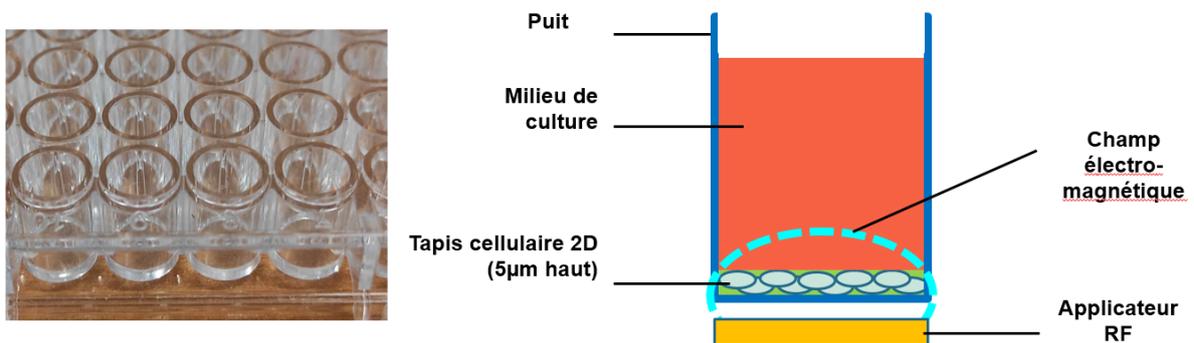


Figure 42: Schéma de principe de l'exposition dans la configuration de notre applicateur RF avec un tapis cellulaire en fond de plaque à puits

Sur le schéma Figure 42, j'ai représenté la situation de l'exposition sur le tapis cellulaire situé en fond de plaque à puits, le milieu de culture et le champ électromagnétique produit par l'applicateur RF. Ce schéma n'est pas à l'échelle : la hauteur du puits est de 11mm, son diamètre

de 6mm et la hauteur du tapis cellulaire de 5 $\mu$ m. Notre objectif est donc de mesurer l'échauffement généré en fond de puits, dans le tapis cellulaire..

## 5) Dosimétrie numérique

Avant toute chose, nous voulons modéliser notre dispositif sur un logiciel de simulation électromagnétique. Cette modélisation nous fournit des données instructives sur le comportement de notre dispositif ainsi qu'une première prédiction du DAS. Nous présenterons les mesures expérimentales du DAS dans la partie suivante celle-ci.

### a) Modélisation 3D

Nous avons décidé de modéliser notre dispositif sur un logiciel de simulation électromagnétique, HFSS de chez Ansys. La simulation du comportement de notre applicateur RF a de nombreux avantages et permet de servir de base pour sa caractérisation. On peut rapidement faire varier les paramètres comme la fréquence, la puissance, les dimensions etc... et donc avoir une première vision du comportement de notre dispositif. De plus ce logiciel est doté d'une fonctionnalité qui nous permet d'accéder directement au DAS. On pourra donc comparer par la suite nos modélisations avec les valeurs expérimentales obtenues à partir de l'incrément thermique.

En amont nous avons travaillé avec Ali Moscatiello sur la modélisation des applicateurs simples et du doublet. J'ai continué ces travaux pour les adapter à ma configuration en îlot : à savoir deux doublets côte à côte.

Nous allons donc simuler un îlot complet incluant les puits situés autour. Voici les différents éléments que nous avons modélisé pour la simulation :

- Le connecteur SMA alimenté par la source d'excitation
- Le PCB contenant deux doublets RF en formation îlot, composé d'une couche de FR4 entre deux couches de cuivre reliées par des vias
- La plaque à puits en polystyrène d'après les dimensions de la datasheet. Elle est positionnée à 200 $\mu$ m au-dessus du PCB dans les simulations qui suivent. En effet dans de précédents travaux nous avons estimé un gap d'air entre 100 $\mu$ m et 200 $\mu$ m. Nous verrons par la suite que cet écart a été sous-estimé.
- Le liquide situé dans tous les puits modélisés (puits illuminés et voisins). Nous avons défini la hauteur de liquide correspondant au volume de 100 $\mu$ L que l'on a choisi.
- Une boîte d'air contenant tout ce qui précède.

On associe à chacun de ces éléments un matériau qui a ses propres caractéristiques intrinsèques, notamment diélectriques. Nos modélisations doivent être effectuées dans les mêmes conditions que les tests, et on sait que la permittivité diélectrique d'un milieu dépend de sa nature, de la fréquence d'exposition mais aussi de la température. Nous détaillerons la démarche mise en œuvre pour déterminer la permittivité du DMEM à 37°C dans le Chapitre 3 3)c).

Sur la Figure 43 est représenté notre modèle 3D d'étude :

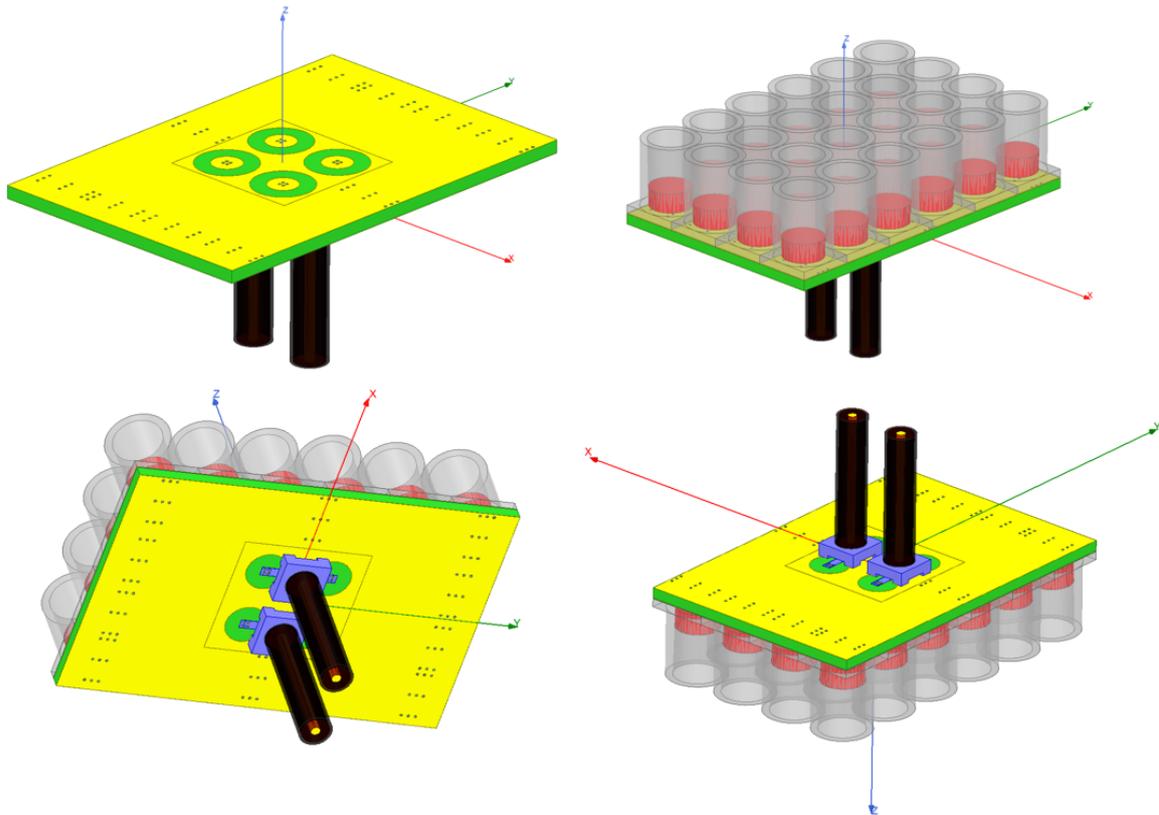


Figure 43: Modélisation 3D d'un îlot de la plateforme d'exposition RF avec puits remplis de DMEM

Sont représentés en jaune les parties métalliques de notre plateforme. On y distingue au centre les 4 applicateurs formant l'îlot. Nous avons modélisé les puits selon la datasheet de la plaque à puits utilisée (Costar Corning Incorporated 3596). Ils sont remplis de 100 $\mu$ L de DMEM (cylindre de hauteur correspondant au volume souhaité). Sur la partie inférieure nous avons modélisé les connecteurs SMA avec lesquels nous assignons les excitations.

Nous avons fixé 3 paramètres qui nous permettront de caractériser notre dispositif :

- L'efficacité : DAS maximal ramené à 1W (30dBm) de puissance en entrée au niveau des connecteurs SMA. C'est un paramètre qui nous permet de normaliser notre valeur du DAS par rapport à une référence, ici une puissance de 1W. On l'exprime en (W/kg)/W.
- L'homogénéité : variation du DAS dans un rayon de 2mm autour du centre du puits illuminé. En effet pour notre méthode d'analyse biologique par LUCS, la zone observée est un disque de rayon 2mm autour du centre. Au-delà de ce disque on ne fait pas d'analyse pour s'affranchir des effets de bord qui pourraient avoir lieu aux extrémités du puits (reflets, tapis cellulaire moins homogène)
- L'isolation : rapport entre le DAS maximal dans le puits illuminé et le DAS maximal dans les puits voisins. C'est une donnée importante qui nous permettra de justifier ou non l'écart laissé entre les zones où sont situées les applicateurs et les contrôles biologiques.

Ces paramètres seront aussi analysés de manière expérimentale, on pourra donc les comparer aux simulations.

Notre zone d'intérêt est le fond du puits où se situe le tapis cellulaire sur lequel nous appliquons notre champ électromagnétique. Pour ce faire nous avons fixé un plan horizontal à  $5\mu\text{m}$  au-dessus du fond des puits (dans le milieu de culture donc) pour y déterminer le DAS.

## b) Analyse du DAS maximal, de l'homogénéité et de l'isolation

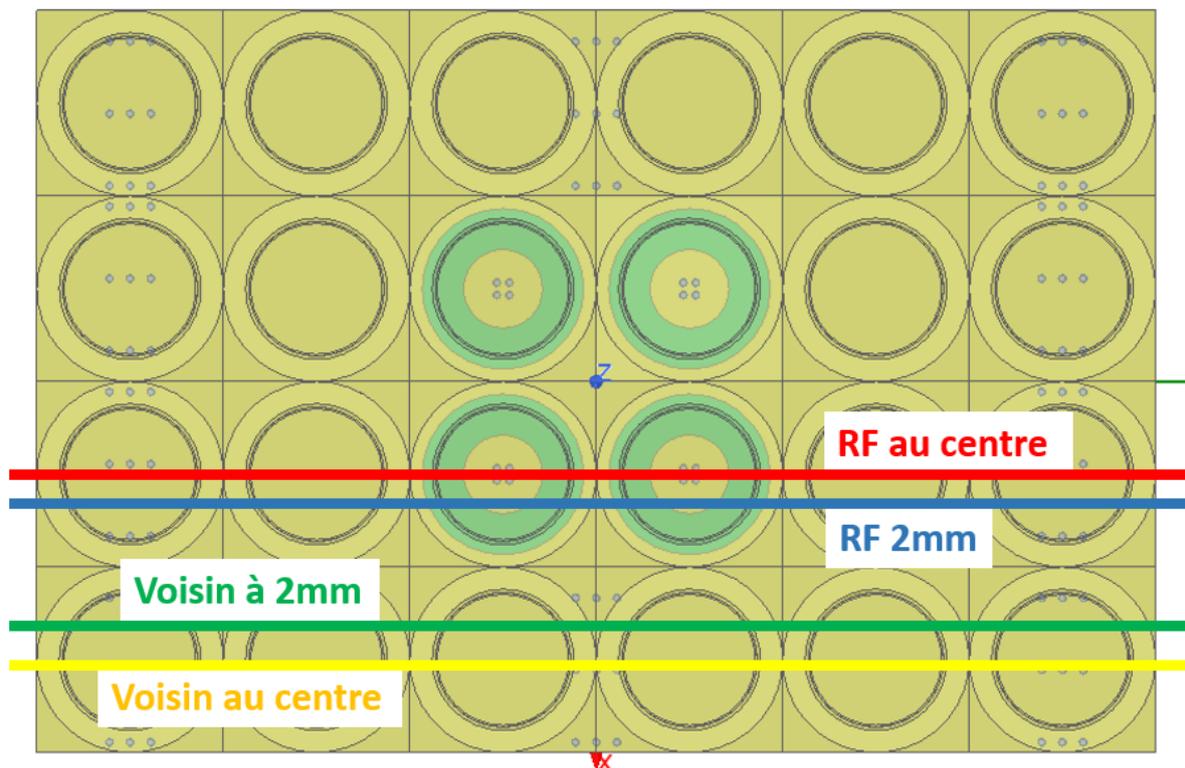


Figure 44: Vue de dessus du modèle 3D avec différentes lignes d'analyse du DAS situées à  $5\mu\text{m}$  au-dessus des applicateurs RF

Nous allons déterminer le DAS suivant 4 lignes qui nous permettront d'estimer les caractéristiques de notre dispositif (Figure 44). Ces lignes passent dans le DMEM, à  $5\mu\text{m}$  au-dessus du fond de puits. La première (en rouge) coupe les puits exposés au RF en leur centre. Une deuxième coupe les puits exposés mais cette fois ci, désaxée à 2mm (ligne bleue). Enfin les deux autres lignes nous permettent d'avoir les valeurs du DAS dans une rangée voisine désaxée à 2mm en direction des puits exposés alimentés par les RF (verte) et une autre centrée sur les puits voisins (jaune).

Ci-dessous la répartition du DAS à  $5\mu\text{m}$  du fond des puits selon les plans (Oxy) (vue de dessus Figure 45) et selon (Oyz) (vu de côté Figure 46). La fréquence de simulation est fixée à 2,3 GHz.

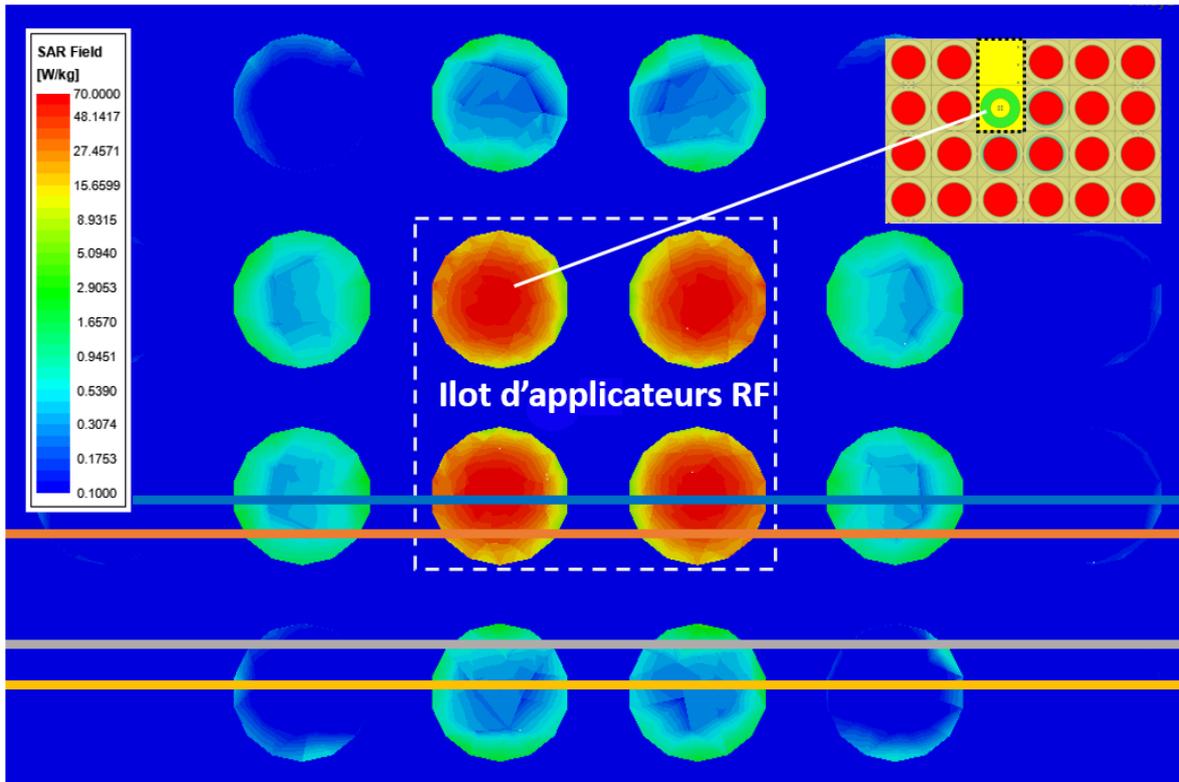


Figure 45: Répartition du DAS dans le plan à  $5\mu\text{m}$  au dessus des applicateurs RF

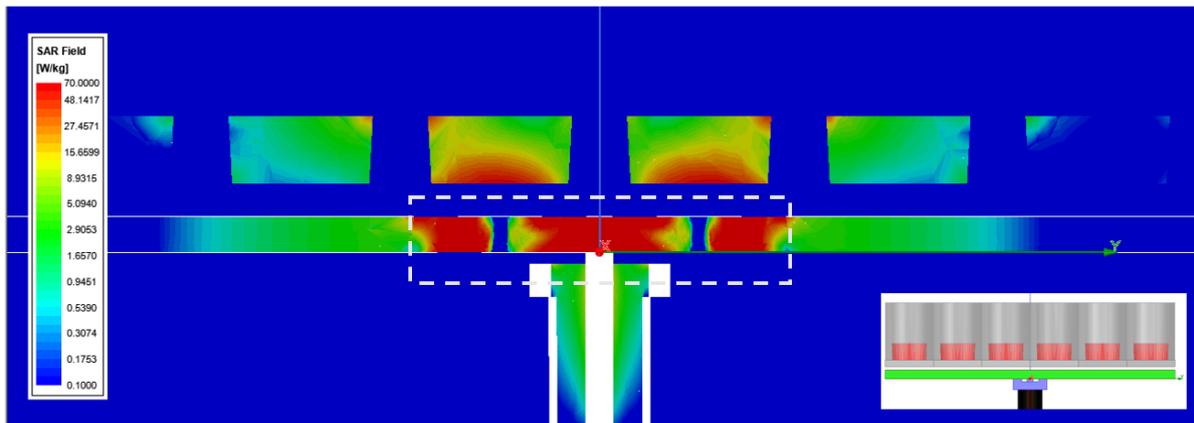


Figure 46: Répartition du DAS en coupe par le milieu des applicateurs RF

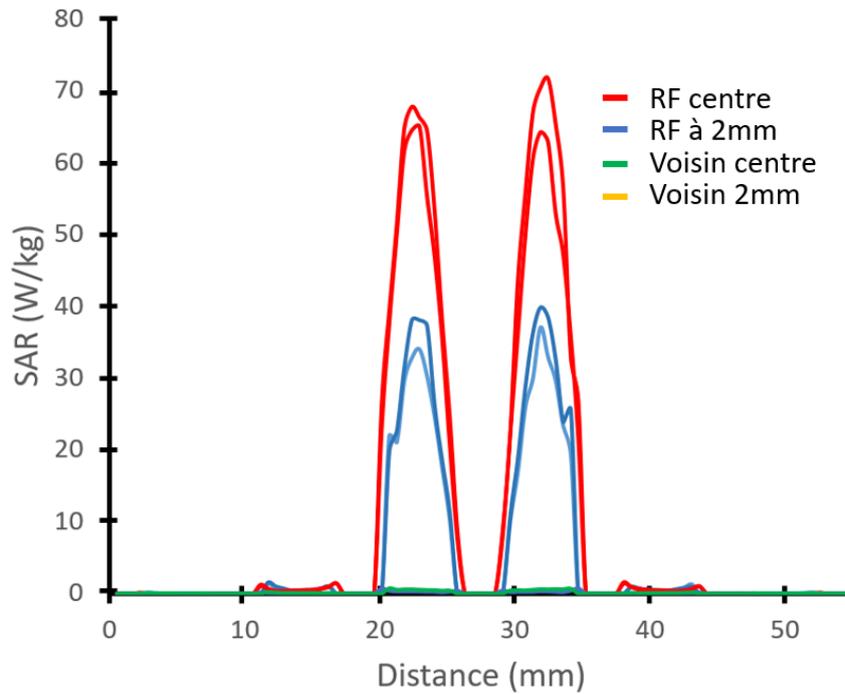


Figure 47: DAS simulé sur les lignes précédemment évoquées

Sur la Figure 47 on a tracé le DAS selon les lignes présentées dans la figure X. Les valeurs maximales de DAS sont obtenues au centre des puits exposés (67,1 W/kg). A 2mm du centre, le DAS diminue d'environ un facteur 2. (37,3 W/kg). Comme les valeurs au niveau des puits voisins sont très faibles, on va tracer ce graphique en échelle logarithmique pour se rendre compte de ces écarts. (Figure 48)

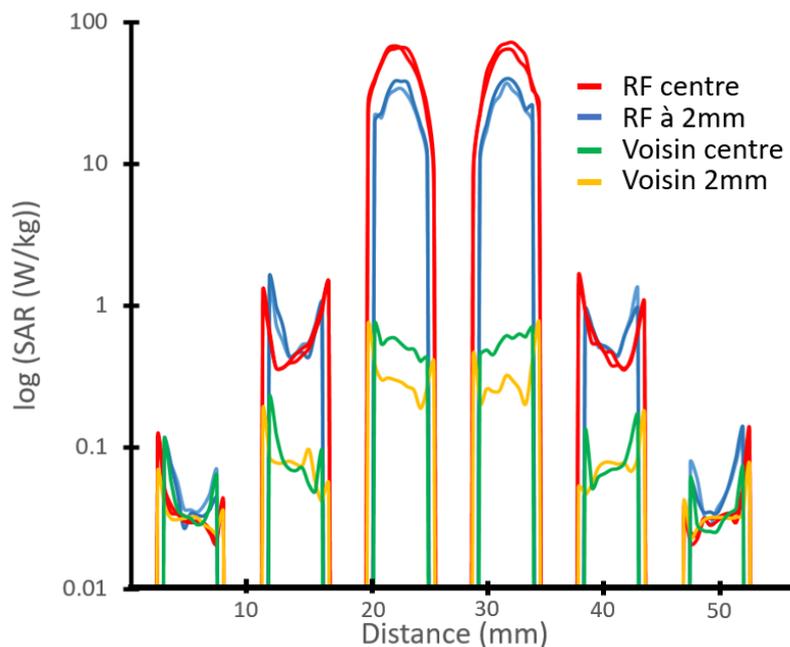


Figure 48 : DAS en simulé sur les lignes précédemment évoquées en échelle log

On voit que le DAS dans les puits voisins est également moins homogène, mais les valeurs restent très faibles. Elles diminuent quand on s'éloigne de la source RF. On remarque aussi des

effets de bords plus marqués pour les puits exposés. Pour nos comparaisons on ne tiendra pas compte de ces effets de bord. Les valeurs de DAS obtenues dans les voisins se situent aux alentours de 0,7 W/kg.

Tableau 12: Bilan des valeurs selon les critères de caractérisation définis : efficacité, homogénéité et isolation déterminés de manière numérique

<b>Efficacité</b>	<b>67,1 ± 3,1 W/kg pour 1W appliqué</b>
<b>Homogénéité</b>	<b>55% du DAS max à 2mm</b>
<b>Isolation</b>	<b>&lt;1% du DAS max dans les puits voisin</b>

L'efficacité obtenue d'après la simulation est très élevée comparée aux travaux que nous avons vu dans la littérature [117]. L'homogénéité est cependant moins bonne, le DAS diminue quasiment de moitié sur 2mm. Quant à l'isolation elle est très bonne, le DAS dans les puits voisins vaut le centième de celui des puits exposés. Nous allons maintenant vérifier expérimentalement, si les valeurs des simulations correspondent avec la réalité.

## 6) Dosimétrie expérimentale

### A) Principes généraux mis en œuvre

#### a) Caractérisation par échauffement thermique

Comme évoqué précédemment, nous allons déterminer le DAS en mesurant expérimentalement l'incrément thermique provoqué par les ondes RF.

Le graphique exposé en Figure 49 est le résultat d'une acquisition faites avec le protocole décrit juste après. Comme vu précédemment on remarque tout d'abord un palier de 180s à 37°C. En effet nous attendons que le système soit stabilisé à une température constante pour lancer l'expérience. On va ensuite enclencher les ondes RF produites par le synthétiseur et instantanément la température va augmenter de manière quasi linéaire. C'est la portion de courbe d'intérêt qui va nous amener à la valeur du DAS. A partir de 300s (2min d'application de RF), on voit une diminution lente de la pente, associée aux échanges thermiques qui rentrent en jeu et deviennent majoritaires. Enfin la courbe va se stabiliser à une valeur limite d'équilibre thermique.

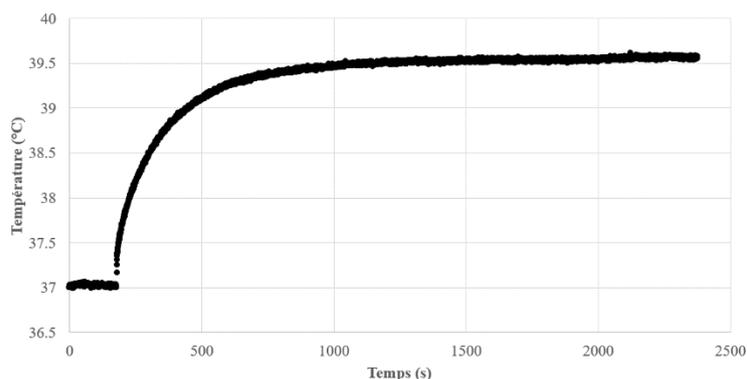


Figure 49 : Profil thermique relevé expérimentalement lors de l'application des ondes RF sur un liquide

Cette acquisition est réalisée sur 40min. Pour la caractérisation du DAS de notre dispositif on ne va pas attendre la stabilisation en température de la courbe pour nos mesures : 10min suffisent amplement pour déterminer le DAS à partir de la tendance à l'origine. On garde tout de même une dizaine de minutes pour avoir assez de points afin que le modèle mathématique de régression soit correct. On détaillera le modèle choisi plus en détail partie 6)B)c). On gagne ainsi du temps pour l'acquisition, et la température du milieu redescend plus rapidement permettant des mesures successives avec un temps d'attente plus faible entre chaque acquisition.

## b) Problématiques liées à la détermination expérimentale du DAS dans notre configuration

Le principe est simple. On utilise un capteur de température que l'on va placer dans notre puits rempli de 100 $\mu$ L de DMEM, de manière orthogonale au fond de puits, et au maximum en contact avec le fond du puits, zone d'intérêt ou sera situé le tapis cellulaire.

On voit apparaître ici deux paramètres importants qui dépendent de notre configuration d'exposition :

- Le capteur en température : quel type de capteur allons-nous choisir pour avoir la meilleure mesure dans nos conditions de test. Un comparatif de deux type de capteurs usuels sera détaillé dans la partie 6)B)b). Dans cette partie nous allons décrire nos mesures avec un capteur type fibre optique OTG420M de chez OPSENS.
- La position de ce capteur : comment maintenir efficacement notre capteur dans une position stable, en centre et fond de puits ?

Auparavant nous utilisions des micro-positionneurs pour maintenir la sonde FO. Encombrants dans l'incubateurs, difficilement manipulables, et n'ayant pas une prise solide sur la FO ce n'était clairement pas le support idéal pour nos tests. J'ai alors eu l'idée de simplifier ces supports pour les adapter à la plaque à puits. Avec l'aide de Julie Foncy du multifab du LAAS-CNRS, une plateforme dédiée à l'impression 3D en résine, ainsi qu'Ali Moscatiello qui rencontrait la même problématique pour ses tests, nous avons développé un dispositif simple et efficace. C'est une sorte de bouchon que l'on pose au-dessus du puits. Ce bouchon est pourvu d'un trou aux dimensions de la FO dans lequel on y glissera cette dernière. (Figure 50) La sonde étant rigide elle se situera perpendiculairement au fond du puits. De plus on sait qu'elle est en

fond de puits lorsqu'on arrive en butée. On peut alors fixer la position de la sonde avec un bout de parafilm qui vient joindre le bouchon à la partie supérieure de la sonde. Après plusieurs prototypes et une optimisation des dimensions de la bordure du bouchon ainsi que du diamètre de l'orifice nous avons validé la conception de ce support de capteur thermique. Comme évoqué précédemment dans la partie simulation numérique, on souhaite déterminer l'homogénéité de notre dispositif, à savoir le DAS dans un rayon de 2mm autour du centre. L'avantage des supports développés c'est que l'on peut réaliser l'orifice à 2mm du centre, et cela devient enfantin de positionner notre sonde dans la position voulue. Nous avons donc réussi à optimiser le positionnement de notre sonde, faciliter la mise en place de la mesure et gagner énormément de place dans l'incubateur.

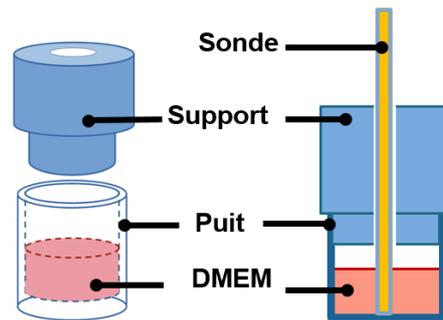


Figure 50: Schéma de principe du support permettant l'adaptation d'un capteur thermique au puits

Ce type de bouchon a aussi été adapté pour les applicateurs 24 puits que nous avons évoqués plus haut aux dimensions de la plaque à puits associée. (Figure 51)



Figure 51: Images des bouchons 96 puits et 24 puits imprimés en résine

Nous avons désormais un banc RF permettant d'exposer aux ondes RF le liquide contenu dans les puits de plaque. Nous avons intégré un capteur en température largement utilisé dans la

littérature et développé un système de support adapté à nos conditions d'exposition. Il nous faut maintenant un protocole d'exposition ainsi qu'une méthode d'analyse des données thermiques recueillies.

### c) Protocole d'exposition pour la détermination du DAS

Nous avons défini les conditions d'exposition comme suit :

- La fréquence est fixée à 2,3 GHz,
- Mode d'exposition en CW,
- Puissance en entrée d'applicateur RF peut varier en fonction des mesures que l'on souhaite effectuer, mais généralement on se place entre 21 dBm et 33 dBm,
- Les puits exposés ainsi que les voisins sont remplis avec 100 $\mu$ L de milieu de culture,
- On se place en incubateur à 37°C, humidité >90% et 5% de CO<sub>2</sub>.

Avec ces conditions nous allons suivre le protocole suivant. Dans un premier temps on remplit les puits avec le milieu de culture et on place la plaque sur notre PCB contenant les applicateurs RF. On positionne ensuite sur ce puits notre support bouchon muni de la fibre optique. Le bouchon est maintenu sur le puits par un fin liserai de parafilm qui borde le rebord du bouchon. On vient enfoncer la fibre optique jusqu'à arriver en contact avec le fond du puits. On ferme l'incubateur et on lance une première acquisition de la température : cela nous permet de savoir quand la température sera stabilisée. Une fois l'incubateur et le liquide des puits arrivés et stabilisés à 37°C on peut lancer l'expérience. On déclenche un minuteur de 3 minutes en même temps que l'acquisition en température. De ce fait on aura un palier à 37°C qui nous permettra de bien visualiser l'enclenchement des RF. Arrivé au bout de ces 3min on enclenche les RF. On observe alors le début du phénomène décrit précédemment, la température monte rapidement. Au bout de 10 minutes, on stoppe l'acquisition de la température puis on arrête les RF. Nous avons en fin de compte le profil thermique souhaité avec un palier de 3min à 37°C.

Pour l'analyse de la courbe et donc la détermination du DAS, plusieurs méthodes sont envisageables. Elles seront évoquées dans la partie 6)B)c)

## B) Optimisation des matériels et techniques de traitement de données

### a) Choix des capteurs en température

Dans la littérature on retrouve de nombreux type de capteurs en température pour la détermination du DAS, on y retrouve notamment :

- Les caméras infrarouges [133],
- Les cristaux liquides thermochromiques [134],
- Les capteur electro-optique fibrés [135],
- Les thermocouples [136],
- Et les sonde à fibre optique que nous utilisons habituellement dans l'équipe. [127]

Compte tenu de notre savoir-faire avec les fibres optiques nous avons choisi un capteur répondant à un cahier des charges similaire, à savoir en contact avec le liquide, avec de faibles dimensions, pratique d'utilisation et pouvant s'adapter aux bouchons support que nous avons développé. Notre choix s'est orienté vers les thermocouples. Nous avons choisi de comparer ces deux types de capteurs pour évaluer leur réponse dans le cadre de nos mesures.

Nous allons nous intéresser ici à la comparaison entre le modèle de fibre optique (FO) OTG420M de chez OPSSENS et les thermocouple (TC) 75 $\mu$ m de chez RS component (Figure 52).

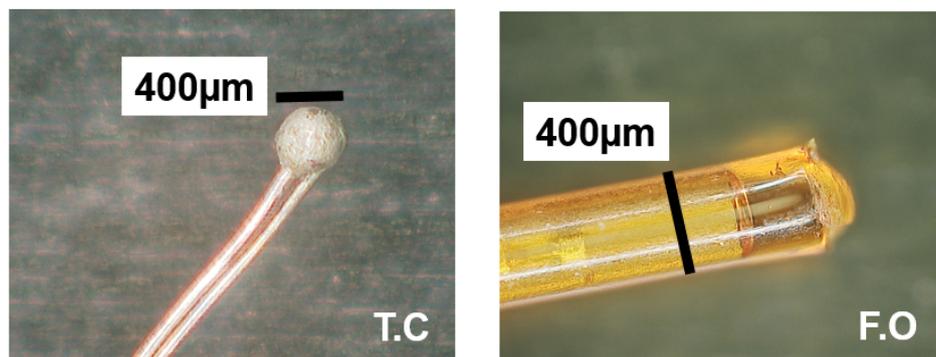


Figure 52: Image à fort grossissement du TC et de la FO

Cette fibre optique est dotée d'un cristal de GaAs (Arséniure de Gallium) et utilise la technologie de bande interdite sensible à la température du cristal. Elle est conçue spécialement pour des environnements énergétiques sous haut voltage ou interférence électromagnétiques. Elles sont censées résister aux perturbations microondes d'après les données du fabricant. Cette sonde est considérée comme l'un des plus petits capteurs optiques du marché avec un diamètre de 420 $\mu$ m (pouvant aller jusqu'à 120 $\mu$ m sur d'autres modèles de la gamme). Une gaine en polyimide protège ce cristal. Le temps de réponse annoncé est de 200ms pour une fiabilité de 0.8°C.

Le thermocouple choisi est l'un des plus petit du catalogue Radiospare component. Son diamètre de 75 $\mu$ m fait de lui un capteur extrêmement sensible. C'est un thermocouple de type K, en Chrome et Alumel. Cependant il est assez difficile à manipuler tel quel. Les câbles du diamètre d'un cheveu ainsi que la liaison à l'extrémité sont très fragiles : ils ne sont pas utilisables sans un conditionnement préalable. Pour cela j'ai utilisé de la gaine thermorétractable. En glissant le TC dans la gaine puis en chauffant on arrive à protéger les câbles tout en leur apportant une rigidité similaire à celle de la FO. Grâce à cette rigidité apportée par la gaine, le TC sera guidé et maintenu de manière rectiligne dans le bouchon support pour arriver de la même manière que la FO en fond de puits. Le protocole présenté à la Figure 53 détaille la mise en place de cette gaine thermo rétractable sur le TC.

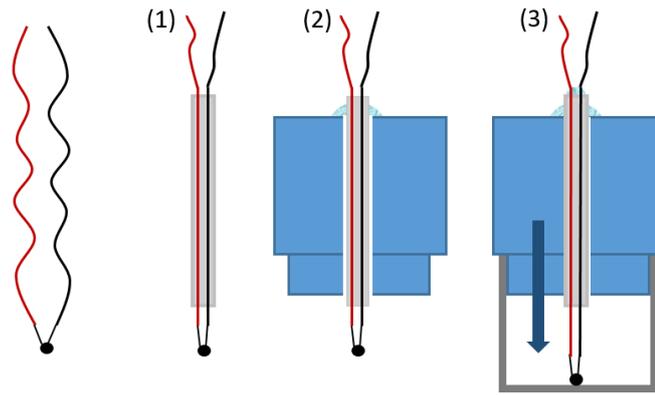


Figure 53: Schéma de la méthode de préparation du TC dans la gaine thermorétractable

- (1) : placer l'extrémité du thermocouple dans une gaine thermo rétractable de diamètre 3/64 et d'environ 3 cm de longueur. Laisser dépasser quelque cm du thermocouple. Puis chauffer afin que la gaine se rétracte.
- (2) : Glisser le TC dans le bouchon support de sorte que la gaine dépasse des deux côtés (environ 5mm côté capteur). Puis coller la gaine au bouchon par un point de colle cyanolite.
- (3) : une fois la colle sèche, positionner le bouchon sur le puits et le maintenir (Figure 54). Faire glisser délicatement le TC dans la gaine pour arriver jusqu'en contact avec le fond du puits. Une fois dans cette position : coller les cables du TC à la gaine pour fixer l'ensemble.
- Enfin vérifier plusieurs fois qu'en repositionnant l'ensemble support + TC, l'extrémité du TC vienne en contact avec le fond du puits. (Figure 54)

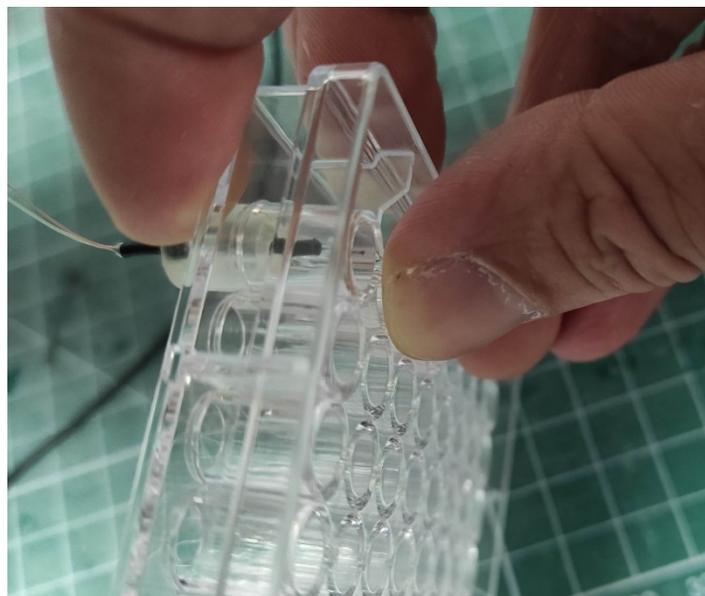


Figure 54: Positionnement final du TC avec le bouchon dans le puits : l'extrémité du TC vient en contact avec le fond du puits

Concernant la FO aucune préparation préalable n'est nécessaire, il suffit de la glisser dans le support.

Les capteurs sont désormais prêts à être utilisés. (Figure 55)

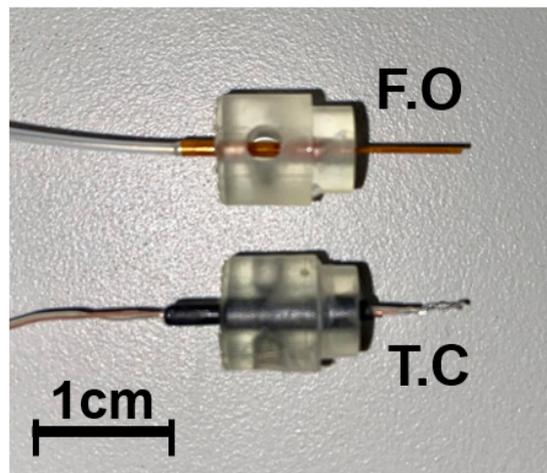


Figure 55: FO et TC adaptés sur bouchon support pour la mesure thermique

Ces capteurs ont leur propre conditionneur de signal. Bien entendu les caractéristiques de ce conditionneur doivent être prises en compte pour le choix final.

Concernant les thermocouples nous avons opté pour un boîtier national instrument NiCDAQ9181, un module spécifique pour les thermocouples possédant 8 entrées (Figure 56 (a)). Nous avons recruté un stagiaire d'IUT GE2I pour développer le logiciel d'acquisition. Ce logiciel nous permet de faire jusqu'à 4 acquisitions en simultané. La fréquence d'acquisition est moins bonne que celle permise par le boîtier opsens.

La fibre optique se connecte à un boîtier développé par la même société OPSENS. C'est un boîtier avec deux entrées, on peut y brancher deux sondes OTG-420M. (Figure 56 (b)). Il se connecte via un câble ethernet au PC et se pilote avec un logiciel d'acquisition. Sa fréquence d'échantillonnage peut aller jusqu'à 1000 Hz, soit 1 mesure toute les 1ms. Le logiciel est plutôt facile d'utilisation, permet de régler un offset sur la température, gérer la fréquence d'acquisition et faire des enregistrements de quelques secondes jusqu'à des dizaines d'heures. Les fichiers générés sont des .txt que l'on peut traiter sur matlab ou excel.

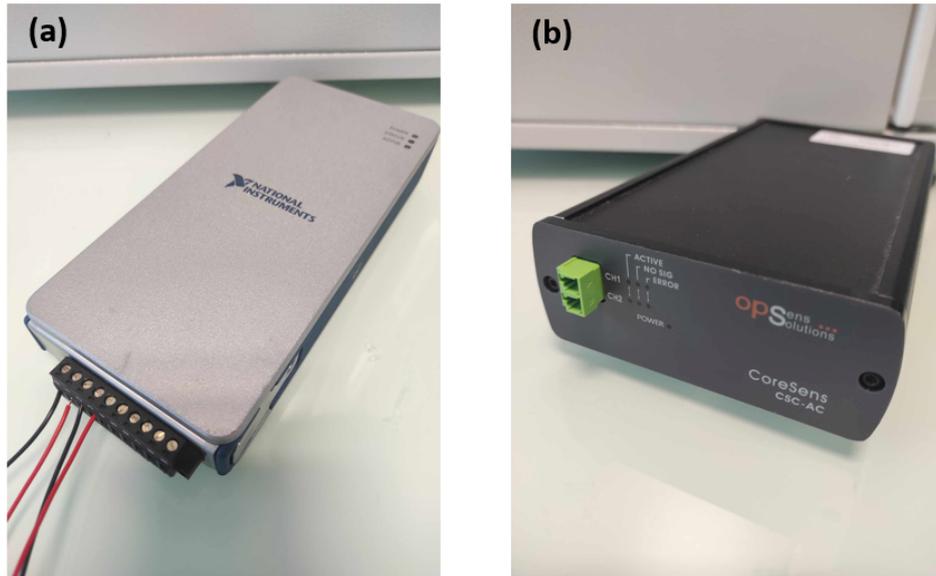


Figure 56: Modules d'acquisition a) pour TC b) pour FO

### b) Comparaison TC/FO pour la détermination du DAS

Pour notre comparatif nous allons donc évaluer les performances des couples capteur/conditionneur de signal pour les deux systèmes de mesure en température.

Pour ce faire nous allons nous placer dans les conditions expérimentales réelles, c'est-à-dire comme décrites plus haut dans 3)b)ii). On choisit une même temps d'échantillonnage pour les deux capteurs, soit 500ms entre chaque mesure. Nous pouvons descendre en dessous de cette fréquence d'acquisition pour les deux capteurs, cependant nous avons choisi une fréquence plus élevée pour les comparer dans des conditions similaires. Cette résolution est suffisante pour nos tests.

Voici en Figure 57 un synoptique de notre banc de test, comportant les deux sondes thermiques en parallèle :

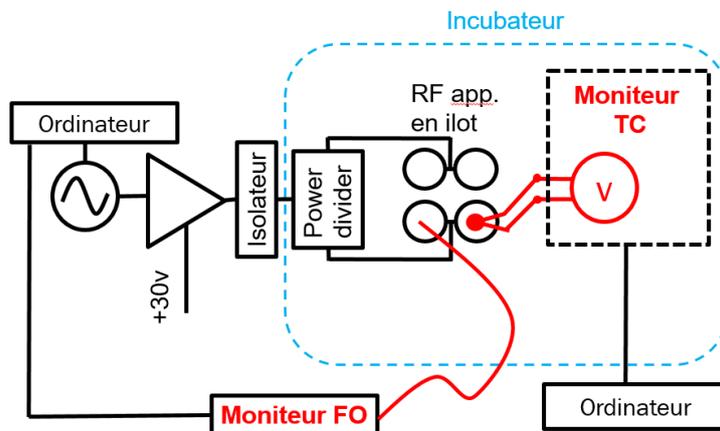


Figure 57: Synoptique du banc de test incluant les deux moyens d'acquisition en température

La chaîne RF comprenant le générateur de signal, l'amplificateur et l'isolateur ainsi que l'alimentation de l'amplificateur est placée hors de l'incubateur. Le moniteur de FO est placé à l'extérieur de l'incubateur car la longueur de câble des fibres le permet contrairement aux thermocouples plus courts. Le module d'acquisition NI est quant à lui placé dans l'incubateur. Nous alimentons un îlot composé de deux doublets grâce à un diviseur de puissance 1→8, dont les 6 ports inutilisés chargés sur 50 ohms. Les 4 puits illuminés ainsi que les 12 premiers voisins sont pourvus de 100μL de DMEM. La FO ainsi que le TC sont positionnées sur deux des puits à l'aide des support bouchons imprimés en 3D. La fréquence choisie est 2,3 GHz, en mode CW pour une puissance en bout de chaîne de 0,5W.

Nous allons donc étudier le profil thermique des puits formant l'îlot avec deux sondes placées en parallèle. Nous réalisons 4 mesures successives, en remplaçant les sondes dans un des puits de l'îlot. Avec 4 mesures, nous aurons couvert les 4 applicateurs de l'îlot avec chacune des sondes. La courbe présentée sur la Figure 58 est la moyenne de ces 4 mesures :

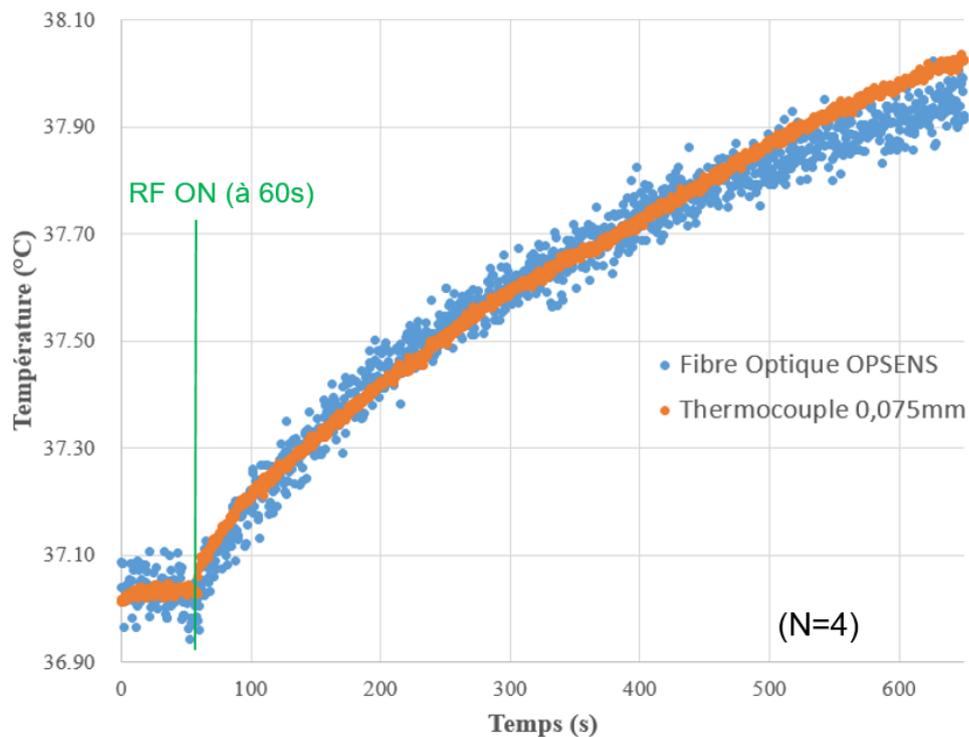


Figure 58: Profil thermique relevé par les deux capteurs : moyenné sur 4 mesures

Tableau 13 : Valeur des DAS obtenus d'après les profils thermiques mesurés

Type de capteur	Fibre optique	Thermocouple
DAS (W/kg), avec n=4	<b>25,6 ± 2,5</b>	<b>23,9 ± 1,6</b>

Le Tableau 13 ci-dessus présente les valeurs de DAS obtenus d'après les profils thermiques de la Figure 58. On observe au premier abord des valeurs très similaires dont les différences semblent non significatives. La tendance des courbes associées au phénomène ne dépend pas du type de capteur utilisé. On remarque tout de même que les courbes commencent à diverger au bout de temps longs (après 40s). Le signal est beaucoup plus bruité (facteur 10) pour la fibre

optique :  $\varepsilon(\text{FO})=0,2^\circ\text{C}$  >:  $\varepsilon(\text{TC})=0,025^\circ\text{C}$ . De ce fait en zoomant sur le temps ou les RF sont enclenchées (Figure 59), on remarque une élévation rapide de la température exactement à 60 secondes pour le thermocouple. Ce temps est plus incertain pour la fibre optique, conséquence du bruit associé à ce capteur.

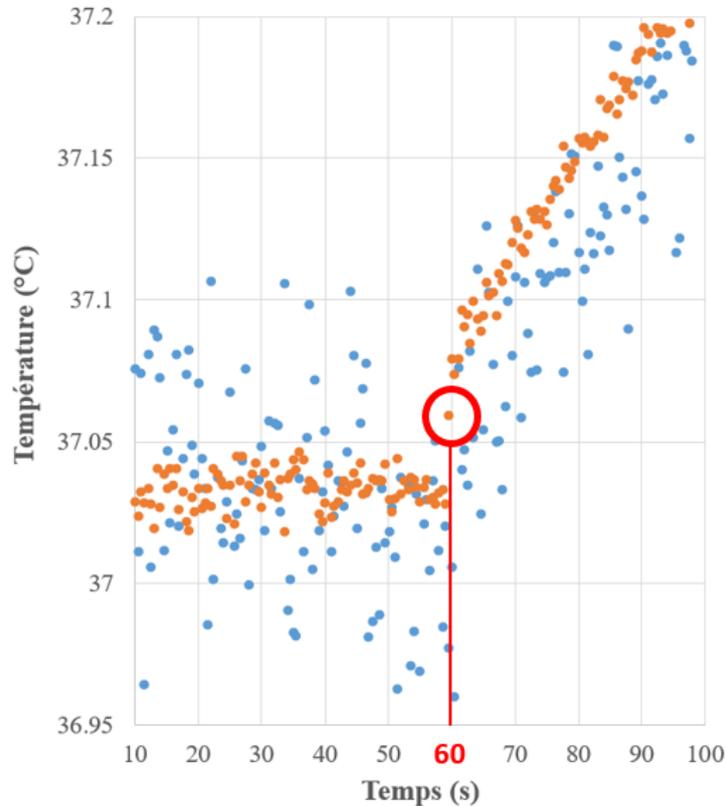


Figure 59: Zoom sur l'enclenchement des RF pour les profils thermiques relevés par TC et FO

Même si le dispositif OPSSENS permet de prendre une mesure toutes les 1ms, cela est inutile dans notre cas car le bruit est trop important. De toute manière le temps de réponse de la FO est de l'ordre de 200ms, il serait donc inutile de prendre une mesure toute les millisecondes. Le bruit et la dispersion des points mesurés sont nettement plus faibles pour le thermocouple ce qui nous permet de détecter des tendances dans les courbes plus rapidement. C'est très utile pour les événements soudains et sur des temps très court. Par exemple le moment où l'on enclenche les RF. Pour la valeur du DAS, celle de la FO est légèrement supérieure sur plusieurs mesures mais l'écart type est beaucoup plus faible pour le TC qui nous donne des mesures plus répétables.

Finalement pour notre cas, l'utilisation du thermocouple présente des avantages certains sur les fibres optiques. Du fait de sa petite taille il peut réagir rapidement à des changements thermiques et donc détecter avec précision l'enclenchement des RF. Il est aussi très précis et nous permet de réaliser des mesures à faible DAS, donc de petites élévations thermiques, ce qui est impossible avec les fibres optiques du fait du bruit trop élevé. Le coût des fibres optiques est largement supérieur à celui des thermocouple, (300€ contre 10€) ce qui peut être un facteur déterminant si l'on souhaite utiliser de nombreux capteurs simultanément. De même, le module

d'acquisition OPSENS est assez onéreux (3500€ pour les deux voies contre 300€ pour le boîtier NI avec 8 voies). Au niveau de la mise en œuvre de la mesure, les fibres optiques sont tout de même beaucoup plus pratiques. Elles sont robustes comparées aux thermocouples très fins et facilement cassants. De plus le positionnement au travers des bouchons ne nécessite pas de préparation particulière et leur rigidité nous permet un positionnement facile. Le programme fourni avec le module d'acquisition OPSENS est relativement facile d'utilisation et possède de nombreuses options pour l'acquisition des données. Ce qui est suffisant dans le cadre de nos mesures. En revanche, pour des expériences spécifiques, le fait de pouvoir développer un programme LabVIEW adapté peut être un avantage. Par exemple pour synchroniser l'envoi des RF par une commande numérique ou encore pour des protocoles d'exposition aux RF spécifiques (échauffement alterné, switch de TC pour la mesure etc...). Enfin, les profils thermiques et les valeurs de DAS étant similaires pour les deux capteurs, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'influence de la présence du capteur dans le puits pour la mesure du DAS est soit négligeable soit similaire pour les deux capteurs, dans le cadre de notre test. En effet certains défendent l'idée qu'une FO perturbe moins le champ électromagnétique du fait de sa nature non métallique comparé au TC.

### c) Comparaison des méthodes de régression et paramètres d'étude

On va récupérer un profil thermique suite à nos exposition RF, il faut analyser cette courbe pour en déduire le DAS associé. Comme évoqué précédemment le DAS est lié à la pente à l'origine de notre courbe par la formule :

$$DAS = c \cdot \frac{dT}{dt} \text{ quand } t \rightarrow 0$$

La première méthode à laquelle nous avons pensé est une simple régression linéaire. On prend la portion de courbe qui nous semble être linéaire, généralement 40-60 secondes et on réalise une régression linéaire sur cette partie. On vérifie que la régression est bonne avec un  $R^2$  proche de 1 et on calcule le DAS par la formule

$$DAS = \text{pente} \cdot \frac{1}{f} \cdot 4184$$

Avec  $f$  la fréquence et 4184 J/kg la capacité calorifique massique de l'eau. C'est une méthode simple et efficace que l'on peut réaliser sur Excel. Cependant cette méthode nous a rapidement montré ses limites. Le DAS dépend énormément du nombre de point que l'on décide de prendre. Quel est donc le nombre de point à prendre qui se rapproche du DAS réel ? Mais que vaut le DAS réel ? On aurait pu le déterminer par une mesure en champ à partir de laquelle on peut aussi remonter au DAS. Cependant à l'heure actuelle, des capteurs en champ qui auraient permis de mesurer le DAS dans un puits de 6mm n'existent pas sur le marché. Une autre approche aurait pu être de déterminer le DAS réel par les simulations. Cela est risqué et partirait du postulat que la simulation est forcément exacte ce qui est forcément discutable.

Il a fallu chercher d'autres pistes d'analyse de ce profil thermique.

On a développé deux méthodes de régression qui nous permettent aussi d'analyser le profil thermique relevé :

- Une régression avec un polynôme d'ordre 4,
- Une régression par une somme d'exponentielles.

L'avantage de ces deux techniques est qu'elles prennent une plus grande partie du profil thermique. On ne s'est donc pas focalisé sur la partie linéaire, mais considéré la totalité de la courbe sur les 10min, puis avons calculé la dérivée de ce modèle en 0. Avec l'aide d'un stagiaire de l'IUT GE2I, nous avons développé un programme Matlab permettant ces régressions en utilisant des fonctions déjà implémentées dans Matlab.

On a comparé ces deux modèles sur plusieurs temps (5min, 8min et 10min). On a utilisé 8 mesures thermiques dans les mêmes conditions pour cette comparaison. Dans le Tableau 14 on retrouve les moyennes et écarts types de ces mesures pour les différents temps choisis.

Tableau 14: Comparatif des DAS obtenus en fonction de la méthode de régression et de la portion de courbe analysée

Méthode de régression	Polynomiale d'ordre 4	Somme d'exponentielles
DAS (10 min)	<b>11,07 ± 2,15 W/kg</b>	<b>11,54 ± 1,56 W/kg</b>
DAS (8 min)	<b>11,04 ± 3,20 W/kg</b>	<b>11,38 ± 1,84 W/kg</b>
DAS (5 min)	<b>11,03 ± 4,57 W/kg</b>	<b>11,37 ± 1,72 W/kg</b>

On remarque que les moyennes du DAS entre les deux modèles sont quasi identiques et assez répétables peu importe le type de régression utilisé. Cependant le modèle exponentiel semble être plus adapté car l'écart type est bien plus faible et indépendant du nombre de points choisis. Je précise ici qu'on s'est restreint à un temps maximal de 10min, donc que le régime établi en température n'a pas été atteint, mais qu'une grande partie de la courbe ne suit pas un modèle linéaire (qui s'arrête aux alentours d'1min). Plus la fenêtre temporelle est grande moins le modèle de régression va être précis à l'origine, puisque la majorité de la portion de courbe associée au DAS sera de moins en moins importante. Aussi, lors de forte puissance ce phénomène apparaît et il est difficile de bien épouser l'allure de la courbe à l'origine. Il est donc préférable de faire nos calibrations à des puissances raisonnables (0,5 W), et même si les incréments thermiques sont plus faibles, la sensibilité des thermocouples permet de les relever sans problème.

## C) Premières caractérisations

### a) Validation de la méthode de dosimétrie expérimentale

Pour valider notre méthode de dosimétrie expérimentale nous avons défini 3 critères qui nous permettent d'assurer la reproductibilité de nos mesures.

1) Stabilité d'une même mesure. Dans ce cas, le TC est maintenu dans le puits pour chaque mesure. Nous laissons simplement la température revenir à l'équilibre (37°C) après chaque mesure sans intervenir sur la plaque à puits ou le TC. La mesure thermique est alors reproduite 3 fois d'affilé et pour n=3.

2) Variabilité au sein d'une même plaque. La mesure du DAS est faite 3 fois sur 2 ilots différents de la plaque à puits.

3) Variabilité entre deux plaques à puits. Les tests en dosimétrie sont réalisés en parallèle sur deux plateformes d'exposition RF tout en utilisant la même localisation des applicateurs RF.

Avec ces 3 tests, nous avons exploré les biais qui pourraient avoir lieu d'une expérience à une autre. Nous avons ajouté les écarts-types obtenus par ces essais pour obtenir un écart-type global.

Afin de faciliter les expériences, nous avons utilisé une puissance RF incidente au bout des connecteurs de 0.5W, contrairement à la simulation qui était à 1W. Ce choix est justifié pour diminuer l'incrément thermique généré. Ainsi, la température du liquide redescend plus rapidement et minimise le temps d'attente pour réaliser la mesure suivante. De plus, notre modèle mathématique d'extraction de DAS présente une très bonne corrélation avec la courbe expérimentale y compris pour des temps courts et lors de faibles puissances appliquées. Le thermocouple étant très sensible et peu bruité, il est possible de relever les profils thermiques induits par des puissances faibles.

## b) Dosimétrie expérimentale de la plateforme RF développée

Les critères de reproductibilité de nos mesures ont été mesurés expérimentalement et sont résumés dans le Tableau 15. Les écart types globaux sont calculés d'après la formule :

$$\sigma(\text{mean}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i^2}{n}}$$

Nous obtenons ainsi un premier écart type associé à la répétition de 3 mesures identiques ( $\sigma_a=1,41$ ). L'écart type global obtenu pour la variabilité intra ou inter plaque ( $\sigma_b$  ou  $\sigma_c$ ) est une combinaison de l'écart type du paramètre analysé et de celui associé aux 3 mesures répétitives  $\sigma_a$ . Afin de calculer l'écart type intrinsèquement lié aux variabilités inter et intra plaque, nous allons y soustraire l'écart type moyen provenant de la répétition de 3 mesures par la formule :

$$\sigma(\text{var}) = \sqrt{(\sigma_b^2 - \sigma_a^2) + (\sigma_c^2 - \sigma_a^2)}$$

On obtient alors un écart type cumulé lié aux changements de puits ou de plaque de 3,2. Pour obtenir l'écart type global des 3 paramètre analysé on va additionner  $\sigma_a$  et  $\sigma(\text{var})$ ,

$$\sigma(\text{tot}) = \sqrt{\sigma(\text{var})^2 + \sigma_a^2}$$

ce qui nous donne 3,49 soit 13,8 % du DAS moyen mesuré (25,28 W/kg). Nous prendrons donc en compte cette marge d'erreur pour des tests faisant intervenir un changement de puits ou de plaque à puits.

Tableau 15 : Résultats obtenus pour les différentes configurations de test afin d'estimer les erreurs de variabilités

Récapitulatif des SAR en (W/kg) mesurés		Mesure 1 (n=3)	Mesure 2 (n=3)	Mesure 3 (n=3)	Global
Stabilité d'une même mesure	Moyenne	25,75	24,00	26,09	<b>25,28</b>
	Ecart type	1,51	1,4	1,28	<b><math>\sigma_a = 1,41</math></b>
Variabilité intraplaque	Moyenne	24,28	24,73	x	<b>24,5</b>
	Ecart type	3,1	2,16	x	<b><math>\sigma_b = 2,68</math></b>
Variabilité interplaque	Moyenne	24,73	24,96	x	<b>24,84</b>
	Ecart type	2,16	3,06	x	<b><math>\sigma_c = 2,65</math></b>

De même que pour la simulation, nous avons défini des points d'intérêts pour caractériser l'homogénéité et l'isolation de nos applicateurs RF. Ces points sont indiqués sur la Figure 60.

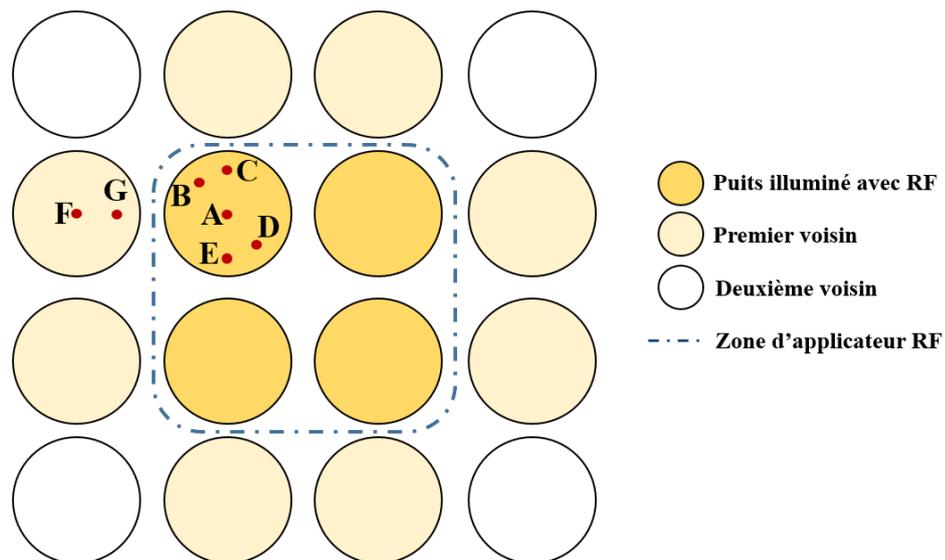


Figure 60: Schéma des différents point d'intérêt à mesurer pour la caractérisation du dispositif

La caractérisation de notre dispositif à une puissance de 0.5W (27dBm) donne les résultats présentés sur la Figure 61 . Nous avons mesuré 3 fois chaque point sur 2 expériences indépendante. Les résultats de la Figure 61 sont les moyennes de 6 mesures.

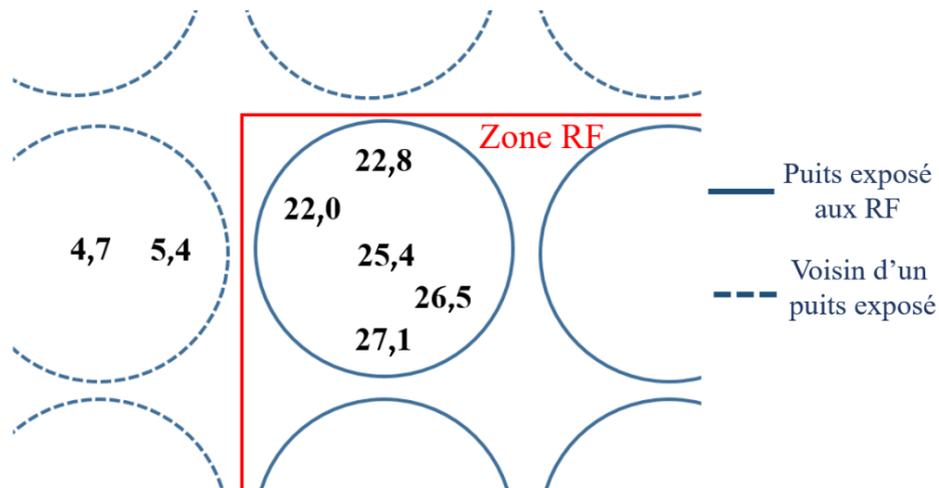


Figure 61: Schéma récapitulatif des DAS moyens obtenus pour les différents points d'intérêt

Nous obtenons un DAS moyen de 24,8 W/kg dans le puits exposé aux ondes RF ce qui correspond à ce que nous avons obtenu dans la partie 6)B)b) avec le thermocouple.

### c) Comparaison des résultats entre dosimétries expérimentale et numérique

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus par simulation du dispositif et de manière expérimentale. Pour les comparer, nous avons ramené les mesures obtenues expérimentalement à 1W en les multipliant par 2. La synthèse des résultats est indiquée dans le Tableau 16 .

Tableau 16 : Tableau comparatif des valeurs du DAS obtenues par dosimétrie expérimentale et numérique

	Exp.	Sim.
Point	SAR (W/kg) for 1W	SAR (W/kg) for 1W
A	<b>50,7 ± 2,8</b>	<b>66,31</b>
B	<b>44,0 ± 2,0</b>	<b>36,75</b>
C	<b>45,6 ± 2,0</b>	<b>37,17</b>
D	<b>52,9 ± 3,7</b>	<b>38,01</b>
E	<b>54,2 ± 3,2</b>	<b>37,59</b>
F	<b>10,8 ± 0,8</b>	<b>1,14</b>
G	<b>9,3 ± 0,6</b>	<b>0,76</b>

Comme précédemment indiqué, l'homogénéité simulée de l'exposition dans un puits illuminé est limitée. La valeur maximale simulée du DAS situé au centre du puits exposé est de 66,31 W/kg, contre une valeur proche de 37 W/kg à 2 mm du centre, soit 55% du DAS maximal. En revanche, la valeur du DAS est fortement diminuée dans les puits voisins non illuminés avec

une valeur de 1,1 W/kg à 2mm du centre du puits, du côté du puits illuminé et 0,8 W/kg au centre du puits voisin, soit 1 % du DAS maximal du puits illuminé. L'isolation obtenue en simulation est donc importante.

Concernant la dosimétrie expérimentale, le DAS maximal relevé se situe au niveau du point E avec une valeur de 54,2 W/kg, ce qui est légèrement inférieur à ce que nous avons estimé par simulation. Néanmoins, l'homogénéité du DAS dans le puits est de 81%, ce qui est bien meilleur que celle obtenue par simulation.

Lorsque nous analysons le DAS mesuré dans les puits voisins, celui-ci est à 10.8 W/kg et 9.3 W/kg aux points F et G respectivement, soit près de 20% du DAS maximal du puits illuminé. D'un point de vue expérimental, l'isolation n'est donc pas aussi bonne qu'en simulation. Le DAS mesuré de l'ordre de 50 W/kg est donc aussi lié aux contributions des applicateurs rayonnants voisins. Malgré cela, notre simulation, qui sous-estime largement les couplages électromagnétiques entre les applicateurs RF, nous donne une efficacité supérieure à celle mesurée. (66,3 contre 50,7 (W/kg)/W ). Nous reviendrons en détail sur les simulations plus tard, dans la partie 5)D)d).

#### d) Bilan de la caractérisation

Un protocole rigoureux et reproductible a été conduit pour caractériser le DAS expérimentalement à l'aide de mesures thermiques. Cette dosimétrie expérimentale nous a permis d'évaluer le DAS au sein d'un puits exposé dans un rayon de 2mm autour du centre. L'homogénéité obtenue est de 81%. Le DAS mesuré dans les puits voisins n'est pas négligeable, contrairement à ce qui est obtenu par simulation. Il est donc pertinent d'éloigner nos îlots à 4 applicateurs RF par deux rangées de puits qui les isolent les uns des autres, afin de pouvoir appliquer différentes valeurs de DAS suivant les îlots considérés, ainsi que la zone de puits dédiée aux contrôles positifs et négatifs biologiques (sans onde RF). Avec cette étude en dosimétrie, il est désormais possible de moduler le DAS souhaité en fonction de la puissance injectée en entrée de chaîne RF et de contrôler l'exposition RF appliquée aux cellules. Cette caractérisation permet d'exposer les cellules avec un système d'exposition RF calibré, et de manière reproductible, quel que soit la localisation des applicateurs sur la plateforme RF, et même d'une plaque à puits à une autre.

### D) Différents enjeux à considérer

#### a) Planéité de la plaque à puits

Au fil des expérimentations nous nous sommes aperçus qu'il y avait une certaine variabilité entre les puits analysés. De plus nos résultats par simulation étaient très éloignés de la réalité. Nous avons donc émis tout un nombre d'hypothèses, dont l'une est que la plaque à puits ou bien notre PCB ne sont pas rigoureusement plans. En effet le gap d'air qu'il peut y avoir entre l'applicateur et le fond de puits agit comme un isolant et donc diminue fortement l'intensité du champ électromagnétique dans le milieu de culture et les cellules dans le puits. Pour cela nous avons utilisé plusieurs techniques afin de caractériser notre plaque à puits, et l'écart qu'il pouvait y avoir avec le PCB.

### *i) Cartographie de quelques puits avec un profilomètre mécanique*

Le profilomètre mécanique Tencor (Figure 62) est un dispositif localisé en salle blanche qui permet de se rendre compte de la planéité de plaquettes. Généralement utilisé pour des mesures de marches avec des épaisseurs allant de 10nm à 300 $\mu$ m, on peut obtenir une cartographie de la surface étudiée. On y retrouve :

- Une tête de mesure
- Un système optique pour observer notre échantillon
- Un plateau mobile sur lequel est fixé l'échantillon
- Un ordinateur assurant le contrôle de la machine et le traitement des mesures

Sur la tête de mesure on retrouve une pointe qui va suivre la surface de l'échantillon. Cette pointe se déplacera de manière rectiligne, et l'on obtiendra la topographie de notre surface le long de cette ligne. Ce dispositif n'est pas adapté pour des objets macroscopiques comme une plaque à puits qui mesure une dizaine de cm. Mais avec l'aide de Benjamin Reig responsable des équipements de caractérisation de la salle blanche du LAAS, nous avons pu analyser une partie de notre plaque à puits.



*Figure 62: Image du profilomètre TENCOR utilisé*

On a ciblé deux aspects à analyser :

- La planéité d'un puits seul, en son fond. Est-il plat, concave convexe ?
- La planéité d'une rangée de puits. Est-ce que le long d'une rangée de puits, le premier puits se situera à la même hauteur en Z que celui situé 3 puits plus loin ?

Pour l'étude de puits seuls nous en avons analysé plusieurs. Pour cela nous plongeons la tête de mesure dans le fond du puits et nous scannons la surface selon une ligne au centre du puits. (Figure 63)

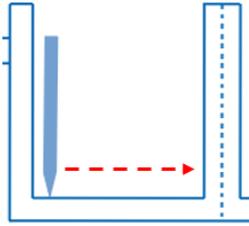


Figure 63: Schéma de la mesure en fond de puits avec le profilomètre

Les résultats nous montrent des formes de profil différentes (Figure 64), certaines sont plutôt plates tandis que d'autres sont concaves. En revanche, les ordres de grandeur en différentiel entre le point le plus haut et le plus bas restent très faibles, de l'ordre de 2 à 4  $\mu\text{m}$ . Il est peu probable que la forme du puits influence autant la répartition du DAS dans le liquide.

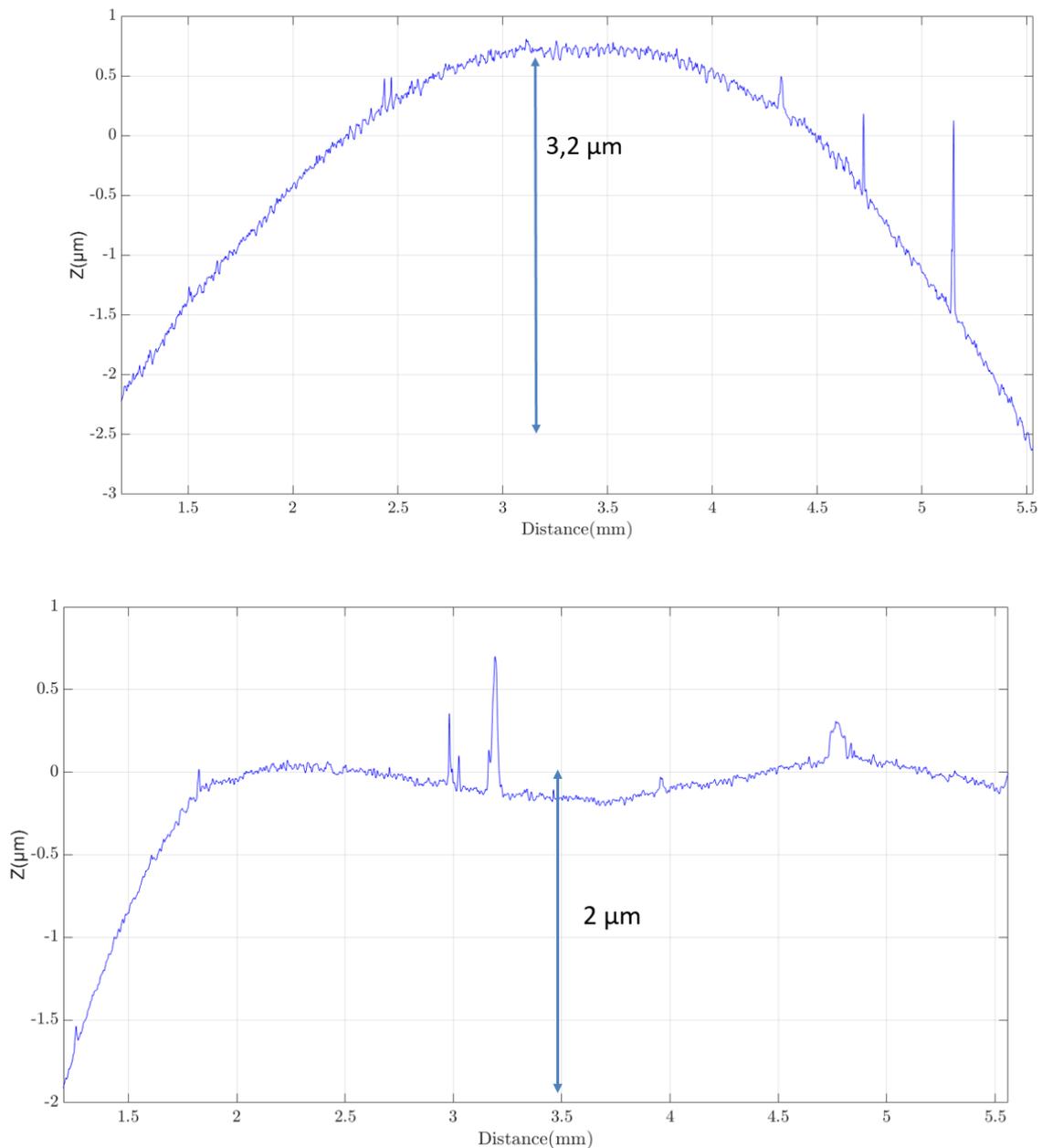


Figure 64: Exemples de mesure obtenue en fond de puits grâce au profilomètre

Nous nous sommes donc intéressés à l'allure de la plaque complète, en scannant sur plusieurs millimètres de rangées ou colonne de puits (Figure 65).

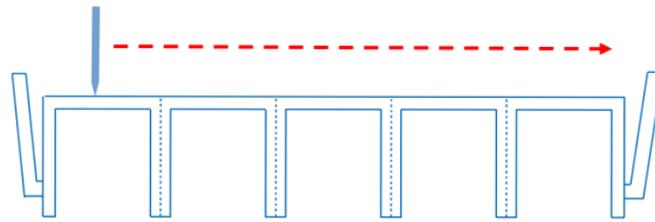


Figure 65: Schéma de la mesure réalisée au profilomètre sur l'arrière de la plaque à puits

La Figure 66 donne le profil obtenu.

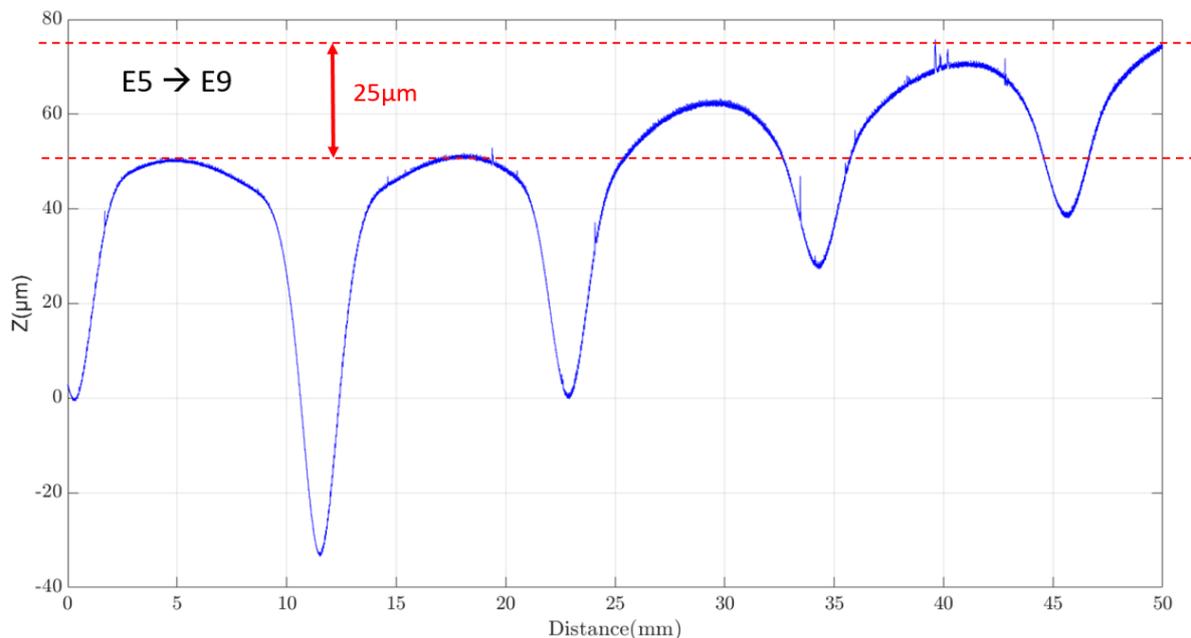
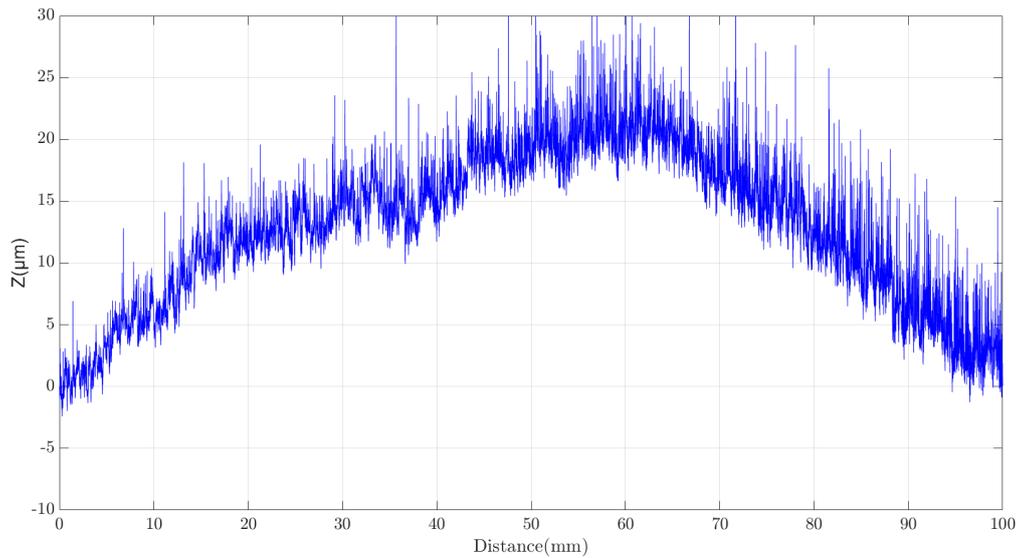


Figure 66: Profil obtenu pour l'arrière de plaque du puits E5 vers le puits E9

Les écarts entre le fond des puits semblent assez importants pour des puits côte à côte. Des variations de 25  $\mu\text{m}$  entre des puits situés sur la même ligne mais à 2 puits d'écart sont observées. On peut donc s'interroger sur la planéité de la plaque si l'on compare des puits très éloignés. Nous utiliserons une autre méthode pour déterminer cette planéité d'un point de vue plus macroscopique, le TENCOR n'étant pas adapté pour ces mesures.

Concernant la plateforme d'applicateurs RF, nous avons utilisé la même technique pour en définir sa planéité. La Figure 67 montre qu'elle est beaucoup plus plane que la plaque à puits, avec un écart d'environ 20  $\mu\text{m}$  sur une dizaine de centimètre. Donc les potentielles variations de mesure du DAS viennent essentiellement de la plaque à puits.



*Figure 67: Profil du PCB contenant les applicateurs RF*

*ii) Cartographie d'une plaque à puits complète à l'aide d'une jauge de mesure Palmer*

Etant limité par l'utilisation du profilomètre mécanique, j'ai essayé une autre technique me permettant de réaliser des tests sur toute la plaque. En effet nous avons vu précédemment que même si le fond des puits est relativement plat, la plaque en elle-même ne l'est pas : les puits situés au centre semblent être plus élevés que les puits de bordures.



*Figure 68: Jauge de mesure PALMER*

Afin de réaliser une cartographie complète de la plaque, nous avons utilisé une jauge de mesure Palmer (Figure 68). Cette jauge sert notamment à mesurer l'épaisseur des plaquettes en salle blanche. On vient lever verticalement une tige métallique mobile que l'on laisse descendre sur notre échantillon : la jauge nous affichera la hauteur de la tige par rapport au 0 défini au préalable. L'utilisation est alors simple pour notre plaque à puits. Nous calibrons le niveau  $Z=0$  sur un des puits, ici un puits d'angle censé être le plus bas. Puis on se déplace sur d'autres puits, on positionne la pointe au centre du puits et on mesure le  $Z$  relatif par rapport au 0 établi. Ainsi en parcourant quelques lignes et colonne nous pouvons établir la topographie de la plaque à puits comme ci-dessous en Figure 69:

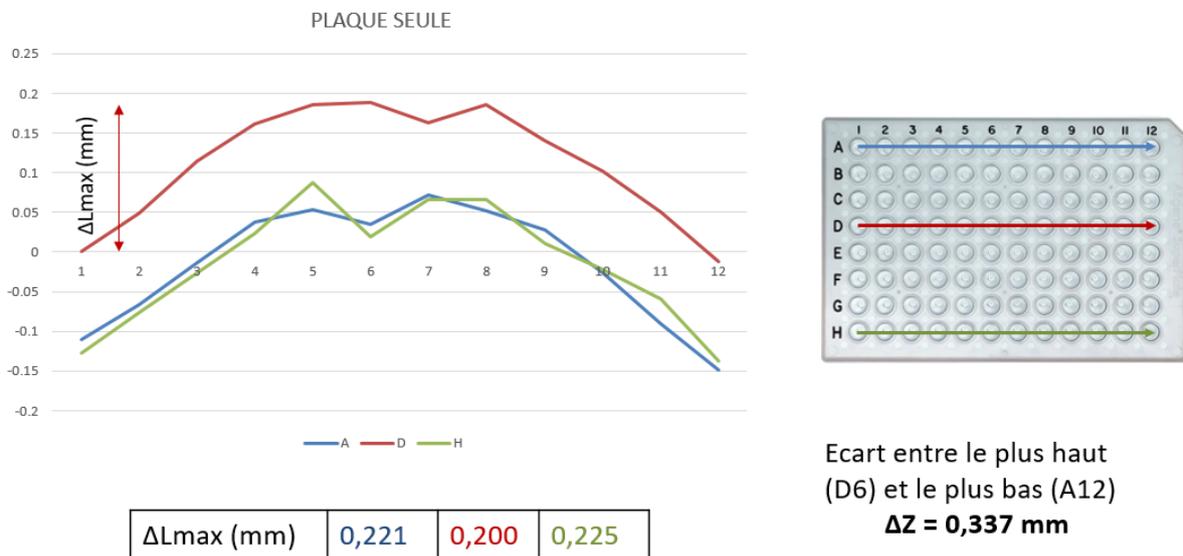
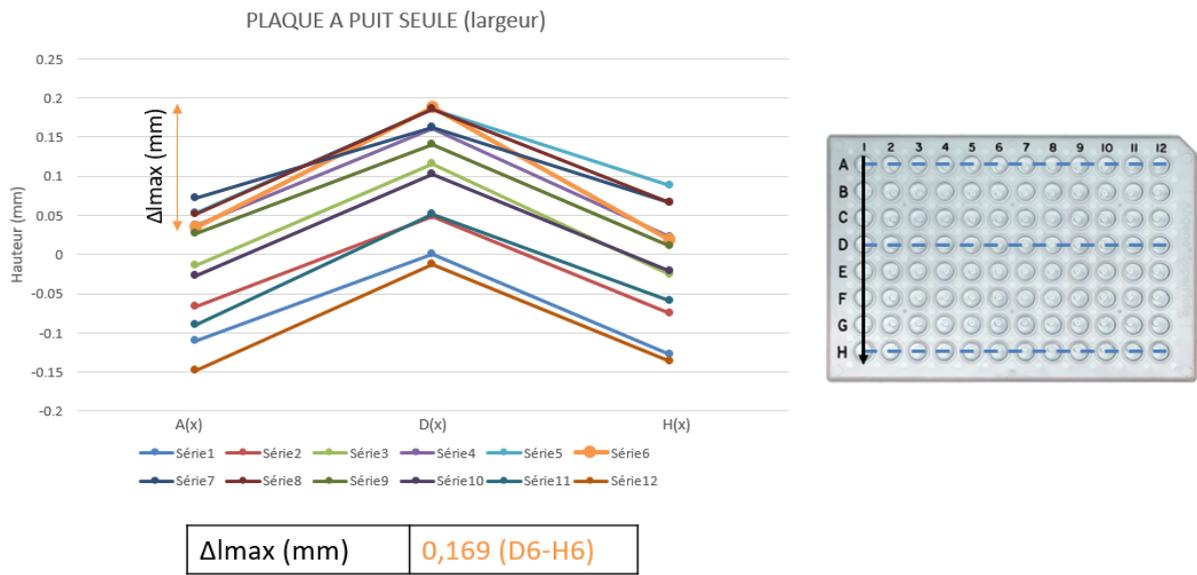


Figure 69: Profil d'une plaque à puits selon 3 lignes (A,B et D) d'après les mesures au Palmer

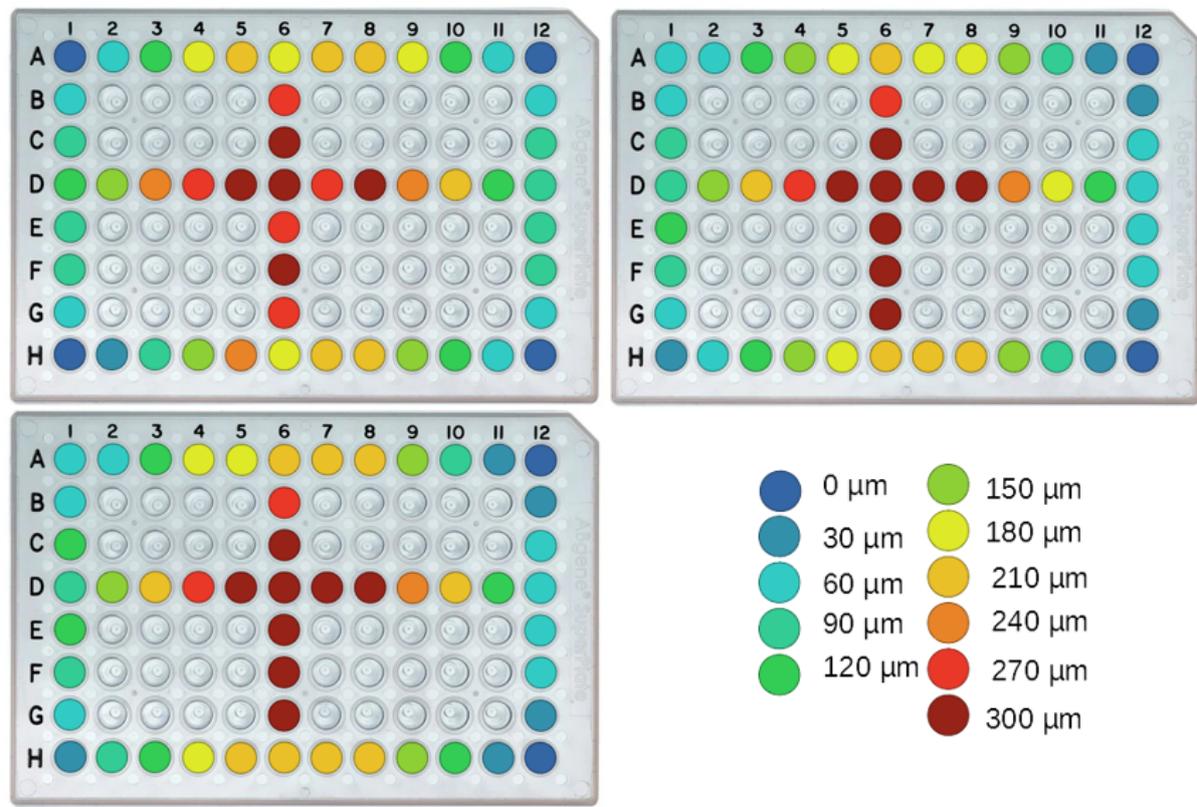
Nous avons choisi 3 lignes éloignées et tracé le profil en ( $Z$ ) pour chacun des puits. On observe que la différence entre le point plus haut et le plus bas pour chacune de ces lignes est supérieur à  $200 \mu\text{m}$ . Si l'on prend le puits le plus bas mesuré (en A12) avec le plus haut (en D6) un écart très important de  $337 \mu\text{m}$  est obtenu.

Si l'on trace le graphique correspondant à chacune des colonnes comme indiqué en Figure 70, nous remarquons que la plaque est aussi convexe sur cet axe, et on a un écart maximal sur une même colonne allant jusqu'à  $169 \mu\text{m}$ .



*Figure 70: Profil d'une plaque à puits selon les 12 colonnes d'après les mesures au Palmer*

Par la suite nous avons fait le test sur 3 plaques à puits issues de lots différents et on retrouve des comportements similaires (Figure 71). Les plaques présentent un aspect bombé avec un écart d'environ 300  $\mu\text{m}$  entre les puits du centre et ceux des angles.



*Figure 71: Cartographie de 3 plaques à puits différentes d'après les mesures au Palmer*

Intéressons-nous à présent à la localisation de nos applicateurs situés dans les zones encadrées en rouge sur la Figure 72.

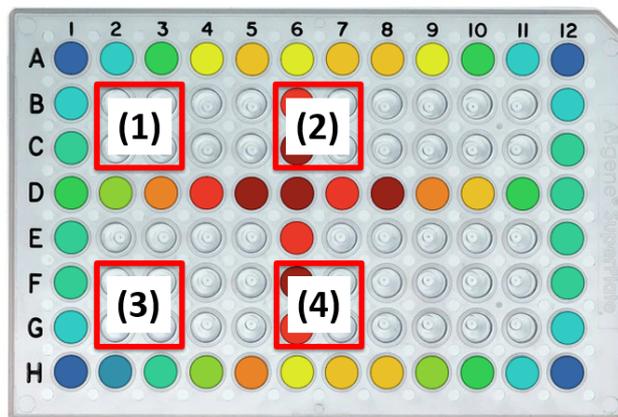


Figure 72: Représentation des ilots d'intérêt sur la cartographie d'une plaque à puits

En extrapolant avec les hauteurs des puits on peut estimer la hauteur de nos ilots.

- Ilots (1) et (3) :  $130\mu\text{m} \pm 40\mu\text{m}$
- Ilots (2) et (4) :  $270\mu\text{m} \pm 20\mu\text{m}$

Nous aboutissons à un écart d'environ  $150\mu\text{m}$  entre nos deux localisations d'ilots. Il faudra évaluer l'impact qu'a cette différence sur le DAS pour bien caractériser notre système.

Après avoir ajusté notre modélisation numérique en prenant en compte cet écart réel, nos résultats restent pourtant toujours bien supérieurs à ceux de la dosimétrie expérimentale...

### *iii) Mesure latérale optique de la configuration plateforme d'applicateurs RF et plaque à puits*

Longtemps, nous avons essayé de comprendre pourquoi notre DAS simulé ne correspondait pas à notre valeur expérimentale. Puis un jour, dans le cadre d'un autre test, j'ai découpé une partie de la plaque à puits, pour mesurer l'échauffement de l'applicateur RF directement sur la plateforme RF. Alors en prenant l'ensemble plateforme RF et plaque à puits et en le regardant de profil, je me suis aperçu qu'on voyait le jour entre les deux, et ce, même sur le bord de la plaque alors qu'il s'agit de notre puits censé être le plus bas. J'ai donc essayé de quantifier ces écarts en glissant plusieurs languettes de feuille de papiers entre la plaque à puits et plateforme RF puis j'ai mesuré l'épaisseur de ces languettes. Une épaisseur de  $500\mu\text{m}$  était obtenue. J'ai alors voulu confirmer ce résultat par une technique plus rigoureuse scientifiquement parlant. J'ai donc utilisé un microscope numérique 3D HIROX. Pour l'ensemble plateforme RF et plaque à puits observé sur la tranche, un écart entre les deux et rendu visible (Figure 73).

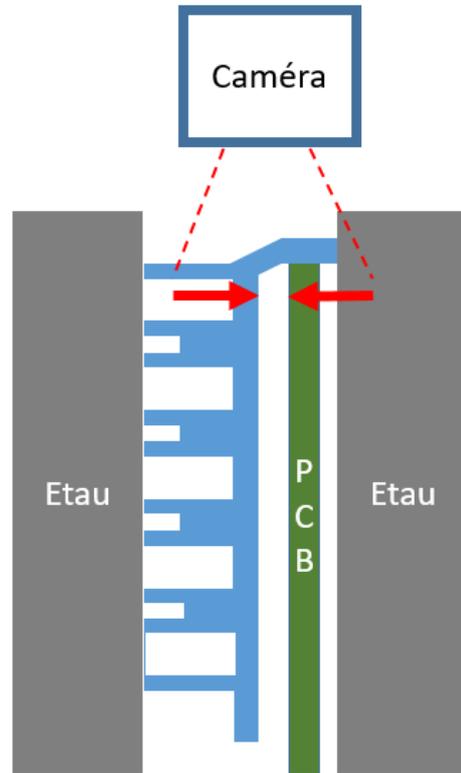
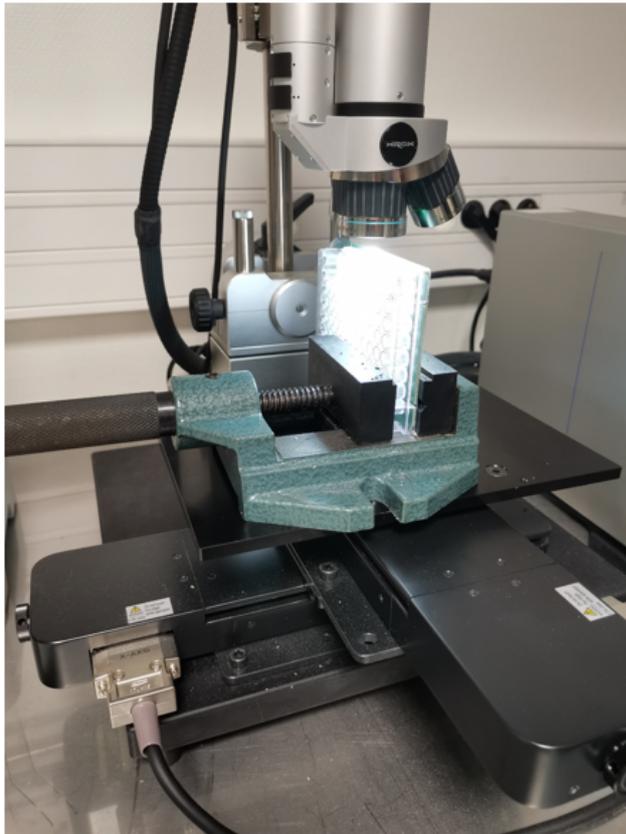


Figure 73: Photographie et schéma de l'observation réalisée à l'HIROX pour déterminer l'espacement entre plaque à puits et PCB

Voici l'image obtenue en Figure 74 :

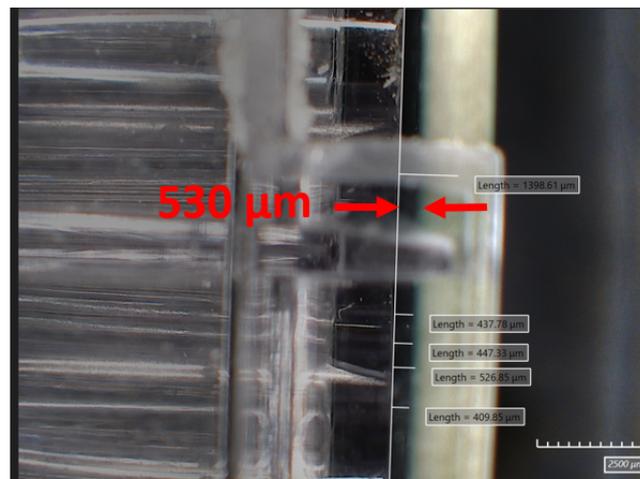


Figure 74: Image montrant l'écart observé entre la plaque à puits et le PCB

La ligne blanche est tracée en suivant exactement le fond de plaque. On peut alors utiliser les outils de mesure du logiciel pour déterminer la longueur entre cette ligne blanche et le haut de la plateforme RF. C'est assez difficile d'obtenir un focus sur le haut de la plateforme RF. Avec la perspective, il existe une marge d'erreur sur la mesure. Ici on mesure donc un écart entre la plateforme RF et la plaque à puits sur les extrémités. On confirme ce qu'on avait mesuré grossièrement avec les feuilles de papier : l'écart entre la plateforme RF et la plaque à puits est

de l'ordre de  $530\mu\text{m}$  à l'endroit mesuré. Sachant que cette mesure est effectuée pour les puits (A6) et (A7) à une hauteur de  $180\mu\text{m}$  d'après la Figure 72, cela nous donne un écart global de  $350\mu\text{m}$ , réellement dû à l'écart entre la plateforme RF et la plaque à puits. Pour les îlots (1) et (3) nous obtenons donc des hauteurs à  $350\mu\text{m} + 130\mu\text{m}$  soit  $480\mu\text{m}$  et pour les îlot (2) et (4)  $350\mu\text{m} + 270\mu\text{m}$  soit  $620\mu\text{m}$ .

Nos caractérisations dans la partie C)b) ont été effectuées sur les puits (B3) (B4) (C3) et (C4) de l'îlot (1) ainsi que leurs homologues symétriques par rapport au centre (E3) (E4) (F3) et (F4) de l'îlot (3). Nous avons donc gardé la valeur de  $480\mu\text{m}$  pour comparer la dosimétrie expérimentale et numérique.

## b) Problème de détermination du DAS dans les puits voisins en comparaison aux résultats simulés

### i) Echanges thermiques mesurés à long terme

Nous avons toujours rencontré des difficultés à mesurer le DAS dans les puits voisins. Il est plutôt faible et ne suit pas le même comportement que le puits exposé. En effet on constate majoritairement une élévation thermique au bout de quelques minutes, correspondant à l'apparition des échanges thermiques. Sur la Figure 75 on peut voir la réponse en température d'un puits exposé directement aux RF (puits central) en orange, et d'un puits voisin en bleu. Pour ce test un seul de doublet de l'îlot est alimenté.

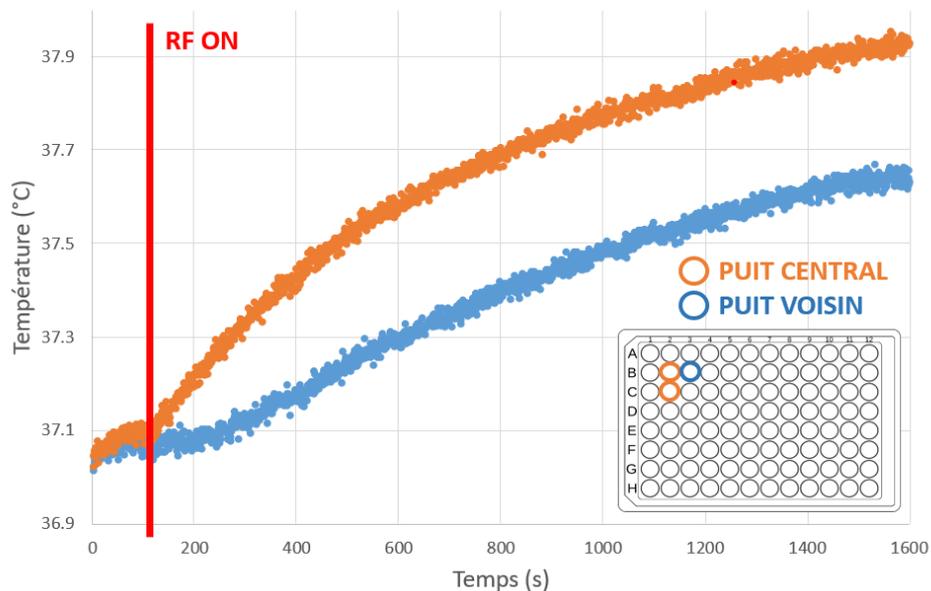


Figure 75: Profil thermique obtenu pour un puits central exposé au RF (orange) et un puits voisin (bleu)

Lorsqu'on zoome sur la partie d'intérêt, c'est-à-dire à l'état initial, nous observons les profils donnés en Figure 76 :

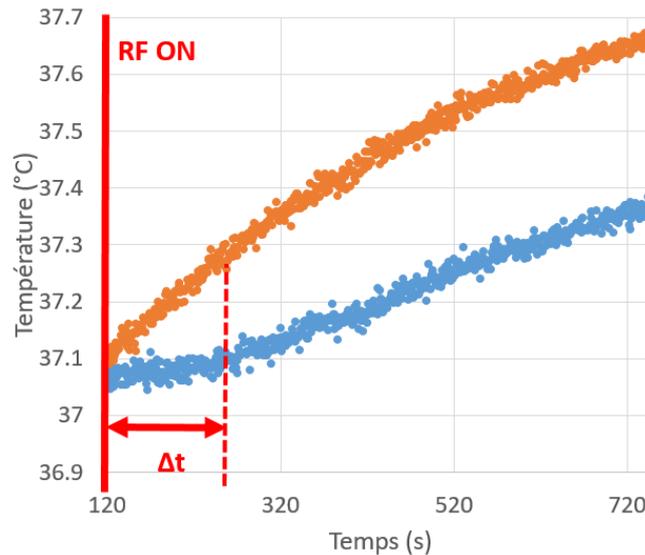


Figure 76 : Analyse du retard de la montée en température pour le puits voisin

Durant une période  $\Delta T$  la réponse thermique dans le puits voisin est nulle (ou trop faible pour être détectée). J'ai donc essayé de faire notre régression exponentielle en prenant en compte ou non cet intervalle de temps. Pour le puits central nous obtenons un DAS de 12,3 W/kg. Pour le voisin si l'on fait la même régression à partir de 120s (RF on), on obtient une valeur aberrante de -3,7 W/kg... En revanche si l'on supprime la portion de courbe sur le  $\Delta t$  (c'est-à-dire que la régression est appliquée à partir de 240s) on obtient un DAS de 5,1 W/kg, soit 25% du DAS du puits central. Dans ce cas-là, la portion analysée est probablement liée aux échanges thermiques.

Si l'on jette un œil à nos simulations, nous avons un facteur 100 entre le puits illuminé et le premier voisin (Figure 77)

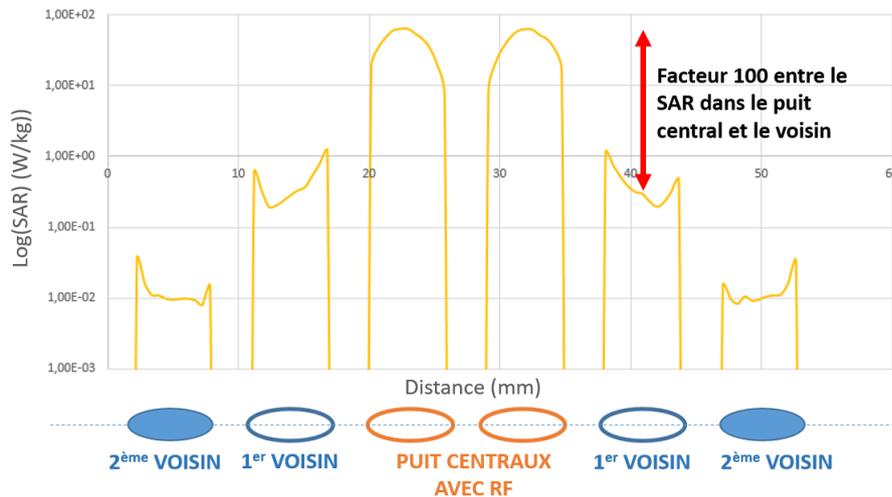


Figure 77: DAS obtenu par modélisation pour notre dispositif en échelle log

Notre conclusion partielle à ce stade est que :

- Si l'on s'intéresse aux premiers instants, nous risquons d'obtenir des valeurs aberrantes car la précision de notre capteur ne permet pas de détecter de si petites élévations de température. Néanmoins, c'est probablement dans cet état initial que nous devons détecter le DAS.

- Si l'on considère une plus grande partie de la courbe notre méthode de régression va majoritairement prendre en compte la suite de la courbe (post  $\Delta t$ ) et nous donner des valeurs bien supérieures au phénomène réel, induit en réalité par des échanges thermiques !

Pour investiguer davantage ce point nous avons deux options :

- Soit en augmentant la sensibilité de notre capteur pour mesurer des échauffements inférieurs à  $0,1^\circ\text{C}$
- Soit en augmentant la puissance appliquée, pour accentuer les phénomènes thermiques et ainsi maximiser la détection du phénomène recherché avec nos capteurs actuels, des thermocouples. J'ai opté pour la deuxième option.

### *ii) Mesure thermique du DAS à forte puissance incidente RF*

J'ai réalisé des mesures à une puissance très élevée pour exagérer au maximum les comportements thermiques dans le puits voisin. La Figure 78 montre une mesure effectuée pour une puissance appliquée de 37 dBm.

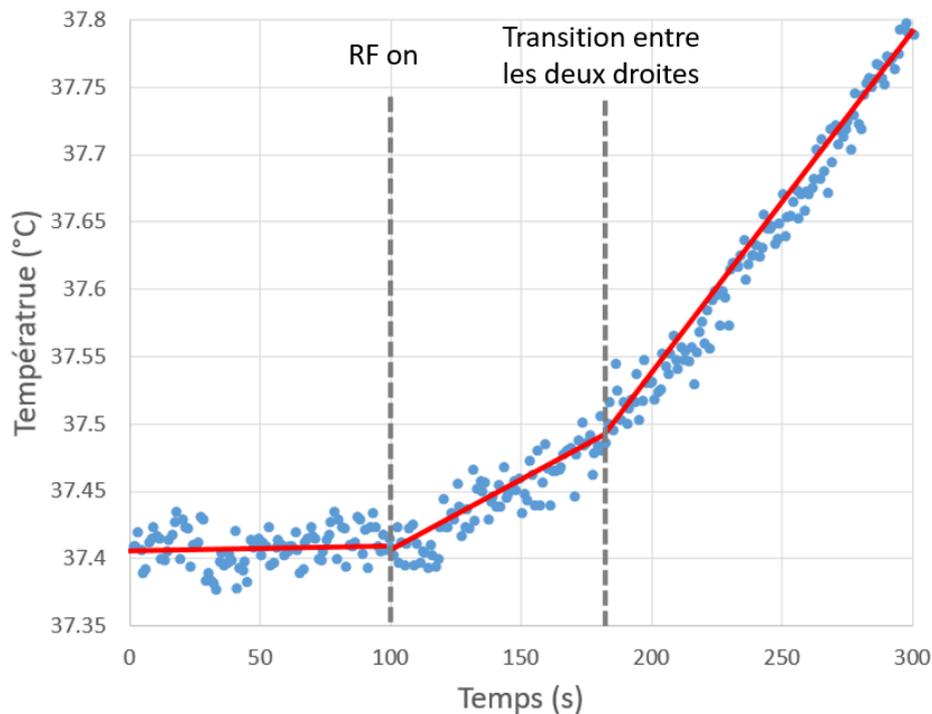


Figure 78: Réponse thermique obtenue lors de l'application d'un DAS très élevé

Sur ce graphique en Figure 78 on distingue bien les deux phases thermiques, celle résultante du DAS (première portion de droite après l'application des ondes RF) suivie des échanges thermiques (à partir de 180s). Cette fois-ci, une régression linéaire est nécessaire en se focalisant sur la fenêtre d'intérêt associée au DAS entre 100 et 180s. Le nombre de point étant faible les méthodes de régression exponentielle et polynomiales ne sont pas applicables.

Nous avons fait ce test 4 fois et nous retrouvons chaque fois ce même comportement, avec une cassure dans la courbe, nous permettant de distinguer deux droites. On retrouve alors des

valeurs beaucoup plus faibles que ce que nous avons estimé jusqu'à présent. Le DAS dans le puits illuminé est de  $151,1 \pm 5,6$  W/kg tandis que pour les voisins on obtient une valeur de  $10,0 \pm 0,3$  W/kg, soit 7 % du DAS dans le puits central. Ce résultat va dans le sens de ceux obtenus par simulation avec le logiciel HFSS. Afin de mieux comprendre l'origine des échanges thermiques de notre système, nous nous sommes intéressés à l'échauffement de la plateforme d'applicateurs RF.

### c) Visualisation de l'échauffement de la plateforme RF par caméra thermique

Dans la même idée que précédemment j'ai pensé que la majorité des échanges thermiques venaient du liquide qui était chauffé par l'application des ondes RF. De là, en conservant le liquide uniquement dans un puits illuminé nous devrions avoir moins d'échanges thermiques et probablement une meilleure visualisation du DAS.

Le protocole de tes mis en place est le suivant. On place deux thermocouples dans des puits éloignés de la plaque (B2) et (G3) (Figure 79).

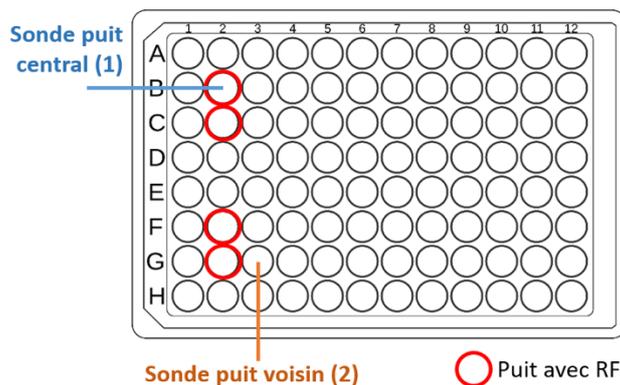


Figure 79: Schéma de la disposition des thermocouple

Nous effectuons alors les mesures suivantes :

- Puits (1) rempli de liquide et puits (2) vide
- Puits (1) vide et puits (2) rempli de liquide
- Puits (1) et (2) remplis de liquide
- Puits (1) et (2) vide

La Figure 80 donne les résultats obtenus.

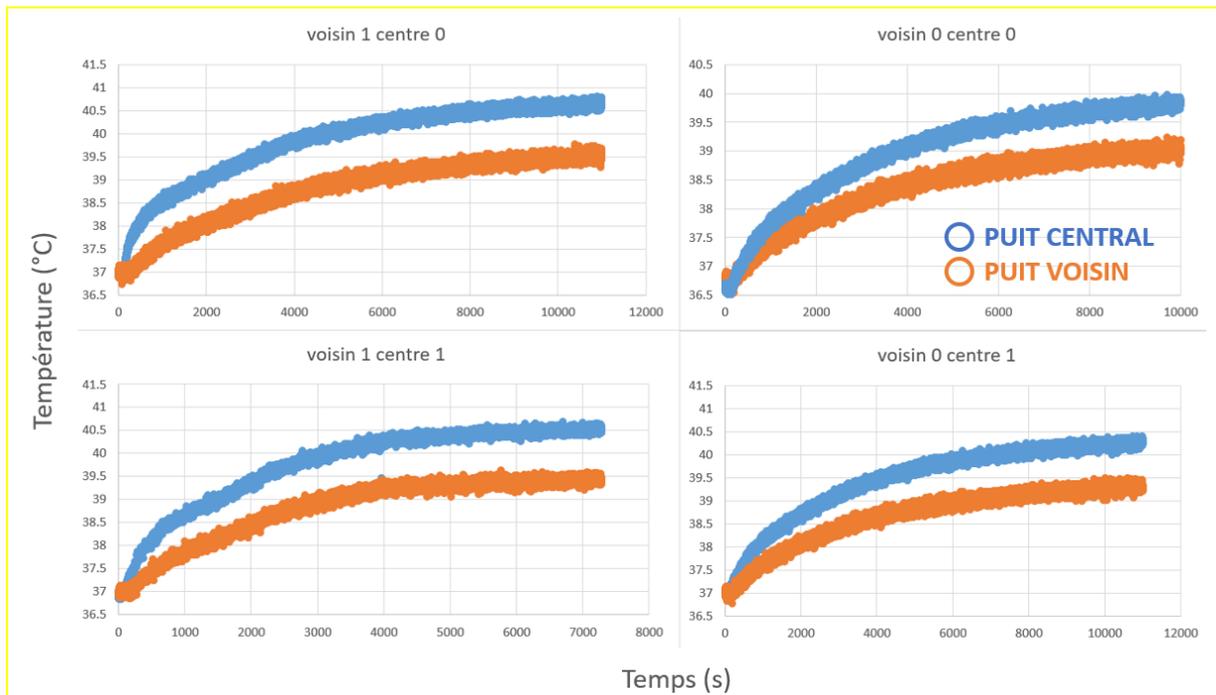


Figure 80: Profil thermique relevé pour dans le puits central et le puits voisin en présence ou non de liquide pour différentes combinaisons

On remarque qu'un échauffement non négligeable est obtenu dans tous les puits, même les vides. Ce résultat est étonnant car l'air et le plastique de la plaque à puits sont isolants. Nous en avons déduit que l'applicateur de la plateforme RF doit chauffer. Pour confirmer cette hypothèse, j'ai donc mesuré avec un thermocouple la température sur la pastille métallique de l'applicateur (Figure 81). Effectivement on constate une forte augmentation de la température (Figure 81 droite).

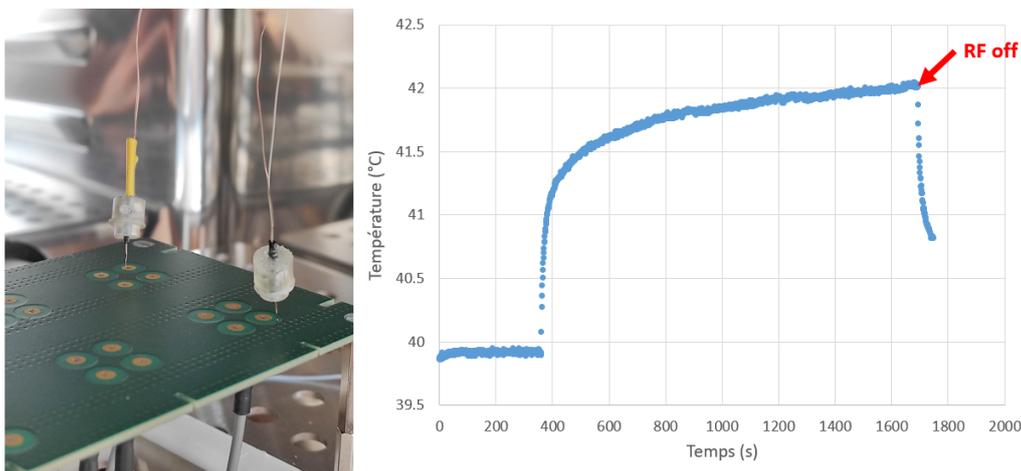


Figure 81: Mesure thermique directe de l'applicateur RF

Cependant le TC n'est pas un moyen idéal pour mesurer la température de l'applicateur, puisqu'on ne peut pas utiliser le support qui le maintient sur le puits. De plus la température n'est évaluée qu'en un seul point. Il est alors difficile de comprendre l'échauffement thermique global de la plateforme RF. Nous avons donc utilisé un autre type de mesure en température : la thermographie infrarouge (IR).

A l'aide d'une caméra thermique IR, nous avons donc pu relever le comportement thermique de notre applicateur en fonction du temps. Sur le banc de test présenté en figure (X), on distingue sur la droite la chaîne RF composée du générateur de signal, l'amplificateur et son alimentation. Vient ensuite un diviseur de puissance 1→4 connecté à notre ilot par deux câbles SMA. La caméra thermique prend la mesure face supérieure, sur l'ilot.

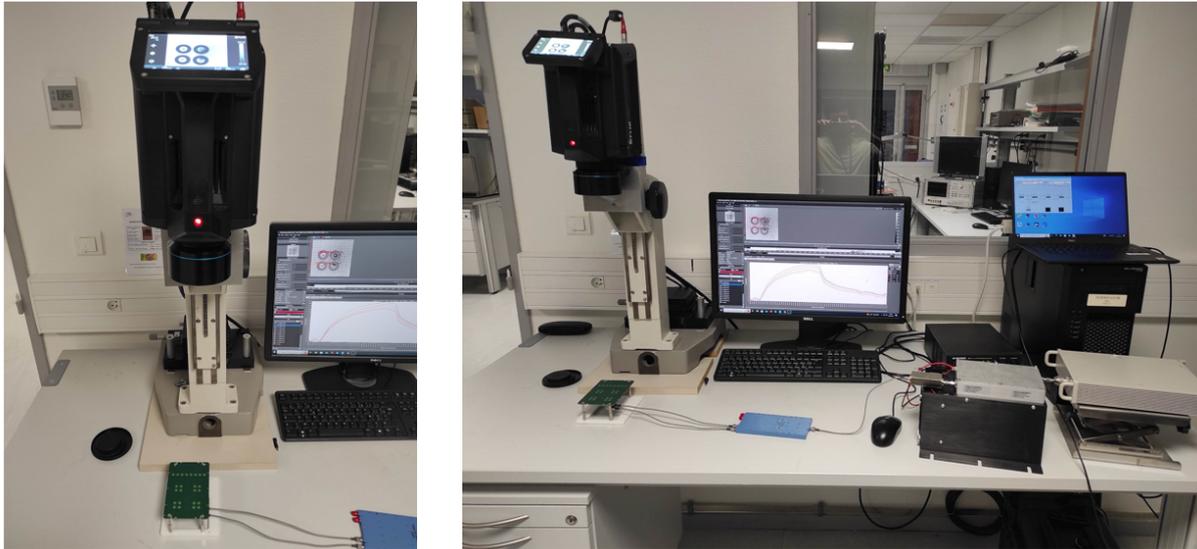


Figure 82 : Photographie du banc de test pour la mesure IR de la plateforme RF

Dans ce cas, les deux doublets d'applicateurs sont connectés et alimentés. A l'aide du logiciel associé à la caméra, il est possible de moyenner le comportement thermique sur une zone géométrique. Sur la Figure 83 on peut voir les différentes zone (8) que nous allons étudier (rectangle bleu, rouge, orange etc...).

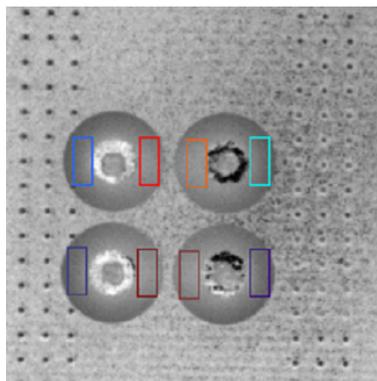


Figure 83: Ilot d'applicateurs RF avec les 8 zones pour l'analyse du comportement thermique

Ces zones ne sont pas symétriques. En effet nous nous sommes aperçus que la piste d'alimentation du doublet, dissipait de la chaleur supplémentaire. Nous allons donc distinguer deux zones : internes (avec la piste métallique) et externes. (Figure 84 (a) )

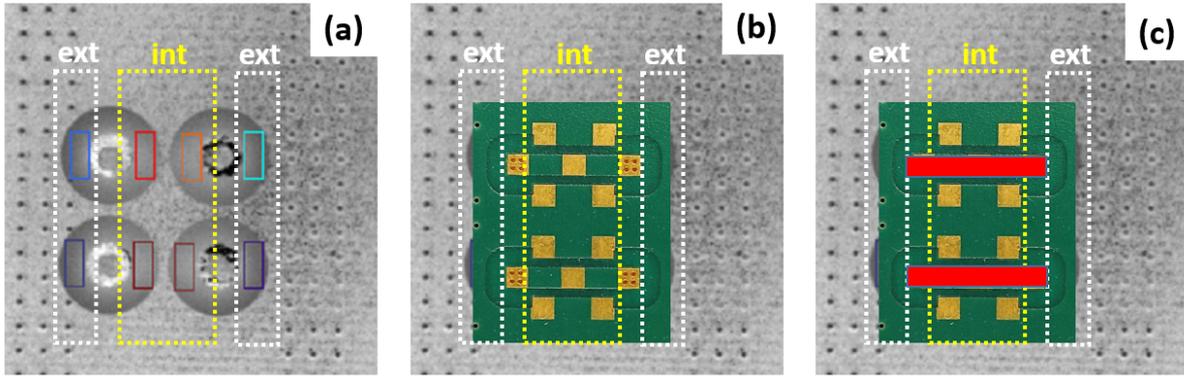


Figure 84: Distinction des différentes zones d'analyse en fonction de la géométrie de l'îlot d'applicateurs RF

Sur la Figure 84 (a) on distingue les zones externes en blanc (comprenant les rectangles bleus/violetes) et les zones interne en jaune (rectangles rouges/oranges). Sur les Figure 84 (b) et (c) j'ai reporté la partie arrière de la plateforme RF sur l'image pour visualiser où se situent les pistes métalliques.

Nous avons réalisé 3 tests à des puissances différentes. Les graphiques de la Figure 85 représentent l'évolution de la température en fonction du temps (acquisition sur 5min).  $\Delta T$  est la différence entre la température maximale atteinte (5min) et la température initiale (avant RF, température ambiante)

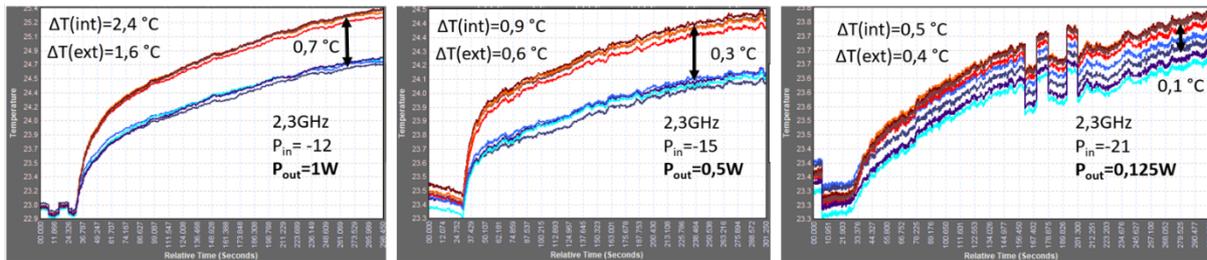


Figure 85: Profils thermiques obtenus pour les zones d'analyse présentés en Figure 83

On remarque un écart notable entre les deux zones. A une puissance équivalente à 1W au connecteur SMA du doublet, on retrouve un écart de 0,7°C entre la zone interne (rouge/orange) et la zone externe (bleu/violet). Cet écart semble diminuer proportionnellement avec la puissance appliquée. Les créneaux que l'on peut observer à faible puissance sont liés à la sensibilité de la caméra et non aux ondes RF.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur l'uniformité de l'incrément thermique lorsque la plaque à puits est positionnée au-dessus de l'applicateur. Pour cela nous avons comparé le profil thermique de la plateforme RF seule (focus sur l'applicateur) et du PCB avec plaque à puits (focus sur le fond des puits) comme indiqué sur la Figure 86.

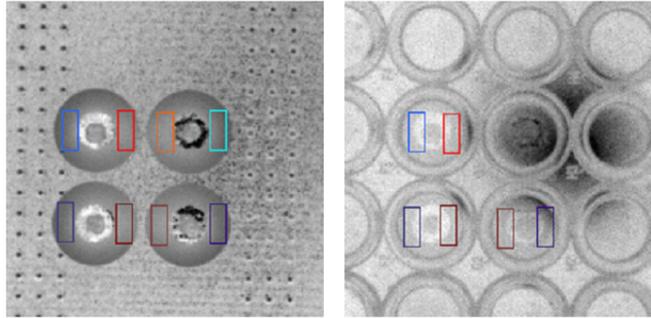


Figure 86: Comparaison du profil thermique obtenu pour la plateforme seul et la plateforme surmontée de la plaque à puits

Le puits (2) n'a pas pu être analysé probablement à cause d'un reflet ou d'une erreur sur l'émissivité détectée (en raison d'une tache noire). La Figure 87 donne les résultats de mesures obtenus.

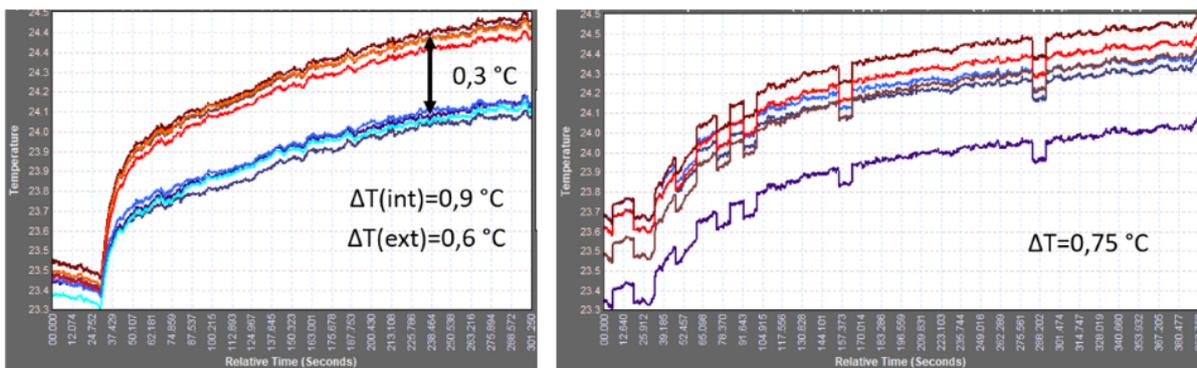


Figure 87: Profils thermiques obtenus pour la plateforme seule et la plateforme surmontée de la plaque à puits

Le graphique de gauche correspond à la plateforme seule et celui de droite avec la plaque à puits. On remarque que les zones externes et internes ont le même incrément thermique en comparaison avec les résultats que nous avons observés sur la plateforme seule. La courbe violette est plus faible que les autres mais cela est certainement dû à un problème d'acquisition comme pour le puits situé au-dessus (partie noire, ou rebord du puits). Une autre chose également très importante à remarquer est que si l'on s'intéresse à la pente à l'origine, celle-ci est beaucoup plus forte pour l'applicateur sans plaque, ce qui signifie que le DAS est plus fort. Ceci est logique puisque le fait d'ajouter la plaque à puits impose un gap d'air ainsi que l'épaisseur du plastique. Comme notre champ électrique diminue en fonction de Z, on peut donc s'attendre à ce résultat. Cependant le DAS dépend aussi du matériau pour lequel on mesure l'incrément thermique, puisqu'il prend en compte la capacité calorifique massique. Pour le cuivre elle est de 385 J/(kg.K) alors que pour les polymères plastiques, elle varie entre 840 et 2900 J/(kg.K). Pour l'air elle est de 1005 J/(kg.K) et pour les liquides, il s'agit de 4185 J/(kg.K). Pour déterminer le DAS dans le cadre d'une analyse par caméra thermique IR il faut donc considérer aussi le matériau sur lequel on observe l'échauffement. Ce travail est encore en cours. Nous avons levé beaucoup de questions pour lesquelles nous n'avons à ce jour pas encore de réponse claire.

#### d) Adaptation à ces enjeux

Nous avons vu tout on long de cette partie que le modèle et les caractérisations initiales sont partiellement justes et qu'il faut prendre en compte beaucoup de facteurs. Les facteurs évoqués comme la distance de la plaque à puits par rapport à la plateforme RF ou les comportements thermiques complexes ne sont pas une liste exhaustive des paramètres qui rentrent en jeu. A ce stade, il n'est pas certain que tous les paramètres intervenant dans cette étude aient été détectés, mais je pense avoir relevé les plus impactants. Le comportement thermique reste encore à approfondir et nous apporte sans arrêt de nouvelles interrogations.

Après avoir déterminé ce gap d'air, la première chose que nous avons faite a été de modifier notre simulation en prenant en compte cet écart. Les simulations précédentes avaient été faites avec un écart de 200 $\mu\text{m}$  ; dans celles qui suivent nous nous sommes placés à 500 et 600 $\mu\text{m}$ .

Tableau 17 : Comparaison des paramètres analysés en simulation en fonction du gap d'air entre la plateforme RF et le fond de la plaque à puits

Gap d'air	200 $\mu\text{m}$	500 $\mu\text{m}$	600 $\mu\text{m}$
<b>Efficacité</b>	67,1 W/kg	<b>35,3 W/kg</b>	<b>29,5 W/kg</b>
<b>Homogénéité</b>	55%	<b>50%</b>	<b>48%</b>
<b>Isolation</b>	0,8%	<b>1,3%</b>	<b>2%</b>

Les valeurs obtenues par la simulation semblent désormais plus proches de la réalité, au moins pour l'efficacité (Tableau 17). L'isolation semble cependant largement sous-estimée. Grâce à la technique développé dans D)b)ii), nous avons estimé le DAS dans le puits voisin à 7% du DAS maximal. Si l'on se place à 500 $\mu\text{m}$ , cela revient à 2,5 W/kg dans les puits voisins (7% de 35,3). On va ajouter ces contributions à la valeur obtenue par simulation. En considérant les contributions parasites d'un puits exposé de l'îlot comme la somme de deux puits voisins ainsi que celui situé sur la diagonale, on trouve une valeur proche de 40W/kg. Cela va dans le sens de nos mesures expérimentales. Si l'on considère les performances d'un doublet seul, on retrouve exactement les mêmes valeurs que pour un îlot, car la modélisation considère les contributions voisines quasiment nulles. Expérimentalement, nous obtenons des valeurs de l'ordre de 30W/kg pour le doublet ce qui est très proche des simulations numériques.

Il est donc intéressant de regarder notre comparatif de dosimétrie expérimentale et numérique de la partie C)b) avec ces nouvelles données. On considère désormais l'écart de 500 $\mu\text{m}$  entre le fond de la plaque et l'applicateur RF ainsi que la nouvelle méthode pour déterminer le DAS dans les puits voisins. Les valeurs obtenues précédemment dans le Tableau 16 ont été mises à jour dans le Tableau 18.

Tableau 18: Tableau comparatif des valeurs du DAS obtenues par dosimétrie expérimentale et numérique mis à jour

	Expérimentalement	Par simulation
Point	SAR (W/kg) for 1W	SAR (W/kg) for 1W
A	<b>50,7 ± 2,8</b>	<b>34,9</b>
B	<b>44,0 ± 2,0</b>	<b>17,5</b>
C	<b>45,6 ± 2,0</b>	<b>17,7</b>
D	<b>52,9 ± 3,7</b>	<b>18,1</b>
E	<b>54,2 ± 3,2</b>	<b>17,9</b>
F	<b>3,5 ± 0,3</b>	<b>0,6</b>
G	<b>3,1 ± 0,2</b>	<b>0,4</b>

Concernant la dosimétrie expérimentale on retrouve une efficacité de 50,7 W/kg pour 1W en puissance d'entrée. L'homogénéité ne change pas non plus avec 81%. En revanche l'isolation est meilleure avec 7% du DAS maximal dans les puits voisins (contre 20% précédemment).

Pour la dosimétrie numérique, l'efficacité est largement diminuée, divisée quasiment par 2. L'homogénéité est sensiblement la même (50% contre 55%) comme pour l'isolation (1% environ).

## Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons détaillés notre méthode d'exposition aux ondes RF adapté à une plaque 96 puits. Premièrement nous avons détaillé le principe de notre plateforme d'exposition et ses forces : des expositions haut débits, adapté pour du consommable biologique, aux dimensions réduites et permettant d'exposer 16 puits aux ondes RF tout en ayant des contrôles biologiques sur une même plaque à puits. Nous avons ensuite évoqué les paramètres permettant de caractériser un système d'exposition aux ondes RF, et nous avons choisi le DAS qui est adapté à notre fréquence de test. Par la suite nous nous sommes concentré sur la dosimétrie numérique de notre plateforme d'exposition à l'aide du logiciel de simulation HFSS. Nous avons pu déterminer le DAS dans les puits exposés aux ondes RF ainsi que dans les puits voisins. Pour comparer les valeurs obtenues par simulation avec des valeurs expérimentales, nous avons opté pour une mesure de l'incrément thermique généré par l'application d'ondes RF. Pour cela nous avons comparé les caractéristiques de deux capteurs thermiques : une fibre optique et un thermocouple. Les résultats nous ont fait opter pour le thermocouple dont les performances sont meilleures dans notre configuration. Nous avons aussi comparé des méthodes de régression afin de sélectionner la plus optimale. Une fois ces paramètres de tests validés nous avons caractérisé notre îlot d'applicateur RF en différents points d'intérêt afin d'en déterminer l'homogénéité, l'isolation et efficacité. Nous avons trouvé

des valeurs éloignées de celles obtenues par simulation. Nous avons donc investigué plusieurs aspects de notre configuration : la forme de plaque à puits, l'écart entre la plateforme d'exposition et la plaque à puits, la méthode de détermination du DAS dans les puits voisins ou encore le comportement thermique des applicateurs. Grâce à ces études nous avons pu corriger le modèle numérique ainsi que les valeurs du DAS dans les puits voisins. Les nouvelles valeurs obtenues semblent plus réalistes compte tenu de la sous-estimation des DAS parasites par la simulation. Finalement, nous avons développé une plateforme d'exposition novatrice et calibrée permettant de réaliser des expositions aux ondes RF sur des tapis cellulaires en plaque 96 puits. Nous allons maintenant utiliser cette plateforme pour étudier la toxicité d'une co-exposition entre ondes RF et Nanomatériaux sur différents modèles cellulaires dans le cadre du projet Nanowave.



# Chapitre 3 : Interactions entre ondes RF et matière : de l'exposition aux ondes RF avec des cellules humaines à l'analyse de solutions biologiques complexe par spectroscopie diélectrique micro-onde

1) Etude <i>in vitro</i> de la co-exposition aux ondes RF et nanomatériaux .....	123
a) Principe du projet Nanowave : .....	123
b) Partenariat avec l'entreprise Anti Oxidant Power (AOP) pour les analyses biologiques associées à l'étude .....	123
c) Méthode LUCS développée par l'entreprise AOP pour l'évaluation <i>in vitro</i> de la toxicité .....	124
d) Description des modèles cellulaires pertinents utilisés pour cette étude .....	125
e) Premiers tests Nanowave : impact des NM à forte concentration sur les différents modèles cellulaires .....	125
f) Détermination de concentrations spécifiques : EC10, EC50 et EC90 pour les NM évalués comme toxiques.....	130
g) Evaluation de la toxicité des ondes RF seules .....	132
h) Co-exposition des ondes RF à différents DAS avec des nanomatériaux à concentration maximale .....	134
i) Protocole pour évaluer les effets synergiques à forte concentration des NM avec les ondes RF .....	134
ii) Protocole pour évaluer les effets synergiques à l'EC10 des NM avec les ondes RF..	137
2) Problématique de l'évaporation du milieu de culture provoquée par l'effet thermique des ondes RF .....	140
a) Chauffer le milieu de culture avec les ondes RF en amont d'une exposition sur cellules .....	140
b) Génération d'une évaporation du milieu de culture avec une autre méthode de chauffage que les ondes RF .....	142
c) Méthodes pour évaluer l'évaporation du milieu de culture .....	144
d) Recherches pour tenter de limiter l'évaporation du milieu de culture.....	145
i) Evaluation de la solution avec modification du couvercle des plaques à puits : .....	146
ii) Evaluation de la solution avec un couvercle percé de trous : .....	147
e) Réflexion sur les problématiques des effets thermiques induits par les RF.....	148
3) Caractérisation de la matière .....	150
a) Mesure par CPW avec station sous pointes .....	150
i) Principe de la technique.....	150
ii) Description et préparation du dispositif .....	150
iii) Banc de test RF .....	151
iv) Exemple type de mesure.....	152
b) Caractérisation d'échantillons contenant des NTC en concentration inconnue mélangés à une matrice organique .....	152
i) Principe et enjeux .....	153

ii) Préparation des échantillons .....	153
iii) Détermination des concentrations inconnues et premiers résultats.....	154
iv) Caractérisation d'une variation à la fois en concentration de MO et de NTC .....	157
v) Nouveau protocole de préparation .....	158
vi) Traitement des données et résultats finaux .....	159
c) Analyse des propriétés du milieu de culture (DMEM) .....	162



Au cours de ce chapitre nous allons nous focaliser sur les tests réalisés dans le cadre du projet Nanowave. Premièrement j'expliquerai la méthode utilisée pour évaluer la toxicité sur les modèles cellulaires choisis. Puis je présenterai les tests réalisés pour évaluer la toxicité des NM seuls, des ondes RF seules puis de la combinaison simultanée des deux agents à concentration maximale mais aussi à des concentrations spécifiques. Enfin la dernière partie exposera les problématiques liées à l'évaporation du milieu de culture sous l'effet des ondes RF, les limitations que cela entraîne et des perspectives de recherche pour limiter ce phénomène.

## 1) Etude *in vitro* de la co-exposition aux ondes RF et nanomatériaux

Dans cette première partie, nous allons nous intéresser à une étude toxicologique d'une combinaison de deux agents : ondes RF et nanomatériaux (NM), sur différents modèles cellulaires, dans le cadre d'un projet financé par l'ANSES et dont l'acronyme est NANOWAVE.

### a) Principe du projet Nanowave :

Le projet Nanowave a pour but d'évaluer des potentiels effets synergiques entre ondes RF et nanomatériaux sur des cellules humaines. Cette étude rentre dans une pensée plus globale correspond à la toxicité d'une accumulation de facteurs possiblement à risque. En effet aujourd'hui notre exposome est de plus en plus riche et nous sommes soumis à tout un tas d'agents et facteurs simultanément. Ces différents exposants ont été majoritairement étudiés de manière isolée. Et même si un de ces agents est inoffensif seul, rien ne garantit qu'il ne devienne toxique en combinaison avec un autre agent environnant.

La co-exposition entre NM et ondes RF est prometteuse, avec notamment des effets thermiques pour des particules métalliques comme l'or. Lors de l'application d'un champ électromagnétique dans des conditions spécifiques, les NP d'or vont générer un échauffement très localisé et permettre de détruire des cellules par effet thermique. Cette technique pourrait potentiellement être utilisée au niveau thérapeutique dans l'ablation thermique de tumeurs. [137]–[139]

### b) Partenariat avec l'entreprise Anti Oxidant Power (AOP) pour les analyses biologiques associées à l'étude

Pour tester la toxicité des NM et ondes RF nous avons besoin de matériel biologique, à savoir des cellules humaines. Pour cela, le projet NANOWAVE comprend comme partenaire l'entreprise Anti Oxidant Power (AOP) spécialisée dans la culture cellulaire et les études toxicologiques sur des modèles *in vitro* à l'aide d'une technique d'analyse dite LUCS spécifique

à cette entreprise et brevetée. Nous avons travaillé en étroite collaboration avec ses membres tout au long du projet. Les résultats présentés par la suite sont le fruit d'un travail commun.

### c) Méthode LUCS développée par l'entreprise AOP pour l'évaluation *in vitro* de la toxicité

Il existe de nombreuses méthodes d'analyse pour évaluer l'état de santé d'une cellule, ce qu'on appelle des tests de cytotoxicité. Généralement on utilise des tests de viabilité cellulaire, qui évaluent l'homéostasie des cellules, c'est-à-dire le potentiel d'une cellule à réguler son métabolisme suite à un évènement extérieur. Le test le plus connu est le MTT qui quantifie l'activité mitochondriale dans la cellule (pour faire simple « le moteur cellulaire »). On peut aussi évoquer les tests d'apoptose (mort cellulaire), de stress oxydatif (présence de ROS), inflammatoire (mesure de marqueurs pro-inflammatoires), prolifération cellulaire (division cellulaire), génotoxicité (dommages à l'ADN). Il en existe tout un panel. Dans notre cas, nous allons utiliser une technologie mesurant la viabilité cellulaire et l'état d'homéostasie de la cellule. Si l'homéostasie cellulaire est altérée et que les cellules n'arrivent pas à réguler leur équilibre cellulaire, alors nous pourrions le détecter grâce à la technique LUCS développée par AOP. AOP est une jeune entreprise hébergée au LAAS spécialisée dans la recherche, le développement et la commercialisation de solutions et technologies sur les antioxydants. C'est notre partenaire pour tout ce qui touche à la biologie dans le cadre du projet Nanowave (culture cellulaire et tests de viabilité cellulaire).

Leur technologie LUCS [140] est basée sur une lecture de fluorescence. Suite à une exposition à un agent toxique, un agent fluorescent est ajouté, le Thiazole orange (TO). Il s'agit d'un intercalant de l'ADN, c'est-à-dire qu'il va générer de la fluorescence seulement en s'intercalant dans l'ADN. Lorsque l'homéostasie de la cellule est normale, la cellule va pouvoir relarguer facilement le TO, empêchant ce dernier de s'intercaler dans l'ADN. En revanche une cellule altérée, dont l'homéostasie est perturbée, ne pourra pas gérer le flux de TO qui va pénétrer en masse dans la cellule et s'intercaler dans l'ADN, générant une fluorescence. Cette fluorescence est proportionnelle à l'état homéostatique de la cellule. Dans un second temps, une perturbation extérieure est provoquée, ici un flash lumineux à 470nm. L'association de ce flash lumineux et du TO présent dans les cellules va engendrer l'apparition de ROS. La fluorescence augmente alors rapidement pour atteindre un seuil maximal. Pour l'analyse, un rapport entre la fluorescence post illumination dite L2 / pre illumination dite L1 est réalisé. Les cellules en bonne santé auront un rapport élevé, tandis que les cellules altérées présentent un rapport faible. (Figure 88)

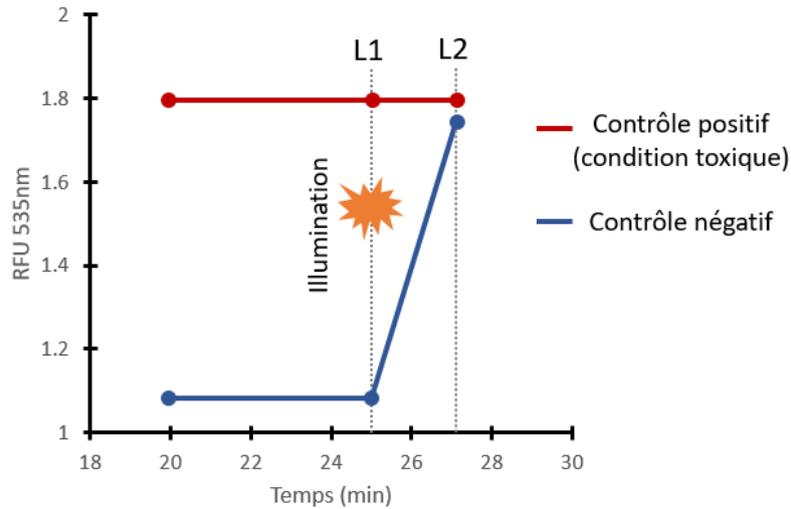


Figure 88 : Schéma de principe de la réponse en fluorescence de la technique LUCS

#### d) Description des modèles cellulaires pertinents utilisés pour cette étude

Il faut savoir que les ondes RF dans la gamme de 2,3 GHz peuvent pénétrer à quelques cm dans le corps humain. Etudier des organes proches de la surface de la peau est donc pertinent. Nous avons choisi par exemple le modèle cellulaire HEPG2 qui est une lignée hépatique cancéreuse issue du foie. La peau est aussi un modèle pertinent, d'où le choix de la lignée HaCaT, des kératinocytes provenant de la peau, immortalisées spontanément. Par ailleurs, nous savons que les ondes radiofréquences interagissent grandement avec l'eau. Pour cela nous avons pensé aux yeux, et choisi un modèle de cellule rétinienne RPE (épithélium pigmentaire rétinien), qui sont des cellules souches différenciées. Nous avons décidé d'étudier un modèle neuron-like car potentiellement plus fragile et sensible que les modèles cellulaires précédents, les SHS-Y5Y issues de neuroblastome, également d'une lignée cancéreuse. Pour finir nous nous sommes intéressés à des Fibroblastes (peau). Il s'agit cette fois ci de cellules primaires, donc plus proches de la réalité et surtout supposées plus sensibles.

#### e) Premiers tests Nanowave : impact des NM à forte concentration sur les différents modèles cellulaires

Dans un premier temps, nous avons testé la toxicité des NM seuls à une concentration définie comme maximale sur les différents modèles cellulaires choisis. Nous avons donc exposé pendant 24h les cellules aux NM évoqués dans le chapitre 1 à une concentration de 100µg/mL (Cmax). Pour cela nous venons disperser pendant 30 secondes les suspensions mères à 1mg/mL (NM dans DMEM) à la sonde à ultrasons pour réhomogénéiser au maximum la suspension de NM. On vient ensuite prélever 10µL de cette suspension qu'on ajoute à 90µL de milieu de culture, du DMEM dans notre cas, dans les puits où les cellules sont préalablement déposées

(24h avant). Après l'exposition de 24h, la cytotoxicité induite par les NM est évaluée avec une analyse LUCS présentée plus haut.

Les résultats obtenus pour les différents NM sur les 5 modèles cellulaires choisis sont présentés de Figure 89 à Figure 93. Ces tests ont été réalisés sur au moins des triplicats (3 puits de la même condition) et par 3 expériences indépendantes (n=3). Ici est présentée une seule expérience parmi les 3, car du fait de la variabilité cellulaire, nous ne pouvons pas rassembler les valeurs sur un seul et même graphique. En revanche, nous les avons comparés un à un pour chacune des 3 expériences et nous avons observé les mêmes comportements.

*(Exposition aux NM concentrés à 100µg/mL, pendant 24h, à 37°C et 95% d'humidité, dans plaque 96 puits, sur les différents modèles cellulaires)*

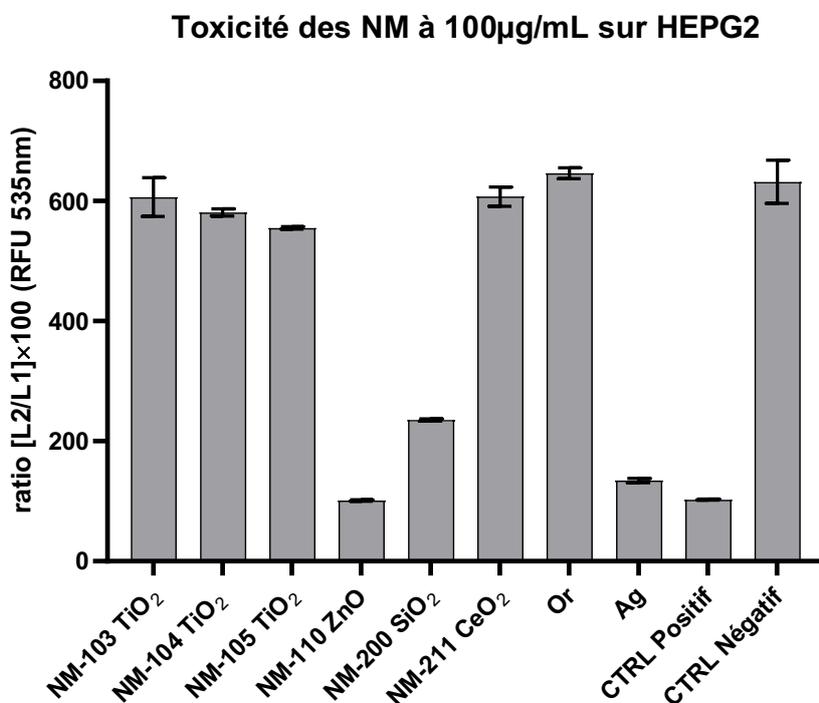


Figure 89: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules HepG2 par la technique LUCS

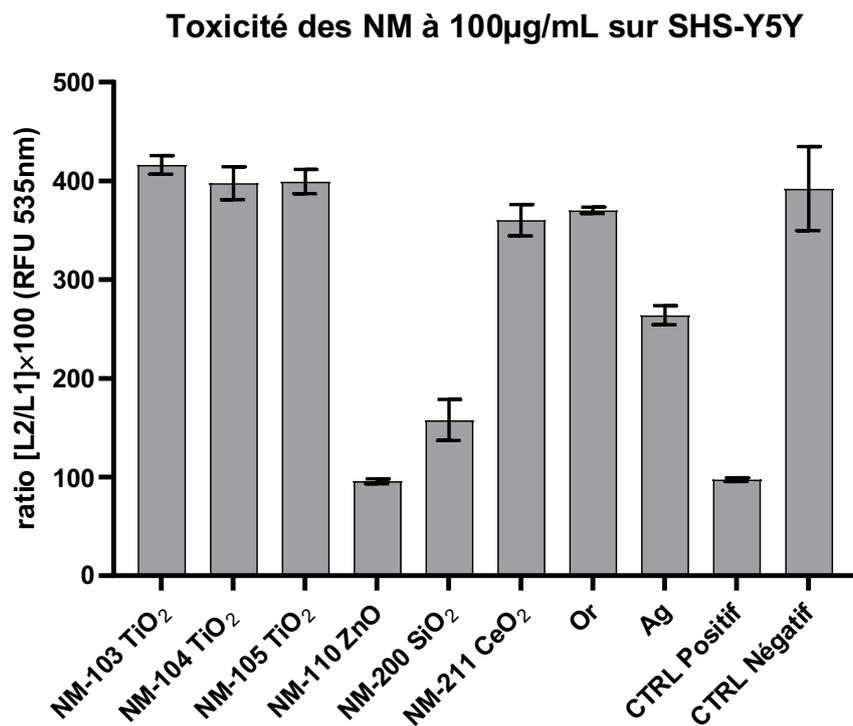


Figure 90: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules SHS-Y5Y par la technique LUCS

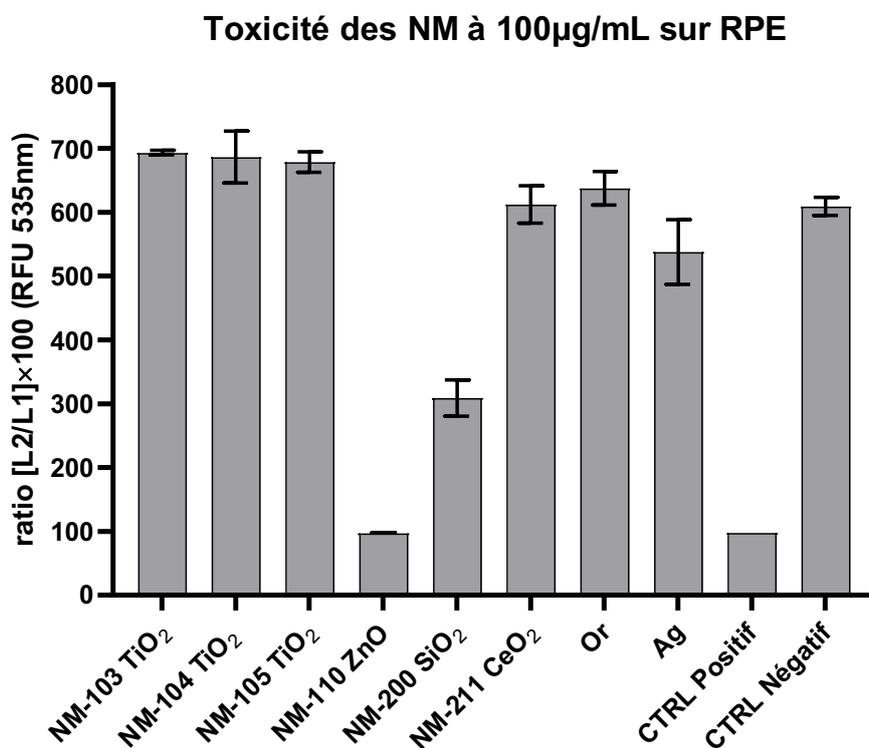


Figure 91: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules RPE par la technique LUCS

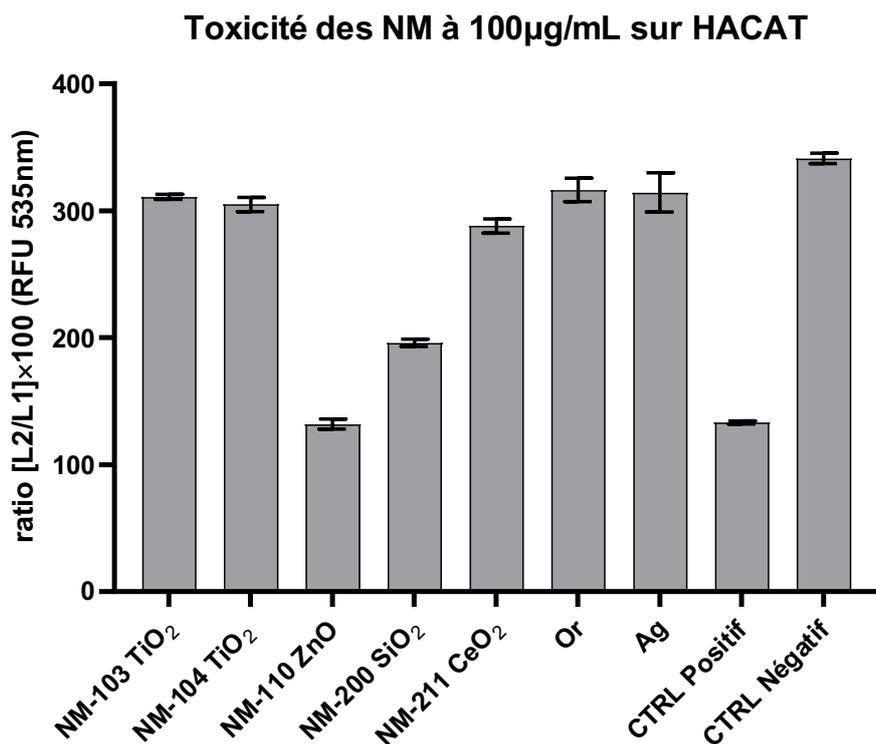


Figure 92: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules HACAT par la technique LUCS

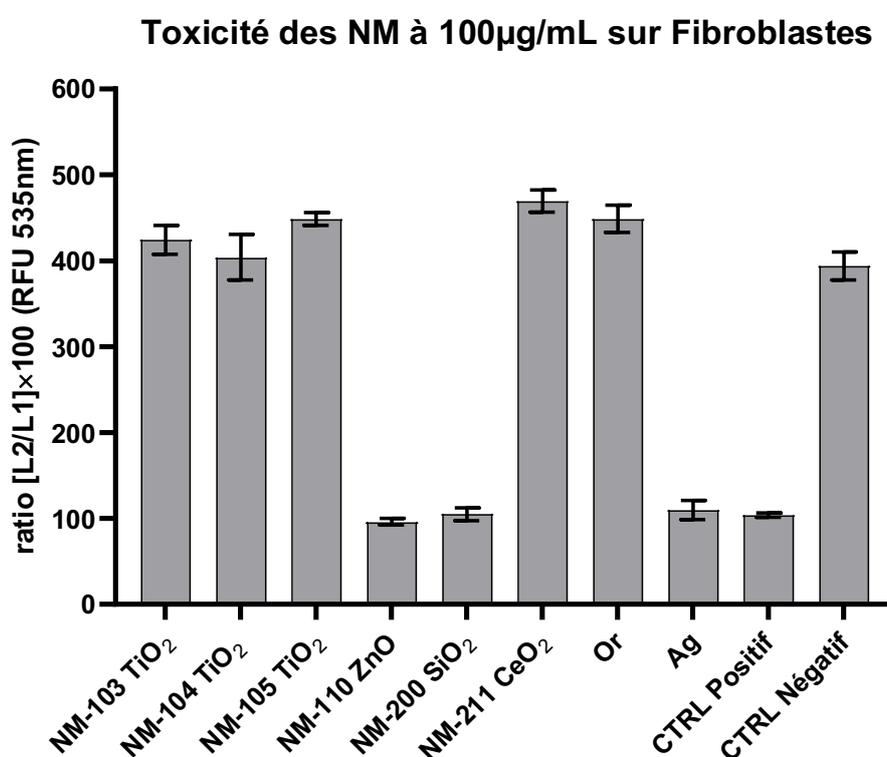


Figure 93: Evaluation de la toxicité des NM à forte concentration sur cellules primaires Fibroblastes par la technique LUCS

Pour analyser ces résultats, il faut comparer les valeurs obtenues pour chaque NM par rapport à celles des contrôles positifs et négatifs. Le contrôle positif nous permet de définir le seuil de toxicité maximal correspondant à la totalité des cellules mortes. Pour cela on ajoute aux cellules

de la chloroquine à forte concentration toxique. Le contrôle négatif est la condition non toxique, aucun agent n'est utilisé sur les cellules. Ce contrôle permet de s'assurer que l'expérience a fonctionné. Il faut comprendre que ces résultats ne sont pas absolus et qu'il y a une marge d'erreur à prendre en compte liée à la sensibilité de la technique. Par exemple, sur le graphique des fibroblastes juste plus haut, on voit que la réponse au CeO<sub>2</sub> est supérieure à celle du contrôle négatif. Ici il faut juste estimer qu'il n'y a pas d'effet sur la viabilité cellulaire, c'est une variabilité due au vivant. Nous cherchons donc à observer des effets beaucoup plus tranchés.

A partir de ces résultats, on peut déterminer quels NM sont toxiques sur chacun des modèles cellulaires et ainsi dresser le tableau suivant :

Tableau 19. Synthèse des résultats de toxicité des NM seuls suivant le modèle cellulaire pour une concentration en NM de 100 µg/mL

Ref JRC		HEPG2	SHS Y5Y	RPE	HACAT	Fibroblastes
NM-103	<b>TiO<sub>2</sub></b>	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
NM-104	<b>TiO<sub>2</sub></b>	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
NM-105	<b>TiO<sub>2</sub></b>	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
NM-110	<b>ZnO</b>	très forte				
NM-200	<b>SiO<sub>2</sub></b>	forte	forte	forte	forte	très forte
NM-211	<b>CeO<sub>2</sub></b>	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
	<b>Or</b>	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
	<b>Ag</b>	très forte	moyenne	légère	nulle	très forte

On remarque que la majorité des NM ne sont pas toxiques sur les modèles cellulaires étudiés, à savoir le TiO<sub>2</sub> sous ses 3 formes, le CeO<sub>2</sub> et l'Or. Le ZnO a un effet très tranché sur chaque modèle cellulaire, avec une réponse égale à celle du contrôle positif et donc toxique. Le SiO<sub>2</sub> semble lui aussi très toxique pour les 5 modèles. En revanche l'argent semble avoir des réponses variables en fonction du type de cellule exposé. Ces résultats étaient attendus et confirment ce qui a déjà été publié sur le sujet. Sur les modèles cellulaires, on remarque quand même que les Fibroblastes, cellules primaires, sont les plus sensibles et ont des réponses très fortes pour les 3 NM toxiques.

Concernant l'exposition aux NTC et nano argile, nous avons rencontré des problèmes. Comme on sur la Figure 94 on pourrait croire à une forte toxicité car le rapport est très faible. Cependant ce résultat est biaisé : les NTC et le NM600 sont morphologiquement les NM les plus macroscopiques, générant de gros agglomérats. Ils sont peu stables en suspension et vont rapidement sédimenter en fond de puits. Nous avons constaté qu'ils présentent un aspect de feuillets. En fait, nous nous sommes aperçus que le faible taux de fluorescence obtenu était à la fois dû à la couche de NM qui forme un tapis sur les cellules, empêchant le TO de rentrer en contact avec les cellules, et cette couche qui brouille le signal fluorescent du TO. Nous avons

réalisé un test en rinçant les puits après les 24h, c'est-à-dire en retirant les NM après exposition. Mais sachant que les cellules mortes ne sont plus adhérentes au puits, celles-ci sont perdues avec le rinçage, ce qui modifie l'analyse. En conséquence, nous avons choisi de nous concentrer sur les autres NM pour la suite de l'étude.

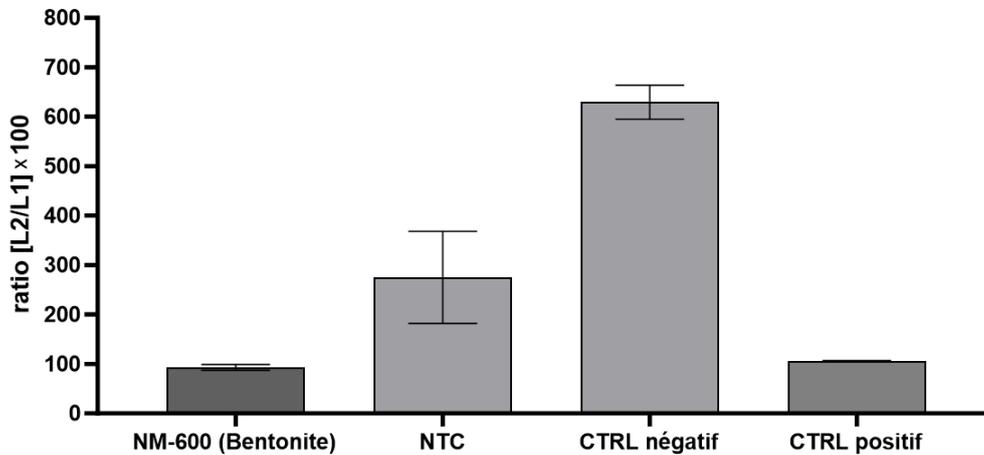


Figure 94: Résultats LUCS sur les NM-600 et NTC pour une exposition de 24h sur cellules HepG2

## f) Détermination de concentrations spécifiques : EC10, EC50 et EC90 pour les NM évalués comme toxiques

Dans la partie précédente, nous avons testé nos NM à une concentration très élevée de 100µg/mL (100mg/L) sur chacun des modèles cellulaires. A partir des résultats de ce test, nous avons pu déterminer quels NM étaient toxiques sur les modèles cellulaires exposés.

Une fois ces NM sélectionnés, nous avons réalisé des doses-réponses sur les modèles cellulaires choisis, pour déterminer les concentrations d'EC50 très utilisés dans les études toxicologiques. L'EC50 représente la concentration à laquelle on observe 50% de l'effet maximal observé. Cet indice est énormément utilisé dans le monde pharmacologique pour quantifier les effets induits par les médicaments. Dans notre cas, l'EC50 correspond à la concentration pour laquelle 50% des cellules sont altérées. On peut aussi déterminer les EC10 et EC90 qui correspondent respectivement à 10% et 90% de la réponse maximale.

Expérimentalement c'est très simple : on part de notre concentration maximale à 100µg/mL et on va la diluer par pas de deux, 10 fois. Cela aboutit aux concentrations suivantes : 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL... jusqu'à 0,2 µg/mL.

Pour déterminer les différents EC, la réponse du signal LUCS en fonction de la concentration en échelle logarithmique est tracée. Voici un exemple de courbe obtenue pour un NM, le SiO<sub>2</sub> de type 200 sur cellules HEPG2.

(Exposition au SiO<sub>2</sub> pour une concentration allant de 100 µg/mL à 0,2 µg/mL par pas de 2, pendant 24h, à 37°C et 95% d'humidité, dans plaque 96 puits)

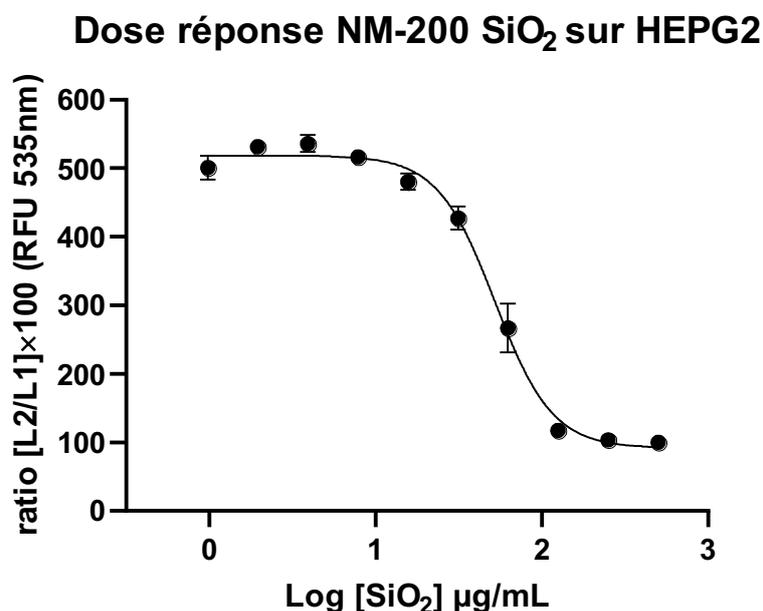


Figure 95: Dose réponse du NM-200 (SiO<sub>2</sub>) déterminée par la méthode LUCS sur le modèle cellulaire HepG2

A partir de cette courbe on peut déterminer les différents EC50 qui nous intéressent, et les récapituler dans le tableau suivant.

Tableau 20: Récapitulatif des valeurs des EC50 pour les 3 NM toxiques en fonction des modèles cellulaires

EC50 en µg/mL	NM-110	NM-200	Ag
HepG2	12.6	55.6	49.6
SHS-Y5Y	9.0	56.6	194.1
RPE	x	x	x
Hacat	11,1	16.5	x
Fibroblaste (NHDF)	11.3	x	x

Chaque dose réponse a été faite 3 fois indépendamment pour chacun des NM et sur chacun des modèles cellulaires.

Nous n'avons pas pu réaliser ce test sur les cellules RPE, car ces dernières sont très difficiles à cultiver et les stocks disponibles étaient faibles.

### g) Evaluation de la toxicité des ondes RF seules

Avant de s'intéresser à des potentiels effets synergiques ou du moins combinés, nous allons regarder les effets des ondes RF seules à différents DAS (2, 6 et 10 W/kg) sur les modèles cellulaires à 2,3 GHz en mode CW. Pour cela nous avons exposé les cellules pendant 24h aux ondes RF dans 100 $\mu$ L de DMEM. Voici les résultats obtenus en Figure 96 :

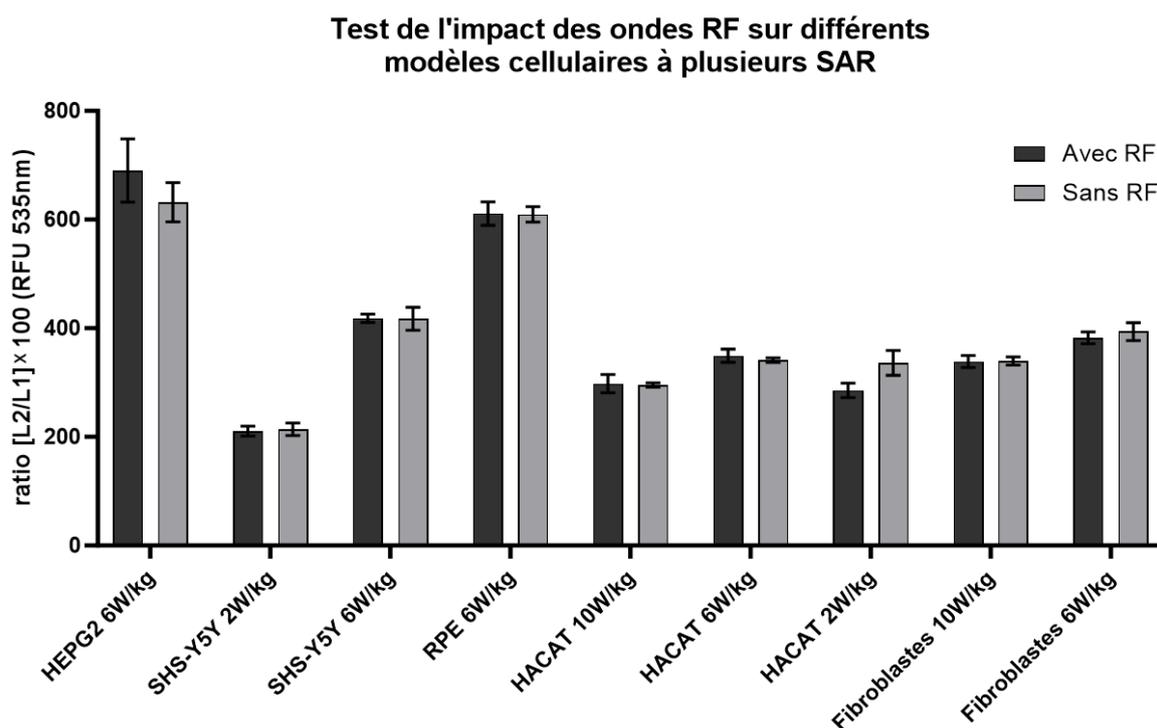


Figure 96: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS des ondes RF à différents DAS pour les modèles cellulaires choisis

Ces résultats sont obtenus à partir d'une comparaison entre 4 puits exposés aux ondes RF (un îlot complet) et 3 puits sans RF. La différence de ratio entre les données (de 200 à 700) est due à la variabilité biologique entre les tests (état des cellules à l'instant t, nombre de passage, et modèle cellulaire). Afin de s'affranchir de ces différences, j'ai normalisé les données en traçant les ratios en pourcentage par rapport à la moyenne des contrôles négatifs sans RF. (Figure 97)

### Test de l'impact des ondes RF sur différents modèles cellulaires à plusieurs SAR (normalisé)

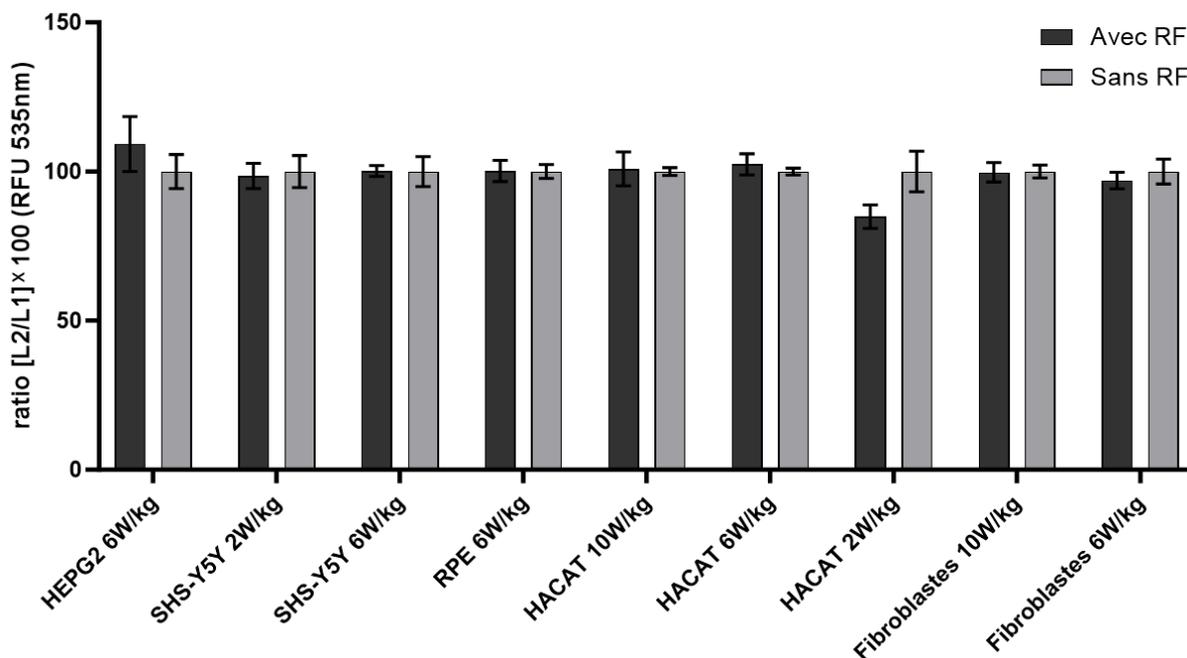


Figure 97: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS des ondes RF à différents DAS pour les modèles cellulaires choisis, normalisé

Visuellement on voit rapidement qu'il n'y a pas de différences significatives entre RF et sans RF. Il est à noter que les premiers tests ont parfois été réalisés à plusieurs jours d'écart, car au début nous avions qu'une seule plateforme d'exposition (16 puits RF). Le problème était que d'un ensemencement cellulaire à un autre il y avait une variabilité liée à l'état des cellules à l'instant t et au nombre de passage cellulaire (réplication des cellules hebdomadaire). Aujourd'hui nous avons 4 plateformes d'exposition RF en parallèle (64 puits RF) utilisables en incubateur et donc nous pouvons éviter une grande partie de cette variabilité biologique.

Pour les cellules HaCaT à 2W/kg, on observe cependant une différence notable, alors que pour des DAS plus élevés (6 et 10W/kg) nous n'avons pas cet effet. Ce modèle cellulaire est encore à l'étude au moment où j'écris ces lignes, et nous n'avons pour l'instant que n=1 pour cette manip à 2W/kg. Il est prévu de réitérer cette expérience pour confirmer ou non l'effet observé. Mais compte tenu des autres résultats c'est probablement un artefact de manip. Nous sommes actuellement en train de compléter ces résultats. A l'heure actuelle, il semblerait qu'une puissance allant jusqu'à 10W/kg n'ait aucun effet sur tous les modèles cellulaires testés, lignées cancéreuses, non différenciés ou primaire. Actuellement, nous sommes limités à cette puissance à cause de problèmes d'évaporations liés à l'échauffement produit par les ondes RF (voir partie 2).

Ces tests ont été réalisés en CW (Continuous Wave).

## h) Co-exposition des ondes RF à différents DAS avec des nanomatériaux à concentration maximale

Notre première idée pour une co-exposition est de surévaluer une condition par rapport à l'autre, c'est-à-dire de se placer dans le pire cas d'un des exposants et d'appliquer le second à une dose non toxique, puis observer si l'on voit des différences entre le 1<sup>er</sup> exposant seul, et la combinaison des deux exposants.

### *i) Protocole pour évaluer les effets synergiques à forte concentration des NM avec les ondes RF*

Nous étions limités par plusieurs problématiques concernant les RF (matériel, évaporation, calibration etc...), et nous n'avions donc pas déterminé avec exactitude une dose réponse des RF qui iraient jusqu'à une toxicité. Nous avons donc fixé une puissance relativement significative mais pour laquelle nous n'observons aucune toxicité, 6W/kg.

C'est donc les NM que nous avons sur-concentré à 100µg/mL. Nous avons considéré plusieurs conditions :

- RF seules, nous permettant de confirmer qu'il n'y a pas d'effet toxique
- NM seuls, nous permettant d'avoir l'étalon de toxicité provoqué par cette forte concentration
- RF + NM, la co-exposition des deux facteurs que nous allons comparer aux résultats avec NM seuls
- Contrôles positifs, pour définir un 100% de toxicité. Dans les tests biologiques que nous réalisons, on utilise de la chloroquine fortement concentrée.
- Contrôles négatifs, nous permettant de nous assurer que le test n'a pas rencontré de problèmes. Ils peuvent aussi servir pour analyser les résultats sous forme de ratio, les contrôles négatifs étant 100% viables et les positifs 0%.

Les résultats suivant chaque modèle cellulaire pour une expérimentation sont indiqués sur les Figure 98 à Figure 102 :

*(Co-exposition simultanée aux NM à une concentration de 100 µg/mL, et ondes RF à 2,3 GHz pour 6W/kg pendant 24h, à 37°C et 95% d'humidité, dans plaque 96 puits sur les différents modèles cellulaires)*

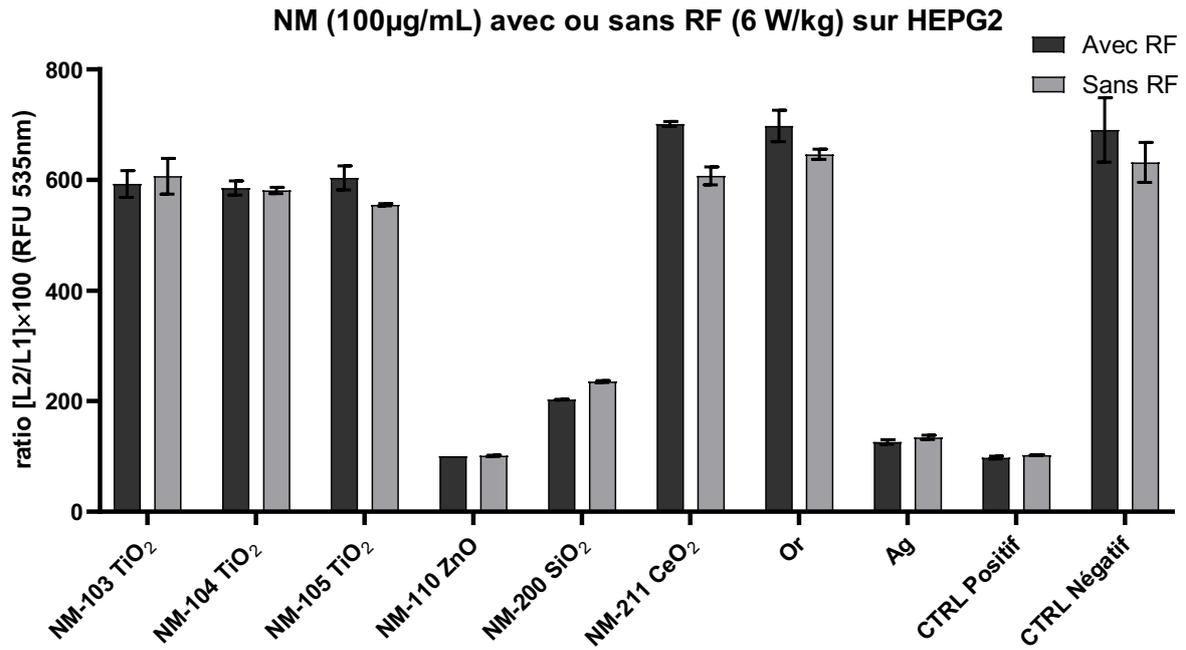


Figure 98: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à Cmax et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire HepG2

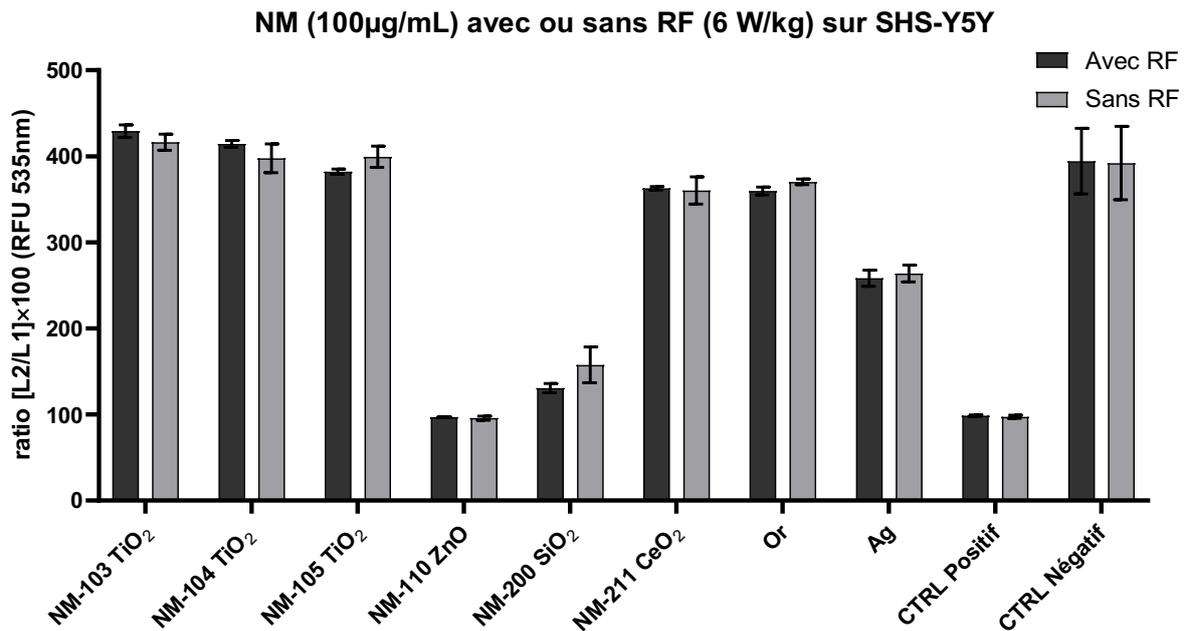


Figure 99: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à Cmax et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire SHS-Y5Y

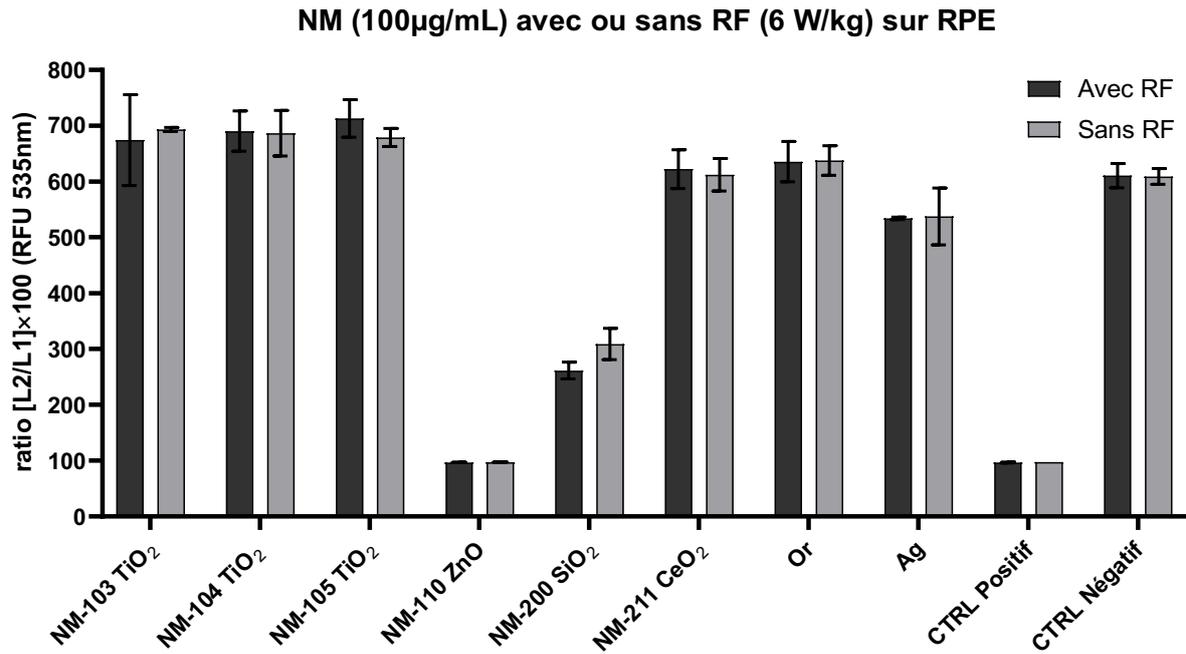


Figure 100: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à Cmax et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire RPE

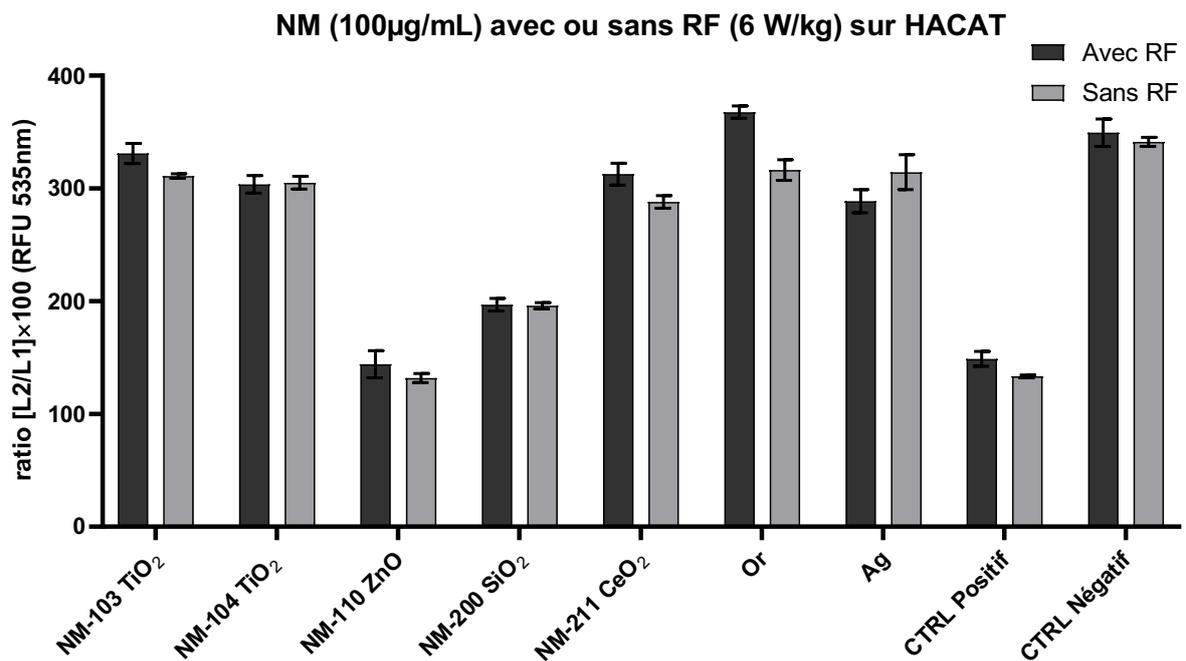


Figure 101: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à Cmax et ondes RF à 6W/kg sur le modèle cellulaire HACAT

### NM (100µg/mL) avec ou sans RF (6 W/kg) sur Fibroblastes

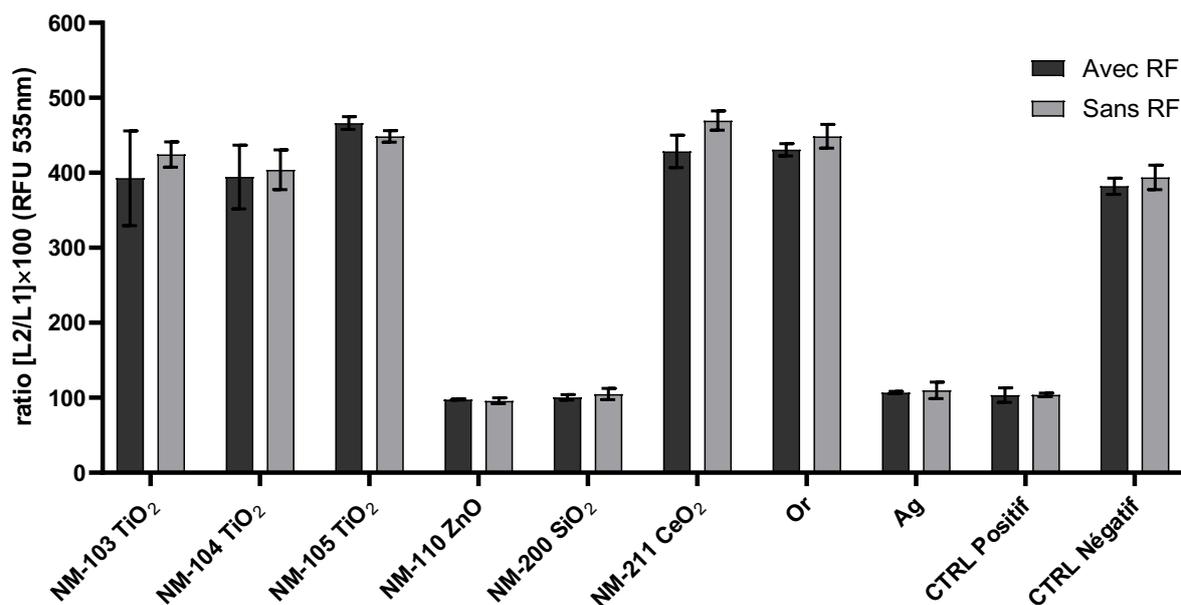


Figure 102: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition des NM à Cmax et ondes RF à 6W/kg sur cellules primaire Fibroblaste

Encore une fois nous sommes limités par la sensibilité de notre méthode d'analyse. Il se peut que nous voyions un effet qui semble important pour un NM en particulier, mais, lors du deuxième ou troisième test, nous ne le reproduisons pas. Il est donc difficile de discerner des effets légers. Nous investiguons actuellement cette problématique avec notre partenaire AOP pour estimer la sensibilité de la méthode LUCS et pouvoir déterminer si nous avons statistiquement des différences significatives entre les conditions.

#### *ii) Protocole pour évaluer les effets synergiques à l'EC10 des NM avec les ondes RF*

Une deuxième idée a été de se placer à la limite de toxicité d'une des conditions, à savoir l'EC10. Les cellules seront dans un état assez sensible pour nous permettre de voir si l'ajout d'un deuxième agent fait tendre la réponse cellulaire vers plus ou moins de toxicité. Dans le paragraphe précédent, nous nous étions placés à des concentration en NM très fortes (100 µg/mL). Comme nous avons fait des doses-réponses des NM toxiques, nous connaissons désormais leurs concentrations à EC10, EC50 et EC90 suivant le modèle cellulaire. Nous supposons que la toxicité est plus susceptible de varier dans la zone EC10 où l'on commence tout juste à voir le côté toxique du NM. Si l'application des ondes RF induit un effet protecteur, alors on devrait voir la toxicité diminuer. Si à l'inverse elles augmentent la toxicité, on verra nos résultats se décaler vers l'EC50. Il est possible qu'il n'y ait aucune interaction entre les deux exposants et que l'on reste dans des valeurs similaires à celles obtenues à l'EC10. Le protocole est le même que précédemment, le seul changement est la concentration en NM. Nous avons pour cela sélectionné les 3 NM présentant une toxicité, soit le ZnO, le SiO<sub>2</sub> et l'argent.

Nous avons fait les tests sur deux modèles cellulaires, les HEPG2 et SHS-Y5Y. Les conditions des RF sont similaires aux tests précédents : 2,3 GHz en mode CW et un DAS de 6W/kg ou

10W/kg. Les co-expositions sont réalisées durant 24h. Les résultats sont présentés Figure 103 et Figure 104 :

*(Co-exposition simultanée aux NM toxiques à une concentration égale à l'EC10, et ondes RF à 2,3 GHz pour 6W/kg pendant 24h, à 37°C et 95% d'humidité, dans plaque 96 puits sur différents modèles cellulaires)*

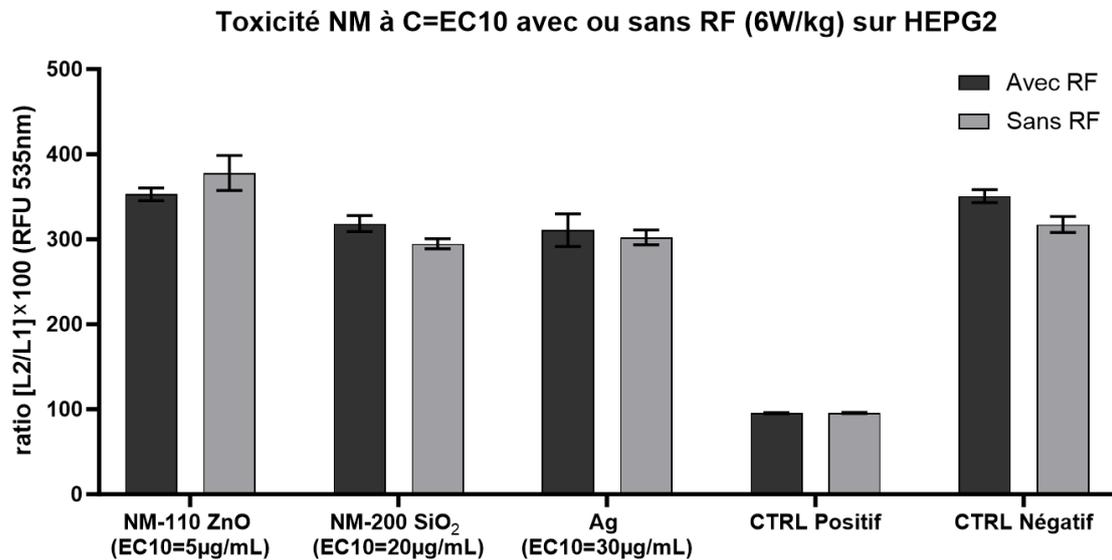


Figure 103: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à la concentrations spécifique EC10 propre à chacun des NM ZnO, SiO<sub>2</sub> et Ag et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire HepG2

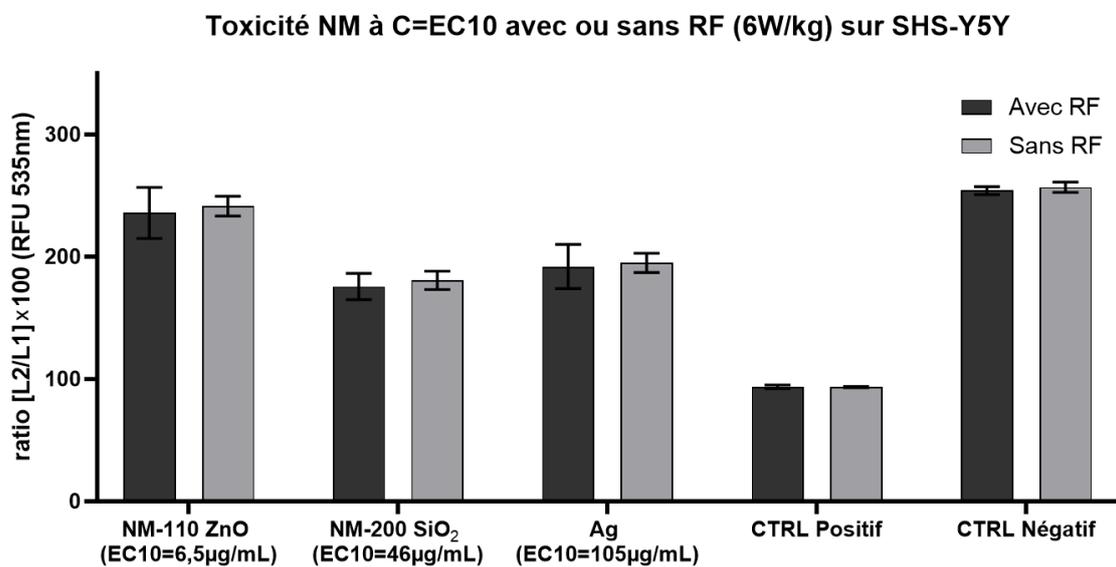


Figure 104: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à la concentrations spécifique EC10 propre à chacun des NM ZnO, SiO<sub>2</sub> et Ag et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire SHS-Y5Y

Nous n'observons pas d'effet particulier d'une co-exposition aux ondes RF et NM à cette concentration spécifique. Nous avons alors décidé de faire un test similaire mais cette fois-ci en ciblant un NM en particulier, le SiO<sub>2</sub>, et de tester plusieurs EC pour voir si en changeant la concentration on faisait apparaître des effets significatifs. Nous avons donc réalisé la même expérimentation à 4 concentrations différentes : EC10, 20, 30 et 50. (Figure 105)

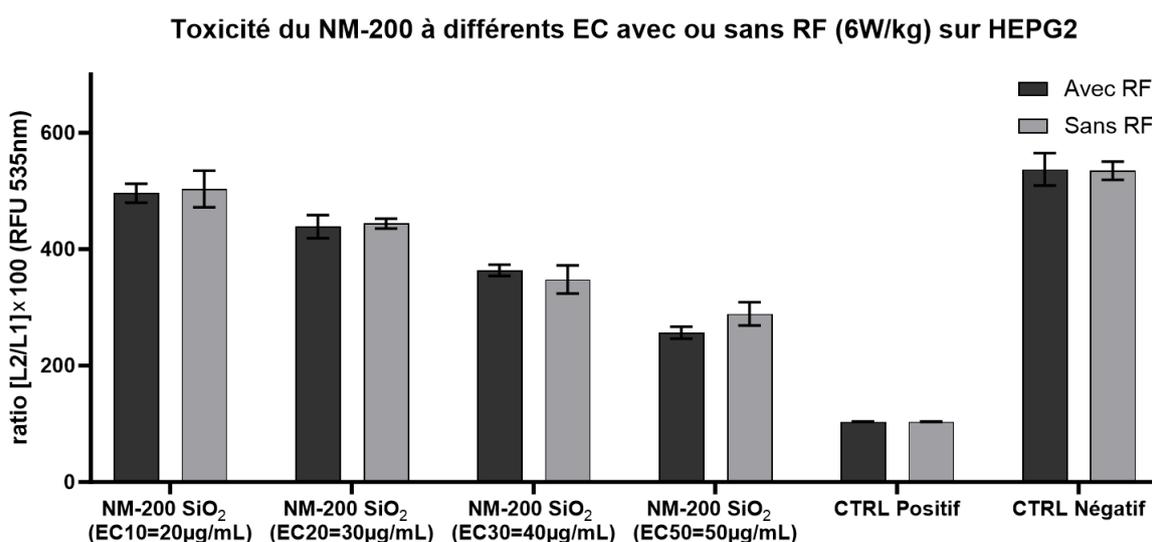


Figure 105: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS d'une co-exposition à des concentrations spécifique EC10 EC20 EC30 et EC50 du NM-200 (SiO) et ondes RF à 6W/kg sur modèle cellulaire HepG2

Les résultats sont semblables aux précédents obtenus. Aucun effet significatif de l'application des deux agents combinés par rapport à un agent seul n'est obtenu.

D'autres tests similaires sont prévus sur les Fibroblastes, cellules humaines primaires probablement plus sensibles que les autres modèles cellulaires étudiés, sur lesquels nous allons tester plusieurs EC combinés avec les RF à 10 W/kg maintenant que notre banc de test le permet.

## 2) Problématique de l'évaporation du milieu de culture provoquée par l'effet thermique des ondes RF

Lorsque nous sommes montés en puissance pour atteindre des DAS de 15W/kg et 30W/kg, nous avons commencé à détecter une forte toxicité sur les cellules. Cependant les effets thermiques étant très importants, nous avons mesuré la quantité restante de liquide après le test et il ne restait plus qu'environ 70µL dans les puits... ! Alors effectivement, le DAS a varié au cours de l'expérimentation. Nous avons vu d'après les travaux d'Ali Moscatiello également en thèse dans l'équipe de recherche que le DAS diminue lorsque le volume diminue. Donc au bout de 24h, le DAS était plus faible que celui désiré. Nous avons supposé que cette toxicité était liée au phénomène d'évaporation du milieu. Afin de le démontrer, il a fallu réaliser une expérience dédiée pour dissocier les effets d'évaporation de ceux des ondes RF.

### a) Chauffer le milieu de culture avec les ondes RF en amont d'une exposition sur cellules

Nous avons décidé de mener une expérience dans laquelle nous faisons chauffer par ondes RF le milieu de culture seul. Pour cela, nous positionnons sur nos applicateurs RF notre plaque à puits remplis chacun de 100µL de DMEM et appliquons les ondes RF exactement dans les mêmes conditions que précédemment. Nous exposons pendant 24h aux ondes RF notre milieu de culture pour provoquer la même évaporation que dans le test précédent. Ensuite nous récupérons ce milieu et le déposons dans une plaque contenant des cellules. On attend 24h avec ce milieu déposé sur les cellules puis nous réalisons une analyse de toxicité.

Plusieurs conditions ont été testées :

- les cellules avec milieu de culture exposé aux RF
- Les cellules avec milieu de culture exposé au RF + le complément en milieu de culture ajouté correspondant à la proportion de volume évaporé en DMEM. Par exemple, si on a 30% d'évaporation dans les 100µL, alors on va préparer un mélange 70µL DMEM exposé + 30µL DMEM neuf.
- Les cellules avec milieu de culture exposé au RF + la proportion de volume évaporé en eau. Nous appliquons la même procédure que ci-dessus sauf qu'on ajoute de l'eau cette fois ci et non du milieu de culture.
- Le contrôle DMEM + eau pour vérifier que ce n'est pas l'ajout de l'eau qui a amené une toxicité.

Pourquoi ajouter soit du DMEM soit de l'eau ? Parce que lors du chauffage RF c'est l'eau qui va s'évaporer, entraînant une concentration du milieu de culture. A ce stade on ne sait toujours pas si c'est le milieu de culture qui est sur-concentré ou bien s'il est dénaturé par l'exposition

aux RF. Voici les résultats obtenus avec comme milieu DMEM pour les cellules, celui pré-exposé en RF pendant 24h à 20W/kg. (Figure 106)

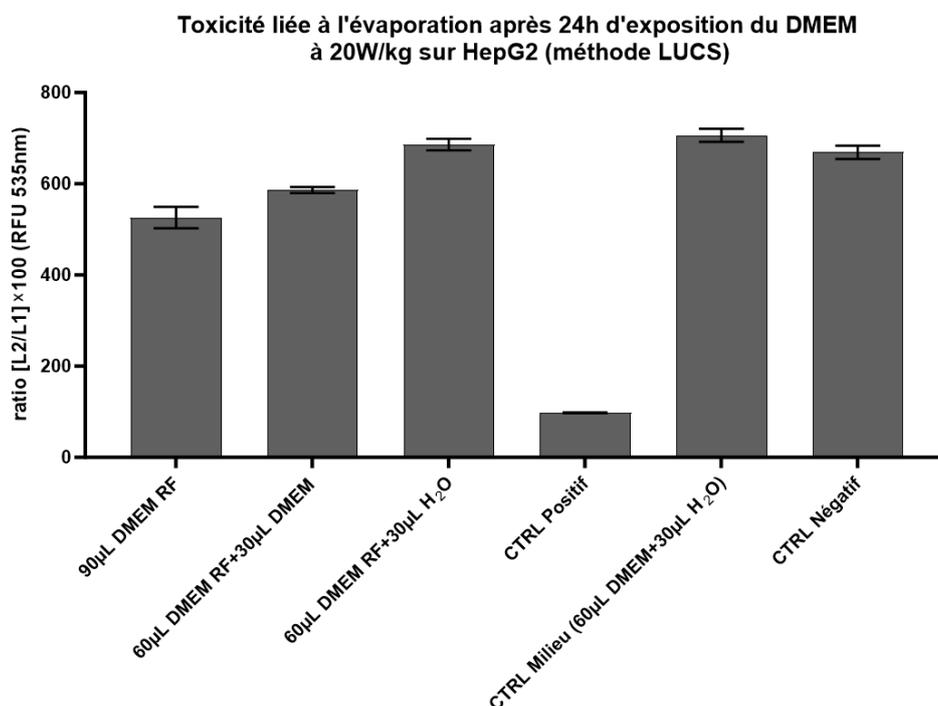


Figure 106: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 20W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2

On remarque ici que lorsqu'on dépose le DMEM exposé préalablement aux ondes RF sur les cellules, on obtient une légère toxicité. Lorsqu'on rajoute du DMEM en proportion de celui évaporé (~30%), on se rapproche du contrôle négatif. Enfin lors de l'ajout de l'eau, on retrouve les valeurs de non toxicité. Par cette approche, on peut déjà dire que l'évaporation joue un rôle dans la toxicité provoquée, très certainement par une sur-concentration des composés du milieu. Par ailleurs, nous avons voulu confirmer qu'en utilisant un autre test de cytotoxicité, nous obtenions les mêmes conclusions. Pour cela nous avons fait une analyse par MTT sur la même plaque. L'avantage de la technique LUCS est qu'elle ne nécessite pas de lyser les cellules pour obtenir le résultat. Nous avons donc dans un premier temps analysé la plaque par LUCS (Figure 106) puis par MTT (Figure 107). Les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyse sont très proches.

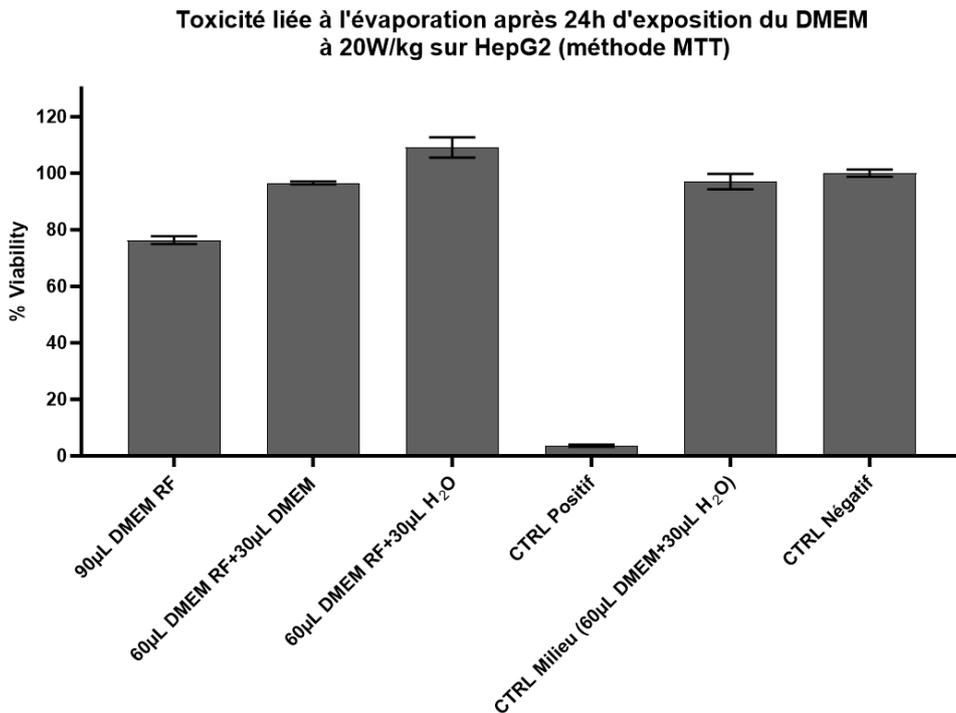


Figure 107 : Evaluation de la toxicité par méthode MTT liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 20W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2

Un autre moyen de savoir si le DMEM a été dénaturé spécifiquement par les ondes RF est de le chauffer par un procédé similaire. C'est ce que nous allons vérifier dans la partie suivante.

### b) Génération d'une évaporation du milieu de culture avec une autre méthode de chauffage que les ondes RF

Pour savoir si le milieu était dénaturé par les ondes RF, nous avons décidé de provoquer cette évaporation par une autre méthode de chauffage, avec l'augmentation de la température de l'étuve. Pour cela on va fixer la température de l'étuve à 55°C et vérifier toutes les heures la quantité de liquide dans les puits. Ainsi on pourra comparer différents taux d'évaporation et essayer de déterminer un seuil pour lequel on voit apparaître une toxicité. Une fois le taux d'évaporation mesuré (en prélevant le volume à la pipette), on le récupère pour ensuite le déposer plus tard sur les cellules. Une fois les différents milieux à des taux d'évaporation différents prélevés, on lance une exposition aux différents milieux sur 24h, suivie d'une analyse par LUCS. (Figure 108)

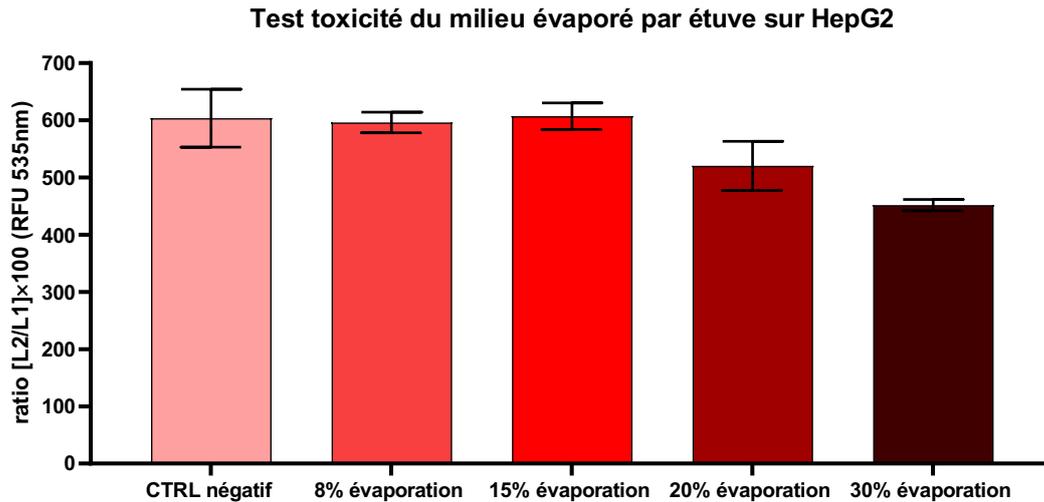


Figure 108 : Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation générée par chauffage à l'étuve sur modèle cellulaire HepG2

Sur ce graphique on voit qu'à partir de 20% d'évaporation dans le puits on commence à remarquer l'apparition d'une toxicité. Nous pouvons donc définir un seuil à 15% pour lequel l'évaporation et donc la surconcentration des composés du DMEM n'influent pas sur la toxicité cellulaire. Lors de nos mesures, pour une exposition de 24h à 10W/kg nous étions à un taux d'évaporation de 8-12%. Nous avons fait un test à cette puissance pour confirmer qu'il n'y avait bien aucune toxicité. (Figure 109)

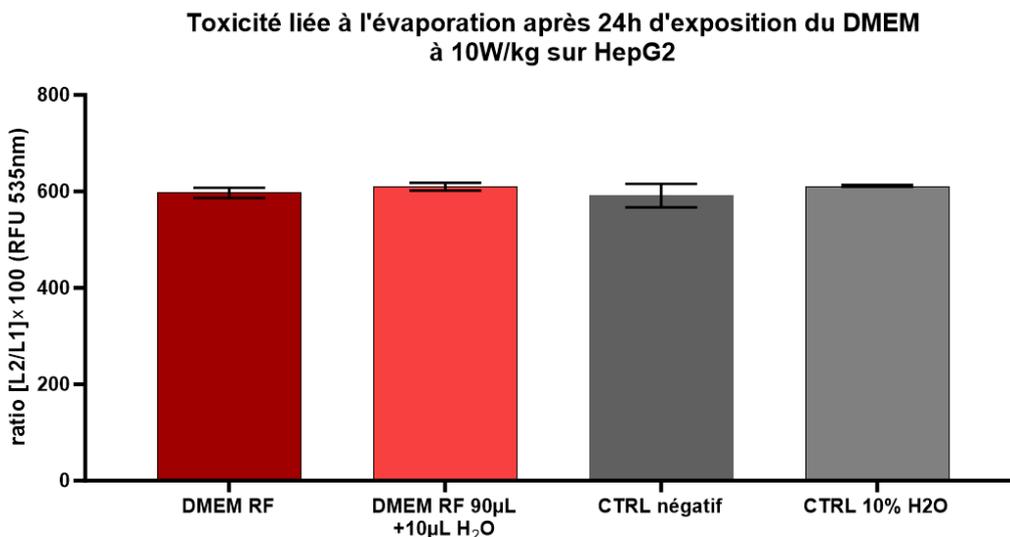


Figure 109: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 10W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2

On ne voit aucune différence entre le DMEM exposé seul, celui complété avec 10% d'eau et les contrôles, ce qui valide le fait qu'on n'a pas d'impact lié à l'évaporation du milieu à 10W/kg. C'est la limite en puissance que l'on s'est fixé à ce jour pour notre système d'exposition aux ondes RF avec plaques à 96 puits.

### c) Méthodes pour évaluer l'évaporation du milieu de culture

Pour l'étude précédente, il a fallu mesurer la quantité d'eau évaporée suite à un échauffement thermique. La méthode habituelle utilisée pour mesurer rapidement un volume dans un puits est de prélever avec une pipette le volume contenu dans le puits. On règle la quantité de volume à prélever supérieure au volume auquel on s'attend prélever. Par exemple, on va ajuster la pipette à 100 $\mu$ L si on s'attend à prélever 90 $\mu$ L. Ainsi lorsque qu'on prélève, les 10 $\mu$ L manquant vont être remplacés par de l'air. Ensuite on diminue le volume de la pipette petit à petit jusqu'à ce que le liquide soit en bout de cône. Cette technique est assez approximative, et comme nous tâtonnions sur ces problématiques d'évaporation, j'avais besoin de confirmer par une autre méthode ce volume restant dans les puits.

Pour cela, j'ai utilisé une technique optique avec un microscope de type Hirox déjà présenté dans le chapitre 2) pour mesurer l'écart entre le PCB et la plaque à puits. Le microscope Hirox possède aussi un système d'imagerie 3D. L'idée est de faire un focus sur le bord supérieur de plaque et à la surface du liquide. En ayant la distance entre ces deux points et en la comparant à des volumes connus on peut déterminer le volume inconnu.

Suite à l'expérience d'évaluation de l'évaporation induit par application d'ondes RF, on prélève sur 3 des îlots le volume restant avec la méthode pipette. Cela nous permettra de comparer les résultats. Avec 12 puits mesurés par cette méthode, nous obtenons assez de données pour établir une moyenne et nous pouvons nous attendre à des valeurs similaires dans le 4<sup>e</sup> îlot. Sans toucher aux puits du dernier îlot exposé aux ondes, j'ai enlevé sur un bord de plaque le liquide de 9 puits. J'y ai rajouté 3 fois 100, 90 et 80  $\mu$ L qui servent d'étalons.

Lors d'un essai préliminaire, on s'était rendu compte qu'il était très difficile de faire le focus sur le liquide. Pour cela j'ai eu l'idée d'y ajouter une pastille en plastique de 5mm de diamètre qui flotte à sa surface et sur laquelle il est facile de faire le focus. (Figure 110) On la dépose délicatement dans le puits, de sorte à ce qu'on n'ait pas de bulles en dessous. L'autre avantage important avec l'ajout de cette pastille, est que l'on diminue grandement l'aspect du ménisque qui est plutôt conséquent dans les puits de si petit diamètre. De même, l'aspect transparent de la plaque ne nous permet pas de faire un focus idéal sur le bord des puits. J'ai donc simplement utilisé un marqueur de couleur pour colorier le bord des puits.

Nous voilà prêts à faire l'imagerie 3D. Nous allons donc relever les distances entre le bord de puits et le haut de la pastille. (Figure 111) On fait une moyenne pour les étalons 100, 90 et 80  $\mu$ L puis on mesure nos 4 puits inconnus de la même manière.

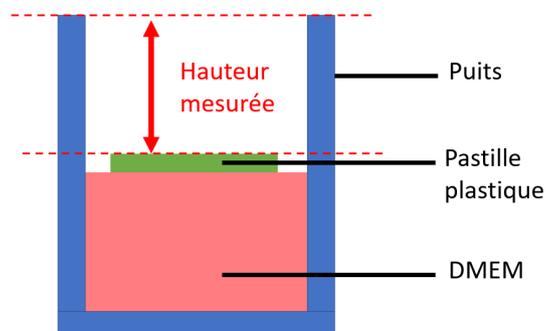


Figure 110: Schéma de principe pour l'analyse de l'évaporation du milieu par la hauteur de milieu présent dans le puits

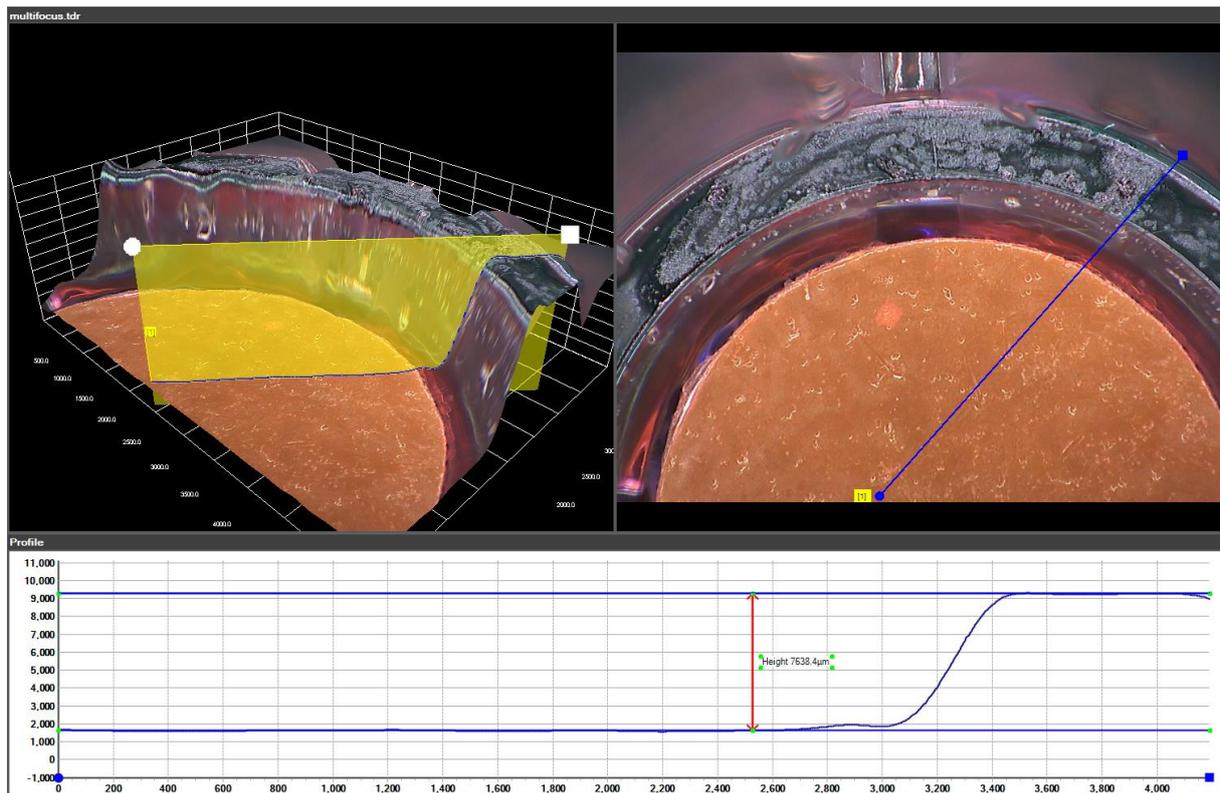


Figure 111: Capture d'écran de l'analyse 3D réalisée par l'HIROX avec une coupe selon le plan jaune

Après comparaison des hauteurs trouvées sur les puits de références (80,90 et 100 $\mu$ L), nous retrouvons des résultats semblables à la mesure faite à la pipette. Nous pouvons donc valider cette technique qui est beaucoup plus rapide que celle faite avec le microscope Hirox.

#### d) Recherches pour tenter de limiter l'évaporation du milieu de culture

Il existe plusieurs techniques commerciales permettant de diminuer l'évaporation dans des plaques 96 puits.

Eppendorf a mis sur le marché une plaque à puits novatrice permettant de réduire drastiquement l'évaporation des bords de plaques. Leur technologie consiste à remplir la bordure des puits de liquide par des canaux dédiés. Normalement sur les temps longs (plusieurs jours), on remarque une évaporation conséquente sur les puits de bordure. Il est classique pour toute étude faite par les biologistes de ne pas utiliser les puits en bordure de plaque, ce qui réduit de 30% le nombre de puits utiles alors à 60 au lieu de 96. Avec ces plaques Eppendorf, on annule quasiment tout effet d'évaporation. Cependant dans notre cas la présence de liquide dans la plaque et non les puits va affecter grandement notre répartition du champ électromagnétique.

En revanche j'ai pensé à deux autres méthodes :

- Développer un couvercle avec des cônes pointés vers les puits, permettant aux gouttes d'y retomber,
- Faire des trous sur le couvercle de la plaque à puits pour permettre un flux d'air et diminuer le gradient de température entre le liquide et l'environnement.

### i) Evaluation de la solution avec modification du couvercle des plaques à puits :

Lorsqu'on chauffe le milieu et génère l'évaporation, on remarque sur le couvercle de plaque de nombreuses gouttes microscopiques. L'idée était donc de développer un couvercle avec des picots, qui permettraient aux gouttes condensées de retomber par gravité dans le puits d'où elles proviennent.

J'ai testé un premier prototype fabriqué par impression 3D, développé par Lionel Seguié du FabLas du laboratoire LAAS. Ci-dessous est présentée une photo du couvercle en Figure 112.

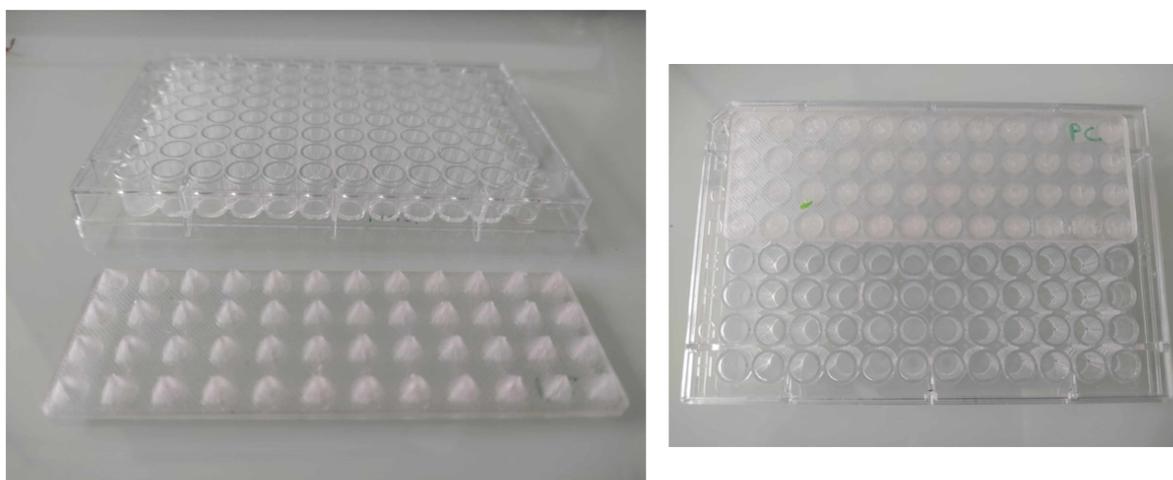


Figure 112: Plaque 96 puits avec couvercle à picots imprimé en 3D

Ce couvercle recouvre 48 puits de la plaque. De par la symétrie de notre PCB, on aura donc une moitié de plaque recouverte par ce nouveau système et l'autre moitié par le couvercle usuel. Le test d'évaporation a été réalisé dans les conditions de 10W/kg pour une exposition de 24h. Pour comparer ces évaporations, on peut penser à plusieurs méthodes. Dans ce cas-ci, je vais prélever à l'aide d'une pipette le volume post exposition de chaque moitié de plaque et les comparer. Ces prélèvements sont rassemblés dans un tube Eppendorf de 5 mL pour chaque partie de plaque. Au préalable, chaque tube a été pesé car il peut y avoir des variations entre chaque contenant. Au final, on n'observe pas de différence significative entre les 2 poids obtenus. Si l'on divise le volume total obtenu par 48, une évaporation moyenne de 12 % est atteinte. D'ailleurs juste après l'exposition aux ondes RF, on peut voir sur le couvercle imprimé en 3D les microgouttes qui sont restées sur sa surface comme sur la Figure 113. Elles n'ont pas été entraînées par la gravité.

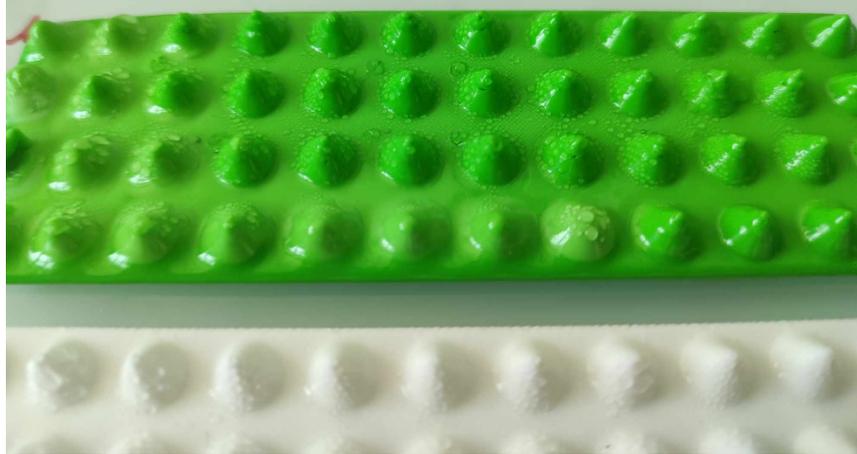


Figure 113: Image des gouttes déposées sur les couvercles imprimés en 3D suite à l'évaporation du milieu

J'ai testé par la suite deux autres type de matériaux 3D qui sont beaucoup plus lisse en pensant que je diminuerais ainsi le potentiel d'adhésion des gouttes au support mais ça n'a pas été concluant. Un travail plus approfondi serait nécessaire pour choisir le matériau adéquat ainsi que la géométrie idéale.

#### ii) Evaluation de la solution avec un couvercle percé de trous :

L'idée ici est de réaliser un trou d'1mm dans le couvercle au-dessus de chacun des 96 puits, permettant ainsi au flux d'air ambiant de venir refroidir le contenu du puits. En pratique on a observé que l'évaporation obtenue après exposition était bien supérieure à celle obtenue avec un couvercle non troué.

Nous avons pu comparer en parallèle une plaque avec couvercle standard, et une avec un petit trou d'1mm sur chacun des puits. Le volume moyen évaporé avec la plaque au couvercle classique est de 10%, tandis que celui avec celle au couvercle troué est de 25%. La Figure 114 montre un comparatif entre le DMEM exposé d'une plaque trouée (bleu) et celui d'une plaque au couvercle normal (rouge). Comme précédemment nous récupérons ce milieu qu'on dépose sur les cellules pour une incubation de 24h, puis on réalise une analyse LUCS. On remarque le même phénomène observé plus haut, une forte évaporation entraîne de la toxicité sur les cellules.

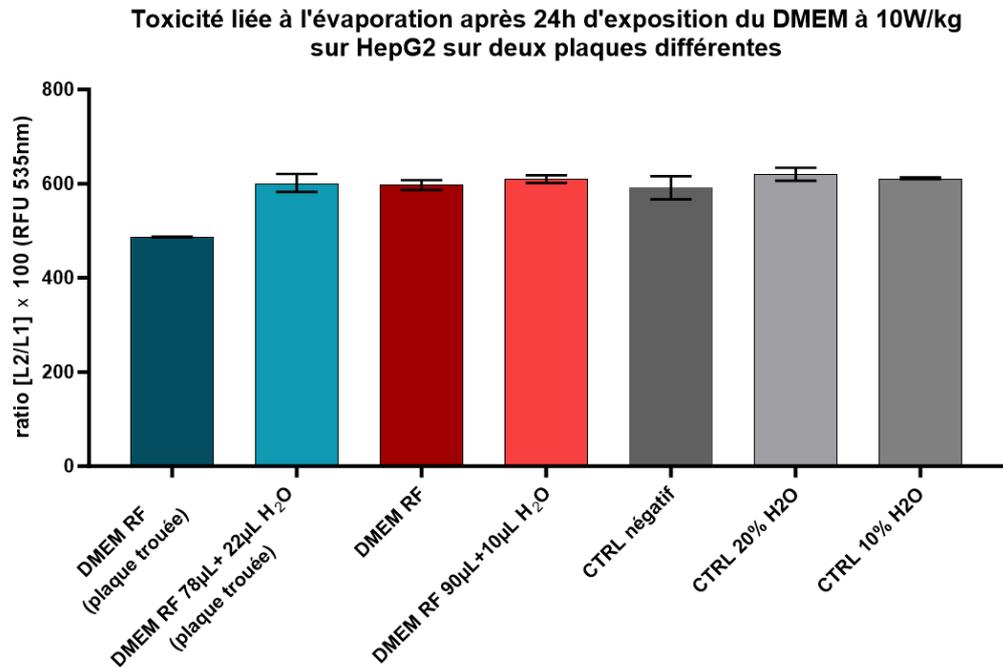


Figure 114 : Evaluation de la toxicité par méthode LUCS liée à l'évaporation provoquée par l'exposition du milieu de culture aux ondes radiofréquences à 10W/kg durant une exposition de 24h sur modèle cellulaire HepG2 pour différents couvercles

Nous n'avons donc pas encore trouvé de moyen technique nous permettant de réduire l'évaporation générée par l'incrément thermique des RF et donc d'augmenter notre puissance d'exposition aux RF au-delà de 10 W/kg pour notre plateforme d'exposition RF pour plaque à 96 puits.

### e) Réflexion sur les problématiques des effets thermiques induits par les RF

Une grande majorité des études toxicologiques sur les ondes radiofréquences mettent en place des bancs de tests avec un système de régulation thermique. Lors de l'application de DAS relativement élevés, supérieurs à 2W/kg, l'effet thermique n'est plus négligeable. L'objectif de ces études est de déterminer de potentiels effets athermiques. Notre vision de la problématique est différente. On ne peut pas décorrélérer l'échauffement provoqué par l'application d'onde radiofréquence des potentiels effets toxiques car dans une exposition réelle ce phénomène thermique est bien présent. Il y a peut-être un effet cumulatif par exemple. Dans notre choix de ne pas décorrélérer les effets thermiques et athermiques, nous devons donc nous assurer que cet échauffement n'entraîne pas de toxicité par ce simple incrément thermique. Comme nous travaillons sur des modèles in vitro, il suffit simplement de faire une expérience d'incubation à 37°C + l'incrément thermique comme témoin des effets thermiques. Si par exemple une exposition à 20W/kg entraîne une élévation de la température de 3°C au fond des puits, on règle notre incubateur à 40°C pour les 24h d'exposition et on évalue la toxicité induite par un élévation thermique seule sur les cellules. Le fait de monter la température de l'incubateur est alors un « pire cas » puisque la totalité du liquide des puits va se retrouver à 40°C, ce qui sera beaucoup plus homogène que notre exposition RF. Si dans ces conditions on n'observe pas de toxicité alors nous sommes assurés que les effets thermiques provoqués par les ondes RF n'altèrent pas l'homéostasie cellulaire.

Ci-dessous sont présentés les résultats de tests thermiques réalisés sur 3 modèles cellulaires à deux températures différentes. Une plaque est placée dans l'incubateur à 37°C tandis qu'une autre plaque est placée parallèlement dans un autre incubateur à 40°C. L'état cellulaire à l'instant t ainsi que le nombre de passage sont donc identiques pour les deux conditions.

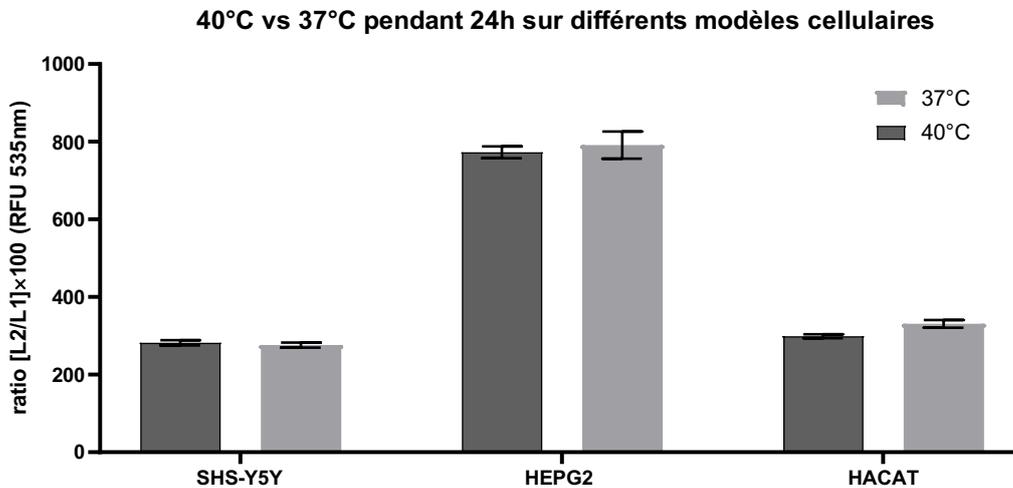


Figure 115: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS de différents modèles cellulaires maintenues 24h dans un environnement à 37°C ou 40°C

On voit à nouveau qu'en fonction des modèles cellulaires il y a une différence importante sur les ratios obtenus. On peut donc normaliser ces valeurs par rapport à la moyenne de chacune condition à 37°C pour obtenir le graphique suivant :

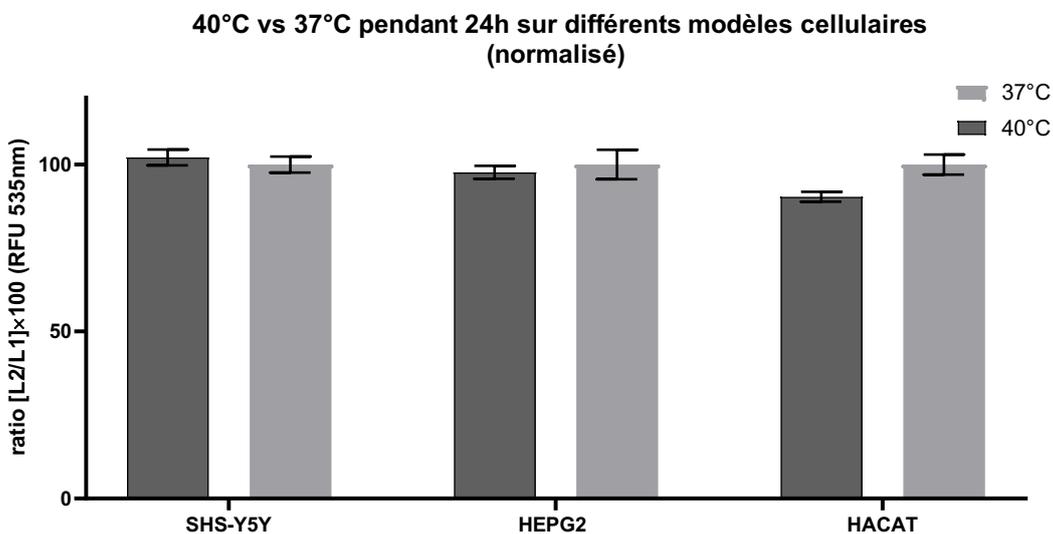


Figure 116: Evaluation de la toxicité par méthode LUCS de différents modèles cellulaires maintenues 24h dans un environnement à 37°C ou 40°C (normalisé)

On n'observe pas de différence entre les plaques exposées à 37°C et celles à 40°C sur les 3 modèles cellulaires testés. Nous pouvons donc confirmer que si nous observons des effets durant nos tests ils ne seraient pas uniquement liés aux effets thermiques.

### 3) Caractérisation de la matière

Jusqu'à présent on a vu le fait d'exposer aux ondes RF des échantillons biologiques pour évaluer la potentielle toxicité des ondes radiofréquences. C'est une problématique assez nouvelle dans l'équipe MH2F, d'utiliser des systèmes d'exposition aux ondes RF. Historiquement l'équipe étudie plutôt les interactions de la matière avec les ondes RF pour la caractériser par ses propriétés diélectriques. Utiliser donc les ondes RF comme capteur puis récupérer les données de l'échantillon sondé pour en déduire des propriétés. [141], [142]

#### a) Mesure par CPW avec station sous pointes

##### i) Principe de la technique

En appliquant un champ électromagnétique sur un échantillon on va induire une polarisation de tout ce qui la constitue : molécules, atomes et électrons. Cette polarisation varie en fonction de l'objet analysé et est caractérisé par sa permittivité relative  $\epsilon_r$ . La spectroscopie diélectrique est la détermination de la permittivité en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué ; cette technique détermine la « signature diélectrique » intrinsèque au matériau. [143]

On va donc appliquer un champ électromagnétique sur un échantillon et récupérer les informations contenant les données de cette permittivité. Pour cela on va utiliser une ligne de transmission coplanaire reliée à une station sous pointe et un analyseur de réseau. Au-dessus de cette ligne on a une structure en SU8 et recouverte de PDMS formant ainsi un réservoir qui contient le liquide à analyser. Le guide d'onde coplanaire est constitué de 3 électrodes : masse – signal – masse. De part en part de ces lignes on viendra positionner les pointes RF à 3 broches qui amènent le signal et mesure la transmission et la réflexion de ce dernier. Ces deux paramètres,  $S_{12}$  et  $S_{11}$ , représentent les rapports entre le signal émis et les signaux transmis ou réfléchis par l'échantillon testé.

Cette technique est très puissante car non invasive, nécessitant de volume faible de l'ordre de quelque  $\mu\text{L}$  et d'une précision remarquable. [142]

##### ii) Description et préparation du dispositif

Pour se rendre compte des dimensions, le canal mesure 9mm de long pour 1mm de large, et s'élargie légèrement au niveau du guide d'onde. La hauteur des bordures en SU-8 est de  $250\mu\text{m}$  et de  $500\mu\text{m}$  d'épaisseur le long du canal puis se réduisent à  $200\mu\text{m}$  au niveau de la ligne d'accès pour diminuer les pertes diélectriques. (Figure 117) On a un volume total de fluide contenu dans le canal de  $2,25\mu\text{L}$ .

Ce dispositif est réalisé en salle blanche. De mon côté j'ai utilisé des dispositifs déjà préparé par mes prédécesseurs. [144], [145] Je vais rapidement détailler les caractéristiques du dispositif.

Ce composant est réalisé sur substrat de quartz 4 pouces, car c'est un matériau à faibles pertes diélectriques, rigide et biocompatible. Le dispositif final est la somme de 3 principales étapes de fabrication :

- Le guide d'onde coplanaire,
- Les piliers de SU-8,
- Développement et assemblage des capots en PDMS, étape que j'ai dû réaliser.

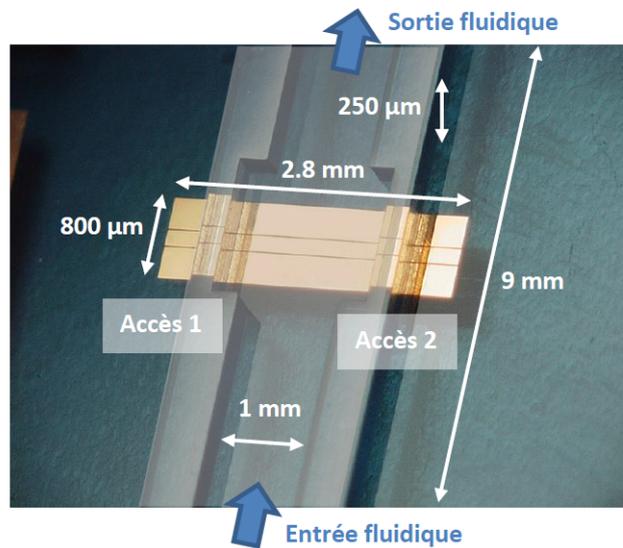


Figure 117: Photo du dispositif utilisé avec les dimensions correspondantes

Concernant les capots de PDMS, nous avons un moule qui permet d'obtenir ces derniers aux bonnes dimensions et avec des rebords sur le dessus, permettant de contenir le fluide. On vient couler le PDMS mélangé à son agent réticulant sur ce moule en silicium pour obtenir une fine couche de quelque millimètre. Le PDMS va passer d'un état visqueux à un état beaucoup plus rigide après une cuisson d'une nuit sous 60°C. On vient ensuite découper manuellement chaque capot à l'aide d'une lame et d'une loupe binoculaire. On poinçonne chacune de ses extrémités avec un puncher afin de réaliser les ouvertures fluidiques (entrée et sortie). Pour fixer ces capots en PDMS sur la structure en SU-8, on va utiliser une technologie plasma, qui modifie la chimie de surface du PDMS et génère des terminaisons silanol (SiOH) permettant le collage sur les murs en SU-8. On fait un dernier recuit de quelques heures pour finir de fixer le collage. Nos dispositifs sont désormais prêts.

### iii) Banc de test RF

Voici un synoptique ainsi qu'une photo du banc de manip en Figure 118 :

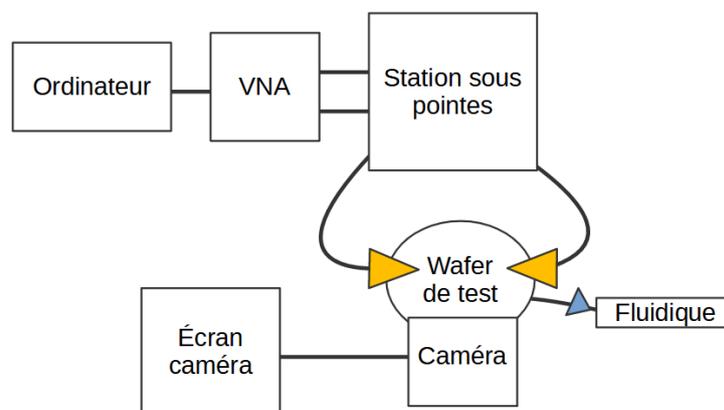


Figure 118: Synoptique du banc de test pour la mesure sous pointe

Le dispositif est placé sur une platine mobile selon X et Y, et qui maintient le wafer en place en faisant le vide sous celui-ci. Côté RF nous avons deux pointes RF connectées à deux ports d'un analyseur de réseaux. Ces pointes sont positionnées sur des micropositionneurs permettant de réaliser des déplacements micrométriques selon X, Y et Z. Nous pouvons nous assurer du bon déplacement des pointes par une caméra placée au-dessus et centrée sur le dispositif, nous permettant ainsi de poser les pointes avec une précision maximale. De plus cette caméra nous permet d'observer le liquide contenu au sein du dispositif et d'apercevoir par exemple si des résidus sont bloqués. Cette caméra est reliée à un écran. Le système fluide est assez simple et efficace, un embout de seringue placé en bout d'un tuyau est relié à une seringue de 5mL. Ainsi on peut aspirer ou pousser le liquide dans le dispositif. Dans d'autres cas on peut utiliser une pompe à seringue automatique pour avoir un débit constant, nous n'en avons pas l'utilité ici. Enfin nous avons l'ordinateur de travail sur lequel on observe les spectres de  $S_{11}$  et  $S_{12}$ , et avec lequel nous ferons l'acquisition des mesures et un traitement des données sur Matlab en temps réel.

L'ensemble de cette station est placé sur une plateforme à coussin d'air permettant d'éviter les chocs et vibrations qui pourraient endommager les pointes RF.

#### iv) Exemple type de mesure

Comme mentionné précédemment cette technique est très précise mais donc très sensible. Un protocole de test a été mis en œuvre pour calculer expressément les propriétés diélectriques du fluide à analyser. Nous nous appuyons sur le principe d'épluchage (de-embedding) c'est-à-dire que l'on mesure indépendamment chacune des contributions pour les soustraire à la mesure et n'obtenir que les caractéristiques de l'échantillon.

Dans un premier temps il y a une étape de calibration de notre analyseur de réseau. Ensuite on passe à notre wafer sur lequel sont positionnés nos dispositifs de test ainsi que des dispositifs spécifiques à la calibration. Ce sont typiquement les longueurs des « bouts » de lignes qui permettent l'accès aux pointes avec et sans SU8. En soustrayant ces parties lors du traitement des données on aura uniquement les valeurs de permittivité de l'échantillon liquide. Ensuite on se place sur le dispositif choisi que nous utiliserons tout au long de la manipulation. On pose les pointes et on réalise une mesure du dispositif à vide.

A partir de ce moment on peut lancer la mesure des échantillons.

Il faut tout de même prendre quelques précautions. On va passer les échantillons du moins concentré vers le plus concentré. On réalise en moyenne une dizaine d'acquisition par échantillon passé. On va aussi rincer le canal avec de l'eau plusieurs fois entre chaque échantillon et prendre 3 mesures de l'eau pour pouvoir les comparer par la suite. Cela nous permet de voir s'il y a une dérive dans les mesures au fil des tests.

#### b) Caractérisation d'échantillons contenant des NTC en concentration inconnue mélangés à une matrice organique

Nous avons pu contribuer à une étude internationale de caractérisation d'échantillons, impliquant de nombreuses équipes à travers le monde entier. Le principe est simple, comparer

différentes méthodes d'analyse d'un même lot d'échantillons pour déterminer les techniques les plus adaptées à cette caractérisation.

### i) Principe et enjeux

Pour cette étude nous allons devoir déterminer une concentration inconnue de nanotube de carbone dans une matrice organique. Voilà le problème, la matrice organique contient elle aussi du carbone et il n'existe aucune technique rapide et simple pour les différencier. Dans l'équipe MH2F Floriane Bourdiol avait réalisé une étude sur la détermination d'une concentration en NTC dans des larves, et nous nous sommes appuyés sur ses travaux pour répondre à ce projet. [146]

Pour cette étude nous disposons des NTC seuls (3 types différents), de la matrice organique seule, et de 2 échantillons de matrice organique contenant les NTC en concentration inconnus pour les 3 types de NTC. On connaît tout de même un ordre de grandeur de concentration, entre 10 et 50 mg de NTC par gramme de matrice organique. On parlera donc ici de mg/g ou  $\mu\text{g/g}$  qui correspondent à  $\text{masse}_{(\text{NTC})}/\text{masse}_{(\text{matrice organique})}$ . L'échantillon (NTC-1) contient des NTC Mitsui de Carbon Nanotech et les échantillon (NTC-2) et (NTC-3) issus respectivement des NM-401 et NM-403 provenant du JRC.

Notre plan d'attaque est de préparer une gamme d'étalonnage à partir des solutions de NTC seuls et de la MO allant de 10mg/g jusqu'à 50mg/g. Normalement d'après les études précédentes on devrait obtenir un comportement linéaire de la permittivité en fonction de la concentration en NTC et, à partir de là, croiser avec les échantillons inconnus pour prédire leurs concentrations en NTC.

### ii) Préparation des échantillons

Cependant nous avons les échantillons sous forme de poudre. Pour les analyser avec notre dispositif il faut les mettre en solution. Ces poudres sont difficilement manipulables, chargés électrostatiquement et très volatiles en plus d'être extrêmement toxiques, les NTC en poudre ne sont pas une partie de plaisir à peser ! On va préparer une solution mère de MO (matrice organique) et peser une seule fois la quantité de NTC nécessaire, pour avoir une solution à la concentration maximale de 50mg/g. Ensuite on procèdera à des dilutions pour avoir la gamme d'étalonnage complète.

La fenêtre des concentrations est [10-50] mg/g ou  $\mu\text{g/mg}$ . J'ai testé plusieurs concentrations pour la matrice organique : 1g/mL, 100mg/mL et 10mg/mL, toutes dans de l'eau DI. Les deux premières concentrations ne sont pas viables : beaucoup trop épaisses et visqueuses, on ne pourra pas les utiliser dans notre dispositif microfluidique. De plus elles s'altèrent très rapidement dans le temps et forment un « bloc » solide au bout d'une journée conservées au réfrigérateur. On va donc partir d'une solution de MO à 10mg/mL avec une concentration de NTC à 50mg/g ce qui correspond à 500 $\mu\text{g/mL}$ .

**Dans nos préparations nous devons toujours avoir un facteur 100 entre les NTC et la MO puisqu'on ne peut pas altérer les solutions de concentration inconnues (de l'ordre de 10mg/g).**

Pour la MO : Une préparation de la poudre est nécessaire en amont. En effet cette poudre n'est pas parfaitement broyée et on trouve des morceaux de quelques millimètres qui ne seront pas solubles dans l'eau. Ces morceaux vont bloquer le prélèvement dans les cones des pipettes et risque également d'obstruer la fluidique du dispositif. En plus de cela, on note la présence de

petites billes qui permettaient d'homogénéiser le mélange lors de la préparation des échantillons. Pour enlever ces objets macroscopiques on va utiliser un tamis très fin et récupérer une poudre fine et homogène. On évacue ainsi les grosses particules de matrice de poumon de porc ainsi que les billes de zircone. (Figure 119)



Figure 119: Tamis contenant les déchets (à gauche) et poudre filtrée grâce au tamis (à droite)

Ensuite seulement on peut préparer la solution à partir de la poudre tamisée. On va peser 100mg de poudre et y ajouter 10 mL d'eau. On homogénéise le tout avec la sonde à ultrason comme dans le protocole de préparation des NM.

Pour la gamme d'étalonnage : on prépare la solution la plus concentrée à 50mg/g puis on la dilue. On pèse donc entre 2 et 3 mg de NTC auxquels on ajoute entre 4 et 6 mL (la valeur exacte pesée x2) de solution de MO précédemment préparée. On mélange le tout avec la sonde à ultrason et on obtient une solution de NTC et MO à 50mg/g. Pour avoir une référence de dilution on va considérer la concentration en NTC, donc ici **500µg(NTC)/mL**. On réalise ensuite une gamme de dilution avec la solution de MO pour obtenir les concentrations de 40, 30, 20 et 10 mg/g.

Pour les poudres inconnues : on sait qu'elles sont entre 10 et 50 mg/g de concentration. On va négliger le poids des NTC (100x plus faible) et préparer nos solutions à partir de la MO. Il faut les préparer à la même concentration que la MO précédente donc à 10mg(MO)/mL. On pèse alors environ x mg de cette poudre inconnues (x compris entre 10 et 15) que l'on dispersera dans x/10 mL d'eau DI. On commet ici deux graves erreurs que je détaillerai par la suite ! (Non ce n'est pas le fait de négliger le poids des NTC !)

### iii) Détermination des concentrations inconnues et premiers résultats

Les spectres obtenus en fonction de la fréquence sont présentés en Figure 120 et Figure 121 : on choisit sur ces spectre les fréquences pour lesquelles nos courbes se discriminent le plus facilement. Par exemple ici on a choisi pour la partie réelle de la permittivité relative du liquide E1, 1,54 GHz et pour la partie imaginaire de la permittivité relative du liquide E2, 16 GHz (lignes verticales rouges).

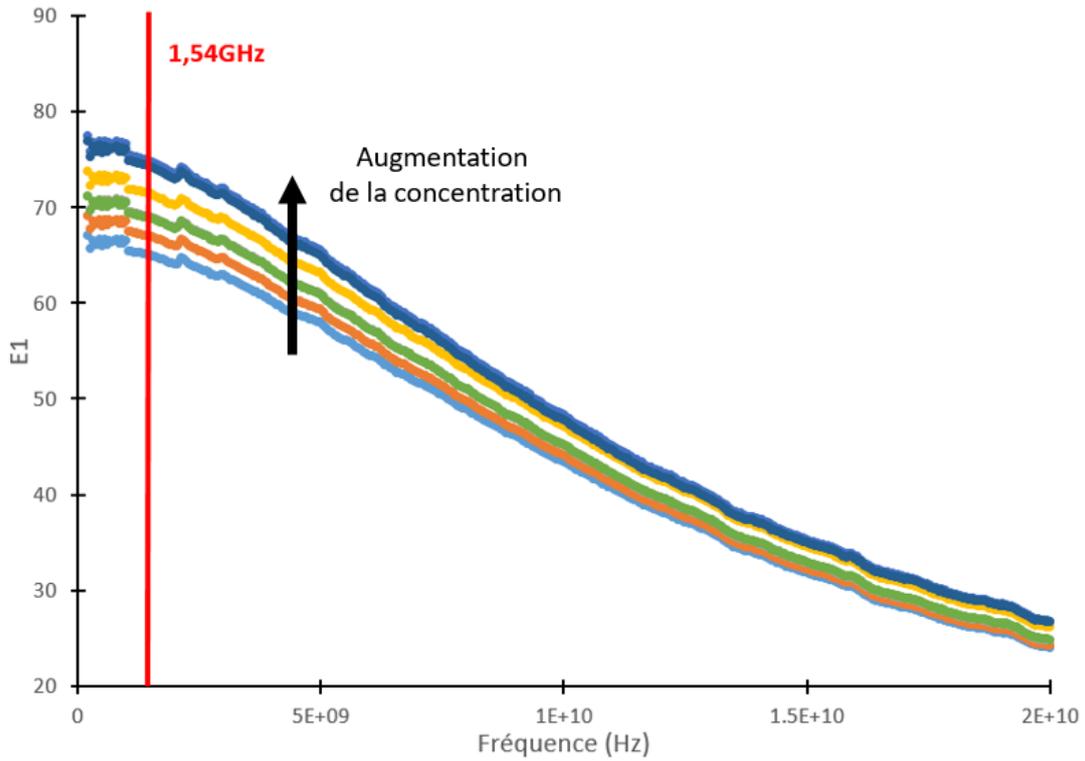


Figure 120: Spectre obtenu pour différentes concentrations en NTC, E1 en fonction de la fréquence

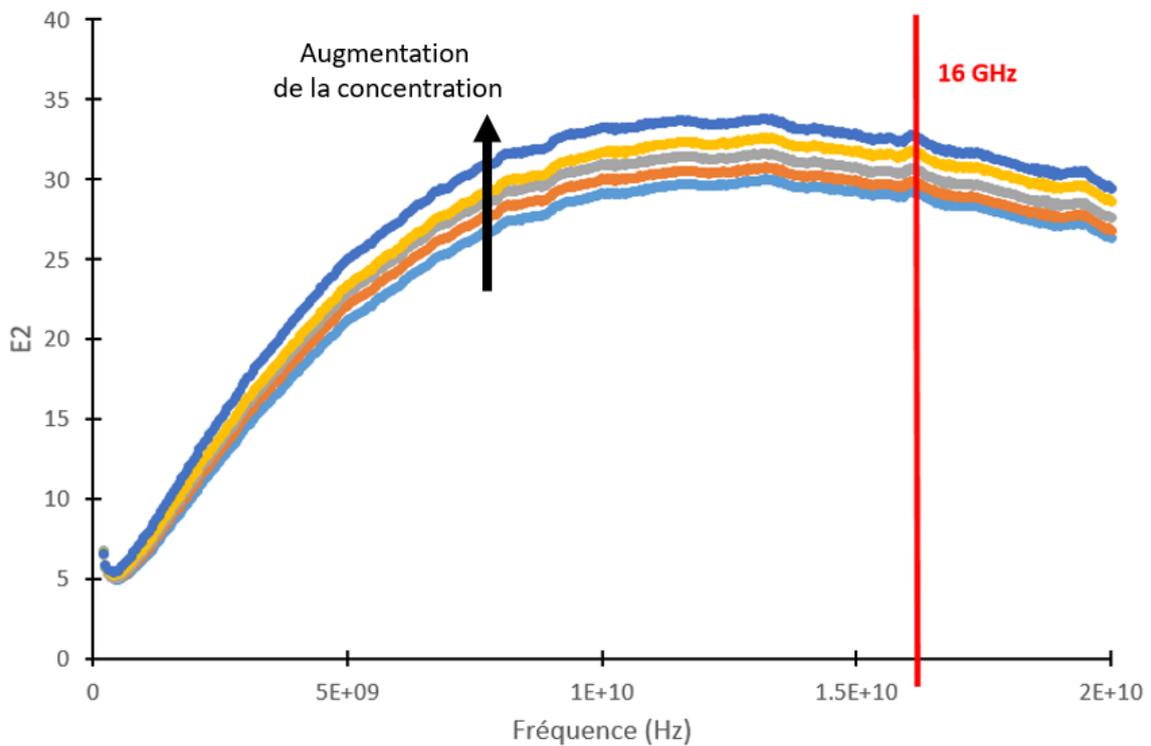


Figure 121: Spectre obtenu pour différentes concentrations en NTC, valeur de E2 en fonction de la fréquence

A partir de ces fréquences on va pouvoir tracer un diagramme dit de « Cole-Cole » représentant E1 en fonction de E2. Sur ce diagramme on doit voir apparaître une tendance linéaire.

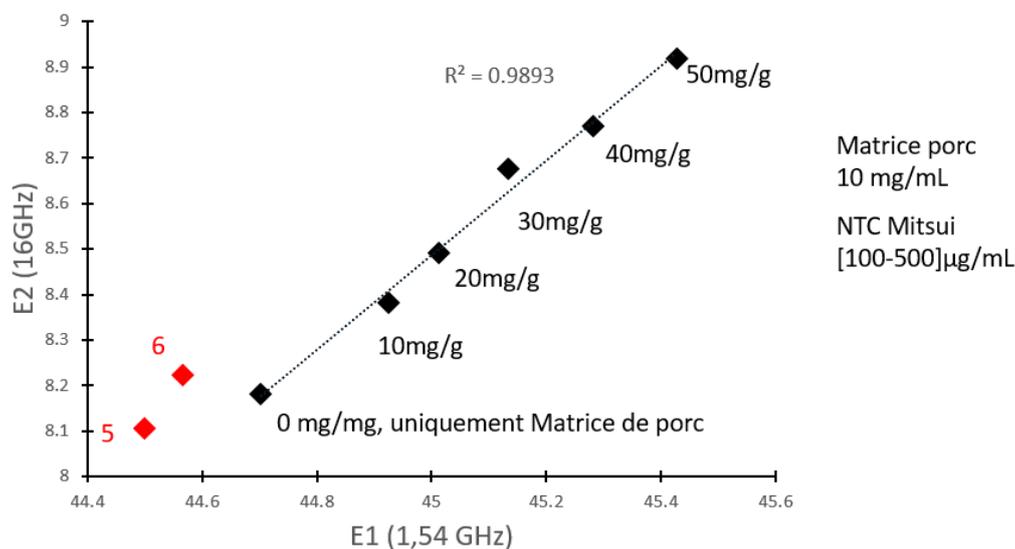


Figure 122: Diagramme Cole-Cole obtenu avec les paramètres E1 à 1,54 GHz et E2 à 16 GHz

On aboutit ainsi en Figure 122 à une belle droite d'étalonnage d'une grande précision ( $R^2=0.99$ ), avec des valeurs bien distinctes. On pourra alors positionner facilement nos solutions inconnues... Et bien non, on observe quelque chose d'étrange avec les échantillons de concentration inconnues (5) et (6) ... ! Malheureusement ils se trouvent hors de notre gamme étalon. Alors qu'ils sont censés contenir des concentrations quasi similaires à celles de notre gamme étalon. Nous avons émis l'hypothèse que les échantillons inconnus reçus n'étaient pas homogènes, et que la poudre s'était hétérogénéisée dans le temps. En effet les NTC auraient par exemple pu se déposer majoritairement sur le bord de l'éppendorf. C'est là que nous avons commis une première erreur en prélevant uniquement une fraction de la poudre. Pour confirmer cette hypothèse j'ai préparé 4 échantillons à partir de la poudre inconnue avec le même protocole. Les résultats sont présentés sur la Figure 123 : six mesures pour chacun des 4 échantillons à gauche et leurs moyennes à droite. On remarque des différences importantes entre chacune de ces moyennes, et les nuages de points sont très dispersés. Sur ces moyennes on voit un écart maximal selon E2 de plus de 1 et selon E1 de 0,15. Si l'on observe les valeurs de E2 de la Figure 122, on constate que la dispersion est beaucoup trop importante pour pouvoir réaliser des identifications de concentration précises.

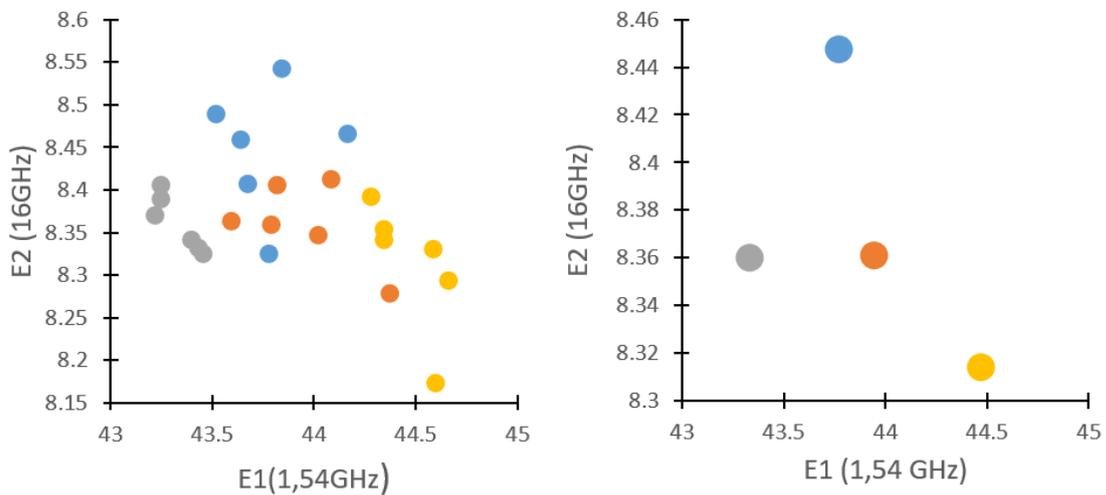


Figure 123: Dispersion des points pour une même concentration : valeurs (à gauche) et moyennes (à droite)

#### iv) Caractérisation d'une variation à la fois en concentration de MO et de NTC

Il y a une certaine variabilité lors de la préparation de nos échantillons inconnus si l'on prélève seulement une portion de poudre dans l'éperdurf. Par curiosité nous nous sommes alors dit que si la proportion de NTC dans la MO avait varié lors de la préparation de ces échantillons inconnus, alors si l'on réalise plusieurs droites d'étalonnage avec des proportions en NTC/MO différentes, alors on devrait pouvoir estimer cette variabilité du prélèvement.

J'ai donc préparé trois gammes étalon avec des concentrations en MO différentes. On en prépare une à 10mg/mL comme précédent, et deux nouvelles à 20mg/mL et 30mg/mL. La quantité de NTC dans ces gammes ne varie pas. C'est-à-dire qu'initialement pour la plus faible concentration de la gamme on était à 10mg/g. Maintenant on aura une gamme où il sera à 5mg/g (100µg de NTC dans 20mg de MO) et une dernière à 3,3mg/g (100µg de NTC dans 30mg de MO). Voici les résultats que nous obtenons sur le diagramme Cole-Cole en Figure 124 :

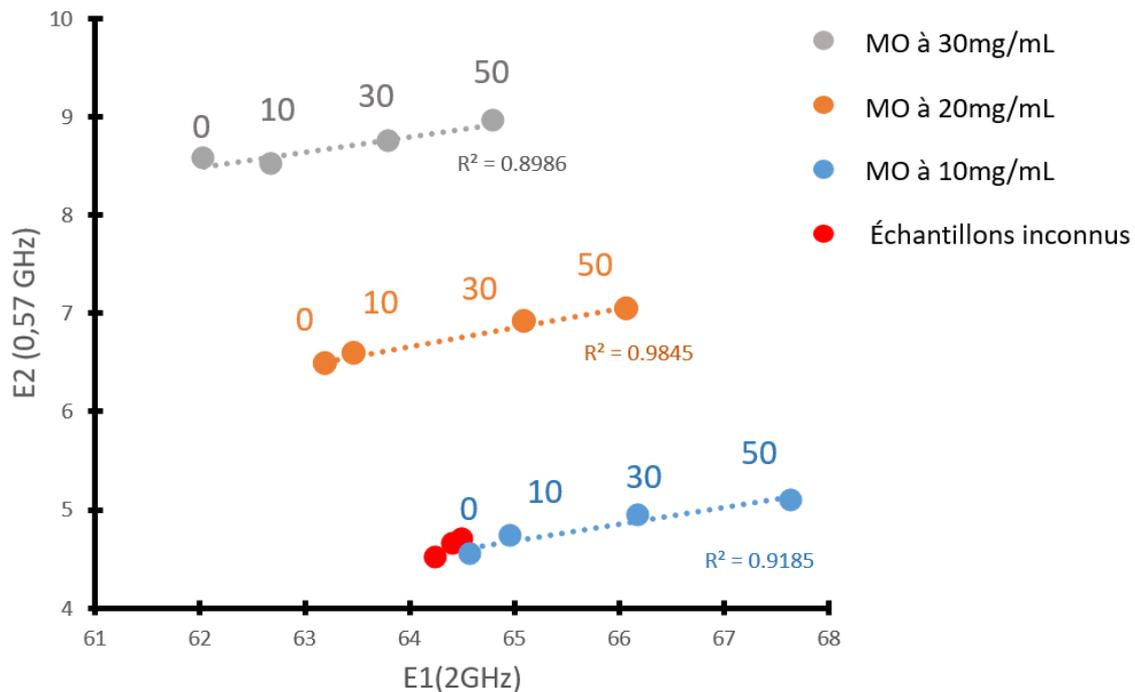


Figure 124 : Diagramme Cole-Cole pour 3 concentration en MO différentes et pour chacune d'entre elle 4 concentrations en NTC

Chose surprenante, on différencie étonnamment bien les 3 droites étalons. La puissance d'analyse de notre dispositif est bien réelle et on peut discriminer de façon très précise des échantillons de même élément chimique. Cela fera l'objet d'un papier très prochainement.

Cependant, on remarque toujours que les échantillons de concentrations inconnues ne se trouvent toujours pas sur les droites étalons. Vient alors notre dernière hypothèse, et qui serait donc notre ultime erreur : la manière de préparer les échantillons influe sur notre caractérisation.

#### v) Nouveau protocole de préparation

Pour cela nous avons demandé à l'initiateur de l'expérience de nous fournir des échantillons supplémentaires, à forte concentration pour pouvoir les diluer, mais préparé exactement dans les mêmes conditions que les échantillons inconnus. Ainsi on s'affranchira de la variabilité du protocole de préparation.

De plus nous avons remarqué une forte variabilité entre les échantillons préparés à partir de la poudre de concentration inconnues : ceci est dû à la non-homogénéité de la poudre dans l'éppendorf. Nous lui avons demandé de nous fournir à nouveau des éppendorfs contenant les échantillons inconnus. Nous diluerons cette fois ci la totalité de l'éppendorf (et non une fraction) en pesant la totalité de la poudre et ajoutant le volume d'eau nécessaire. Ainsi on s'affranchira de la variabilité du prélèvement dans le mélange inconnu.

Nous avons observé que les points des courbes précédentes étaient tout de même très proches. J'ai donc pensé à concentrer plus les échantillons : précédemment j'avais rencontré des problèmes pour des solutions plus concentrées, qui bouchaient le canal fluïdique et n'étaient pas stables dans le temps. Pour contrer ces problématiques j'ai fait un test en préparant la MO dans 80% d'eau DI et 20% d'éthanol. J'ai obtenu une solution beaucoup plus fluïde et stable

dans le temps. La gamme étalon 10x plus concentré (à la fois en NTC et MO pour conserver bien entendu le rapport NTC/MO) nous donne le même comportement que précédemment, et les points sont plus facilement discriminables. On a un rapport de quasiment 10 pour E1 et E2 entre chaque point de la gamme.

On pourra donc partir sur ces concentrations pour les prochaines analyses.

Nous avons reçu nos nouveaux échantillons pour l'analyse :

- Mélanges inconnus de NTC dans MO, A [10-30mg/g] et B [30-50mg/g]
- Mélange de concentration connu de NTC dans MO, à 39 mg/g

Pour ces trois échantillons nous allons peser la totalité de la poudre et y ajouter le volume de liquide correspondant (eau 80% + ethanol 20%) afin d'obtenir des solutions à 100mg/mL de MO. On va ensuite réaliser une dilution de l'échantillon de concentration connue à 39 mg/g pour obtenir 30 mg/g, 20mg/g et 10mg/g.

On aura alors :

- A : [10-30] mg<sub>NTC</sub>/g<sub>MO</sub>
- B : [30-50] mg<sub>NTC</sub>/g<sub>MO</sub>
- Nos solutions étalons, 10, 20, 30 et 39,45 mg<sub>NTC</sub>/g<sub>MO</sub>
- Notre MO seule à 0 mg/g

On va faire 2 manipulations indépendantes, dans lesquelles on mesurera chaque échantillon 10 fois. On commence par mesurer l'eau jusqu'à stabilisation de la réponse diélectrique. Ensuite on mesure la MO seule 10 fois. Suite à quoi on mesure la première concentration de la gamme à 10mg/g 10 fois. On rince le dispositif avec la MO seule, et on prend 3 mesures. Puis on passe l'échantillon suivant etc... Et on fini avec 3 acquisitions de la MO seule.

Jusqu'ici j'ai présenté les résultats d'un seul type de NTC pour faciliter la lecture. Mais ces expériences ont été réalisées avec 3 types de NTC différents (3)b)i) :

Pour la dernière campagne de mesures, nous n'avons pu obtenir que 2 de ces NM à des fortes concentrations et connues, le (NTC-1) à 39,45 mg/g et le (NTC-2) à 39,0 mg/g. Malheureusement pour le (NTC-3) je n'avais pas assez de masse pour pouvoir réaliser une gamme de dilution. Je vais donc présenter ici les résultats pour les NTC-1 et NTC-2, chacun basés sur 2 expériences indépendantes (donc 4 expériences au total) et d'après le protocole expérimental qui précède ce paragraphe.

#### vi) Traitement des données et résultats finaux

On obtient le même genre de spectre que précédemment : E1 et E2 en fonction de la fréquence (Figure 120 et Figure 121). Tout d'abord, on a tracé les moyennes des 10 valeurs de chacun des échantillons. On choisit à partir de ces graphiques les fréquences qui nous permettent de discriminer au mieux les courbes, ici nous avons choisi 1,54 GHz pour E1 et 16 GHz pour E2. On prendra ces valeurs pour toutes les expériences.

Dans les 4 expériences, l'échantillon de MO seule est censé donner les mêmes valeurs. De même l'eau mesurée avant chaque test doit être comparable. Cependant de par la calibration, le dispositif et la manière de poser les pointes, on va générer une légère dérive qui nous empêche de comparer les résultats entre eux. Pour cela on va faire une normalisation par rapport à l'une

des manips. Les graphiques suivants sont les résultats de 4 manips distinctes pour lesquelles on a représenté uniquement l'eau et la MO. Chaque couleur correspond à un des tests.

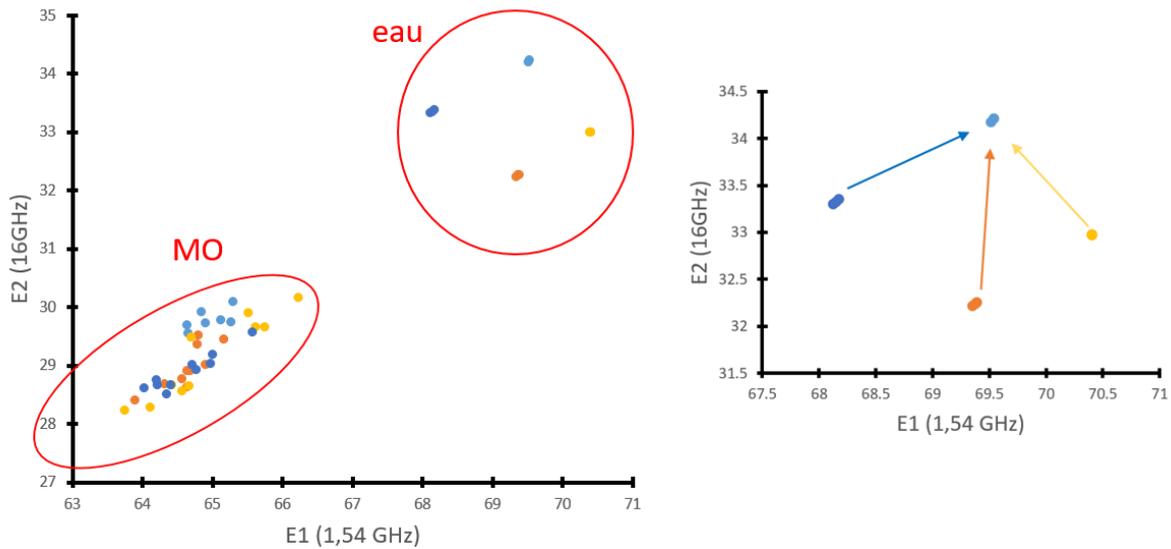


Figure 125: Diagramme Cole-Cole de la MO et l'eau mesurées pour 4 expériences indépendantes. À droite, représentation visuelle de la correction à effectuer

On remarque sur la Figure 125 que les points correspondant à l'eau dans une même manip sont quand même beaucoup moins dispersés. Il est donc préférable de normaliser les valeurs par rapport à celles de l'eau, par exemple ici de celle de la manip NTC-1\_1 en bleu clair. On récupère l'écart sur E1 et E2 pour chacun des tests NTC-1\_2, NTC-2\_1 et NTC-2\_2 que l'on ajoute à chacune des valeurs expérimentales des mesures correspondantes. Nous obtenons ainsi des valeurs normalisées et comparables.

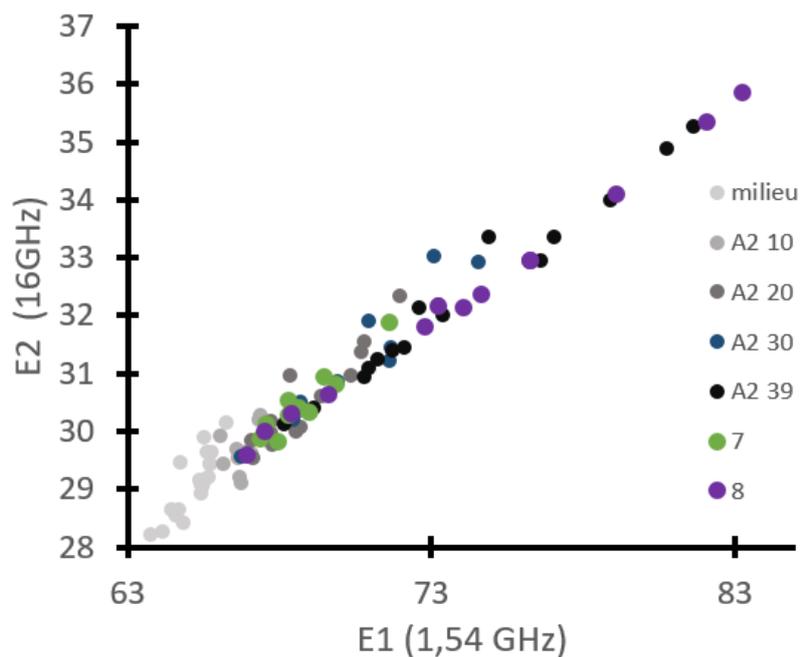


Figure 126: Exemple de Diagramme Cole-Cole obtenu pour une manip, avec 10 mesures pour chacune des solutions

La Figure 126 représente un digramme Cole-Cole aux deux fréquences choisies, ici pour l'échantillon NTC-2\_1

Une fois les valeurs corrigées on va sommer les moyennes de chacun des échantillons des deux manip indépendantes (2 x 10 valeurs), pour chacun des NTC. On trace ensuite  $E1=f(\text{concentration})$  et  $E2=f(\text{concentration})$  en Figure 127. On réalise une régression linéaire sur chacune de ces courbes et on récupère l'équation de la droite comme représenté à la Figure 127. On peut ensuite exploiter les équations permettant de prédire les concentrations en NTC des solutions en fonction des valeurs mesurées de E1 et E2 :

$$\text{Concentration}(A, E1) = \frac{E1(A) - b(E1)}{a(E1)}$$

$$\text{Concentration}(A, E2) = \frac{E2(A) - b(E2)}{a(E2)}$$

Où a et b sont déterminés par les régressions linéaires de la Figure 127.

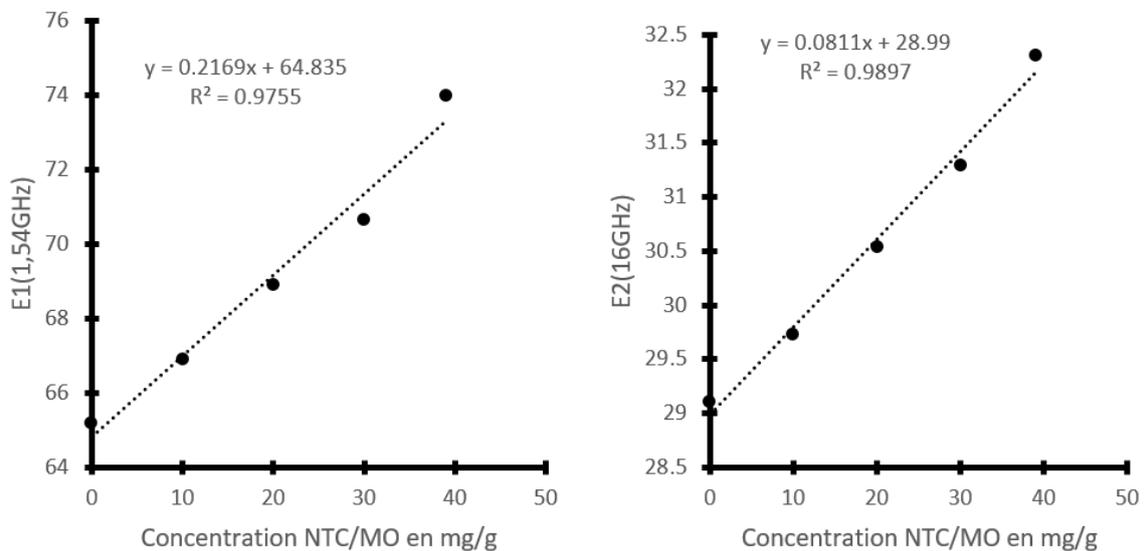


Figure 127: Graphique de E1 et E2 en fonction de la concentration obtenus en moyennant deux manip indépendantes

En remplaçant les moyennes de E1 et E2 de chaque échantillons (7) et (8) dans les équations précédentes on trouve des valeurs en concentration de NTC de  $18,45 \pm 0,56 \text{ mg/g}$  et  $41,85 \pm 2,80 \text{ mg/g}$ . Au final pour cet échantillon NTC-2, les résultats attendus étaient de 19,49 mg/g et 39,00 mg/g. Nos mesures sont donc très proches (à 2 ou 3 mg/g près) de ce qui était attendu, cependant pour les fortes valeurs de concentration notre écart type est beaucoup plus grand. Le constat est similaire pour les échantillons du NTC-1 : on obtient des valeurs proches de celles attendues (à 2 ou 3mg/g près) et l'écart type à forte concentration est très élevé. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21: Tableau récapitulatif de l'étude menée sur la détermination d'une concentration inconnue en NTC

mg(NTC)/g(MO)	NTC-1		NTC-2	
	mesurée	exacte	mesurée	exacte
Echantillons inconnu <b>faible</b> concentration	<b>17,03 ± 0,83</b>	19,84 ± 0,17	<b>18,45 ± 0,56</b>	19,49 ± 0,16
Echantillon inconnu <b>forte</b> concentration	<b>37,88 ± 6,38</b>	39,45 ± 0,33	<b>41,85 ± 2,80</b>	39,00 ± 0,32

Si l'on trace en chaque point en fonction de la concentration associée pour E1 et E2 (Figure 128) on remarque que pour des fortes concentrations notre précision se dégrade.

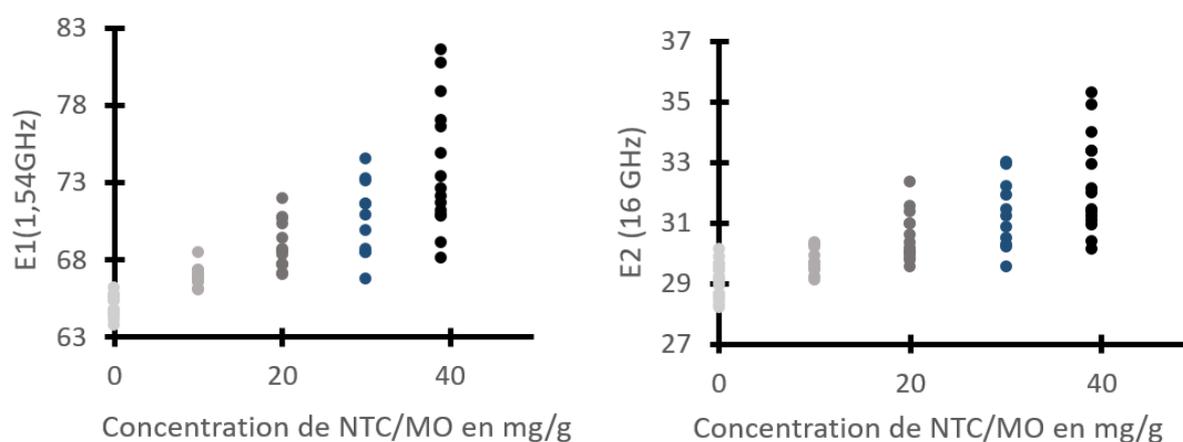


Figure 128: Dispersion des points pour E1 et E2 en fonction de la concentration en NTC

Le bilan de cette caractérisation est positif, et nous a permis de montrer que notre technique est à la fois très sensible et précise. Elle permet de prédire des valeurs de concentration en NTC très proches de la réalité pour les échantillons de concentration inconnue. L'autre avantage indéniable est la possibilité de discriminer avec précision les différentes concentrations d'un même élément chimique, ici des NTC avec une matrice organique.

### c) Analyse des propriétés du milieu de culture (DMEM)

Nous avons rencontré une difficulté lors de nos simulations sur HFSS (Chapitre 2, 5) : avoir les valeurs de permittivité du milieu de culture DMEM à 37°C. En effet, la permittivité est aussi fonction de la température du matériau. Et donc nous ne pouvons pas modéliser exactement notre système avec les propriétés du liquide à tester. Pour cela nous avons combiné deux techniques :

- La mesure par CPW, présentée précédemment
- Et une mesure avec une sonde diélectrique

Le problème de la mesure CPW avec les pointes RF est que nous sommes sur un dispositif très fragile contenant des faibles volumes. Nous ne pouvons donc pas chauffer le liquide pendant le

test, et si l'on chauffe le liquide en amont compte tenu des faibles volumes il va refroidir quasi instantanément. D'où l'intérêt ici d'avoir une sonde diélectrique : on peut la plonger dans un grand volume de liquide qui sera maintenu à la température désirée par un bain Marie.



Figure 129: Sonde diélectrique utilisée avec son kit de calibration

Cette sonde se connecte via un câble SMA à un VNA qui nous permet via un logiciel développé par Keysight de déterminer les propriétés diélectriques du milieu dans lequel la sonde est plongée. Après une étape de calibration, nous plongeons la sonde dans de l'eau à 37°C et nous pouvons obtenir les valeurs sur une gamme de fréquence de 1 MHz à 20 GHz en Figure 130:

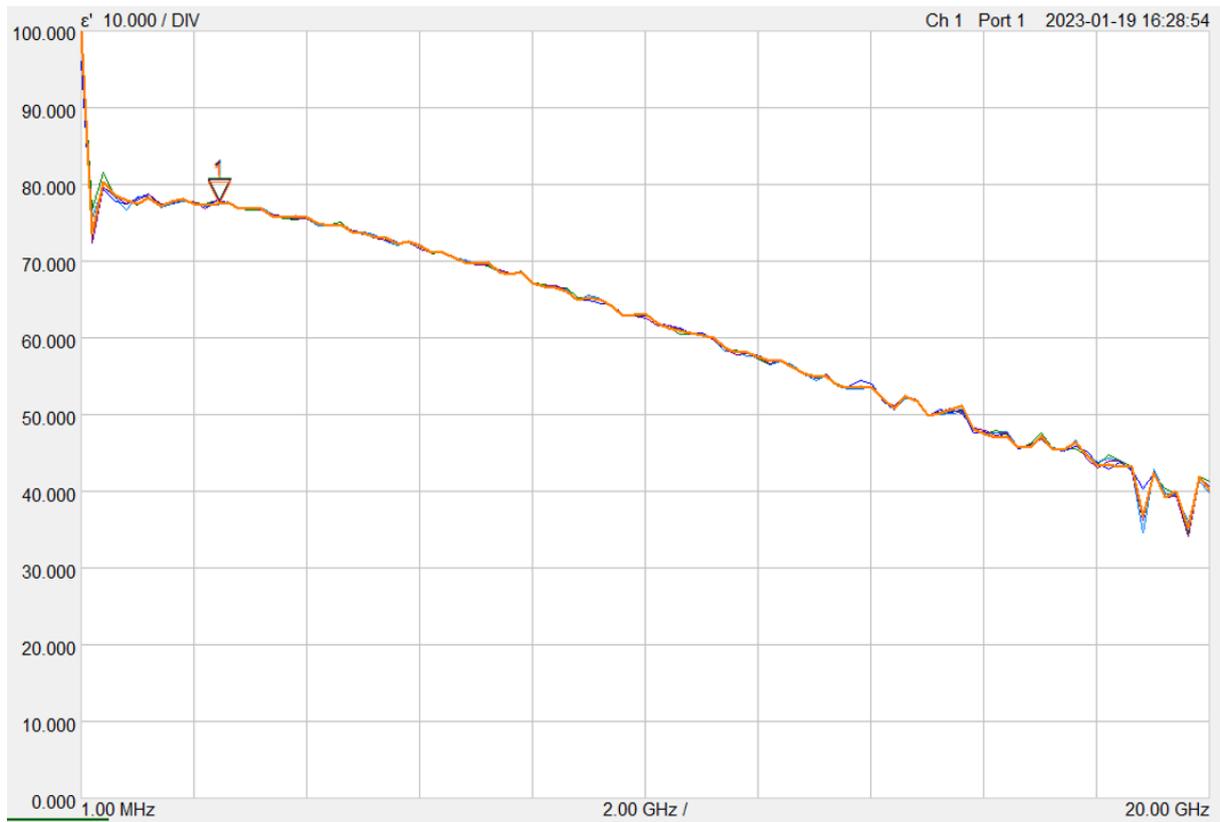


Figure 130: Permittivité diélectrique de l'eau à 37°C en fonction de la fréquence, mesurée grâce à la sonde Keysight

En plaçant le curseur à 2,3 GHz nous obtenons la valeur de  $\epsilon'=77,53$  à température ambiante. Pour 37°C la valeur diminue à  $\epsilon'=73,55$ .

Nous avons tenté de faire de même avec le DMEM, malheureusement pour des raisons inconnues, nous n'avons pas réussi à mesurer la permittivité diélectrique du DMEM avec cette sonde.

Nous avons alors procédé autrement pour déterminer cette valeur. Voilà ce que nous allons faire pour déterminer la valeur de la permittivité diélectrique du DMEM à 37°C :

- Mesurer les valeurs de la permittivité diélectrique de l'eau à T°ambiante et à 37°C pour la fréquences désirée (2,3 GHz) à l'aide de la sonde diélectrique (vu précédemment),
- Mesurer la valeur du DMEM à T°ambiante avec le dispositif CPW,
- Mesurer la valeur de l'eau à T°ambiante avec le dispositif CPW : cela nous permettra d'estimer l'écart qu'il y a entre la mesure avec la sonde diélectrique (réelle) et celle du dispositif CPW (relative). En prenant en compte cet écart on peut remonter à la valeur réelle de la permittivité diélectrique du DMEM à T°ambiante,
- Enfin d'après les équations de Ellison [147], qui déterminent le comportement de l'eau en fonction de la fréquence et de la température, et en faisant l'hypothèse que ce modèle est utilisable pour le DMEM on peut retrouver mathématiquement la valeur du DMEM à 37°C.

Nous avons mesuré avec le dispositif CPW :

- $\epsilon'(\text{DMEM}, T^{\circ}\text{ambiante}) = 66,0$
- $\epsilon'(\text{eau}, T^{\circ}\text{ambiante}) = 69,3$

On a donc un écart sonde/CPW pour l'eau à T°ambiante de  $77,53 - 69,3 = 8,23$  entre les mesures. Ce qui nous ramène à une valeur réelle de

$$\epsilon'(\text{DMEM}, T^{\circ}\text{ambiante}, \text{corrigée}) = 66,0 + 8,23 = 74,23.$$

D'après les équations de Ellison, on se retrouve dans une zone linéaire pour laquelle :

$$\epsilon'(f, T) = A + B \cdot T$$

avec A et B constantes, f la fréquence et T la température.

A partir nos mesures de l'eau à 20°C et 37°C on peut retrouver les constantes A et B, telles que :

$$B = -0,23 \text{ et } A = 82,13$$

Finalement on obtient :

$$\epsilon'(\text{DMEM}, 37^{\circ}\text{C}) = \epsilon'(\text{DMEM}, 20^{\circ}\text{C}, \text{corrigée}) - 0,23(37 - 20) = 70,32$$

C'est donc cette valeur que nous utiliserons pour nos simulations.

# Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans une dynamique de recherche récente qui a pour but d'évaluer les effets de plusieurs facteurs environnementaux agissant simultanément. Notre exposome est de plus en plus complexe et s'attacher à l'étude toxicologique d'un de ses composants ne suffit pas à estimer sa dangerosité. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la co-exposition de nanomatériaux et d'ondes radiofréquences. Dans un premier temps nous avons caractérisé au mieux nos deux agents sélectionnés. Les NM doivent être caractérisés par différentes techniques d'analyse nous renseignant sur leurs propriétés physico-chimiques tandis que le système d'application aux ondes radiofréquences doit être calibré et contrôlé en terme de dosimétrie par son DAS.

Concernant les NM nous avons choisi des échantillons provenant du JRC pour la plupart, utilisés dans de nombreuses études toxicologiques. Ainsi ces NM provenant de lots communs ont déjà été caractérisés par d'autres laboratoires. Nous avons pu ainsi comparer et compléter nos caractérisations en taille, forme, surface spécifique, phase cristallographique, chimie de surface, charge de surface, état d'agglomération ou encore dispersibilité. Enfin nous avons exposé notre protocole de préparation des solutions de NM en milieu de culture d'après les échantillons sous forme de poudre, afin d'obtenir des solutions stables et homogènes pour une exposition sur cellule optimale.

Le système d'exposition aux ondes électromagnétiques de la gamme micro-onde développé est innovant et à la pointe des travaux de recherche sur le sujet. Il combine une plateforme d'applicateurs RF et l'utilisation de plaques à puits, consommable traditionnellement employé par les biologistes, pour des tests à haut débit. Il permet d'exposer de manière contrôlée jusqu'à 24 puits aux ondes radiofréquences, tout en ayant des contrôles biologiques sur ces mêmes plaques à puits. La dosimétrie a été réalisée de manière numérique grâce à un logiciel de simulation, puis de manière expérimentale. Pour la dosimétrie expérimentale, nous avons développé un protocole rigoureux et fiable, nous permettant de mesurer l'évolution thermique provoquée par les RF avec un thermocouple extrêmement sensible. Le développement d'un support imprimé en 3D maintenant ce thermocouple lors de la mesure nous permet d'obtenir des mesures répétables et localisées. Nous avons défini 3 critères importants pour la caractérisation de notre plateforme d'exposition :

- L'homogénéité : elle nous informe sur la répartition du DAS dans un puits. On obtient expérimentalement une homogénéité de 81% dans un rayon de 2mm par rapport au centre du puits qui est notre zone d'exposition et d'analyse biologique.
- L'isolation : ce paramètre nous renseigne sur l'impact d'un applicateur RF sur un puits voisin. On retrouve un DAS relativement faible chez le premier voisin, de 7% du DAS maximal. Ce DAS est nul chez le deuxième voisin. Ainsi on peut valider qu'il n'y a pas de rayonnement parasite dans la zone contenant les contrôles biologiques.
- L'efficacité : elle nous permet de définir le DAS maximal obtenu à partir d'une puissance en entrée d'applicateur RF de 1W. On obtient ici une très bonne efficacité de  $50,7(W/kg)/W$ .

Concernant les tests sur cellules nous avons réalisé deux scénarii, le premier étant une co-exposition aux ondes RF et NM à une concentration extrême de 100µg/mL, tandis que le deuxième correspond à une co exposition avec différentes concentrations de NM (différents EC). L'impact cellulaire a été étudié en partenariat avec des membres de la société Anti Oxidant Power à leur technique d'analyse brevetée LUCS, qui permet de détecter un changement d'homéostasie. Dans les deux cas, et ce pour les différents modèles cellulaires et de puissances RF étudiées, nous n'observons aucun impact sur l'homéostasie des cellules lié à l'exposition des RF ou des NM et RF combinés. Nous n'avons pas obtenu d'effet toxique des RF sur les 5 modèles cellulaires étudiés, pour une exposition de 24h allant de 2W/kg à 10W/kg. De plus l'application des ondes RF ne modifie pas la réponse cellulaire aux NM toxiques, à concentration maximale ou ciblée.

## Perspectives

Au cours de nos travaux, nous avons soulevé de nombreuses pistes de réflexion sur le comportement thermique de notre applicateur RF. Que ce soit pour l'analyse du DAS dans les puits voisins, les différents modèles de régression utilisable et le nombre de point de choisi pour l'analyse de l'évolution thermique ou encore les observations à la caméra thermique infrarouge, il reste encore des mécanismes thermiques à explorer plus en profondeur. De plus il serait idéal de comparer les valeurs de DAS déterminées par mesures thermiques avec des mesures obtenues par une autre approche, comme des sondes de champ électromagnétique. Croiser les méthodes d'analyse basées sur des variables physiques différentes serait un gros atout pour statuer sur de nombreux points de notre approche de détermination actuelle.

Concernant les tests d'une co-exposition, nous sommes actuellement limités en terme de DAS applicable avec une valeur maximale de 10W/kg, compte tenu de l'évaporation du milieu de culture dans les puits au-delà de cette valeur, ce qui provoque une toxicité parasite par la surconcentration des composants du milieu. Nous avons pensé à plusieurs moyens pour limiter cet effet, par le développement d'un couvercle spécifique, en ajoutant du milieu de culture au bout de 12h d'exposition, ou bien en utilisant un volume de milieu de culture supérieur à 100µL. Ces idées n'ont pas été concluantes. Ce travail est à continuer.

Par ailleurs nos analyses biologiques visent à mettre en évidence une perturbation de l'homéostasie cellulaires et une cytotoxicité. Il se peut cependant que des mécanismes cellulaires rentrent en jeu et ne soient pas forcément associé à une réponse cellulaire aussi critique. Parmi les analyses biologiques intéressantes à mener, des méthodes d'analyse génomiques comme la transcriptomique seraient pertinentes et nous donnerai accès à de précieuses informations sur l'activation de voies géniques et métaboliques spécifiques.

Enfin, les expérimentations menées durant ces travaux se sont limitées à une exposition en mode continu (CW) à une seule fréquence. On peut imaginer poursuivre des tests similaires avec des modes différents comme le LTE, WCDMA ou GSM. De même nous avons relevé dans la littérature des effets antagonistes lors d'une pré-exposition en mode pulsé. Il serait intéressant de reproduire ces tests avec notre plateforme d'exposition et les nanomatériaux toxiques.

# Production Scientifique

- « Comparison of Two Thermal Probe Technologies for the Dosimetric Investigations of RF Exposure Systems » **B. Cerdan**, E. Flahaut, D. Dubuc and K. Grenier, IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference September 2023, 10.1109/IMBioC56839.2023.10305111
- « Dosimetry Performances of a MultiWell-Plate-Based Near-Field RF Applicator for the Investigation of EM Impact on Biological Cells » A. Moscatiello, **B. Cerdan**, C. Gironde, C. Furger, D. Dubuc and K. Grenier, *2022 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium - IMS 2022*, Denver, CO, USA, 2022, pp. 794-797, doi: 10.1109/IMS37962.2022.9865593.
- « Interests of Microwave Dielectric Spectroscopy for biological characterizations » Olivia Peytral-Rieu, Yegor Kozhemyakin, **Benjamin Cerdan**, Anne Calvel, Yuwei Li, et al. URSI GASS 2023, Aug 2023, Sapporo, Japan. hal-04197176
- « Caractérisation dosimétrique d'un applicateur RF en champ proche adapté aux plaques à puits de tests biologiques pour étudier l'impact des ondes EM sur cellules » A. Moscatiello, **B. Cerdan**, D. Dubuc and K. Grenier, Journée Nationale Microondes 2022

En cours de soumission :

- « Analysis of Carbon Nanotube levels in organic matter : an inter-laboratory comparison to determine best practice » Jérôme Devoy\*<sup>1</sup>, **Benjamin Cerdan**<sup>3</sup>, D. Dubuc<sup>3</sup>, E. Flahaut<sup>5</sup>, Katia Grenier<sup>3</sup> et al. *Journal Nanotoxicology*
- « Development and Characterization of a High Throughput Radiofrequency Exposure System for in vitro 2D Cellular Model in 96 Well Plate. » **B. Cerdan**, D. Dubuc and K. Grenier, *IEEE Journal of Microwave*

# Bibliographie

- [1] M. Vrijheid, « The exposome: a new paradigm to study the impact of environment on health », *Thorax*, vol. 69, n° 9, p. 876-878, sept. 2014, doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204949.
- [2] C. P. Wild, « The exposome: from concept to utility », *International Journal of Epidemiology*, vol. 41, n° 1, p. 24-32, févr. 2012, doi: 10.1093/ije/dyr236.
- [3] Vineis P., Robinson O., Chadeau-Hyam M., Dehghan A., Mudway I., Dagnino S. " What is new in the exposome " (2020) *Environment International*, 143 , art. no. 10588
- [4] P. Q.-Y. B. Brochot, « Exposome », *Environnement, Risques & Santé*, vol. 1, n° 1, p. 44, avr. 2016.
- [5] A. Daiber *et al.*, « The “exposome” concept – how environmental risk factors influence cardiovascular health: », *Acta Biochimica Polonica*, vol. 66, n° 3, Art. n° 3, sept. 2019, doi: 10.18388/abp.2019\_2853.
- [6] A. Bhatnagar, « Environmental Determinants of Cardiovascular Disease », *Circulation Research*, vol. 121, n° 2, p. 162-180, juill. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306458.
- [7] S. M. Rappaport et M. T. Smith, « Environment and Disease Risks », *Science*, vol. 330, n° 6003, p. 460-461, oct. 2010, doi: 10.1126/science.1192603.
- [8] M. Simkó *et al.*, « Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells », *Toxicology Letters*, vol. 161, n° 1, p. 73-82, févr. 2006, doi: 10.1016/j.toxlet.2005.08.005.
- [9] M. Herrala, E. Mustafa, J. Naarala, et J. Juutilainen, « Assessment of genotoxicity and genomic instability in rat primary astrocytes exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and chemicals », *International Journal of Radiation Biology*, vol. 94, n° 10, p. 883-889, oct. 2018, doi: 10.1080/09553002.2018.1450534.
- [10] F. Brescia, M. Sarti, R. Massa, M. L. Calabrese, A. Sannino, et M. R. Scarfi, « Reactive oxygen species formation is not enhanced by exposure to UMTS 1950 MHz radiation and co-exposure to ferrous ions in Jurkat cells », *Bioelectromagnetics*, vol. 30, n° 7, p. 525-535, oct. 2009, doi: 10.1002/bem.20502.
- [11] K. A. Kang *et al.*, « Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells », *Journal of Radiation Research*, vol. 55, n° 2, p. 265-276, mars 2014, doi: 10.1093/jrr/rrt116.
- [12] A. Joushomme *et al.*, « Label-Free Study of the Global Cell Behavior during Exposure to Environmental Radiofrequency Fields in the Presence or Absence of Pro-Apoptotic or Pro-Autophagic Treatments », *IJMS*, vol. 23, n° 2, p. 658, janv. 2022, doi: 10.3390/ijms23020658.
- [13] A. Bosquillon De Jenlis, F. Del Vecchio, S. Delanaud, V. Bach, et A. Pelletier, « Effects of co-exposure to 900 MHz radiofrequency electromagnetic fields and high-level

noise on sleep, weight, and food intake parameters in juvenile rats », *Environmental Pollution*, vol. 256, p. 113461, janv. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2019.113461.

[14] G. Del Vecchio *et al.*, « Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on in vitro models of neurodegenerative disease », *Bioelectromagnetics*, vol. 30, n° 7, p. 564-572, oct. 2009, doi: 10.1002/bem.20507.

[15] S. Romeo, A. Sannino, O. Zeni, L. Angrisani, R. Massa, et M. R. Scarfi, « Effects of Radiofrequency Exposure and Co-Exposure on Human Lymphocytes: The Influence of Signal Modulation and Bandwidth », *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.*, vol. 4, n° 1, p. 17-23, mars 2020, doi: 10.1109/JERM.2019.2918023.

[16] Z. Szilágyi *et al.*, « Evaluation of Inflammation by Cytokine Production Following Combined Exposure to Ultraviolet and Radiofrequency Radiation of Mobile Phones on 3D Reconstructed Human Skin In Vitro », *IJERPH*, vol. 17, n° 12, p. 4401, juin 2020, doi: 10.3390/ijerph17124401.

[17] Y. Ji, Q. He, Y. Sun, J. Tong, et Y. Cao, « Adaptive response in mouse bone-marrow stromal cells exposed to 900-MHz radiofrequency fields: Gamma-radiation-induced DNA strand breaks and repair », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 79, n° 9-10, p. 419-426, mai 2016, doi: 10.1080/15287394.2016.1176618.

[18] E. G. Novoselova, O. V. Glushkova, M. O. Khrenov, T. V. Novoselova, S. M. Lunin, et E. E. Fesenko, « Extremely low-level microwaves attenuate immune imbalance induced by inhalation exposure to low-level toluene in mice », *International Journal of Radiation Biology*, vol. 93, n° 5, p. 535-543, mai 2017, doi: 10.1080/09553002.2017.1270473.

[19] A. B. Gapeyev et N. A. Lukyanova, « Pulse-modulated extremely high-frequency electromagnetic radiation protects cellular DNA from the damaging effects of physical and chemical factors in vitro », *BIOPHYSICS*, vol. 60, n° 5, p. 732-738, sept. 2015, doi: 10.1134/S0006350915050061.

[20] Commission Recommendation of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) 2022/C 229/01 (OJ C, C/229, 14.06.2022, p. 1, CELEX: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32022H0614\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32022H0614(01)))

[21] M. A. El-Sayed, « Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals », *Acc. Chem. Res.*, vol. 37, n° 5, p. 326-333, mai 2004, doi: 10.1021/ar020204f.

[22] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, et M. R. Wiesner, « Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective », *Nat Nanotechnol*, vol. 4, n° 10, p. 634-641, oct. 2009, doi: 10.1038/nnano.2009.242.

[23] S. Zhang, Z. Wen, K. Rui, C. Shen, Y. Lu, et J. Yang, « Graphene nanosheets loaded with Pt nanoparticles with enhanced electrochemical performance for sodium–oxygen batteries », *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 3, n° 6, p. 2568-2571, 2015, doi: 10.1039/C4TA05427J.

- [24] S. Basu et P. Bhattacharyya, « Recent developments on graphene and graphene oxide based solid state gas sensors », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 173, p. 1-21, oct. 2012, doi: 10.1016/j.snb.2012.07.092.
- [25] W. Wu, M. Du, H. Shi, Q. Zheng, et Z. Bai, « Application of graphene aerogels in oil spill recovery: A review », *Science of The Total Environment*, vol. 856, p. 159107, janv. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159107.
- [26] C. M. Cobley, S. E. Skrabalak, D. J. Campbell, et Y. Xia, « Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles for Plasmonic and Sensing Applications », *Plasmonics*, vol. 4, n° 2, p. 171-179, juin 2009, doi: 10.1007/s11468-009-9088-0.
- [27] I. O. Sosa, C. Noguez, et R. G. Barrera, « Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes », *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, n° 26, p. 6269-6275, juill. 2003, doi: 10.1021/jp0274076.
- [28] U. G. Akpan et B. H. Hameed, « Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO<sub>2</sub>-based photocatalysts: A review », *Journal of Hazardous Materials*, vol. 170, n° 2, p. 520-529, oct. 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.05.039.
- [29] A. Kumar, K. Sharma, et A. R. Dixit, « A review on the mechanical properties of polymer composites reinforced by carbon nanotubes and graphene », *Carbon Lett.*, vol. 31, n° 2, p. 149-165, avr. 2021, doi: 10.1007/s42823-020-00161-x.
- [30] P.-J. Debouttière *et al.*, « Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging », *Advanced Functional Materials*, vol. 16, n° 18, p. 2330-2339, 2006, doi: 10.1002/adfm.200600242.
- [31] E. C. Dreaden, L. A. Austin, M. A. Mackey, et M. A. El-Sayed, « Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery », *Therapeutic Delivery*, vol. 3, n° 4, p. 457-478, avr. 2012, doi: 10.4155/tde.12.21.
- [32] A. Seaton, L. Tran, R. Aitken, et K. Donaldson, « Nanoparticles, human health hazard and regulation », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 7, n° suppl\_1, p. S119-S129, sept. 2009, doi: 10.1098/rsif.2009.0252.focus.
- [33] A. Elsaesser et C. V. Howard, « Toxicology of nanoparticles », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, n° 2, p. 129-137, févr. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
- [34] Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, Rasmussen, K., Mast, J., De Temmerman, P. et al., Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105 – Characterisation and physico-chemical properties, Publications Office of the European Union, 2014
- [35] Kirsten, R. et al., *Synthetic Amorphous Silicon Dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204): Characterisation and Physico-Chemical Properties*, Publications Office of the European Union. Belgium
- [36] Charanjeet, S. et al., *Cerium Dioxide, NM-211, NM-212, NM-213. Characterisation and test item preparation*, Publications Office of the European Union. Belgium

- [37] C. Singh *et al.*, « NM-series of representative manufactured nanomaterials: Zinc oxide NM-110, NM-111, NM-112, NM-113 characterisation and test item preparation », *EUR 25066 EN-2011*, 2011,
- [38] M. Janus, *Application of Titanium Dioxide*. BoD – Books on Demand, 2017.
- [39] F. Michiels *et al.*, « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel - Évaluation des effets sur la santé pour le dioxyde de titane sous forme nanométrique (nTiO<sub>2</sub>, P25) CAS N° 13463-67-7 », report, Anses, 2020.
- [40] « Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive - - 2021 - EFSA Journal - Wiley Online Library ». DOI : 10.2903/j.efsa.2021.6585
- [41] P. Tucci *et al.*, « Metabolic effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes », *Cell Death Dis*, vol. 4, n° 3, Art. n° 3, mars 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.76.
- [42] A. Patel, P. Prajapati, et R. Boghra, « OVERVIEW ON APPLICATION OF NANOPARTICLES IN COSMETICS », vol. 1, n° 2, 2011.
- [43] A. Azimzada *et al.*, « Single- and Multi-Element Quantification and Characterization of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Released From Outdoor Stains and Paints », *Frontiers in Environmental Science*, vol. 8, 2020, <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00091>
- [44] M. Paramsothy, « Nanotechnology in Clothing and Fabrics », *Nanomaterials*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, janv. 2022, doi: 10.3390/nano12010067.
- [45] P.-J. Lu, S.-C. Huang, Y.-P. Chen, L.-C. Chiueh, et D. Y.-C. Shih, « Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics », *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 23, n° 3, p. 587-594, sept. 2015, doi: 10.1016/j.jfda.2015.02.009.
- [46] H. Mirzaei et M. Darroudi, « Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications », *Ceramics International*, vol. 43, n° 1, Part B, p. 907-914, janv. 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2016.10.051.
- [47] V. Parthasarathi et G. Thilagavathi, « SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ZINC OXIDE NANOPARTICLE AND ITS APPLICATION ON FABRICS FOR MICROBE RESISTANT DEFENCE CLOTHING », vol. 3, n° 4.
- [48] A. Becheri, M. Dürr, P. Lo Nostro, et P. Baglioni, « Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers », *J Nanopart Res*, vol. 10, n° 4, p. 679-689, avr. 2008, doi: 10.1007/s11051-007-9318-3.
- [49] O. M. El-Feky, E. A. Hassan, S. M. Fadel, et M. L. Hassan, « Use of ZnO nanoparticles for protecting oil paintings on paper support against dirt, fungal attack, and UV aging », *Journal of Cultural Heritage*, vol. 15, n° 2, p. 165-172, mars 2014, doi: 10.1016/j.culher.2013.01.012.
- [50] J. G. Clar *et al.*, « Release and transformation of ZnO nanoparticles used in outdoor surface coatings for UV protection », *Science of The Total Environment*, vol. 670, p. 78-86, juin 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.189.

- [51] W. Zhang, M. A. Sani, Z. Zhang, D. J. McClements, et S. M. Jafari, « High performance biopolymeric packaging films containing zinc oxide nanoparticles for fresh food preservation: A review », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 230, p. 123188, mars 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123188.
- [52] D. D. La *et al.*, « Effects of antibacterial ZnO nanoparticles on the performance of a chitosan/gum arabic edible coating for post-harvest banana preservation », *Progress in Organic Coatings*, vol. 151, p. 106057, févr. 2021, doi: 10.1016/j.porgcoat.2020.106057.
- [53] J. Athinarayanan, V. S. Periasamy, M. A. Alsaif, A. A. Al-Warthan, et A. A. Alshatwi, « Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells », *Cell Biol Toxicol*, vol. 30, n° 2, p. 89-100, avr. 2014, doi: 10.1007/s10565-014-9271-8.
- [54] M.-R. Go, S.-H. Bae, H.-J. Kim, J. Yu, et S.-J. Choi, « Interactions between Food Additive Silica Nanoparticles and Food Matrices », *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017
- [55] A. Spoiala, M. G. Albu, A. Ficai, E. Andronescu, et G. Voicu, « THE SiO<sub>2</sub>/ZnO COMPOSITE MATERIALS FOR COSMETIC CREAMS ».
- [56] M. Correia, T. Uusimäki, A. Philippe, et K. Loeschner, « Challenges in Determining the Size Distribution of Nanoparticles in Consumer Products by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: The Example of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, and SiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Toothpaste », *Separations*, vol. 5, n° 4, Art. n° 4, déc. 2018, doi: 10.3390/separations5040056.
- [57] M. C. Gonçalves, « Sol-Gel Silica Nanoparticles in Medicine: A Natural Choice. Design, Synthesis and Products », *Molecules*, vol. 23, n° 8, Art. n° 8, août 2018, doi: 10.3390/molecules23082021.
- [58] A. Najjigivi, A. Khaloo, A. Irajizad, et S. Abdul Rashid, « Investigating the effects of using different types of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on the mechanical properties of binary blended concrete », *Composites Part B: Engineering*, vol. 54, p. 52-58, nov. 2013, doi: 10.1016/j.compositesb.2013.04.035.
- [59] A. Nazari et S. Riahi, « Microstructural, thermal, physical and mechanical behavior of the self compacting concrete containing SiO<sub>2</sub> nanoparticles », *Materials Science and Engineering: A*, vol. 527, n° 29, p. 7663-7672, nov. 2010, doi: 10.1016/j.msea.2010.08.095.
- [60] A. C. Sajeevan et V. Sajith, « Diesel Engine Emission Reduction Using Catalytic Nanoparticles: An Experimental Investigation », *Journal of Engineering*, vol. 2013, p. e589382, févr. 2013, doi: 10.1155/2013/589382.
- [61] E. Aneggi, C. de Leitenburg, M. Boaro, P. Fornasiero, et A. Trovarelli, « 3 - Catalytic applications of cerium dioxide », in *Cerium Oxide (CeO<sub>2</sub>): Synthesis, Properties and Applications*, S. Scirè et L. Palmisano, Éd., in Metal Oxides. , Elsevier, 2020, p. 45-108. doi: 10.1016/B978-0-12-815661-2.00003-7.
- [62] J. T. Dahle et Y. Arai, « Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 12, n° 2, Art. n° 2, févr. 2015, doi: 10.3390/ijerph120201253.

- [63] D. Nath, S. R. K. Pal, et P. Sarkar, « Nanoclay-based active food packaging systems: A review », *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 31, p. 100803, mars 2022, doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100803.
- [64] H. A. Patel, R. S. Somani, H. C. Bajaj, et R. V. Jasra, « Nanoclays for polymer nanocomposites, paints, inks, greases and cosmetics formulations, drug delivery vehicle and waste water treatment », *Bull Mater Sci*, vol. 29, n° 2, p. 133-145, avr. 2006, doi: 10.1007/BF02704606.
- [65] C. Portet, P. L. Taberna, P. Simon, et E. Flahaut, « Influence of carbon nanotubes addition on carbon-carbon supercapacitor performances in organic electrolyte », *Journal of Power Sources*, vol. 139, n° 1, p. 371-378, janv. 2005, doi: 10.1016/j.jpowsour.2004.07.015.
- [66] C. Portet, P. L. Taberna, P. Simon, E. Flahaut, et C. Laberty-Robert, « High power density electrodes for Carbon supercapacitor applications », *Electrochimica Acta*, vol. 50, n° 20, p. 4174-4181, juill. 2005, doi: 10.1016/j.electacta.2005.01.038.
- [67] V. Gabaudan, J. Touja, D. Cot, E. Flahaut, L. Stievano, et L. Monconduit, « Double-walled carbon nanotubes, a performing additive to enhance capacity retention of antimony anode in potassium-ion batteries », *Electrochemistry Communications*, vol. 105, p. 106493, août 2019, doi: 10.1016/j.elecom.2019.106493.
- [68] E. Flahaut, A. Peigney, C. Laurent, C. Marlière, F. Chastel, et A. Rousset, « Carbon nanotube-metal-oxide nanocomposites: microstructure, electrical conductivity and mechanical properties », *Acta Materialia*, vol. 48, n° 14, p. 3803-3812, sept. 2000, doi: 10.1016/S1359-6454(00)00147-6.
- [69] K. Bouzidi, D. Chaussy, A. Gandini, E. Flahaut, R. Bongiovanni, et D. Beneventi, « Bio-based formulation of an electrically conductive ink with high potential for additive manufacturing by direct ink writing », *Composites Science and Technology*, vol. 230, p. 109765, nov. 2022, doi: 10.1016/j.compscitech.2022.109765.
- [70] A. Simaite, A. Delagarde, B. Tondu, P. Souères, E. Flahaut, et C. Bergaud, « Spray-coated carbon nanotube carpets for creeping reduction of conducting polymer based artificial muscles », *Nanotechnology*, vol. 28, n° 2, p. 025502, déc. 2016, doi: 10.1088/0957-4484/28/2/025502.
- [71] G. Kougkoulos, M. Golzio, L. Laudebat, Z. Valdez-Nava, et E. Flahaut, « Hydrogels with electrically conductive nanomaterials for biomedical applications », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 11, n° 10, p. 2036-2062, 2023, doi: 10.1039/D2TB02019J.
- [72] A. Srivastava, O. N. Srivastava, S. Talapatra, R. Vajtai, et P. M. Ajayan, « Carbon nanotube filters », *Nature Mater*, vol. 3, n° 9, Art. n° 9, sept. 2004, doi: 10.1038/nmat1192.
- [73] P. Li, C. Wang, Y. Zhang, et F. Wei, « Air Filtration in the Free Molecular Flow Regime: A Review of High-Efficiency Particulate Air Filters Based on Carbon Nanotubes », *Small*, vol. 10, n° 22, p. 4543-4561, 2014, doi: 10.1002/sml.201401553.
- [74] C. B. Collins, R. S. McCoy, B. J. Ackerson, G. J. Collins, et C. J. Ackerson, « Radiofrequency heating pathways for gold nanoparticles », *Nanoscale*, vol. 6, n° 15, p. 8459-8472, 2014, doi: 10.1039/C4NR00464G.

- [75] L. A. Austin, M. A. Mackey, E. C. Dreaden, et M. A. El-Sayed, « The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery », *Arch Toxicol*, vol. 88, n° 7, p. 1391-1417, juill. 2014, doi: 10.1007/s00204-014-1245-3.
- [76] R. Popovtzer *et al.*, « Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Cancer », *Nano Lett.*, vol. 8, n° 12, p. 4593-4596, déc. 2008, doi: 10.1021/nl8029114.
- [77] G. Franci *et al.*, « Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents », *Molecules*, vol. 20, n° 5, Art. n° 5, mai 2015, doi: 10.3390/molecules20058856.
- [78] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. OU-Yang, et Y.-B. Chen, « Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli », *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 85, n° 4, p. 1115-1122, janv. 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2159-5.
- [79] S. Tang et J. Zheng, « Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects », *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, n° 13, p. 1701503, 2018, doi: 10.1002/adhm.201701503.
- [80] A. Bettencourt *et al.*, « Analysis of the Characteristics and Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanomaterials Following Simulated In Vitro Digestion », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 8, p. 1516, août 2020, doi: 10.3390/nano10081516.
- [81] S. Di Bucchianico, F. Cappellini, F. Le Bihanic, Y. Zhang, K. Dreij, et H. L. Karlsson, « Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry », *MUTAGE*, vol. 32, n° 1, p. 127-137, janv. 2017, doi: 10.1093/mutage/gew030.
- [82] F. Brandão *et al.*, « Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Four Different Human Cell Lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y) », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 3, p. 412, févr. 2020, doi: 10.3390/nano10030412.
- [83] P. Jalili *et al.*, « Investigation of the in vitro genotoxicity of two rutile TiO<sub>2</sub> nanomaterials in human intestinal and hepatic cells and evaluation of their interference with toxicity assays », *NanoImpact*, vol. 11, p. 69-81, juill. 2018, doi: 10.1016/j.impact.2018.02.004.
- [84] N. Vallabani, R. K. Shukla, D. Konka, A. Kumar, S. Singh, et A. Dhawan, « TiO<sub>2</sub> nanoparticles induced micronucleus formation in human liver (HepG2) cells: comparison of conventional and flow cytometry based methods », *Mol Cytogenet*, vol. 7, n° Suppl 1, p. P79, 2014, doi: 10.1186/1755-8166-7-S1-P79.
- [85] M. L. Fernández-Cruz *et al.*, « Comparative cytotoxicity induced by bulk and nanoparticulated ZnO in the fish and human hepatoma cell lines PLHC-1 and Hep G2 », *Nanotoxicology*, vol. 7, n° 5, p. 935-952, août 2013, doi: 10.3109/17435390.2012.676098.
- [86] M. Ahamed, Javed Akhtar, Kumar, M. Khan, Ahmad, et Alrokayan, « Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species », *IJN*, p. 845, févr. 2012, doi: 10.2147/IJN.S29129.

- [87] D. Bartczak, M.-O. Baradez, S. Merson, H. Goenaga-Infante, et D. Marshall, « Surface ligand dependent toxicity of zinc oxide nanoparticles in HepG2 cell model », *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 429, p. 012015, avr. 2013, doi: 10.1088/1742-6596/429/1/012015.
- [88] V. Sharma, D. Anderson, et A. Dhawan, « Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2) », *Apoptosis*, vol. 17, n° 8, p. 852-870, août 2012, doi: 10.1007/s10495-012-0705-6.
- [89] V. Sharma, D. Anderson, et A. Dhawan, « Zinc Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Liver Cells (HepG2) », *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 7, n° 1, p. 98-99, janv. 2011, doi: 10.1166/jbn.2011.1220.
- [90] J. Ahmad *et al.*, « Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2 », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 259, n° 2, p. 160-168, mars 2012, doi: 10.1016/j.taap.2011.12.020.
- [91] L. Hu, Z. Mao, Y. Zhang, et C. Gao, « Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells », vol. 1, n° 1, 2011.
- [92] K. T. Kitchin, S. Stirdivant, B. L. Robinette, B. T. Castellon, et X. Liang, « Metabolomic effects of CeO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and CuO metal oxide nanomaterials on HepG2 cells », *Part Fibre Toxicol.*, vol. 14, n° 1, p. 50, déc. 2017, doi: 10.1186/s12989-017-0230-4.
- [93] J. Keller, « Biokinetics and inhalation toxicity of cerium dioxide and barium sulfate nanoparticles after 1, 4, 13 and 52 weeks of exposure », doctoralThesis, 2015.
- [94] S. Dekkers *et al.*, « Differences in the toxicity of cerium dioxide nanomaterials after inhalation can be explained by lung deposition, animal species and nanoforms », *Inhalation Toxicology*, vol. 30, n° 7-8, p. 273-286, juill. 2018, doi: 10.1080/08958378.2018.1516834.
- [95] P. Demokritou *et al.*, « An in vivo and in vitro toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO<sub>2</sub> inhalation exposures », *Nanotoxicology*, vol. 7, n° 8, p. 1338-1350, déc. 2013, doi: 10.3109/17435390.2012.739665.
- [96] L. De Marzi *et al.*, « Cytotoxicity and Genotoxicity of Ceria Nanoparticles on Different Cell Lines in Vitro », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, n° 2, Art. n° 2, févr. 2013, doi: 10.3390/ijms14023065.
- [97] P. Rosenkranz *et al.*, « Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology », *Toxicology in Vitro*, vol. 26, n° 6, p. 888-896, sept. 2012, doi: 10.1016/j.tiv.2012.04.019.
- [98] J. Cabellos, C. Delpivo, S. Vázquez-Campos, et G. Janer, « In vitro assessment of CeO<sub>2</sub> nanoparticles effects on intestinal microvilli morphology », *Toxicology in Vitro*, vol. 59, p. 70-77, sept. 2019, doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.002.
- [99] H. L. Karlsson et A. Hartwig, « Lung Cell Toxicity of Metal-Containing Nanoparticles », *Nanomaterials*, vol. 12, n° 17, Art. n° 17, janv. 2022, doi: 10.3390/nano12173044.
- [100] M. Wiemann, A. Vennemann, et W. Wohlleben, « Lung Toxicity Analysis of Nano-Sized Kaolin and Bentonite: Missing Indications for a Common Grouping », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, févr. 2020, doi: 10.3390/nano10020204.

- [101] Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Dec;65(15):2087-97. doi: 10.1016/j.addr.2013.05.012. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23751779.
- [102] J. Dong et Q. Ma, « Macrophage polarization and activation at the interface of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary inflammation and fibrosis », *Nanotoxicology*, vol. 12, n° 2, p. 153-168, févr. 2018, doi: 10.1080/17435390.2018.1425501.
- [103] S. T. Stern, P. P. Adisheshaiah, et R. M. Crist, « Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity », *Part Fibre Toxicol*, vol. 9, n° 1, p. 20, juin 2012, doi: 10.1186/1743-8977-9-20.
- [104] Potential reproductive toxicity of multi-walled carbon nanotubes and their chronic exposure effects on the growth and development of *Xenopus tropicalis* Zhao J., Luo W., Xu Y., Ling J., Deng L. (2021) *Science of the Total Environment*, 766 , art. no. 142652
- [105] S. Mathew, D. K. Tiwari, et D. Tripathi, « Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review », *Carbon Lett.*, vol. 31, n° 2, p. 167-176, avr. 2021, doi: 10.1007/s42823-020-00195-1.
- [106] Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochem Biophys Rep.* 2021 Apr 10;26:100991. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100991. PMID: 33912692; PMCID: PMC8063742.
- [107] Tortella GR, Rubilar O, Durán N, Diez MC, Martínez M, Parada J, Seabra AB. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *J Hazard Mater.* 2020 May 15;390:121974. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121974. Epub 2019 Dec 24. PMID: 32062374.
- [108] T. A. P. Nederstigt, W. J. G. M. Peijnenburg, R. Blom, et M. G. Vijver, « Correlation analysis of single- and multigenerational endpoints in *Daphnia magna* toxicity tests: A case-study using TiO<sub>2</sub> nanoparticles », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 241, p. 113792, août 2022, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113792.
- [109] M. G. Vijver, C. A. M. van Gestel, R. P. Lanno, N. M. van Straalen, et W. J. G. M. Peijnenburg, « Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, n° 18, p. 4705-4712, sept. 2004, doi: 10.1021/es040354g.
- [110] Y. Li et E. Cummins, « A semi-quantitative risk ranking of potential human exposure to engineered nanoparticles (ENPs) in Europe », *Sci Total Environ*, vol. 778, p. 146232, juill. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146232.
- [111] « Scientific basis for the definition of the term “nanomaterial” ».
- [112] J. Yon, « Caractérisation physique et chimique des nanoparticules », 2014.
- [113] « DOSSIER ON NANOCCLAYS Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 47

- [114] « Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes - ScienceDirect ». Consulté le: 4 novembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862230000155X?via%3Dihub>
- [115] D. Dron, Y. Magne, et I. Pavel, « Rapport de mission exploratoire Thème de l'année 2018-2019 ».
- [116] A. Paffi *et al.*, « Microwave Exposure Systems for In Vivo Biological Experiments: A Systematic Review », *IEEE Trans. Microwave Theory Techn.*, vol. 61, n° 5, p. 1980-1993, mai 2013, doi: 10.1109/TMTT.2013.2246183.
- [117] A. Paffi *et al.*, « A Wire Patch Cell Exposure System for in vitro Experiments at Wi-Fi Frequencies », *IEEE Trans. Microwave Theory Techn.*, vol. 58, n° 12, p. 4086-4093, déc. 2010, doi: 10.1109/TMTT.2010.2086072.
- [118] M. Popović, S. C. Hagness, et A. Taflove, « Finite-difference time-domain analysis of a complete transverse electromagnetic cell loaded with liquid biological media in culture dishes », *IEEE Trans Biomed Eng.*, vol. 45, n° 8, p. 1067-1076, août 1998, doi: 10.1109/10.704876.
- [119] L. Laval, P. Leveque, et B. Jecko, « A new in vitro exposure device for the mobile frequency of 900 MHz », *Bioelectromagnetics*, vol. 21, n° 4, p. 255-263, mai 2000, doi: 10.1002/(sici)1521-186x(200005)21:4<255::aid-bem2>3.0.co;2-4.
- [120] L. Ardoino, V. Lopresto, S. Mancini, R. Pinto, et G. A. Lovisolo, « 1800 MHz in vitro exposure device for experimental studies on the effects of mobile communication systems », *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 112, n° 3, p. 419-428, déc. 2004, doi: 10.1093/rpd/nch414.
- [121] Y. Takashima, H. Hirose, S. Koyama, Y. Suzuki, M. Taki, et J. Miyakoshi, « Effects of continuous and intermittent exposure to RF fields with a wide range of SARs on cell growth, survival, and cell cycle distribution », *Bioelectromagnetics*, vol. 27, n° 5, p. 392-400, juill. 2006, doi: 10.1002/bem.20220.
- [122] A. Collin, M. Cueille, A. Perrin, C. Pivain, et P. Leveque, *Electromagnetic Dosimetry and Thermal Analysis of a New Exposure Setup for In Vitro Studies on a Large Frequency Band*. 2007, p. 2224. doi: 10.1109/MWSYM.2007.380402.
- [123] F. Schönborn, K. Poković, A. M. Wobus, et N. Kuster, « Design, optimization, realization, and analysis of an in vitro system for the exposure of embryonic stem cells at 1.71 GHz », *Bioelectromagnetics*, vol. 21, n° 5, p. 372-384, 2000, doi: 10.1002/1521-186X(200007)21:5<372::AID-BEM6>3.0.CO;2-S.
- [124] J. Schuderer, D. Spat, T. Samaras, W. Oesch, et N. Kuster, « In vitro exposure systems for RF exposures at 900 MHz », *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 52, n° 8, p. 2067-2075, août 2004, doi: 10.1109/TMTT.2004.832010.
- [125] M. Zhadobov *et al.*, « Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins », *Bioelectromagnetics*, vol. 28, n° 3, p. 188-196, 2007, doi: 10.1002/bem.20285.

- [126] M. Zhadobov *et al.*, « Exposure System and Dosimetry for In Vitro Studies of Biocompatibility of Pulse-Modulated RF Signals of Ultrahigh Field MRI », *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 60, n° 11, p. 3167-3175, nov. 2013, doi: 10.1109/TBME.2013.2270371.
- [127] A. Moscatiello, B. Cerdan, C. Gironde, C. Furger, D. Dubuc, et K. Grenier, « Dosimetry Performances of a MultiWell-Plate-Based Near-Field RF Applicator for the Investigation of EM Impact on Biological Cells », in *2022 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium - IMS 2022*, juin 2022, p. 794-797. doi: 10.1109/IMS37962.2022.9865593.
- [128] A. Peinnequin *et al.*, « Non-thermal effects of continuous 2.45 GHz microwaves on Fas-induced apoptosis in human Jurkat T-cell line », *Bioelectrochemistry*, vol. 51, n° 2, p. 157-161, juin 2000, doi: 10.1016/s0302-4598(00)00064-7.
- [129] N. Yaekashiwa, S. Otsuki, S. Hayashi, et K. Kawase, « Investigation of the non-thermal effects of exposing cells to 70-300 GHz irradiation using a widely tunable source », *J Radiat Res*, vol. 59, n° 2, p. 116-121, mars 2018, doi: 10.1093/jrr/rrx075.
- [130] M. Capri *et al.*, « In Vitro Exposure of Human Lymphocytes to 900 MHz CW and GSM Modulated Radiofrequency: Studies of Proliferation, Apoptosis and Mitochondrial Membrane Potential », *Radiation Research*, vol. 162, n° 2, p. 211-218, 2004.
- [131] Y. Okano, « The comparison measurement for SAR by thermal evaluation and the electric field probe », in *2007 18th International Zurich Symposium on Electromagnetic Compatibility*, sept. 2007, p. 147-150. doi: 10.1109/EMCZUR.2007.4388217.
- [132] Y. Okano et H. Shimoji, « Comparison Measurement for Specific Absorption Rate With Physically Different Procedure », *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 61, n° 2, p. 439-446, févr. 2012, doi: 10.1109/TIM.2010.2045939.
- [133] E. P. Khizhnyak et M. C. Ziskin, « Infrared Thermography in Experimental Dosimetry of Radio Frequency and Millimeter Wavelength Radiation Exposure », in *Radio Frequency Radiation Dosimetry and Its Relationship to the Biological Effects of Electromagnetic Fields*, B. J. Klauenberg et D. Miklavčič, Éd., in NATO Science Series. , Dordrecht: Springer Netherlands, 2000, p. 199-206. doi: 10.1007/978-94-011-4191-8\_22.
- [134] M. Baba, Y. Suzuki, A. Ishii, M. Taki, K. Fukunaga, et S. Watanabe, « Development of a transparency high molecular gel phantom for three-dimensional visualization of radio frequency electromagnetic power absorption with capsule thermo-chromic liquid crystal », in *2004 Asia-Pacific Radio Science Conference, 2004. Proceedings.*, août 2004, p. 418-419. doi: 10.1109/APRASC.2004.1422503.
- [135] « Mesure dosimétrique par capteur électro-optique fibré » Jarrige, P., Kohler, S., Ticaud, N., Gaborit, G., Duvillaret, L., Lévêque, P., & Arnaud-Cormos, D. JS'12, Cnam Paris, 3-4 Avril 2012
- [136] M. Zhadobov, S. I. Alekseev, R. Sauleau, Y. Le Page, Y. Le Dréan, et E. E. Fesenko, « Microscale temperature and SAR measurements in cell monolayer models exposed to millimeter waves », *Bioelectromagnetics*, vol. 38, n° 1, p. 11-21, janv. 2017, doi: 10.1002/bem.21999.

- [137] P. Cherukuri, E. S. Glazer, et S. A. Curley, « Targeted hyperthermia using metal nanoparticles », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, n° 3, p. 339-345, mars 2010, doi: 10.1016/j.addr.2009.11.006.
- [138] C. B. Collins, R. S. McCoy, B. J. Ackerson, G. J. Collins, et C. J. Ackerson, « Radiofrequency heating pathways for gold nanoparticles », *Nanoscale*, vol. 6, n° 15, p. 8459-8472, 2014, doi: 10.1039/C4NR00464G.
- [139] A. Rezaeian, S. M. Amini, M. R. H. Najafabadi, Z. J. Farsangi, et H. Samadian, « Plasmonic hyperthermia or radiofrequency electric field hyperthermia of cancerous cells through green-synthesized curcumin-coated gold nanoparticles », *Lasers Med Sci*, vol. 37, n° 2, p. 1333-1341, mars 2022, doi: 10.1007/s10103-021-03399-7.
- [140] S. Derick *et al.*, « LUCS (Light-Up Cell System), a universal high throughput assay for homeostasis evaluation in live cells », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-18211-2.
- [141] M. Dragoman *et al.*, « Experimental determination of microwave attenuation and electrical permittivity of double-walled carbon nanotubes », *Applied Physics Letters*, vol. 88, n° 15, p. 153108, avr. 2006, doi: 10.1063/1.2193464.
- [142] K. Grenier *et al.*, « Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering », *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 57, n° 12, p. 3246-3253, déc. 2009, doi: 10.1109/TMTT.2009.2034226.
- [143] F. Kremer et A. Schönhals, *Broadband Dielectric Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2002.
- [144] K. Grenier *et al.*, « Recent Advances in Microwave-Based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations », *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 61, n° 5, p. 2023-2030, mai 2013, doi: 10.1109/TMTT.2013.2255885.
- [145] F. Artis, D. Dubuc, C. Blatche, et K. Grenier, « Biological cells proliferation in microwave microsystems », in *2012 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium Digest*, juin 2012, p. 1-3. doi: 10.1109/MWSYM.2012.6259556.
- [146] F. Bourdiol, D. Dubuc, K. Grenier, F. Mouchet, L. Gauthier, et E. Flahaut, « Quantitative detection of carbon nanotubes in biological samples by an original method based on microwave permittivity measurements », *Carbon*, vol. 81, p. 535-545, janv. 2015, doi: 10.1016/j.carbon.2014.09.086.
- [147] W. J. Ellison, « Permittivity of Pure Water, at Standard Atmospheric Pressure, over the Frequency Range –25THz and the Temperature Range –100°C », *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 36, n° 1, p. 1-18, févr. 2007, doi: 10.1063/1.2360986.